

インスリンによる脂肪細胞の数とサイズの制御機構の解明

Clarification of Regulatory Mechanisms for Determining Number and Size of Adipocytes
by Insulin

平成 25 年度 論文博士申請者 伊藤 実 (Ito, Minoru)

指導教員 本島清人

肥満は糖尿病、脂質異常症、高血圧、動脈硬化症などの生活習慣病の基盤となるリスクファクターである。脂肪容量は脂肪細胞のサイズと数によって規定されている。過食や運動不足による肥満は主に脂肪細胞のサイズアップ（以下、肥大化）である。近年、脂肪細胞の肥大化が慢性炎症を惹起することから、脂肪細胞の肥大化を抑制することで種々の肥満関連疾患の予防・治療に役立つ可能性が示唆されている。しかし、脂肪細胞の数の増加や肥大化に関わる分子やシグナル伝達経路は十分には解明されておらず、また肥大化を特異的に抑制する創薬ターゲットも同定されてはいない。本研究では、ヒト白色脂肪細胞でのインスリンによる脂肪細胞数の増加と脂肪細胞の肥大化に cell death-inducing DNA fragmentation factor- α -like effector (CIDE)ファミリータンパクが深く関与し、その発現制御メカニズムが細胞数の増加と細胞の肥大化で異なることが見出された。

1. ヒト白色脂肪細胞でのインスリン作用におけるCIDEファミリーの役割

脂肪組織は単なるエネルギー貯蔵庫として働くばかりでなく、生理状況に応じて種々の内分泌因子（アディポサイトカイン）を産生・分泌し、糖・脂質代謝、動脈壁の恒常性維持に重要な役割を果たしている。その一方で、過栄養や遺伝子背景による肥満、脂肪蓄積は糖尿病、脂質異常症、高血圧、動脈硬化症を引き起こす要因の一つとして考えられている¹⁾。脂肪容量は脂肪細胞の数の増加と肥大

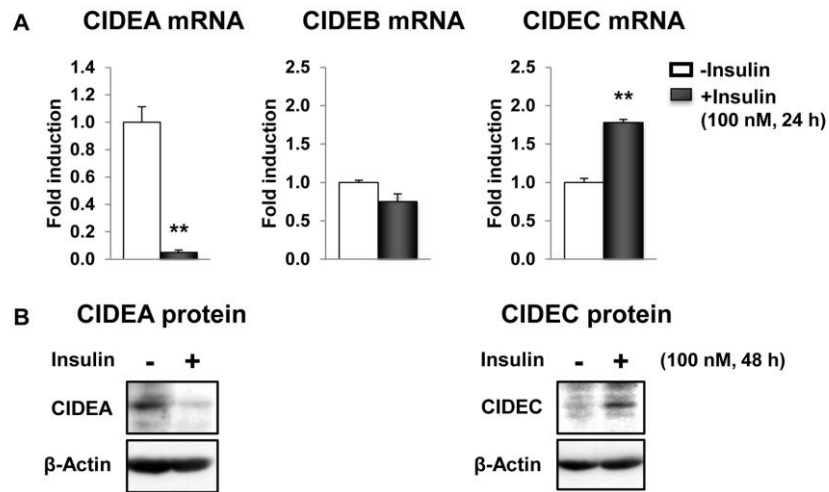


図1 ヒト白色脂肪細胞におけるインスリンによるCIDEファミリーの発現制御⁶⁾ **P<0.01

化により規定される。近年、脂肪細胞は肥大化することで悪性化し、アディポサイトカインの産生異常をきたして慢性炎症やインスリン抵抗性、糖・脂質代謝異常の惹起に関わることが明らかとなっている²⁾。脂肪容量を増大させる強力な生体内ホルモンとしてインスリンが知られる。インスリンは脂肪細胞において、数に影響するアポトーシスを抑制すること、サイズに影響する脂質合成を亢進させることが知られているが³⁻⁴⁾、作用メカニズムは未だ不明な点が多い。

一方、脂肪容量を制御する分子としてCIDEファミリータンパクがある。CIDEファミリータンパクとしてCIDEA、CIDEB、CIDECEが知られており、アポトーシス誘導、脂肪滴形成などに関わることが報告されている⁵⁾。しかし、脂肪細胞でのインスリン作用との関連については不明である。

そこで、CIDEファミリーがインスリン作用に寄与するかどうかを調べるため、はじめに、ヒト白色脂肪前駆細胞から分化させた脂肪細胞（以下ヒト白色脂肪細胞）でインスリンによるCIDEA、CIDEB及びCIDECEの発現変動が認められるか、リアルタイム定量PCR法で調べた。インスリンはCIDEA mRNAの発現を低下させ、その一方で、CIDECE mRNAの発現を亢進していた（図1A）。これらの現象は濃度依存的かつ時間依存的であり、100 nMのインスリン添加後24時間でピークに達していた⁶⁾。また、インスリンはCIDEB mRNAの発現には影響を及ぼさなかった。インスリンによるmRNAの発現変動が認められたCIDEA及びCIDECEについてはタ

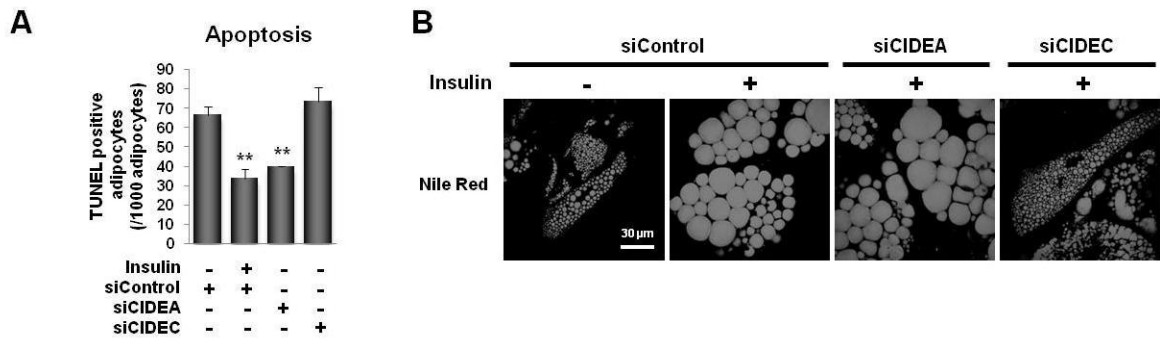


図2 インスリンのアポトーシス抑制作用および脂肪滴形成作用に対する CIDEA および CIDEA の選択的な関与⁶⁾ ** P < 0.01

ンパクの発現レベルをウエスタンブロット法により確認し、同様の結果が得られた(図1B)。以上の結果から、ヒト白色脂肪細胞ではインスリンによりCIDEAが発現低下し、CIDEAが発現亢進することが明らかとなった。

次に、インスリンによる発現変動が認められたCIDEA及びCIDEAについて、インスリンのアポトーシス抑制作用及び脂肪滴形成作用に関与するかどうか、siRNAを用いた遺伝子ノックダウン法で調べた。CIDEAのsiRNA (siCIDEA)を添加したヒト白色脂肪細胞ではインスリンと同程度に無血清状態によるアポトーシスを抑制していたが、CIDEA siRNA (siCIDEA)添加では無影響であった(図2A)。また、siCIDEAを添加したヒト白色脂肪細胞ではインスリンによる相加的なアポトーシス抑制作用が認められなかった⁶⁾。一方、インスリンによる脂肪滴形成作

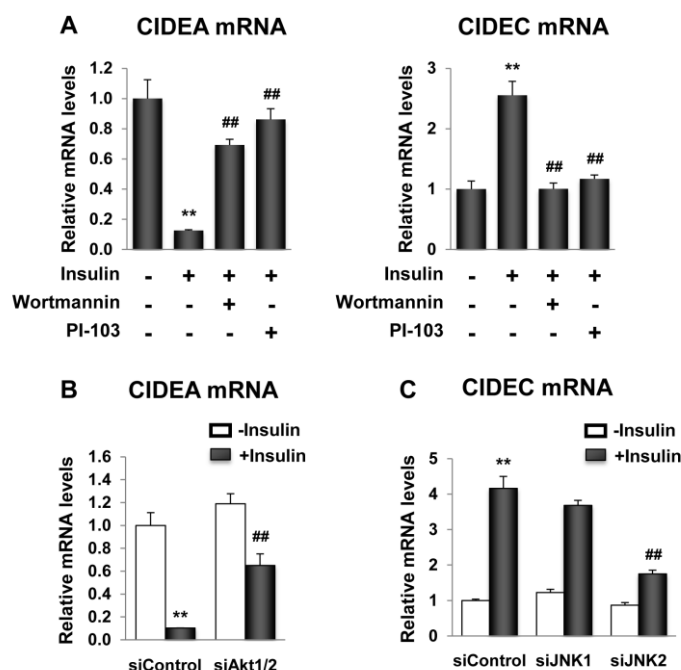


図3 インスリンによる CIDEA および CIDEA の発現制御に対する PI3K、Akt1/2 および JNK2 の関与⁷⁾ ** P < 0.01 (インスリン非処置コントロール群と比較), ## P < 0.01 (インスリン処置コントロール群と比較)

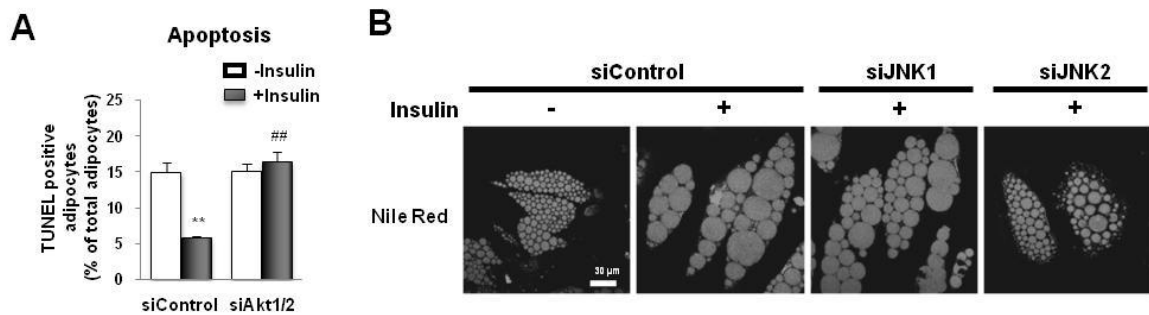


図4 インスリンのアポトーシス抑制作用および脂肪滴形成作用に対する Akt1/2 および JNK2 の選択的な関与⁷⁾
 ** P < 0.01 (インスリン非処置 siControl 群と比較), ## P < 0.01 (インスリン処置 siControl 群と比較)

用は siCIDEA により抑制され、siCIDEA は無影響であった (図2B)。以上の結果から、インスリンによるアポトーシス抑制作用には CIDEA の発現低下が寄与し、脂肪滴形成作用には CIDEA の発現亢進が重要であることが示唆された。

2. インスリンによる CIDEA 及び CIDEA の発現制御に関わる経路の探索

次に、インスリンの主要なシグナル伝達経路に関わるキナーゼの阻害剤又は siRNA を用いて、ヒト白色脂肪細胞でのインスリンによる CIDEA 及び CIDEA の発現制御に関わる経路を探索した⁷⁾。Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) の阻害剤である Wortmannin 及び PI-103 はインスリンによる CIDEA の発現低下及び CIDEA の発現亢進の双方を抑制した (図3A)。一方、PI3K の下流に位置する Akt1/2 の siRNA (siAkt1/2) はインスリンによる CIDEA の発現低下を抑制し (図3B)、c-Jun N-terminal kinase 2 (JNK2) の siRNA (siJNK2) はインスリンによる CIDEA の発現亢進を抑制した (図3C)。また、siAkt1/2 はインスリンによるアポトーシス抑制を解除し (図4A)、siJNK2 は脂肪滴形成を抑制した (図4B)。以上の結果から、インスリンのアポトーシス抑制に関わる CIDEA の発現制御は PI3K 及び Akt1/2 を介し、脂肪滴形成に関わる CIDEA の発現制御は PI3K 及び JNK2 を介することが明らかとなった。

3. インスリン/JNK2 による脂肪滴サイズの増大に関与する新規遺伝子の探索

さらに、脂肪滴サイズの増大メカニズムを明らかにするため、CIDEA 以外にも他の脂肪滴形成に関わる遺伝子がインスリン/JNK2 経路により制御されるかどうかをヒト全ゲノムマイクロアレイ解析及びパスウェイ解析により探索した⁸⁾。インスリン/JNK2 経路は脂質代謝に関わる遺伝子の発現を主に制御することが判明

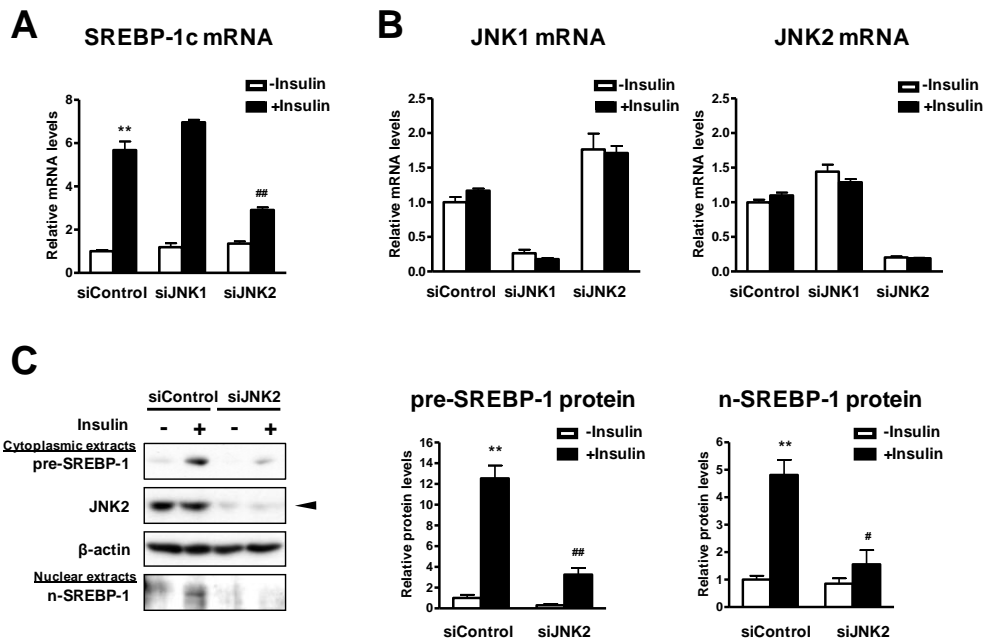


図5 インスリンによるSREBP-1cの発現制御に対するJNK2の関与
 ** P < 0.01 (インスリン非処置コントロール群と比較), # P < 0.05, ## P < 0.01 (インスリン処置コントロール群と比較)

した。さらに、パスウェイ解析により、脂肪合成の調節に関わる重要な転写因子であるsterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1)がこれら遺伝子の主要な制御因子であることが予測された。そこで、次に脂肪組織で発現量の多いアイソフォームであるSREBP-1cの発現がインスリン/JNK2経路により制御されるかどうかをリアルタイム定量PCR法で調べた。siJNK2はインスリンによるSREBP-1c mRNAの発現亢進を抑制し(図5A)、JNK2 mRNAの発現を特異的に減少させた(図5B)。また、siJNK2はインスリンによる前駆体SREBP-1蛋白質(pre-SREBP-1)及び活性型である核型SREBP-1蛋白質(n-SREBP-1)の発現亢進をいずれも抑制した(図5C)。以上の結果から、SREBP-1cはインスリン/JNK2経路により制御されることが明らかとなった。

本研究では、インスリンによるヒト白色脂肪細胞の数の増加(アポトーシスの抑制)と脂肪細胞の肥大化(脂肪滴形成、サイズの増大)にCIDEAとCIDEKが選択的に関与し、その発現制御はPI3K以降のシグナルで分岐し、それぞれAkt1/2、JNK2を介することが明らかとなった(図6)。また、本研究でヒト白色脂肪細胞においてインスリンによる肥大化(サイズの増大)に関わる特異的な経路としてJNK2/CIDEK並びにJNK2/SREBP-1cが見出された。肥満及びその後の関連疾患の

予防・治療においては、言うまでもなく食事・運動療法がベースとなり余剰エネルギーを作らないことが重要である。しかし一方で、数のシグナルとは分岐した肥大化特異的シグナルのみを選択的に阻害するという手法ができれば、慢性炎症を惹起する悪性脂肪細胞を良性脂肪細胞へと質的に変化させ、肥満関連疾患の発症抑制に役立てることができるかもしれない。

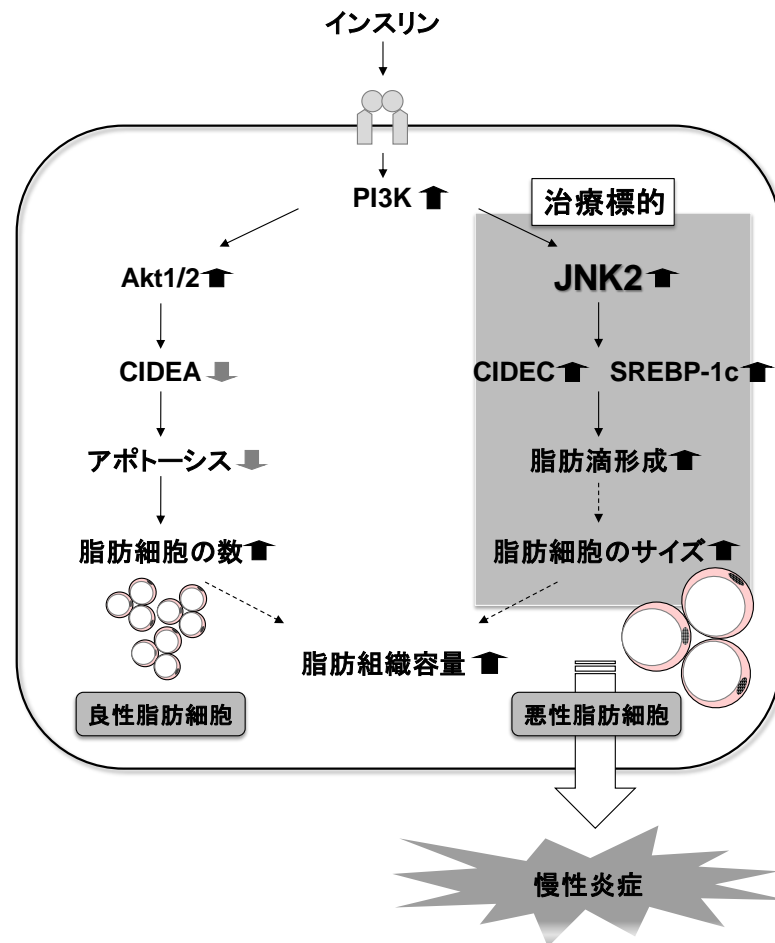


図6 インスリンによる脂肪細胞の数とサイズの制御機構の仮説

参考文献

- 1) Haslam DW., James WP., *Lancet.*, **366**, 1197-1209 (2005).
- 2) Guilherme A., Virbasius JV., Puri V., Czech MP., *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **9**, 367-377 (2008).
- 3) Ursø B., Niesler CU., O'Rahilly S., Siddle K., *Cell Signal.*, **13**, 279-85 (2001).
- 4) Kersten S., *EMBO Rep.*, **2**, 282-6 (2001).
- 5) Gong J., Sun Z., Li P., *Curr Opin Lipidol.*, **20**, 121-126 (2009).
- 6) Ito M., Nagasawa M., Hara T., Ide T., Murakami K., *J Lipid Res.*, **51**, 1676-1684 (2010).
- 7) Ito M., Nagasawa M., Omae N., Ide T., Akasaka Y., Murakami K., *J Lipid Res.*, **52**, 1450-1460 (2011).
- 8) Ito M., Nagasawa M., Omae N., Tsunoda M., Ishiyama J., Ide T., Akasaka Y., Murakami K., *J Lipid Res.*, **54**, 1531-1540 (2013).