

論文の内容の要旨

論文題目

Regulation of Resistin Expression by Transcription Factors and Insulin Signal-transducing Molecules

和訳

インスリンシグナル伝達と脂肪細胞分化に関する蛋白によるレジスチン発現の調節

指導教官 藤田敏郎教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 宋海燕

背景

2 型糖尿病は、標的組織におけるインスリン抵抗性を特徴とし、肥満との強い相関が見られる。レジスチン(resistin)は、近年、新たに発見された脂肪細胞から分泌されるホルモンであり、肥満動物の筋肉におけるインスリンの作用不全を誘発するホルモンとして注目された。血中レジスチン値は、摂食過剰や遺伝性の肥満によって増加する。また、レジスチンを正常マウスに投与すると、耐糖能およびインスリンの効果が損なわれる。従って、レジスチンは肥満と糖尿病を結びつけるホルモンと考えられている。しかし、その発現や作用のメカニズムについてまだほとんど解明されていない。そこで本研究では、レジスチン発現調節機序を解明するために、分子生物学方法で、3T3-L1 脂肪細胞に、インスリンシグナル伝達や脂肪細胞分化に関する蛋白(PI3 キナーゼ、Akt キナーゼ、MAP キナーゼ、PPARs、C/EBPs、PTEN など)によるレジスチン発現調節を検討した。

方法

1. 抗体の作製

精製レジスチンを抗原にして rabbit polyclonal 抗体を作製した。

2. 細胞:

3T3-L1 細胞は D-MEM 培地 (10% 成牛血清) の中でほぼ confluent に培養した後、分化培地にて 48 時間培養して脂肪細胞に分化させ、その後は D-MEM 培地 (10% ウシ胎児血清) にて培養して使用した。3T3-L1 脂肪細胞を分化させ、7 日間ほど成熟させた。成熟した 3T3-L1 脂肪細胞、NIH3T3 線維芽細胞、32D 骨髄細胞にアデノウイルスベクターを用いて、インスリンシグナル伝達や脂肪細胞の分化に関連する蛋白を発現させた。脂肪細胞の分化に関連する蛋白として核内転写因子 C/EBP α 、C/EBP ζ 、PPAR α 、PPAR γ 、インスリンシグナル伝達物質として PI 3-kinase の活性部位である p110 α 、その下流のセリンキナーゼである Akt、抑制作用をもつ PTEN、3 種類の MAPK kinases (MKKs)、またベクターのみを発現させた。蛋白の発現は、それぞれの蛋白に対する抗体を用いてウエスタンブロットを行い確認した。それぞれの蛋白を過剰発現した状態で、細胞を回収した。レジスチンの mRNA 量は RPA (RNase protection assay) により評価した。レジスチンの蛋白量は抗レジスチン抗体で免疫沈降し、ウエスタンブロットにより評価した。細胞量のコントロールとして、 β -actin の量を RPA およびウエスタンブロットで示した。Student の t 検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

結果

1. 3T3-L1 脂肪細胞における C/EBP α と C/EBP ζ 過剰発現によるレジスチンの発現への効果

アデノウイルスによる C/EBP α の過剰発現により、レジスチンの mRNA と蛋白量をそれぞれ 170%, 141% と著明に増加した。逆に、C/EBP ζ はレジスチンの mRNA と蛋白量はそれぞれ 85%, 80% と著明に減少させた。コントロールとして β -actin の発現は、これらのアデノウイルスによる過剰発現により影響を受けなかった。

2. L6 筋肉細胞、NIH3T3 線維芽細胞、32D 骨髄細胞における C/EBP α 過剰発現によるレジスチンの発現への効果

生体内におけるレジスチンは、脂肪細胞のみに発現すると報告されている。C/EBP α によるレジスチンの発現誘導が、3T3-L1 脂肪細胞などの脂肪細胞に限られるのか明らかにするため、脂肪細胞ではない L6 筋肉細胞、NIH3T3 線維芽細胞、32D 骨髄細胞に C/EBP α をアデノウイルスで過剰発現させた。L6 筋肉細胞で、C/EBP α の過剰発現により、レジスチンの mRNA と蛋白の両方において発現が確認された。一方で、NIH3T3 と 32D 細胞では、C/EBP α を過剰発現させても、レジスチンの発現は認められなかった。コントロールとして β -actin の発現は、これらのアデノウイルスによる過剰発現により影響を受けなかった。

3. 3T3-L1 脂肪細胞における PPAR α と PPAR γ 過剰発現によるレジスチン発現への効果

アデノウイルスによる PPAR γ の過剰発現により、レジスチンの mRNA と蛋白量はそれぞれ60%,43%と著明に減少した。逆に、PPAR α はレジスチンの mRNA と蛋白量に影響がなかった。コントロールとして β -actin の発現は、これらのアデノウイルスによる過剰発現により影響を受けなかった。

4. 3T3-L1 脂肪細胞における PI 3-kinase, PTEN, Akt 過剰発現によるレジスチンの発現への効果

アデノウイルスによる p110 α の過剰発現により、レジスチンの mRNA と蛋白量はそれぞれ 78%, 74%と著明に減少した。PTEN は PI 3-kinase の効果を抑制するが、アデノウイルスによる PTEN の過剰発現により、レジスチンの mRNA と蛋白量はそれぞれ 2.1 倍、2.0 倍と著明に増加した。Myristoylated PTEN の過剰発現により、レジスチンの mRNA と蛋白量はそれぞれ 2.8 倍、2.5 倍と著明に増加した。Akt は PI 3-kinase の下流の蛋白の一つである。アデノウイルスによる Akt の過剰発現により、レジスチンの mRNA と蛋白量はそれぞれ 61%, 58%と著明に減少した。myristoylated Akt の過剰発現により、レジスチンの mRNA と蛋白量はそれぞれ 83%, 70%と著明に減少した。

5. 3T3-L1 脂肪細胞における ERK, p38, JNK の過剰発現によるレジスチンの発現への効果

ERK, p38, JNK は 3 種類の MAP kinase である。MEK1, MKK6, MKK7 はそれぞれ ERK, p38, JNK の上流にある。アデノウイルスによる MEK1 の過剰発現により、レジスチンの mRNA と蛋白量はそれぞれ 94%, 70%と著明に減少した。同様に、MKK6 はレジスチンの mRNA と蛋白量をそれぞれ 84%, 60%と著明に減少させた。MKK7 は、コントロールと比べて、レジスチンの mRNA と蛋白量をそれぞれ減少させた。レジスチンの mRNA と蛋白量に影響がなかった。コントロールとして β -actin の発現は、これらのアデノウイルスによる過剰発現により影響を受けなかった。

6. PI 3-kinase, Akt, PTEN, MAPK の過剰発現による PPAR と C/EBP の変化

PI 3-kinase, Akt, PTEN, MAPK によるレジスチンの調節が、PPAR や C/EBP を介しているかどうかを明らかにするため、3T3-L1 脂肪細胞において PI 3-kinase, Akt, PTEN, MAPK を過剰発現させた際の、PPAR α , PPAR γ , C/EBP α , C/EBP ζ の蛋白量を測定した。PPAR α と PPAR γ の発現は、Akt, PTEN, MAPK の過剰発現による影響はなかった。一方で、C/EBP α は p110 α の過剰発現により 102 %と著明な増加を認め、Akt と myr-Akt も C/EBP α をそれぞれ 116 % と 121%と著明に増加させた。PTEN と myr-PTEN は、C/EBP

α をそれぞれ 74 % と 77 %と著明に減少させた。MEK1, MKK6, MKK7 は C/EBP α をそれぞれ 69 %, 48 %, 35%と著明に減少させた。p110 α , Akt, myr-Akt, PTEN, myr-PTEN, MEK1 は C/EBP ζ に影響はなかった。MKK6, MKK7 は C/EBP ζ をそれぞれ 36% と 40%と著明に増加させた。

考察

1. 脂肪細胞分化の際のレジスチンの発現は、転写因子 C/EBP α により促進されC/EBP ζ により抑制される。C/EBP α は、脂肪細胞ではない L6 筋肉細胞でも、レジスチンの発現を誘導する。
2. 成熟脂肪細胞においては、PPAR γ またはその活性化により、レジスチン発現は抑制される。
3. 成長因子による PI 3-kinase, Akt, MAPK カスケードの活性化は、レジスチンの発現を抑制する。
4. MAPK の活性化により C/EBP α は抑制を受けるため、MAPK のレジスチン抑制作用の一部は、C/EBP α を減少させることを介していると思われた。Akt と myr-Akt は C/EBP α を増加させるため、PI 3-kinase-Akt を介したレジスチンの抑制は、C/EBP α と独立して起こると考えられた。
5. PI-3 kinase, Akt, MAPK, PTEN によるレジスチンの発現調節において、PPAR の関与は認められなかった。

結論

1. 転写因子 C/EBP α 、PPAR γ は、脂肪細胞の分化やインスリン抵抗性に関与するが、レジスチンの発現における主な調節因子でもある。
2. 脂肪細胞では、成長因子による刺激により PI 3-kinase, Akt, MAPK カスケードが活性化され、レジスチンの発現は抑制される。