

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Humoral regulation of resistin expression in 3T3-L1 and mouse adipose cells

和訳 レジスチンの 3T3-L1 脂肪細胞およびマウスにおける体液性調節

指導教官 山下直秀 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月 入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 庄嶋伸浩

【目的】

肥満は、先進諸国において急増しており、糖尿病や動脈硬化の原因として、健康への影響が増大している。一方で、脂肪細胞は単なるエネルギー貯蔵庫でなく、多くの生理活性物質を分泌しインスリン抵抗性に関与することがわかってきた。インスリン抵抗性に関するものとして TNF α や遊離脂肪酸、インスリン感受性に関するものとしてアディポネクチン、レプチンなどが注目されてきた。レジスチンは、脂肪細胞から分泌される 12kDa の新規分子で 6 量体を形成し、高脂肪食や遺伝子異常による肥満とインスリン抵抗性を呈するマウスで増加する。レジスチンの投与によりインスリン抵抗性が惹起されることから、肥満に伴うインスリン抵抗性に関与していると考えられている。しかし、肥満に伴うインスリン抵抗性における、レジスチン発現増加のメカニズムは不明である。また、肥満以外のインスリン抵抗性の病態への関与は明らかでない。そこで、糖質や糖代謝に影響する種々のホルモンによるレジスチン発現の調節について検討した。

【方法】

3T3-L1 線維芽細胞を 0.5 mmol/l の 3-isobutyl-1-methylxanthine, 4 μ g/ml のデキサメサゾンにより分化させ、その後 10% fetal bovine serum を含む培地で 4 ~ 10 日間培養し脂肪細胞に成熟させた。成熟した 3T3-L1 脂肪細胞を、その培地に糖代謝に関連する物質（糖質、インスリン、グルココルチコイド、TNF α 、チアゾリジン系薬剤トログリタゾン、エピネフリン、成長ホルモン）を濃度や時間を変えて投与した。それぞれの刺激物質の最高濃度は、糖質 25mM、インスリン 100mM、グルココルチコイド 1 μ M、TNF α 100ng/ml、トログリタゾン 10 μ mol/l、エピネフリン 1 μ M、成長ホルモン 200ng/ml であった。最大刺激時間は 24 時間で行った。

刺激後、細胞を回収した。

mRNA量はRPA (RNase protection assay) により評価した。蛋白量は抗レジスチン抗体で免疫沈降後ウエスタンブロットにより評価した。グルココルチコイドに関しては、10mg/kgをマウスに5日間筋肉注射して、12～14時間絶食後、脂肪組織におけるレジスチンのmRNA量、蛋白量の変化を評価した。マウス血中TNF α 濃度は、ELISAにより測定した。Studentの*t*検定を行い、P<0.05を有意とした。

【結果】

Flag タグを融合させたレジスチンを、COS-7細胞に過剰発現させ、抗Flag抗体と抗レジスチン抗体でウエスタンブロットを行った。抗Flag抗体と同様に、抗レジスチン抗体により、還元状態では12kDa、非還元状態では多量体形成と考えられる24kDa、72kDaバンドが認められ、レジスチンへの特異性が確認できた。

インスリンや糖によるレジスチン発現への影響を検討した。100mMのインスリンで24時間刺激すると、3T3-L1脂肪細胞でレジスチンmRNAと蛋白はそれぞれ、37%と30%の有意な減少(P<0.005)を認めた。24時間の25mmol/lの糖刺激では、5mmol/lでの糖刺激に比較して、脂肪細胞のレジスチンmRNAと蛋白をそれぞれ、50%と35%の有意な増加(P<0.005)を認めた。

最大1 μ mol/lのグルココルチコイド投与により、レジスチンのmRNA量と蛋白量はそれぞれ3T3-L1脂肪細胞において3.3倍と1.5倍(P<0.005)と増加した。さらに、10mg/kgを5日間筋肉注射したマウスの脂肪組織では、コントロールに比較して、レジスチンのmRNA量と蛋白量はそれぞれ70%と80%の増加(P<0.005)を認めた。グルココルチコイド投与マウスにおいては、血糖値に有意差はなかったが、血中インスリン濃度は2.9 \pm 1.0 μ U/dl (コントロールマウスでは0.8 \pm 1.0 μ U/dl)と増加しており、インスリン抵抗性の状態にあると考えられた。また、血中TNF α 濃度はグルココルチコイド投与マウスにおいて4.08 \pm 2.98pg/ml、コントロールマウスにおいて3.62 \pm 1.18pg/mlと有意差を認めなかった。

TNF α やチアゾリジン系薬剤による刺激のレジスチン発現への影響を検討した。100ng/mlのTNF α の刺激により、刺激後3時間から3T3-L1脂肪細胞のレジスチンは減少傾向にあり、24時間後にはmRNAと蛋白量をそれぞれ77%と80%の著明な減少(P<0.005)を認めた。また、24時間のTNF α の刺激では、10ng/mlと100ng/mlのTNF α 濃度において、有意な減少(P<0.005)を認めた。24時間の10 μ mol/lのトログリタゾンの刺激により、3T3-L1脂肪細胞のレジスチンmRNAと蛋白量を、ともに著明に約80%減少(P<0.005)させた。

エピネフリンや成長ホルモンによるレジスチンの発現変化を検討した。3T3-L1脂肪細胞でレジスチンmRNAと蛋白はそれぞれ、24時間の1 μ mol/lのエピネフリンにより48%と38%と中等度の減少(P<0.05)を認めた。同様に、24時間の200ng/mlの成長ホルモンにより、脂肪細胞でレジスチンmRNAと蛋白はそれぞれ42%と29%と中等度の減少(P<0.05)を認めた。

糖やグルココルチコイドのレジスチン増加に対する、インスリンやTNF α の影響を検討した。グルココルチコイドによるレジスチンmRNAと蛋白量の増加はそれぞれ186%と152%であったが、100nmol/lのインスリンで同時に刺激することで、全ての刺激なしのコントロールと同

程度まで、有意に増加を抑制($P<0.005$)した。100ng/ml の TNF α を糖やグルココルチコイドと同時に刺激すると、全ての刺激なしのコントロールに比較してどちらも約 70%減と、著明に減少($P<0.005$)させた。

【考察】

インスリン抵抗性は、遺伝的素因に加え、肥満、運動不足、炎症など環境要因が組み合わさってひきおこされる。肥満とインスリン抵抗性の関連について精力的に研究されている。脂肪細胞は、TNF α やアディポネクチンなどを分泌し、末梢組織でのインスリン抵抗性を調節する。レジスチンも脂肪から分泌され、肥満に関連するインスリン抵抗性をひきおこすホルモンとして同定された。また、チアゾリジン系薬剤はインスリン抵抗性改善薬であるが、転写因子 PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) に結合して作用する。チアゾリジン系薬剤はレジスチンの発現を抑制することがわかっており、レジスチンはチアゾリジン系薬剤によるインスリン抵抗性改善にも関与していると考えられる。

そこで、インスリン抵抗性に関連する様々な因子の、レジスチン発現への関与を検討した。培養脂肪細胞において、糖刺激ではレジスチンが増加し、逆にインスリン刺激では減少した。糖尿病は高血糖と高インスリン血症が同時に存在する時期があり、糖とインスリンの影響のバランスによりレジスチンが調節されると思われる。また、インスリンの持つレジスチンの発現抑制作用が減弱し、レジスチンが増加してインスリン抵抗性の状態が形成される、という可能性も考えられる。糖尿病でインスリン分泌の枯渇した状態では、高血糖に比して血中インスリン濃度が低いため、レジスチンが増加してインスリン抵抗性を助長すると思われる。

グルココルチコイドにより培養脂肪細胞のみならずマウス脂肪組織においてもレジスチンが増加することがわかった。グルココルチコイドは、インスリンの受容体との結合、IRS-1(insulin receptor substrate-1)のリン酸化、グルコーストランスポーターの細胞表面への移動に関与して、インスリン抵抗性をひきおこす。副腎皮質ホルモンの局所での活性酵素である 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD)の欠損マウスでは、レジスチンが低下しており、今回の結果と一致した。レジスチンは肝臓での糖産生を増加させることがわかっており、グルココルチコイドによる肝臓での糖産生作用は、レジスチンを介す可能性が考えられる。さらに、ヒトにおいてもクッシング症候群でインスリン抵抗性を呈す女性 14 人で、血中レジスチンは著明に高値であった。今後、レジスチンノックアウトマウスやレジスチン中和抗体を用いて、グルココルチコイドに伴うインスリン抵抗性へのレジスチンの関与をさらに解明したい。

本実験の結果の中で、TNF α が強いレジスチン抑制作用をもつことは興味深い。しかし、*in vitro* における TNF α によるレジスチンの抑制効果は、*in vivo* では確認されていない。2型糖尿病患者における血中レジスチンは、血中可溶性 TNF α 受容体濃度とよく相関し、ヒトマクロファージでは TNF α 刺激によりレジスチン発現が増加する。また、TNF α 欠損マウスにおいても、高脂肪食により肥満すると、血中レジスチンが対照群と同様に増加したと報告がある。この *in vitro* と *in vivo* における違いの理由は大きく 2つ考えられる。第 1 に、脂肪細胞肥大化

によるレジスチン増加作用が、TNF α によるレジスチン抑制作用よりも強い可能性がある。第2に、TNF α のシグナルと効果の多様性が原因と考えられる。レジスチン発現を強く誘導するLPS刺激は、NF κ Bを介していると考えられる。そのためTNF α 刺激においては、TNFR1-TRAF2-NF κ B経路はレジスチンを増加させるが、もう一方のTNFR1-FADD経路はレジスチンを減少させる可能性がある。これらの可能性について、解明が必要である。

エピネフリンや成長ホルモンはインスリン抵抗性と関連がある。エピネフリンと成長ホルモンは、中等度のレジスチン抑制効果がある。エピネフリンは、 α と β 受容体をどちらも活性化する。脂肪組織においては、 β アドレナリン受容体に加え、 $\alpha 2$ アドレナリン受容体が発現しており、それぞれ脂肪分解、脂肪分解抑制と逆の作用がある。イソプロテレノールが選択的に β 受容体とGs蛋白を介してレジスチンの発現を減少させるが、レジスチンの発現には α 受容体の関与は少ないという報告と合致する。レジスチンのエピネフリンや成長ホルモンによるインスリン抵抗性への関与は小さいと思われる。

今までに報告された3種類のレジスチントランスジェニックマウスの表現系から、レジスチンはendocrineまたはpara/autocrineにより、肝臓・脂肪・筋肉におけるインスリン抵抗性に関与していると考えられる。ノックアウトマウスの体重や脂肪分布への影響に著明なものはなく、レジスチンの肥満や内臓脂肪への影響は限られたものであると思われる。レジスチン発現アデノウイルス静注マウスでは、脂質代謝異常も認められた。高血圧については、今後の検討が必要である。レジスチンは、炎症により誘導されるため、動脈硬化への関与も考えられる。ヒトにおいては、糖尿病患者と耐糖能異常の白人77人において、レジスチンの血中濃度が、炎症系のマーカーであるCRPと正の相関があった。培養内皮細胞でのvascular cell adhesion molecule (VCAM-1)やケモカイン monocyte chemoattractant chemokine (MCP-1)の発現を惹起し、動脈硬化を進展する。レジスチンはVCAM-1やICAM-1を誘導し、この誘導はアディポネクチンにより打ち消される。これらの結果から、レジスチンは、過食や運動不足などの環境の下、肥大脂肪細胞から分泌され、インスリン抵抗性と脂質代謝異常を介して、また直接に動脈硬化へ関与し、Metabolic Syndromeを形成する一因となっていることが考えられた。

【結語】

レジスチンは、脂肪から分泌される新しいホルモンであるが、糖そのものに加えて糖代謝に関わる様々なホルモンや転写因子により制御されていた。高血糖、グルココルチコイドによりレジスチンが増加し、チアゾリジン系薬剤によりレジスチンが減少することから、レジスチンはインスリン抵抗性の原因となるホルモンであると考えられた。最近、レジスチン欠損マウスでは、肝臓のインスリン感受性増加により低血糖をきたすことが報告されており、本研究と合致する結果であった。今後、ステロイドによるインスリン抵抗性へのレジスチンの関与を、レジスチンノックアウトマウスや中和抗体を用いて検討したい。また、腸管や骨髄から分泌されるレジスチンのファミリーに関しても、糖代謝において重複した作用を持っていることがわかってきた。レジスチンとインスリン抵抗性の関係を明らかにすることで、糖尿病の新たな治療法の開発に結びつく可能性があると考えられた。