

[別紙 1]

## 論文の内容の要旨

論文題目 Function of resistin like molecule  $\beta$  derived from intestinal tract in the pathogenesis of insulin resistance

和訳 インスリン抵抗性に關与する腸管由来レジスチン様分子 $\beta$ の機能

指導教員 山下直秀教授

東京大学大学院医学系研究科

平成14年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 櫛山暁史

### 【背景】

インスリン抵抗性は2型糖尿病の主要な原因であり、様々なメカニズムによりインスリン抵抗性が惹起されることが知られている。近年、組織から分泌されるタンパクが全身を循環し、臓器間ネットワークとも呼ぶべき反応により、他臓器、あるいは発現臓器自身でのインスリン抵抗性やそれに起因する動脈硬化に關連することが知られるようになった。インスリン抵抗性や動脈硬化は、世界的な問題である疾病、すなわち脳梗塞や心筋梗塞といった、大血管障害の発症の原因となる。したがって、インスリン抵抗性の改善、あるいは大血管障害の予防に關係する、これら分泌タンパクとインスリン抵抗性、あるいは動脈硬化との關連の

研究は世界的にも、創薬の分野を含めて競争が激しい領域である。その中でレジスチンは、肝でインスリン抵抗性をもたらすと考えられており、ヒトでもいくつかのデータでレジスチンの発現量が高いほどインスリン抵抗性が高くなることが示唆されている。またヒトで、動脈硬化を直接的に促進する作用があることも示唆されている。レジスチンにはアイソフォームが3種同定されており、それぞれ REsistin-Like Molecule (RELM)  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ と命名されている。そのうち RELM $\beta$ のみが、ヒトに存在することが確認されている。RELMs はレジスチンと同様血液中を循環することが知られており、レジスチンとは発現臓器が異なっている。したがって、脂肪以外の臓器からも発現する RELMs がレジスチンと同様インスリン抵抗性に関連があるとすると、その臓器によりインスリン抵抗性の制御を受けることとなり、その意味でも RELM とインスリン抵抗性の関連が注目される。特に RELM $\beta$ は栄養の吸収や、免疫防御の場である腸管でのみ発現し、食事の内容により制御を受けることが示唆されるため、食事や腸管の状態（感染症などの炎症を含む）が RELM $\beta$ を介してインスリン抵抗性に影響する、というメカニズムが想定され、注目される。

我々のグループはすでに、RELM $\beta$ が高脂肪食負荷や *db/db* マウスなどで発現量が増加していることを *Diabetologia* 誌上で発表しており、レジスチンの腸管のみで発現されるアイソフォームとして、インスリン抵抗性との関連に注目してきた。今回私は、レジスチンのアイソフォームである RELM $\beta$ とインスリン抵抗性発症との関連を、RELM $\beta$ 過剰発現マウスの糖脂質代謝状態の解析

と、初代培養肝細胞の系での RELM $\beta$  投与実験により解析した。

#### 【方法】

肝特異的 SAP プロモーター下流に RELM $\beta$  の cDNA 全長を挿入したコンストラクトを用いて RELM $\beta$  過剰発現マウスを作成した。得られた RELM $\beta$  過剰発現マウスは、サザンブロットで transgene の挿入を確認し、ウサギに精製 RELM $\beta$  タンパクを免疫して作成した、RELM $\beta$  のポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法を用いて RELM $\beta$  の発現を確認した。マウスは通常食により飼育し、6 週目に血糖及び体重を測定し、糖負荷試験を行った。また、高脂肪食を 4 週間負荷した後に血糖をはじめとした糖脂質代謝の血清データを測定し、RELM $\beta$  過剰発現マウスとその同胞を比較した。さらに高脂肪食負荷後に関しては、糖負荷試験、インスリン負荷試験、ピルビン酸負荷試験を行い、 $[^3\text{H}]$ -D-glucose を用いたグルコースクランプ試験を行って GIR (グルコース注入速度)、GDR (グルコース消失速度)、HGP (肝糖新生) を測定した。グルコースクランプ時には、試験終了時に  $[^{14}\text{C}]$ -2-deoxy-glucose を bolus 注入することで筋肉、脂肪への取り込み量をも測定した。また単離ヒラメ筋をインスリン刺激し糖取り込みアッセイを行った。また、門脈よりインスリン注入を行い、肝臓、筋肉でのインスリンシグナル伝達分子のタンパク量と、インスリン刺激によるリン酸化状態を免疫沈降ウエスタンブロット法で解析し、また PI3-kinase、Akt/PKB のキナーゼ活性を測定した。また、肝での脂質代謝で重要な酵素の発現量に関して RPA 法を用いて検討した。

一方、肝細胞初代培養細胞の系では、293細胞に RELM $\beta$ を発現するアデノウイルスを感染させた上清を精製して作成した RELM $\beta$ タンパクを投与することにより、インスリンシグナル伝達分子のタンパク量、インスリン刺激によるリン酸化状態を検討した。また、RELM $\beta$ の投与により MAPK のリン酸化状態に変化が生じるか検討した。

#### 【結果】

RELM $\beta$ 過剰発現マウスが2系統得られ、肝での発現と血清中の RELM $\beta$ 濃度は、系統1では極めて高く、系統2では発現量は少なく、血清中の濃度は同胞マウスの2倍程度であった。通常食下では RELM $\beta$ 過剰発現マウスは同胞マウスと比較して体重、空腹時血糖値、血清インスリン値、血清コレステロール値、中性脂肪値に有意な差は認められなかった。しかし、両系統で RELM $\beta$ 過剰発現マウスの方が、体重増により空腹時血糖が上昇しやすい傾向を認めた。高脂肪食を負荷すると、体重や摂餌量には明らかな差を認めないが、空腹時血糖、血清インスリン値、血清コレステロール値、血清中性脂肪値がすべて RELM $\beta$ 過剰発現マウスで増加した。糖負荷試験、インスリン負荷試験、ピルビン酸負荷試験では、それぞれ RELM $\beta$ 過剰発現マウスで血糖高値となった。組織像では、脂肪肝と膵島肥大を認め、肝内中性脂肪含量の増加と血中インスリン高値を裏付けるものであった。グルコースクランプ法では、GIRの低下を認めたが、GDRは不変であり、HGPの上昇すなわち肝でのインスリン抵抗性を認めた。 $[^{14}\text{C}]$ -2-deoxy-glucoseの注入により筋肉、脂肪での糖取り込み量は RELM $\beta$ 過剰発現マウ

スで変化がなかった。また、単離ヒラメ筋でのインスリン刺激による糖取り込みにも変化がなかった。さらに、肝臓、筋肉のいずれにおいても IRS タンパク量の減少を認め、インスリン刺激によるチロシンリン酸化の低下、PI3-kinase 活性の低下を認めた。肝での脂質代謝の酵素の発現量（脂肪酸合成酵素、カルニチン・パルミトイル基転移酵素）に変化を認めた。初代培養肝細胞に RELM $\beta$  を投与すると、IRS 蛋白量はやはり減少し、インスリン刺激によるチロシンリン酸化も減少した。また、MAPK のリン酸化を認め、リン酸化の量は、RELM $\beta$  投与量依存性を認めた。

#### 【考察】

本研究では、まず RELM $\beta$  過剰発現マウスを用いて、*in vivo* での RELM $\beta$  とインスリン抵抗性の関連を検討した。それにより、RELM $\beta$  の血中濃度が慢性的に高い状態が持続すると、単独ではインスリン抵抗性を来たさないが、高脂肪食や体重増などの要因が加わることによって糖尿病、高脂血症、脂肪肝を呈し、その主要な原因と考えられるインスリン抵抗性が肝臓で生じることが証明された。筋肉に関しては、インスリン刺激による糖取り込み状態とインスリンシグナル伝達の状態には乖離が存在している。インスリンに依存した糖の代謝に関しては肝臓では糖新生やグリコーゲン分解の制御が行われ、筋肉では GLUT4 のトランスロケーションによる糖取り込みがメインのメカニズムであるという違いがあるため、生じた差となっている可能性があるが、特定はできていない。脂肪肝と高脂血症に関しては、肝での脂質代謝の酵素の発現量に変化を生じており、RELM $\beta$  の作用である可能性もある。

一方、*in vivo* で生じた RELM $\beta$ 過剰発現による肝臓への変化が直接的作用であることは、初代培養肝細胞に RELM $\beta$ を投与したところ、同様の変化が生じ、直接的作用が存在することが示唆された。のみならず、RELM $\beta$ が複数の MAPK をリン酸化することも証明し、*in vivo* でも特に p38MAPK のリン酸化状態が亢進していた。以前我々のグループにおいて、MAPK の慢性的刺激が IRS のタンパク量やインスリン刺激による IRS のチロシンリン酸化を低下させることを発表してきたが、同様の機序すなわち MAPK の刺激による IRS タンパク量の変化が RELM $\beta$ によるインスリン抵抗性の発症機序であることが示唆された。

本研究の限界として重要なのは、*in vitro* では証明された RELM $\beta$ の用量依存性の効果が、生理的な範囲の変動でどの程度インスリン抵抗性に影響するか、という点である。RELM $\beta$ の血中濃度に関しては、より定量性の確かな RIA や ELISA の系が確立される必要があり、開発中である。

現時点で RELM $\beta$ の受容体の存在やシグナル伝達経路が未だ解明されたわけではないため、RELM $\beta$ の作用に関しては今後のさらなる研究課題であるし、動脈硬化との関連に関してもさらなる解析が必要と考えられる。さらに、ヒト RELM $\beta$ の作用の検討も必要である。また、炎症とインスリン抵抗性との関連を考える上での基礎医学的側面、また糖尿病や動脈硬化の治療薬としてのターゲットとしての臨床医学的側面から、重要なテーマであると考えられた。