

論文の内容の要旨

論文題目 脂肪細胞分化におけるインスリン受容体基質-1
(IRS-1)および IRS-2 の役割

氏 名 三木啓司

脂肪細胞の分化は、増殖因子やホルモン・サイトカイン・脂質などの生理活性物質が細胞に対して複雑に関与しながら、制御されている。増殖因子やホルモンなどの内分泌因子がレセプターに作用して下流シグナルを伝達することにより転写因子の活性化および核内移行が起こり、転写調節あるいは転写後調節を介して、脂肪細胞の分化が制御される。近年、脂肪細胞の分化とインスリン抵抗性の間には密接な関連性があることがわかってきた。この関連性が注目されたのは、インスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン誘導体が核内受容体型転写因子 **peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR) γ** のアゴニストとして働き脂肪細胞分化を促進させるという報告が発端であった。チアゾリジン誘導体は脂肪細胞の分化を促進させ小型化の脂肪細胞を増加させる一方で、肥大化した脂肪細胞はアポトーシスにより減少させる。その結果、全体として脂肪細胞の小型化が進み、**TNF α** などのインスリン抵抗性惹起因子の分泌が減少しアディポネクチンなどのインスリン抵抗性改善因子の分泌が増加することで、インスリン抵抗性を改善していると考えられている。またチアゾリジン誘導体が脂肪細胞の分化を促進させ血中の遊離脂肪酸が脂肪細胞に流入することで、骨格筋への遊離脂肪酸の流入量が減少し骨格筋中での脂肪毒性が解除され、インスリン抵抗性が改善されるメカニズムも報告された。以上のように、脂肪細胞を積極的に分化させるとインスリン抵抗性は改善される。

このような観点から脂肪細胞の分化のメカニズムを解明することは重要であり、脂肪細胞の分化をコントロールすることで、肥満症およびインスリン抵抗性の新たな治療法や治療薬が確立される可能性がある。脂肪細胞分化のメカニズムを考える上で、転写因子とシグナル伝達についての研究は重要である。脂肪細胞分化に働く転写因子の研究はこれまで多くの研究者に注目され、特に C/EBP δ 、C/EBP β 、PPAR γ 、C/EBP α の発現およびカスケードに関する研究は詳細に解明されてきた。一方、脂肪細胞分化に関わるシグナル伝達分子に関する知見は未だ少なく、たとえば脂肪細胞分化過程で PI-3kinase の活性化が起こることや Akt が関与していることなどが知られていたが、PI-3kinase の上流の分子については不明な点が多い。インスリン受容体基質-1(IRS-1)および IRS-2 は PI-3kinase を活性化させる分子として知られており、脂肪細胞分化において IRS-1 および IRS-2 はどのような役割を果たしているのかは、肥満症およびインスリン抵抗性の発症メカニズムを考える上で、興味深いテーマである。そこで今回、IRS-1 および IRS-2 の脂肪細胞分化における役割について、IRS-1 欠損マウスおよび IRS-2 欠損マウスからの胎児由来線維芽細胞を使用した loss-of-function の実験方法で、その研究を行った。

【研究結果】

結果 1. IRS-1、IRS-2 は脂肪細胞分化に必須の分子である。

IRS-1 ヘテロ欠損マウスと IRS-2 ヘテロ欠損マウスより 4 種(野生型、IRS-1 欠損型、IRS-2 欠損型、IRS-1/IRS-2 ダブル欠損型)の胎児線維芽細胞を調製し脂肪細胞へ分化させることで、脂肪細胞分化過程における IRS-1 および IRS-2 の役割を検討した。4 種の細胞を脂肪細胞に分化させ、Oil-Red O 染色と細胞内中性脂肪含量で分化の程度を評価したところ、IRS-1 欠損型細胞及び IRS-2 欠損型細胞は野生型に比してそれぞれ約 60%、約 15%脂肪細胞分化が抑えられていた。これらの結果より、IRS-1、IRS-2 は互いに、脂肪細胞分化過程において完全にはその機能を代償することができないことが分かった。また、IRS-1/IRS-2 ダブル欠損型細胞は Oil-Red O 染色で赤く染まらず、細胞内中性脂肪含量の上昇も認められず、脂肪細胞に全く分化しなかった。IRS-1 および IRS-2 は脂肪細胞分化に必須の分子であることがこれらの結果より判明した。

結果 2. IRS-1、IRS-2 を介した PI-3Kinase 活性が脂肪細胞分化に必要である。

次に IRS-1 および IRS-2 を介する細胞内情報伝達について検討するために、脂肪細胞分化過程の PI-3Kinase 活性の上昇を測定したところ、IRS-1 欠損型細胞は野生型に比し約 50%低下していたのに対し、IRS-1/IRS-2 ダブル欠損型細胞では著明に低下していた。PI-3Kinase 阻害剤 LY294002 の添加で野生型細胞の脂肪細胞分化が抑制された結果を含めて、脂肪細胞分化過程に上昇する PI-3Kinase 活性は脂肪細胞分化に必要であるという報告と一致した。脂肪細胞分化過程の MAPK のリン酸化を測定したところ、4 種の細胞間で差

は認められず、IRS-1およびIRS-2が存在していなくてもMAPK活性には変化がなく、今回の脂肪細胞分化が障害されている原因にMAPK活性の減弱は関与していないことが分かった。

結果 3. IRS-1、IRS-2 を介する PI-3Kinase 活性が転写因子 PPAR γ 、C/EBP α の発現を調節している。

次に、IRS-1 および IRS-2 を介するシグナル伝達が脂肪細胞分化に関わる転写因子の発現をいかに制御しているかを検討するために転写因子の mRNA の発現を調べた。その結果、脂肪細胞分化初期に発現する転写因子 C/EBP β の発現は 4 種の細胞間で変わらず、C/EBP δ の mRNA の発現は IRS-1 欠損型細胞および IRS-1/IRS-2 ダブル欠損型細胞で上昇していた。一方、脂肪細胞分化中期に発現してくる転写因子 C/EBP α 、PPAR γ の mRNA 発現は IRS-1/IRS-2 ダブル欠損型細胞で著明に低下しており、タンパクレベルでも低下していることを確認した。PI-3Kinase 阻害剤 LY294002 の添加で C/EBP α 、PPAR γ の発現が認められなかったことから、IRS-1 および IRS-2 を介する PI-3Kinase 活性が PPAR γ 、C/EBP α の発現を調節していることが判明した。

結果 4. IRS-1、IRS-2 は PI-3Kinase 活性を介した PPAR γ の発現のみではなく、他の下流シグナル伝達経路を含めて脂肪細胞分化に関与している。

IRS-1/IRS-2 ダブル欠損型細胞へのレトロウイルスを用いた PPAR γ 遺伝子の導入で脂肪滴は認められたが、その分化の程度は完全には回復しなかったことから、IRS-1 および IRS-2 は PPAR γ の発現上昇のみに関与しているわけではなく、他の下流シグナル伝達経路も含めて脂肪細胞分化を調節していると考えられた。

結果 5. IRS-1/IRS-2 のダブル欠損型マウスの個体レベルの解析の結果、in vitro 実験結果と一致する部分と乖離する部分が認められた。

これら *in vitro* の脂肪細胞分化実験系の解析結果が個体レベルにおいても説明できるか検討するために、IRS-1/IRS-2 のダブル欠損型マウスの新生児の脂肪組織を解析した。IRS-1/IRS-2 ダブル欠損マウス新生児の組織解析の結果、白色脂肪組織量は著明に低下していたが認められた。これは、*in vitro* 実験の結果と相関しているものの完全に一致した結果ではなかった。*in vitro* 実験は分化誘導剤として 3-isobutyl-1-methylxanthine・dexamethasone・インスリンおよび Fetal Calf Serum を用いた実験系であるのに対し、胎盤中ではインスリン・IGF-1・IGF-II・Growth Hormone などの増殖因子・ホルモン・生理活性物質が関与した種々の経路のシグナルが IRS-1/IRS-2 シグナルを部分的に代償することで、ダブル欠損マウス新生児の白色脂肪組織は部分的に分化したのではないかと推察された。一方、ダブル欠損マウス新生児の褐色脂肪組織量は低下していなかった。ダブル欠損マウス新生児の褐色脂肪組織量が低下していなかった理由として、褐色脂肪組織にお

いては、IRS-3がIRS-1/IRS2シグナルをほぼ完全に代償できた可能性が考えられた。

以上、IRS-1欠損マウスおよびIRS-2欠損マウスからの4種の胎児由来線維芽細胞を用いた研究により、IRS-1とIRS-2は脂肪細胞分化に必須の分子でありその両者には完全な相補性はないこと、またその役割としてPI-3kinaseの活性化を介してPPAR γ とC/EBP α の発現を上昇させる調節機構に関与していることを明らかにした。