

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻
平成 16 年度博士課程進学
氏名 長 克武
指導教員名 高橋伸一郎

論文題目 臓器間連携によるインスリン抵抗性補償機構の解明

成長ホルモン (GH) は、脳下垂体から分泌され、動物個体の成長と代謝の調節に重要な役割を果たしている。GH の分泌不全は成長遅滞を引き起こすが、GH の過剰分泌はインスリン抵抗性を引き起こし、いずれも临床上大きな問題となっている。

我々の研究グループでは、GH の代謝調節活性を *in vivo* レベルで研究するために、ヒト成長ホルモン (hGH) 遺伝子導入ラットの作出を進め、複数の系統の遺伝子導入ラットの作出に成功している。そのうちの一系統のトランスジェニックラット (以下 TG と略す) は、生後 10 週齢において hGH の過剰分泌が認められ、高インスリン血症を示していたが、驚いたことに血糖値の異常は認められなかった。各臓器の糖取り込み能について検討したところ、野生型ラット (以下 WT と略す) と比較して、TG では筋肉と脂肪組織においてインスリン依存的な糖取り込み能は低下、インスリン抵抗性を示していた。これに対して、TG の肝臓においては基底状態での糖取り込み能が亢進、脂肪及びグリコーゲンの過剰蓄積による肝肥大が認められた。

そこで本研究では、この TG をモデルとして、インスリン抵抗性の新しい補償機構を明らかにすることを目的とした。これまでの研究成果より、肝臓でのインスリン応答が亢進、取り込んだ糖を脂質やグリコーゲンに合成して蓄積する結果、血糖値が正常に維持されるというインスリン抵抗性補償機構の存在を仮定、研究を進めた。

TG 肝臓におけるインスリン抵抗性補償作用の解析

まず、10 週齢 TG ラットの表現型を糖代謝の指標を中心に検討した。TG の血中インスリン値は、WT と比較して自由摂食時と絶食時どちらにおいても有意に高値を示し、インスリン負荷試験においても TG のインスリンに対する応答性は低下、インスリン抵抗性の発生が確

認められた。しかし、耐糖能試験では両者に有意な差は認められなかった。ピルビン酸負荷試験では、TG はピルビン酸投与後の血糖値の上昇が緩やかで、肝臓の糖新生が抑制されていることがわかった。また、TG 肝臓では脂肪蓄積が激しく、糖取り込み量も有意に増加していることを確認した。これら一連の結果は、TG 肝臓においてインスリンシグナルが増強されている可能性を示していた。

そこで、WT、TG の初代培養肝細胞を用いて、インスリンシグナルを解析した。一般に、インスリンがインスリン受容体 (IR) に結合すると内蔵されているチロシンキナーゼを活性化し、IR を自己リン酸化するとともにインスリン受容体基質 (IRS)-1, 2 をチロシンリン酸化する。チロシンリン酸化された IRS を認識してホスファチジルイノシトール 3-リン酸化酵素 (PI 3-kinase) が結合・活性化されることで下流にシグナルが伝達され、広範な生理活性が発現すると考えられている。TG 肝細胞では、インスリン刺激に応答した IR と IRS-1 のチロシンリン酸化の亢進は認められなかったが、IRS-2 のチロシンリン酸化は TG において有意に増強していることを発見した。これを良く反映して IRS-2 に結合している PI 3-kinase 活性も有意に上昇していた。

次に、増強されたインスリンシグナルがどのようにインスリンの生理作用に反映されているかを、糖・脂質代謝酵素の発現量を指標に解析した。インスリン処理した TG 肝細胞では、脂肪酸合成酵素、アセチル-CoA カルボキシラーゼ、グルコキナーゼなど脂肪酸合成酵素群のインスリンに依存した mRNA 量の増加が増強され、グルコース-6-ホスファターゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼなど糖新生酵素のインスリンに依存した mRNA 量の減少が更に強められていた。

他の結果も併せ、TG 肝臓では、インスリンシグナルの増強を介して、糖から脂質への合成が促進する一方で、糖新生が抑制され、糖利用が増加、糖放出が抑制、その結果、筋肉と脂肪における糖取り込み能の低下を補償していると結論した。

TG におけるインスリン抵抗性の発生とインスリン抵抗性補償作用の誘導の連関の解析

TG におけるインスリン抵抗性と肝臓における補償作用の発現時期を明らかにするため、2.5 (離乳前)、5、10 週齢の WT と TG の血中インスリン値、血糖値、肝細胞のインスリンシグナルを調べた。血中インスリン値は、2.5 週齢では、WT と TG 間で差は認められず、5 週齢と 10 週齢においてそれぞれ 1.80 倍、5.25 倍と有意に高値を示した。血糖値はいずれの週齢においても有意な差は認められなかった。一方、インスリン刺激に応答した IRS-2 のチロシンリン酸化と IRS-2 に結合する PI 3-kinase の活性、インスリン処理に応答した脂質合成酵素の発現量の増加は 5 週齢より増強され、脂肪の過剰蓄積もこの時期より確認された。

TG ラットは過食、肥満を呈することが明らかになっているので、離乳後より pair-feeding 試験を行い、過食・肥満がインスリン抵抗性の発生、補償作用の誘導に与える影響を検討した。Pair-feeding により TG の体重は WT と比較して有意な差は認められなくなったが、血中インスリン値は、pair-fed TG で WT と比較して 6 倍と有意に高値を示し、肝臓のイン

スリンシグナルも増強されていた。

以上の結果から、TG ラットにおけるインスリン抵抗性の発生と補償作用の誘導は、過食・肥満を介しておらず、hGH の長期間の暴露により起こるインスリン抵抗性が補償作用を誘起している可能性が考えられた。

TG 肝臓におけるインスリンシグナルの増強機構と糖・脂質代謝酵素群の転写制御機構の解析

インスリン抵抗性の補償作用の誘導に、TG 肝臓における IRS-2 のインスリン依存性チロシンリン酸化の増強が重要であることを示すために、small hairpin RNA 法を用いて TG の初代培養肝細胞の IRS-2 タンパク量を減少させ、インスリンシグナル及び生理活性の変動を検討した。その結果、IRS-2 の発現量を抑制すると、IRS-2 タンパク量あたりのインスリン依存性チロシンリン酸化量はむしろ増加し、下流のシグナルや糖・脂質代謝酵素の発現は増強されたまま維持されていることがわかった。これらの結果から、TG 肝臓の IRS-2 は、インスリン受容体によりチロシンリン酸化されやすくなっている可能性が考えられた。そこで、WT と TG 肝細胞からそれぞれ IRS-2 を調製し、インスリン受容体と ATP 存在下 *in vitro* リン酸化反応を行ったところ、WT 肝細胞より調製した IRS-2 と比較して、TG 肝細胞より調製した IRS-2 は、強くチロシンリン酸化されることを見出した。さらに、高塩濃度の緩衝液で予め免疫沈降物を洗浄し IRS-2 と相互作用するタンパク質を除去後、*in vitro* リン酸化反応を行ったところ、TG 肝細胞より調製した IRS-2 のチロシンリン酸化の増強は観察されなくなった。他の結果も併せると、TG 肝細胞では、IRS-2 は何らかタンパク質と相互作用し、インスリン受容体のより良い基質になっていると考えられた。

これまでに、インスリンは肝臓の PI 3-kinase の活性の上昇を介し、転写因子 sterol regulatory element binding protein (SREBP)-1c の発現量を遺伝子レベルで亢進させ、脂質合成酵素の発現を誘導することが明らかとなっている。この機構として、インスリンが核内受容体型転写因子である liver X receptor (LXR) の内在性リガンドを産生、活性化された LXR が SREBP-1c の発現を上昇させるモデルが提唱されている。そこで、TG 肝細胞において、このような機構が脂質合成酵素の発現の増強に関わっているかどうかを検討した。インスリンで WT、TG 初代培養肝細胞を処理したところ、TG 肝細胞の SREBP-1c の発現量は WT 肝細胞に比べ有意に増加し、この増加は LXR のアンタゴニストであるアラキドン酸の添加により部分的に抑制された。次に、LXR の合成アゴニスト T0901317 で WT、TG の初代培養肝細胞を処理し、SREBP-1c をはじめとした LXR の標的遺伝子の発現量を解析した。その結果、TG 肝細胞では、これらの遺伝子発現量が有意に増加した。これらの結果より、TG 肝細胞においては、インスリンシグナルの増強により LXR の内在性リガンドの産生が増加すると同時に、LXR のリガンドに対する応答性が亢進、これらが SREBP-1c の発現量の増加を促し、脂肪合成酵素群の発現誘導が増強されると結論した。

本研究により、GH のトランスジェニックラットをモデルとして、「筋肉・脂肪でインスリン抵抗性が発生しているが、肝臓においてインスリンシグナルが増強され、取り込んだ糖を脂質・グリコーゲンとして貯蔵、すなわち糖利用が増加、同時に糖新生が抑制され、糖放出が減少、その結果、肝臓の糖取り込みが増加し、他臓器で起こるインスリン抵抗性を補償する」という糖代謝の新しい恒常性維持機構の存在を明らかにすることができた。このような臓器間連携を介した血糖値を正常に維持する機構の解明は、インスリン抵抗性の新たな治療法の開発につながると期待している。