

論文の内容の要旨

論文題目 アディポネクチンによる肝臓での脂肪酸合成系の調節機構

指導教員 門脇 孝 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

栗澤 元晴

【背景】

脂肪細胞はアディポカインと呼ばれる種々の液性因子を分泌し、全身のエネルギー代謝に積極的な役割を果たしている。肥満に伴って生じる脂肪細胞の肥大化や脂肪組織への炎症細胞浸潤はアディポカインの分泌パターンを変化させ、インスリン抵抗性やメタボリック症候群を惹起する一因になっていると考えられている。

アディポネクチン(Ad)は肥満やインスリン抵抗性に伴って減少し、抗肥満、抗動脈硬化作用を持つと考えられるユニークなアディポカインである。Ad の作用として、これまで 5'-adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK)の活性化と peroxidase proliferator activator receptor (PPAR) α の活性化が知られており、これらを介した糖新生の低下、骨格筋における糖取り込みの促進、肝臓および骨格筋における脂肪酸燃焼の亢進の結果、血中インスリンの低下、脂肪肝の抑制などを介した二次的な作用と併せて全身性のインスリン感受性が維持されることが報告されている。

脂肪肝はインスリン抵抗性、メタボリック症候群の病態において重要な要素の一つであるが、fatty acid synthase (FAS)や acetylCoA carboxylase (ACC)-1 等の肝臓における脂肪酸合成系遺伝子の多くは、転写因子 sterol regulatory element binding protein (SREBP)1c により制御されている。SREBP1c は脂肪肝及びメタボリック症候群の病態形成において大きな位置を占めるものと考えられるが、Ad が SREBP1c 及び肝臓での脂肪酸合成系に与える影響については明らかではない。そこで本研究では、Ad による脂質代謝関連遺伝子の制御及びそのメカニズムを、培養細胞系及び *db/db* マウスを用いて検討した。

【方法】

クローニングした全長型マウス Ad を発現ベクターに導入、大腸菌から Ad を精製した。

7-8 週齢、雌の *db/db* マウスの腹腔内に 3 μ g/gBW の Ad を投与し、4 時間及び 8 時間後マウスの肝臓における mRNA 発現の変化を検討した。また、*db/db* マウスに対して、3 μ g/gBW の Ad を 2 週間連日腹腔内注射し、肝中性脂肪含量、各種遺伝子発現及び組織学的な検討を行った。

ラット肝細胞系の培養細胞である Fao 細胞を終濃度 25 μ g/ml のマウス全長型 Ad で刺激し、2 時間及び 8 時間後の遺伝子発現の変化を検討した。またマウス SREBP1c 遺伝子の 5' 側非翻訳領域・2.6Kbp を挿入した pGL2 ルシフェラーゼレポーターベクターを Fao 細胞に導入し、終濃度 25 μ g/ml の Ad で刺激してデュアルルシフェラーゼ定量システムによりプロモーターアッセイを行った。

Ad 受容体 AdipoR1 及び AdipoR2 の siRNA をアデノウイルスに導入した。7 週齢雌の *db/db* マウスの尾静脈より 4 \times 10⁹ pfu/gBW のウイルス液を注射し、7 日目に肝臓における遺伝子発現の変化を観察した。また、マウスの初代培養肝細胞を採取し、翌日 100 MOI のアデノウイルス液(MOI: multiplicity of infection = pfu/細胞数)にて遺伝子導入を行った。刺激実験においては終濃度 25 μ g/ml の Ad で刺激し、8 時間後の遺伝子発現を検討した。

AMPK の優性阻害型変異体 (DN AMPK) をアデノウイルスにより導入した。8 週齢雌の *db/db* マウスの尾静脈より 4 \times 10⁹ pfu/gBW のウイルス液を注射し、7 日目、空腹状態における肝臓の AMPK 及びそのリン酸化フォームの発現を観察した。

【結果】

3 μ g/gBW の Ad を *db/db* マウスの腹腔内に投与後、血中濃度は 1 時間で速やかに上昇し、24 時間に渡って対照マウスの約 2 倍の値を持続した(n=7-8, p<0.001)。この時、肝臓 SREBP1c の mRNA は投与後 4 時間で有意に低下した(1 \pm 0.180 vs 0.476 \pm 0.076, arbitrary unit, n=9, p<0.05)。この時血糖値及び血中インスリン値に差を認めず、SREBP1c の発現の変化が Ad の直接作用であることが示唆された。更にその下流である stearylCoA desaturase (SCD)-1 の遺伝子発現は 8 時間で有意に低下(1 \pm 0.129 vs 0.555 \pm 0.071, arbitrary unit, n=9, p<0.05)、ACC-1 の遺伝子発現も低下傾向を示した(1 \pm 0.053 vs 0.817 \pm 0.059, arbitrary unit, n=9, p=0.052)。

Fao 細胞においても、Ad による刺激後 8 時間で SREBP1c の発現は有意に低下した(1.098 \pm 0.059 vs 0.611 \pm 0.036, arbitrary unit, n=3, p<0.05)。更に SREBP1c の下流である FAS, ACC-1 の発現も 8 時間後に有意に低下した(それぞれ 1.176 \pm 0.029 vs 0.747 \pm 0.004, 1.121 \pm 0.034 vs 0.848 \pm 0.025, arbitrary unit, n=3, p<0.05)。次に、SREBP1c 遺伝子の 5' 側非翻訳領域・2600 の配列を有するルシフェラーゼベクター を Fao 細胞に導入し、Ad により 4 時間刺激すると、SREBP1c のプロモーター活性は有意に抑制された(1.967 \pm 0.084 vs 1.177 \pm 0.100, ルシフェラーゼ活性比, n=3, p<0.005)。以上から Ad は SREBP1c のプロモーター活性を低下させることにより、転写レベルで SREBP1c の発現を直接抑制するものと考えられた。

Ad の受容体には AdipoR1 および AdipoR2 の二つが存在する。私は AdipoR1, AdipoR2

の siRNA をアデノウイルスにより *db/db* マウスに導入することで肝臓での発現を抑制し、各遺伝子の発現の変化を検討した。AdipoR1 の発現抑制により肝臓の SREBP1c の発現は有意に増加し(1 ± 0.073 vs 1.424 ± 0.096 , arbitrary unit, $n=12\sim 13$, $p<0.005$), その下流である SCD-1 の発現も増加傾向を示していた(1 ± 0.127 vs 1.251 ± 0.166 , arbitrary unit, $n=12\sim 13$, $p=0.26$)。一方 AdipoR2 の発現抑制は SREBP1c 及び SCD-1 の発現を変化させなかった。

更に、マウスの初代培養肝細胞に対してアデノウイルスによる AdipoR1, AdipoR2 及び両者の発現抑制を行うと、AdipoR1 の発現抑制により SREBP1c の発現は上昇傾向を示した(0.732 ± 0.109 vs 1.013 ± 0.052 , arbitrary unit, $n=3\sim 4$, $p=0.051$)のに対し、AdipoR2 の発現抑制では SREBP1c の発現は変化しなかった。一方 AdipoR1 及び AdipoR2 両者の発現抑制を同時に行うと、AdipoR1 の発現抑制単独の場合と比較してより強い SREBP1c の発現上昇が見られた(0.732 ± 0.109 vs 1.319 ± 0.09 , arbitrary unit, $n=3\sim 4$, $p<0.01$)。更に、AdipoR1 の発現抑制下でマウス初代培養肝細胞に Ad を添加すると、対照においては有意な SREBP1c の mRNA の低下が認められたが(1.122 ± 0.051 vs 0.772 ± 0.078 , arbitrary unit, $n=3$, $p<0.05$), siAdipoR1 発現群においてその抑制は認められなかった。以上の結果から、Ad による SREBP1c の抑制作用は、AdipoR1 を介したものであることが示唆された。

Ad による SREBP1c の抑制作用が、実際に *db/db* マウスの肝臓において中性脂肪含量の低下に寄与するか否かを検証する目的で、Ad の連日投与を行った。2 週間の Ad 投与後、空腹時の肝中性脂肪含量は、Ad 投与群において低下傾向を示した(49.9 ± 2.67 vs 39.7 ± 3.98 mg/g, $n=8$, $p=0.059$)。この時肝臓における SREBP1c 及び SCD-1 の mRNA 発現は Ad 投与群において有意に低下しており(それぞれ 1.143 ± 0.136 vs 0.801 ± 0.132 , 1.634 ± 0.297 vs 0.639 ± 0.331 , $n=7\sim 8$, $p<0.05$)、これまでの結果と合致することが示された。

Ad による SREBP1c 抑制作用の機序を明らかとする目的で、DN AMPK をアデノウイルスにより肝臓で発現させた。AMPK のリン酸化は有意に低下し(1 ± 0.056 vs 0.253 ± 0.022 , arbitrary unit, $n=4$, $p<0.0001$)、Ad による SREBP1c の抑制の検討に相応しい実験系であると考えられた。

【結論】

私は今回 *db/db* マウスの肝臓において、Ad が SREBP1c の mRNA 発現を抑制することを見出し、この作用が Ad による直接のプロモーター活性の抑制によることを培養細胞の系で確認した。アデノウイルスを用いた検討では Ad による SREBP1c の抑制が AdipoR1 を介することが示唆された。また Ad の連日投与により、SREBP1c の抑制が脂肪肝の改善をもたらしていることを示した。その作用機序としては AMPK の活性化の関与が想定されたが、今後更なる検討が必要である。以上より Ad は肝臓において、脂肪酸燃焼のみならず、AdipoR1 を介して脂肪酸合成系も制御していることが示唆された。