〔論文の内容の要旨〕

論文題目　Analysis of dynamics of insulin-induced glucose transporter 4 (GLUT4) translocation and functional role of cytoskeleton remodeling in adipocytes
和訳　脂肪細胞におけるグルコーストランスポーター4(GLUT4)の細胞内挙動および細胞骨格の関与についての解析
指導教員　永井 良三 教授

東京大学大学院医学系研究科
平成 16 年 4 月入学
医学博士課程　内科学 専攻
細谷 弓子

生活習慣病の罹患率上昇に伴う心血管イベントのリスク増加は 現代の重要な医療問題の一つである。近年、高血圧・高脂血症・糖尿病といった生活習慣病の背景には 内臓脂肪の蓄積とその結果発生するインスリン抵抗性および動脈硬化が共通の発症基盤として存在すると考えられるようになり、これらの疾患を総称してメタボリックシンドロームと位置づけるようになった。このメタボリックシンドロームが 冠動脈疾患の独立した危険因子であることから、インスリン抵抗性に対する治療が循環器疾患の予防においても重要であると広く認識されるところとなった。

インスリン抵抗性とは、具体的には骨格筋・肝臓・脂肪組織などの臓器における インスリン刺激に対する反応の低下であると考えられる。全身の糖代謝において、脂肪組織でのインスリンに対する反応自体が占める割合は決して大きくない。例えば、インスリン投与に伴う骨格筋・脂肪組織での糖取込みにおいても、脂肪組織へ取込まれるグルコースの総量は決して多くはない。しかし、脂肪組織でのインスリン感受性の変動が 各種アディポサイトカインを介して

他臓器にも影響を及ぼし、全身の糖代謝に大きな影響を与えることが 遺伝子改変マウスを用いた研究で判明している。またヒトにおいても、内臓脂肪量がインスリン抵抗性と相関することが報告されており、脂肪組織におけるインスリン作用及びインスリン抵抗性の機序を解明することが 全身のインスリン抵抗性や糖代謝異常の治療法の開発につながると考えられる。

インスリンの主要作用の一つに 骨格筋及び脂肪細胞における糖取込みがある。この糖取込みはグルコーストランスポーター4（GLUT4）を含む小胞がインスリン刺激により細胞内から細胞膜へ移動し、細胞膜上に GLUT4 が表出して細胞内への糖輸送を行うことでもたらされる。

これまでの研究により、インスリン刺激による GLUT4 の細胞内移動（translocation）には PI3K や TC10 などを経由する複数のインスリンシグナル経路の関与が明らかとなっている。またイメージング技術の発達に伴い GLUT4 小胞の細胞内動態自体の解析も進んでおり、translocation が幾つかの段階を持つ複雑な運動であると判明しつつある。しかし、インスリンシグナルの伝達がどの其質を介して GLUT4 の挙動に直接働きかけるのか、また GLUT4 の複雑な挙動のどの段階を制御しているのかに関しては依然不明である。また、脂肪細胞においては表層アクチンがインスリン刺激によって形態変化（リモデリング）を起こし、GLUT4 の translocation に関わっていることが報告されているが、その具体的な役割もまた明らかではない。

本研究ではまず GLUT4 の細胞内動態におけるインスリンの作用点を明らかにすることを目的とし、eGFP-GLUT4-cmyc を導入した 3T3L1 脂肪細胞を対象として用い、レーザー共焦点顕微鏡を用いて生細胞での GFP-GLUT4 小胞の細胞内挙動を記録・観察した。インスリン刺激により GFP-GLUT4 小胞の細胞膜への translocation が観察され、これを核周辺と細胞膜における GFP 輝度比を計測することで定量化した（図１）。また、蛍光標識グルコースを用いた糖取込みの評価系を用いて、脂肪細胞の糖取込み能を評価し GLUT4 小胞の細胞内挙動の変化と比較検討した。

次にレーザー共焦点顕微鏡を用いた時間的・空間的高解像度のライブセルイメージングと FRET（ Fluorescence Resonance Energy Transfer ; 蛍光共鳴エネルギー移動）法を組み合わせた解析法を開発し、GLUT4 小胞の translocation を詳細に観察し、その過程を幾つかに段階化して解析を行った。GLUT4 小胞は細胞質内を直線的に移動して核周辺から細胞膜近辺に到達し、その一部が細胞膜に固定されて膜融合へと至る。本研究では特に細胞膜近辺での GLUT4 小胞の動きに着目し、その挙動を細胞膜直下での停留・細胞膜との接着・膜融合の

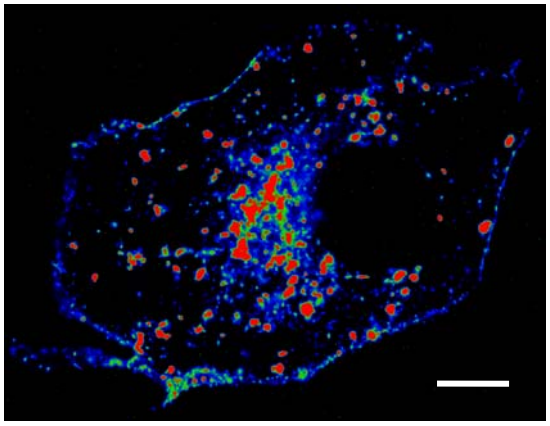
ステップに細分化し 各段階でのインスリンの影響を検討した。その結果、インスリン投与に伴い、GLUT4 小胞の細胞膜直下での停留時間が有意に延長し、また細胞膜との接着率も有意に上昇していた。即ち、この 2 段階が GLUT4 小胞の translocation におけるインスリン作用点であると考えられた。

さらに、GLUT4 小胞の挙動における細胞骨格の役割を検討した。既に微小管は細胞質内の GLUT4 小胞輸送に関わっていることが知られており、実際にコルヒチンを用いて微小管の重合を阻害すると GLUT4 小胞の細胞内輸送が消失し、インスリン刺激による translocation も消失した。
一方、同じく細胞骨格を形成するアクチンについては、既存の研究によって脂肪細胞の分化に伴いその形態を大きく変えることが報告されている。即ち、脂肪前駆細胞ではアクチンフィラメントは太いファイバー状の集積（ストレスファイバー）を示すが、脂肪細胞へと分化するに従い 形質膜直下にスポット状に分布する表層アクチンと呼ばれる像へと変化する。この表層アクチンという特殊な形態が インスリン投与前後でどのような変化を示すかを 成熟脂肪細胞を用いた固定染色標本にて観察したところ、インスリン刺激により表層アクチンが細網状に増殖し、さらに GLUT4 小胞を捕捉している像が得られた。アクチンの重合阻害剤であるサイトカラシン D で細胞を予め処理すると、このインスリン刺激に対する表層アクチンの形態変化（リモデリング）や GLUT4 の捕捉現象は認められなくなった。 そこで同様にサイトカラシン D で前処理した脂肪細胞を用いて GLUT4 小胞の translocation の解析を行い、GLUT4 小胞の細胞内挙動が表層アクチンの形態変化によりどのような影響を受けるか検討した。サイトカラシン D 投与により、インスリン刺激に伴う GLUT4 小胞の translocation は消失した。さらに GLUT4 小胞の挙動を各段階に分けて解析すると、細胞質内での輸送速度に変化は認めなかったが インスリン刺激後の細胞膜直下での停留時間の延長や細胞膜との接着率の上昇は消失していた。この結果から、インスリン刺激に伴う表層アクチンのリモデリングが 細胞膜直下での GLUT4 小胞の挙動に影響し translocation に関与している可能性が示唆された。
さらに、この表層アクチンのリモデリングに関わる分子を検索するために アクチン結合蛋白のスクリーニングを行った。 対象とした蛋白のうち Dynamin2 が成熟脂肪細胞で発現が顕著に増加すること、また免疫組織化学でも表層アクチンと共局在することが確認され、GLUT4 小胞の挙動にも関与している可能性があると考えた。siRNA を用いてこの Dynamin2 発現を抑制した脂肪細胞を用いて GLUT4 小胞の挙動解析を行ったところ、インスリン投与後の GLUT4 小胞の translocation は消失し、細胞膜への停留時間の延長や接着率の上昇も顕著に抑制された。

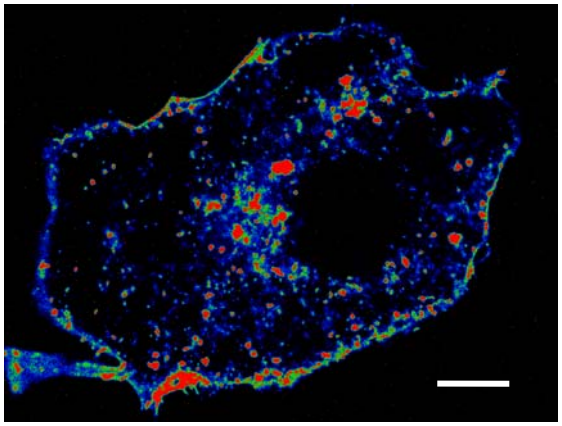
以上の結果より、インスリン刺激による GLUT4 小胞の translocation は 細胞膜近辺での GLUT4 小胞の停留時間の延長及び細胞膜との接着率の上昇によりもたらされることが判明した。またこの細胞膜近辺での GLUT4 小胞の挙動変化にはインスリン刺激による表層アクチンのリモデリングが重要な役割を担っており、Dynamin2 も協働蛋白として関与していることが示唆された（図２）。さらに興味深いことには、インスリン投与後の経過時間による GLUT4 小胞の細胞内挙動の変化を各段階で解析したところ、インスリン刺激による細胞膜との接着率の上昇は投与 30 分後でも残存しており、他段階よりも長時間インスリンの効果が持続していると考えられた。即ち、インスリン刺激に伴う細胞骨格のリモデリングは GLUT4 小胞の translocation を長時間にわたり促進し、インスリン作用の持続に寄与している可能性が示唆された。

脂肪細胞における糖取込みは 血糖降下に対する実際の貢献度は比較的小さいものの、内分泌的に他臓器に与える影響を介して 全身の糖代謝に関与する重要なインスリン作用であると考えられている。その糖取込み作用の本態である GLUT4 の translocation についてはこれまでも様々な研究がなされ、その動態や制御機構が 多数のインスリンシグナルや細胞骨格の関与する複雑な過程であることが明らかになってきた。しかし、その動態が複雑であるために 従来の分子生物学的手法だけでは制御機構を明確にすることが困難であり、共焦点顕微鏡や全反射顕微鏡などを用いたライブセルイメージング技術の発達が この問題の克服に大きく貢献すると期待されている。特に近年報告されている全反射顕微鏡を用いた研究は、細胞膜上での GLUT4 小胞の挙動を詳細に分析するために非常に有用であった。しかし、観察可能範囲が細胞膜上にほぼ限定されるため、細胞全体にわたる GLUT4 小胞の動態全貌を捉える事は困難であった。本研究では共焦点顕微鏡を用いた高解像度のライブセルイメージングと FRET 法を組み合わせた新たな解析手法を用いて GLUT4 小胞の挙動を全段階にわたり詳細に観察し、インスリンの作用点及び細胞骨格の具体的な役割について新たな知見を得た。特に表層アクチンのリモデリングは インスリン作用の持続性への関与も示唆され、今後 インスリン抵抗性治療の新たな創薬ターゲットとなる可能性があると思われる。しかし、インスリンシグナル経路がどのように関与するかなど 未解決な点も多く残されており、今後 分子生物学手法を併用したさらなる追究が必要である。

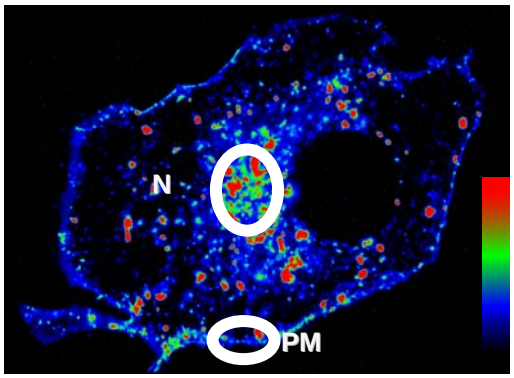
図１．インスリン刺激による GFP－GLUT4 小胞の細胞内移動（translocation）と GFP 輝度を利用した定量化

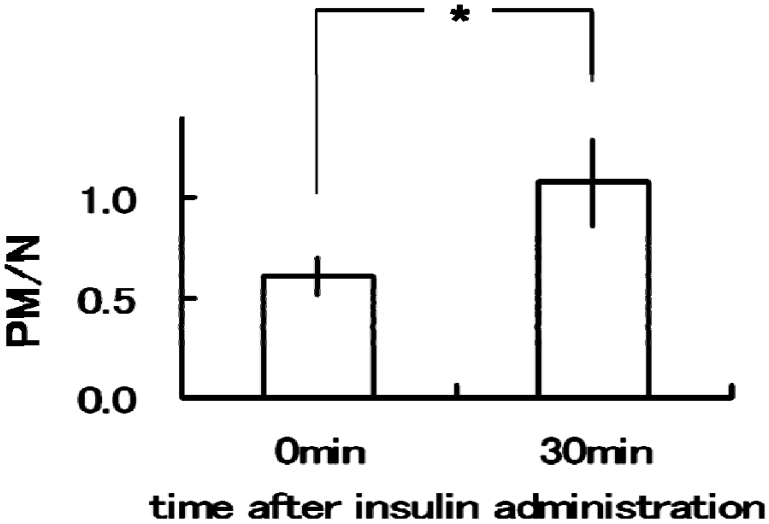


インスリン投与前



インスリン投与 30 分後





インスリン刺激によって eGFP－GLUT4 小胞は細胞膜へと移動する（translocation）ため、細胞膜での GFP 輝度が相対的に上昇する。

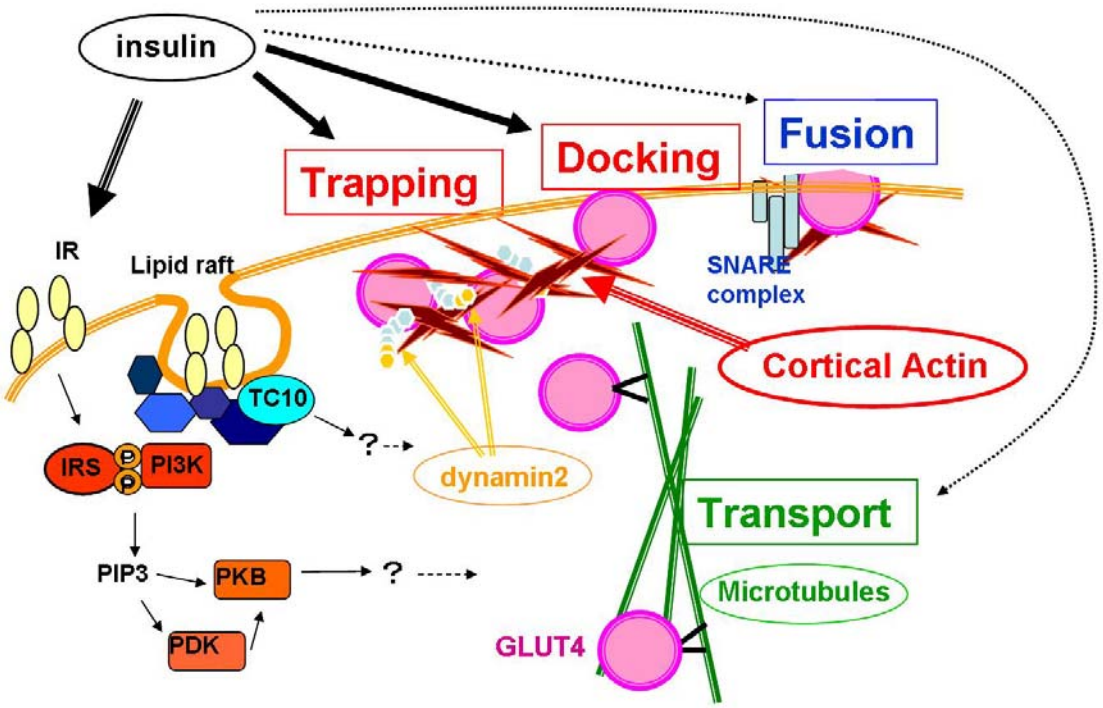



図２．GLUT4 小胞の細胞膜近辺での挙動と細胞骨格の関与