

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻

平成 17 年度博士課程進学

氏 名 長谷川 高士

指導教員名 高橋 伸一郎

論文題目 脂肪細胞への分化過程におけるインスリン受容体基質の
量変動の生理的意義の解明

動物の生体内で脂肪細胞は、余剰なエネルギーを中性脂肪として貯蔵し、これらを必要に応じて分解して他の臓器に遊離脂肪酸として供給するという役割を担っている。したがって、必要以上にエネルギー摂取を続けると、脂肪細胞へ過剰な脂肪蓄積が起り肥満となり、先進国で深刻な医療問題となっているメタボリックシンドロームなどを誘発する。

脂肪細胞が脂肪蓄積機能を獲得するためには、内分泌因子などに応答して脂肪前駆細胞の分化が誘導され、成熟脂肪細胞となることが必要である。多くの研究者の長年の努力により、脂肪細胞への分化誘導の分子機構が明らかにされつつある。例えばモデル細胞として汎用されているマウス 3T3-L1 細胞では、グルココルチコイドと cAMP 刺激が転写因子 CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) β を誘導し、これが転写因子 C/EBP α 、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ などの転写を促進して脂肪細胞への分化が決定され、更にこれらの転写因子が脂肪蓄積に関わる種々のタンパク質、glucose transporter (GLUT) 4、stearoyl-Coenzyme A desaturase (SCD) 1 などの発現を増加させる結果、成熟脂肪細胞として機能すると考えられている。

一方、3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化・成熟の誘導には、グルココルチコイドと cAMP

刺激と同時に insulin-like growth factor (IGF)/インスリン刺激も必要であることが示されている。IGF は生体の栄養状態、インスリンは食事刺激に応じて産生・分泌が制御されており、*in vivo* レベルでの生理活性として、動物の成長促進、タンパク質あるいは糖・脂質代謝の同化の促進を挙げることができる。細胞レベルでは、IGF は他のホルモンや成長因子と協働して多くの細胞の増殖、分化、生存などを促進し、インスリンは糖・アミノ酸膜透過や糖利用を促進する。一般に IGF/インスリンは、細胞膜上の特異的な受容体に結合すると、受容体内蔵型チロシンキナーゼを活性化し、基質である insulin receptor substrate (IRS) をチロシンリン酸化する。次いで、チロシンリン酸化 IRS を認識して SH2 ドメインを有したシグナル分子、例えば phosphatidylinositol (PI) 3-kinase が結合、下流の PI 3-kinase 経路などを活性化、広範な生理活性を発現すると考えられている。IRS には 4 つの分子種があるが、そのうち IRS-1、IRS-2、それぞれの遺伝子をノックアウトしたマウス胎児胚より調製した繊維芽細胞において、脂肪細胞への分化誘導が抑制される結果は、IRS を介したインスリン様シグナルが脂肪細胞の分化誘導に重要な役割を果たしていることを示している。一方、PI 3-kinase 経路では下流シグナル分子であるセリン/スレオニンキナーゼ Akt の活性化が glycogen synthase kinase (GSK) 3 β のリン酸化・不活性化を誘導するが、最近になり、活性型 GSK3 β は C/EBP β をセリンリン酸化し転写因子の活性化を誘導する、すなわちインスリン様シグナルが C/EBP β を不活性化するという報告もある。

このような背景のもと、本研究では、3T3-L1 細胞を用いて脂肪細胞への分化・成熟誘導における IGF/インスリンの役割を、細胞内シグナル伝達の観点から明らかにすることを目的とした。

脂肪細胞への分化過程および成熟過程におけるインスリン様シグナルの変動

コンフルエントまで培養した 3T3-L1 脂肪前駆細胞を更に 2 日間培養後、IGF-I 受容体を活性化するために高濃度インスリン、合成グルココルチコイドであるデキサメタゾン、そして細胞内 cAMP 濃度を上昇させるために phosphodiesterase 阻害剤イソブチルメチルキサンチンを牛胎児血清と共に加え、4 日間分化を誘導した (分化誘導期)。その結果、この時期には C/EBP α 、PPAR γ の誘導が確認された。その後、インスリンと牛胎児血清のみを含む培地に切り替えて培養を続け、脂肪細胞を成熟させた (成熟誘導期)。この時期には、GLUT4 や SCD1、11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β HSD1) などの発現が観察され、Oil red O 染色などにより脂肪蓄積も確認できた。そこでこの細胞系を用いて、分化誘導期および成熟誘導期のインスリン様シグナル分子の動態を経時的に解析した。まず、分化誘導にตอบสนองして IGF-I 受容体の量・チロシンリン酸化が徐々に減少したのに対して、インスリン受容体の量・チロシンリン酸化が漸増し、分化から成熟への進行にตอบสนองして IGF からインスリンへのインスリン様シグナルの切り替えが起こることがわかった。一方、IRS-1 の量・チロシンリン酸化は分化誘導開始 1 日目に著減し、4 日目以降に再び増加した。これに対して、IRS-2 の量・チロシンリン酸化は分化誘導開始 1 日目に増加し、成熟誘導期

にかけて減少した。IRS-1あるいはIRS-2に相互作用するPI 3-kinase量は、それぞれのIGFのチロシンリン酸化を良く反映していたが、Akt活性を示すAktのセリン/スレオニンリン酸化はIRS-1のチロシンリン酸化の抑制と良く相関していた。このようにIRS-1とIRS-2を介したシグナルは、それぞれのタンパク質の量調節を介して異なる様式でダイナミックに制御されることが明らかとなった。

脂肪細胞への分化誘導に応答したIRS-1量の減少が分化誘導に果たす役割

分化誘導に応答して起こるIRS-1量の減少およびAkt活性の抑制の生理的意義を明らかにするために、アデノウイルスベクターを用いてIRS-1、あるいは細胞膜にアンカリングし高いキナーゼ活性を維持することが明らかとなっているmyristoyl-Akt (myr-Akt)を3T3-L1脂肪前駆細胞に高発現した。この細胞に定法どおり脂肪細胞への分化・成熟を誘導し、IGF/インスリンシグナルおよび脂肪細胞への分化・成熟のマーカーの変動を解析した。まず、IRS-1高発現細胞では、分化誘導に応答して対照細胞で観察されるIRS-1の量・チロシンリン酸化およびIRS-1と結合するPI 3-kinase量の減少が観察されず、AktおよびGSK3βのリン酸化も高いレベルを維持していた。この際、IRS-1高発現は、C/EBPα、PPARγの発現誘導を抑制、これらの転写因子の標的遺伝子であるGLUT4、11βHSD1の発現も有意に減少させた。更にOil red O法により脂質を染色したところ、対照細胞と比較してIRS-1高発現細胞では脂肪蓄積が全体的に少ないが、いくつかの部分ではスポット状に強い染色が観察されることが明らかとなった。一方、myr-Akt高発現細胞ではIRS-1高発現細胞と同様に、GSK3βのリン酸化が強くなり、C/EBPαやPPARγの発現も有意に減少した。更に、GSK3に対する特異的阻害剤を、脂肪細胞への分化誘導期に添加すると脂肪蓄積は阻害されるが、成熟誘導期に添加しても脂肪蓄積の阻害が観察されない結果は、GSK3が分化誘導期に機能していることを示唆している。他の研究グループの研究成果も合わせ、IRS-1の減少は、インスリン様シグナルを遮断することによってGSK3βの活性化を引き起こし、C/EBPβのリン酸化・活性化を介してC/EBPαやPPARγの転写を誘導、脂肪細胞への分化を決定づけていると結論した。

脂肪細胞への分化誘導に応答したIRS-2量の増加が成熟誘導に果たす役割

分化誘導に応答して起こるIRS-2量の増加の生理的意義を明らかにするために、siRNA法を用いてIRS-2をノックダウンした。先と同様に、この細胞に定法どおり脂肪細胞への分化・成熟を誘導し、IGF/インスリンシグナルおよび脂肪細胞への分化・成熟のマーカーの変動を解析した。IRS-2ノックダウン細胞では、IRS-2量が対照細胞と比較して25%程度まで減少し、この抑制効果は分化誘導6日目までは持続していた。この際、Aktのスレオニンリン酸化も抑制された。しかし、GSK3βのリン酸化は影響を受けず、C/EBPα、PPARγ、これらの標的遺伝子であるGLUT4、SCD1、11βHSD1、脂質代謝酵素の発現に関わる転写因子であるsterol regulatory element binding transcription factor (SREBP) 1とともに、対

照細胞と差異は観察されなかった。しかし、Oil red O 染色により、IRS-2 ノックダウンが脂肪蓄積の抑制を誘導することがわかった。これらの結果は、IRS-2 量の増加は、脂肪細胞への分化誘導には寄与しないが、今回解析した以外の経路で脂肪細胞の成熟に重要な役割を果たしていると考えられた。

脂肪細胞への分化誘導に応答した IRS 量の調節機構

最後に分化誘導に応答した IRS-1 量の減少、IRS-2 量の増加の調節機構を検討した。まず、IGF/インスリン、グルココルチコイド、cAMP 刺激のうち、どの分化誘導因子が IRS 量を変動させるのかを調べた。その結果、IRS-1 の減少には IGF/インスリン、グルココルチコイド、cAMP 刺激のすべてが必要で、IRS-2 の増加は主に cAMP 刺激に応答して起こることが明らかとなった。また、分化誘導直後に IRS-1 の mRNA が有意に減少し、同時に IRS-1 タンパク質の減少はプロテオソーム阻害剤 MG132 の添加により回復することから、IRS-1 の減少は転写抑制とタンパク質分解を介していると考えられた。これに対して、IRS-2 の増加は主に mRNA の増加によることが明らかとなった。このように、分化誘導因子の刺激に応答して、IRS-1 と IRS-2 は異なる機構により量のダイナミックな制御が行われていることがわかった。

本研究の成果により、これまで脂肪細胞の分化誘導に重要な役割を果たしていると考えられてきた IGF は、むしろ脂肪細胞への分化誘導を抑制しており、分化誘導因子は IRS-1 量を減少させることにより IGF シグナルを遮断、その結果、脂肪細胞への分化誘導が決定づけられることを明らかにした。一方、脂肪細胞への成熟誘導にはインスリン様シグナルが必要で、この際 IRS-2 量の増加を介して脂肪蓄積が促進される。この分子機構は今後の課題である。生体内では栄養状態の悪化に伴って分泌されるグルココルチコイドやカテコラミンによって脂肪前駆細胞の IRS の量が調節され脂肪細胞への分化が決定づけられる、ここに十分なエネルギー基質が循環すると、IGF/インスリンの産生・分泌が起こり、脂肪細胞の成熟が進んで脂肪蓄積が起こる。このように考えると、これらの内分泌因子に応答した脂肪細胞への分化・成熟誘導の分子機構は極めて合目的的といえる。今回、私が明らかにした IRS の量調節を介した脂肪細胞への分化・成熟誘導機構に関する研究成果は、今後、脂肪細胞への分化・成熟や脂肪蓄積の異常が原因である種々の疾患に対する新しい治療法の開発の基礎になるものと期待している。