

## 論文内容の要旨

論文題目 肥満・糖尿病における Wilms' tumor 1-associating protein の  
役割の解明

指導教員 門脇 孝 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

小林 正稔

肥満・糖尿病の発症・増悪過程においては、高血糖の増悪に先行して膵β細胞が代償性に増殖し、高インスリン血症による代償が生じるが、その代償性機構の破綻が2型糖尿病発症原因の一つと考えられている。従ってこの代償機構の破綻のメカニズムを明らかにし、これを防ぐことができれば新規の2型糖尿病の治療につながるものと期待される。そこで我々のグループでは、インスリン抵抗性下における膵βの代償性増殖機構に関与する分子を同定することを目的として、インスリン抵抗性マウスモデルの膵島細胞における網羅的発現解析を施行したところ、細胞周期調節因子の一つであるCyclin A2が上昇することを見出した。

細胞周期関連因子と疾患の関連は、腫瘍や発生、老化に関する研究ばかりでなく、肥満・糖尿病に関するものも数多く報告されている。特に膵β細胞の増殖障害は糖尿病の主要な原因となると考えられるため、Cyclin D1、CyclinD2、

Cdk4、p21<sup>Cip1</sup>などの多くの報告がある。また脂肪細胞についても、Cyclin D1、Cyclin D3、Cdk4などがPPAR $\gamma$ の転写活性調節を介して脂肪細胞分化にかかわるということばかりでなく、p21<sup>Cip1</sup>、p27<sup>Kip1</sup>、Skp2などが脂肪細胞の数の制御に関わるということが近年明らかになってきた。

我々が着目したCyclin Aは、細胞周期においてサイクリン依存性キナーゼCDK2、CDK1と複合体を形成し、G1/S、G2/Mの移行に働くとされる。Cyclin A1は生殖系列に特異的に発現するのに対し、Cyclin A2は体細胞で発現している。全身のCyclin A2ホモノックアウトマウスは、着床前胚盤胞後期までは発育するものの胎生5.5日以降に致死となり、成体のヘテロ欠損マウスの詳細な表現型は報告されていない。膵 $\beta$ 細胞においてCyclin Aが果たす機能の報告は多くなく、膵 $\beta$ 細胞特異的ノックアウト動物の表現型も報告されていない。そしてCyclin A2が脂肪細胞や、肝臓・骨格筋などのインスリン感受性臓器に作用して、肥満・糖尿病の病態に関与するという報告は未だない。

一方、一方Wilms' tumor 1-associating protein (Wtap) がCyclin A2の制御因子として働くということがHoriuchiらにより近年報告された。WtapはCyclin A2のmRNAの3'-UTRの特異配列に結合し、mRNAの安定化に働く。従って、上述の如く細胞周期関連因子が一般に膵 $\beta$ 細胞やインスリン感受性臓器で重要な働きを担っていることが多いことを勘案すると、肥満およびインスリン抵抗性下における糖代謝変化に、細胞周期調節因子であるCyclin A2とその制御因子Wtapが関与する可能性も考えられる。

WtapはLittleらによりyeast-two-hybrid screen法を用いて、腫瘍抑制遺伝子産物でありまた泌尿生殖器系の発生に必須の因子であるWilms' tumor-1

(WT-1) に結合する核蛋白として同定された。Horiuchiらはヒト臍帯静脈内皮

細胞株 (HUVEC) において、*Wtap*のsiRNAによりCyclin A2蛋白が低下し、G2/M期で細胞周期回転が停滞しHUVECの増殖が抑制されるのに対し、アデノウイルスを用いたCyclin A2の回復により細胞周期回転の停滞が部分的に解除されることを報告し、そのメカニズムとして*Wtap*がCyclin A2のmRNAの3'-UTRの特異配列に結合し、mRNAの安定化に働くことを示した。さらに*Wtap*欠損マウスの解析を行い、ホモ欠損マウスは、胎生6.5日には致死となり、これがCyclin A2ホモ欠損マウスの表現型と一致することを報告している。*Wtap*は全身にユビキタスに存在しており様々な臓器で働く可能性があるが、*Wtap*の機能は多くが未知のままで、*Wtap*ヘテロ欠損マウスについての解析はほとんどなされておらず、糖代謝および肥満に関連する機能については全く報告されていない。さらにHoriuchiらによると、血管内皮細胞において*Wtap*をノックダウンした時に変化する遺伝子をマイクロアレイで解析すると、発現が低下した上位の遺伝子に細胞周期関連因子が多く認められるのに加えて、発現が上昇する遺伝子の上位には代謝・炎症・細胞接着にかかわる遺伝子が多く認められたと報告されている。

そこで我々は、本研究においてCyclin A2および*Wtap*が肥満および糖代謝に関与するという仮説をたて、肥満モデルマウスである*ob/ob*マウスを用いて、膵島細胞および白色脂肪組織 (WAT) のCyclin A2および*Wtap*の発現を検討した。すると*ob/ob*マウスの膵島細胞においてCyclin A2ならびに*Wtap*の発現の増加を認めた。さらに*Wtap*は白色脂肪組織においても発現が上昇していた。このことから*Wtap*はCyclin A2とならんで、インスリン抵抗性下・高血糖下でおこる組織の細胞増殖・代謝変化に関わる可能性が示唆されたため、その機能を解析することにした。特に*in vivo*における*Wtap*の役割を明らかにするため、*Wtap*へ

テロ欠損マウスの解析を中心に行った。

その結果、*Wtap*ヘテロ欠損マウスは野生型に比し体重および体脂肪率が小さく、その差は高脂肪食でより著明となった。また *Wtap*ヘテロ欠損マウスは高脂肪食で惹起される脂肪肝が著明に抑制されていた。現在までの解析では *Wtap*ヘテロ欠損マウスの膵β細胞が減少している可能性は否定できなかったが少なくとも本実験の条件下においては耐糖能を悪化させる影響は認められず、*Wtap*ヘテロ欠損マウスは野生型と比較してインスリン負荷試験においてインスリン感受性が高く、経口ブドウ糖負荷試験において良好な耐糖能を示した。そしてインスリンシグナル伝達試験により、肝臓および骨格筋においてインスリン受容体シグナル伝達が亢進（肝臓においてはインスリン受容体およびIRS-2の、骨格筋においてはIRS-1のチロシンリン酸化が亢進）していた。また血清脂質について検討すると、*Wtap*ヘテロ欠損マウスは野生型と比較して、高脂肪食下で中性脂肪・総コレステロールおよび遊離脂肪酸（FFA）が有意に低値であった。次に、肥満によるインスリン抵抗性増大のメカニズムとして、脂肪細胞の肥大化により、インスリン抵抗性を惹起するアディポカインが増加する一方、インスリン感受性を改善させるアディポカインが減少することが近年明らかになってきているため、脂肪組織の組織学的解析および血中アディポカインの解析を行った。すると *Wtap*ヘテロ欠損マウスの脂肪細胞は、普通食下および高脂肪食下ともに野生型と比較して有意に小型であった。そして血中のアディポカインにおいては、糖代謝改善作用をもつアディポネクチン値には有意差を認めず、高脂肪食下でのmonocyte chemoattractant protein-1（MCP-1）の血中レベルの上昇が有意に抑制されていた。脂肪組織からのMCP-1によりマクロファージが脂肪組織に集積して、脂肪組織での炎症をもたらすことが肥満によるインスリ

ン抵抗性惹起の一因となることが近年明らかになっているため、*Wtap*ヘテロ欠損マウスの脂肪組織におけるマクロファージについて検討した。すると、高脂肪食を負荷した *Wtap*ヘテロ欠損マウスのWATにおいて、免疫組織化学によりマクロファージ特異的分子マーカーF4/80の陽性細胞数が野生型と比較して有意に抑制されており、別のマクロファージ特異マーカーであるCD68、MMP-12の発現も有意な低下を認め、マクロファージの脂肪組織への浸潤が低下していることが示唆された。また近年、肝臓におけるマクロファージも肝細胞に影響を与えることにより糖代謝に影響を与えうることが報告されているため、*Wtap*ヘテロ欠損マウスの肝臓について解析したところ、高脂肪食負荷により野生型マウスの肝臓では免疫組織化学でF4/80陽性細胞が多数認められるのに対して、*Wtap*ヘテロ欠損マウスの肝臓ではこれが有意に抑制されており、CD68およびMMP-12の発現も有意な低下を認め、MCP-1の発現も有意に低下していた。また、マクロファージ由来と考えられるサイトカインであるTNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ の発現も有意に低下していた。

以上の結果から、*Wtap*欠損マウスは、脂肪細胞の小型化、脂肪組織へのマクロファージ浸潤の抑制、血中MCP-1およびFFA濃度の低下、肝臓における脂肪蓄積の抑制と肝臓マクロファージ特異マーカーの減少が少なくともその原因の一部となって、肥満への抵抗性およびインスリン感受性の亢進を呈したと考えられた。

本研究は、新規の肥満・糖尿病の増悪因子候補として*Wtap*を見出した。また*Wtap*が肥満・糖代謝に関わりうるということを初めて示した。*Wtap*がいかなる分子メカニズムによって、これら脂肪細胞、肝臓、マクロファージに影響するかは現時点では明らかではないが、*Wtap*の作用機構や制御機構を明らかにし、

特異性のあるWtapの阻害薬あるいはWtapの標的因子への阻害薬が見いだされば、より有望な抗肥満・抗糖尿病薬の創薬へつながるものと期待され、今後の研究の発展が望まれる。