

論文の内容の要旨

論文題目 脂肪細胞のインスリン抵抗性における p21^{WAF1/CIP1} の関与の分子機構

指導教員 門脇 孝 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月入学
医学博士課程
内科学専攻
久保田みどり

近年、自然科学や工業技術の発達により、我々のライフスタイルは便利で豊かなものへと劇的に変化した。例えば、第 2 次世界大戦以降、高度経済成長により食生活の欧米化が進んだことにより、我々の摂取するエネルギーは増加し、過剰となりがちである。しかし、その一方で自動車やコンピューターの発達により、我々が消費するエネルギーは減少する一方である。この摂取エネルギーと消費エネルギーのアンバランスにより、現在、先進諸国では肥満が流行している。肥満は心血管疾患や糖尿病の主要な危険因子であり、肥満の発症機序の解明や、それに伴うインスリン抵抗性といった病態との関連の解明は現代医学にとって最重要課題のひとつである。

脂肪細胞は、近年の生活習慣の変化による肥満の増加や、肥満に起因するメタボリックシンドロームなどの生活習慣病の蔓延に伴って、その新たな内分泌器官としての機能が認識されるようになり、脂肪細胞の分化・増殖・肥大化などのメカニズムの解明が、生活習慣病の予防・治療に直接結びつくことが期待されるようになってきている。脂肪細胞の増殖は勿論のこと、その分化においても細胞周期調整が極めて重要な役割をはたしていることが近年あきらかになりつつある。

脂肪細胞の分化の過程は、マウス繊維芽細胞由来の前駆脂肪細胞の特性を持つ Cell line である 3T3-L1 細胞や 3T3F422A 細胞を特定の条件下で培養することにより観察される^{1,2)}。脂肪細胞への分化には前脂肪細胞の増殖の停止を含む一連の流れが必要とされ、Clonal Expansion と呼ばれるステップを経た後、脂

脂肪細胞への分化の過程へと進み細胞内に脂肪の蓄積が生じる。それゆえ、細胞周期の制御に関わる因子は、脂肪細胞の分化の過程で重要な役割をもつことが推定できる。

哺乳類の細胞における細胞周期の進行は、Cyclin family や CDKs (Cyclin-dependent kinase) と呼ばれる kinase、そして CDKs の作用を阻害する CKIs (Cyclin-dependent kinase inhibitors) などの様々なタンパク質により調節されている。

p21^{WAF1/CIP1} と p27^{KIP1} は主要な CKI であり細胞周期を G1 で停止させる。p21 と p27 は様々な分野に関連付けられた研究がなされており、脂肪細胞への分化の過程においては p21 と p27 の発現が変化することが報告されている。また、p21 は Foxo1 と呼ばれる転写因子により発現が誘導され、脂肪細胞への分化に向かうための Clonal expansion に関与していることが報告されている。一方、p27 は脂肪細胞が肥大化するのに重要であることが報告されている。

p21 は細胞に対するストレスに応答する転写因子である p53 のターゲット遺伝子であり、G1 arrest を引き起こすのみならずアポトーシスから細胞を守る働きがあることがよく知られているが、最近、我々の研究室において p21 が脂質代謝や脂肪細胞形成に関わる転写因子である SREBPs (Sterol Regulatory Element-Binding Proteins) の直接的な遺伝子ターゲットであることを発見した。さらに我々は、p53 ならびに p21 の発現が肥大化した脂肪組織と肥満モデルマウスの肝臓において上昇していることを報告した。

肥満は栄養過多および運動量の減少によって引き起こされるが、脂肪細胞の過形成と細胞の増大によって説明される脂肪組織の脂質の過剰な蓄積により特徴づけられる。肥満はしばしば、インスリン抵抗性に先行し、2型糖尿病や心血管イベントの原因となる。脂肪細胞の分化が欠如することはインスリン抵抗性に関係すると考えられている。CKIs が細胞周期の進行とアポトーシスにおいて重要な役割を担っていることを考えると、CKIs が脂肪細胞の分化と脂肪組織の成長を通して、肥満とインスリン抵抗性に関係しているという見解をもつことが可能と思われる。

そこで我々は脂肪細胞分化および肥大化における p21 の役割、ひいては肥満とインスリン抵抗性における p21 の重要性を検討することとなった。

培養細胞を用いた *in vitro* の系においては、p21 は脂肪細胞への分化に重要な役割を担っていることが分かり、また肥満モデルマウスを用いた *in vivo* の両方の系においては、p21 が肥大化した脂肪細胞が維持された状態、すなわち肥満からくるインスリン抵抗性に対し決定的な因子であることが示された。脂肪細胞に分化する前の 3T3L1 繊維芽細胞の p21 を RNAi によりロックダウンさせると、脂肪細胞への分化が著しく阻害された。

また、普通食を食べさせた p21KO マウスは脂肪組織重量や脂肪細胞のサイズ、血中のグルコース、インスリン、脂質、レプチンの濃度は Wild type と変わらなかったが、高脂肪食負荷をかけた p21KO マウスにおいては、脂肪組織重量や脂肪細胞のサイズが減少しており、Wild type に比べ明らかにインスリン感受性が改善していた。高脂肪食負荷をかけた p21KO マウスの肥大した精巢上体脂肪組織と、十分に分化した 3T3-L1 脂肪細胞において p53 による多大なアポトーシスが認められることから、p21 は脂肪細胞の分化と、肥大した脂肪細胞から保護するという両方の作用に関わっていることが示された。

これらの結果により、p21 は高脂肪食負荷のマウスにおいて脂肪細胞の肥大をきたし、そしてそれは病態学的にいわゆるインスリン抵抗性のような下流の一連の流れへと繋げる役割を担っていることが考えられる。

我々は以上の結果から、脂肪細胞における p21 の過剰発現がインスリン抵抗性を惹起するのではないかと仮定しさらに研究を進めていくこととした。

そこで、脂肪組織特異的 p21 過剰発現マウスの樹立を試みた。脂肪組織に目的の遺伝子を過剰発現させる際に広く用いられている aP2 プロモーターの下流にマウスの p21 遺伝子を繋げたコンストラクトを作成し、そのコンストラクトを用いて aP2-p21 トランスジェニックマウスの Founder マウスを計 2 匹得ることが出来たが、両マウスともに脂肪細胞での p21 の高発現は見られなかった。

次に、脂肪細胞における p21 のインスリン抵抗性に及ぼす影響を調べるため、ラットの白色脂肪組織より単離された primary mature adipocyte および 3T3-L1 細胞において、インスリン刺激での³H]- 2-Deoxy-D-glucose (2-DG) の取り込みに与える p21 の影響を検討した。アデノウイルスにより p21 を過剰発現させた結果、インスリン刺激による 2-DG の取り込みを有意に減少させた。また、この作用は Tet-on システムを用いた 3T3-L1 細胞での急速な発現誘導においても確認された。

また、p21-shRNA 発現アデノウイルスにより 3T3-L1 細胞の p21 をノックダウンすると 2-DG の取り込みは有意に増加した。

このメカニズムに関し、p21 のインスリンシグナル伝達に対する影響を見たところ、p21 の過剰発現ではインスリン刺激による Akt のリン酸化には影響が見られなかったことから、p21 のインスリンシグナルに対する作用は Akt より下流にターゲットがあることが示唆された。

また、p21 の直接の標的分子候補として、低分子化合物の cdk inhibitor である Roscovicine と Purvalanol A によってもインスリン刺激による 2-DG の取り込みは有意に減少したことから、cdk のインスリン抵抗性への関与も示唆された。

以上の結論として、脂肪細胞において p21 はインスリン作用に阻害的な効果をもつということが示された。またそれ故に、p21 は肥満とインスリン抵抗性の

mechanic link であると言える。