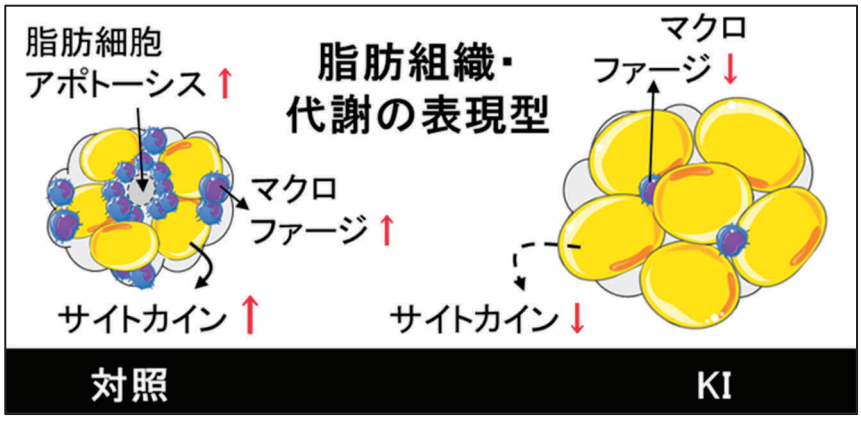
160　脂肪細胞の微小管捕捉因子を介した糖脂質代謝制御	大熊　英之

【目的】これまで、遺伝子工学的手法により臓器選択的なインスリン（Ins）作用の制御が試みられてきた。特に、肝臓よりも脂肪細胞優位に Ins 作用を高めることにより、肝臓への脂肪蓄積を促進することなく肥満に伴う糖脂質代謝異常の改善に寄与する可能性が報告されている。著者らは、発現データベースを用いた比較より、肝臓や骨格筋には低発現であるが脂肪組織において発現が顕著である pleckstrin homology-like domain family B member 1（PHLDB1）に着目した。微小管捕捉因子として知られる PHLDB1 は、微小管の位置決定に関与する一方、Ins 依存的に Ins シグナル活性を増幅する因子でもある。本研究課題では、個体レベルでの PHLDB1 の制御が糖脂質代謝に及ぼす影響を、脂肪組織とその他の臓器における Ins 作用の差異の観点から明らかにすることを目的とする。

【方法】1）PHLDB1 の臓器発現パターンおよび肥満における発現変化の検討：野生型マウスにおいて PHLDB1 蛋白の各臓器における発現分布を解析した。また、高脂肪食誘導性肥満マウスの脂肪組織における PHLDB1 の蛋白発現レベルを非肥満対照マウスと比較した。2）*PHLDB1* 遺伝子改変マウスの解析：連携研究者より以下の *PHLDB1* 遺伝子改変マウスの分与を受け、解析を行った。①R26-TagRFP-T-PHLDB1 マウス（ROSA26 遺伝子座へ全身性に *PHLDB1* をノックインしたマウス）および②Adipoq-Cre: R26R-TagRFP-T-PHLDB1 マウス（脂肪細胞特異的 *PHLDB1* ノックインマウス）。これらのマウスを、対照マウスとともに高脂肪食により飼育し、耐糖能（ブドウ糖および Ins 負荷試験等）、血清糖脂質パラメータの解析に加えて、脂肪細胞の組織学的解析、遺伝子発現解析、Ins シグナル解析等を施行した。

【結果】1）野生型マウスにおける PHLDB1 発現分布・及びその制御：野生型マウスにおいて、PHLDB1 は白色・褐色脂肪組織に高発現し、骨格筋・肝臓では低発現であった。高脂肪食給餌野生型マウスは、対照の非肥満マウスと比較して脂肪組織の PHLDB1 発現が低下していた。肥満マウスの脂肪組織で惹起されるとされる小胞体ストレス・低酸素を 3T3-L1 脂肪細胞に誘導すると PHLDB1 の発現が有意に抑制された。2）全身 *PHLDB1* ノックイン（KI）マウス・脂肪細胞特異的 *PHLDB1* KI マウスの解析：高脂肪食給餌全身 KI マウスは、対照マウスと比較して体重非依存的に耐糖能および Ins 抵抗性が改善し、血中遊離脂肪酸の低下、脂肪組織重量・脂肪細胞面積の増加、脂肪組織の炎症関連遺伝子の発現低下を認め、脂肪組織における Ins 依存的 Akt リン酸化の亢進および肝臓脂肪蓄積の減少を認めた。さらに、脂肪細胞特異的 *PHLDB1* KI マウスを作製し、高脂肪食を給餌すると、対照マウスと比較した表現型は全身 KI マウスと同様であった。これら 2 種類の *PHLDB1* KI マウスで認めた、脂肪組織炎症の軽減を伴った脂肪細胞の肥大化は、“Healthy adipose expansion”と称されている。本研究結果より、肥満個体において PHLDB1 発現を増強することにより、Healthy adipose expansion が誘導され、肥満関連代謝障害の改善につながることが示唆された。

高脂肪食負荷 *PHLDB1* ノックインマウスの脂肪組織の表現型



160. 脂肪細胞の微小管捕捉因子を介した糖脂質代謝制御

大熊　英之

山梨大学 大学院総合研究部 医学域

Key words：脂肪細胞，微小管捕捉因子，インスリンシグナル，healthy adipose expansion，脂肪肝

緒　言

インスリン（Ins）は Ins 受容体のチロシン残基をリン酸化し、PI3K（phosphatidylinositol 3-kinase）を活性化する。活性化 PI3K は PIP2 をリン酸化し PIP3 に変換し、Akt をリン酸化する。リン酸化された Akt は糖輸送担体（GLUT）4 を細胞表面に移行させ、ブドウ糖取り込みを促進し血糖値が低下する。この一連の Ins シグナル活性化を「Ins 作用」と呼び、Ins が Ins 作用を十分に発揮できない状態を「Ins 抵抗性」と呼ぶ。

臨床医学的には、Ins 抵抗性は肥満に合併する代謝異常の基盤病態である。これまで、Ins 抵抗性に伴う代謝異常の治療戦略として、臓器選択的に Ins シグナルを活性化する基礎的な試みが報告されてきた。しかし、肝臓に恒常活性型 Akt を導入すると脂肪蓄積（脂肪肝）が促進し、高中性脂肪血症が惹起される［1］。一方、Ins シグナルの負の調節因子 PTEN を脂肪細胞特異的に欠損させると、脂肪組織の Akt リン酸化が亢進し、脂肪組織由来ホルモン（アディポカイン）の分泌異常の是正に加えて肝臓の脂肪蓄積を増加させずに代謝異常が改善する［2］。従って、肝臓よりも脂肪細胞優位に Ins 作用を高めることにより、肝臓への脂肪蓄積を促進せずに Ins 抵抗性に伴う代謝異常の改善に寄与する可能性がある。この点から、肝臓より脂肪組織において豊富に発現する Ins シグナル構成分子を制御対象とするアプローチが考えられるが、現状ではそのような報告はない。そこで著者らは、文献的検索および発現データベースを用いた比較より、肝臓や骨格筋には低発現であるが脂肪組織において発現が顕著である pleckstrin homology-like domain family B member 1（PHLDB1）に着目した。PHLDB1 は 3T3-L1 脂肪細胞において細胞膜上の PIP2、PIP3 と相互作用し、Ins 依存的に Akt のリン酸化を亢進させる Ins シグナル活性増強因子として報告されている［3］。また、PHLDB1 は微小管先端に特異的に結合し、他の分子と複合体を形成して細胞膜に“連結”させることにより、微小管の安定性や配置を決める微小管捕捉因子として知られている［4］。微小管は tubulin が多数結合（重合）したチューブ状の構造をしており、細胞形成と分裂においては微小管の重合と微小管の解体（脱重合）が秩序立って進行し、PHLDB1 は微小管の重合を促進し安定化を促す因子と考えられるが、微小管捕捉因子による脂肪細胞の機能調節機構は未知である。これらの背景を基に、本研究では以下の 2 点について解明することを目的とした。

1）臓器間に発現差を有する Ins シグナル構成分子を制御することにより、臓器選択的な Ins 作用の調節と個体レベルの病態改善が可能か？

2）代謝異常の観点からみた脂肪細胞における微小管捕捉因子の病態生理的意義は？

方　法

1. PHLDB1 の臓器発現パターンおよび肥満における発現変化の検討

野生型マウスにおいて PHLDB1 蛋白の各臓器における発現分布を解析した。また、高脂肪食誘導性肥満マウスの脂肪組織における PHLDB1 の蛋白発現レベルを非肥満対照マウスと比較した。

2. *PHLDB1* 遺伝子改変マウスの解析

連携研究者より以下の *PHLDB1* 遺伝子改変マウスの分与を受け、解析を行った。

① R26-TagRFP-T-PHLDB1 マウス（ROSA26 遺伝子座へ *PHLDB1* をノックインしたマウス＝「全身性 *PHLDB1* ノックインマウス」）

② Adipoq-Cre: R26R-TagRFP-T-PHLDB1 マウス（脂肪細胞特異的 *PHLDB1* ノックインマウス）

これらのマウスを、野生型マウスを対照として高脂肪食により飼育し、耐糖能（ブドウ糖および Ins 負荷試験等）、血清糖脂質パラメータの解析に加えて、脂肪細胞の組織学的解析（脂肪細胞径、炎症細胞浸潤等）、遺伝子発現解析（炎症性遺伝子等）、Ins シグナル解析等を施行した。ⅰ）およびⅱ）のマウスにより、個体レベルの PHLDB1 発現調節が、脂肪組織選択的な Ins 作用の変化を伴って糖脂質代謝の改善に寄与するか、そして脂肪細胞の PHLDB1 の発現変化が個体レベルの糖脂質代謝を調節し得るかを検証することとした。

結　果

1. 野生型マウスにおける PHLDB1 発現分布・及びその制御

野生型マウスにおいて、PHLDB1 は白色・褐色脂肪組織に高発現し、骨格筋・肝臓では低発現であった（図 1）。高脂肪食給餌野生型マウスは、対照の非肥満マウスと比較して脂肪組織の PHLDB1 発現が低下していた（図 2a）。この機序を検討するため、肥満マウスの脂肪細胞を 3T3-L1 脂肪細胞を用いて再現した。具体的には、肥満マウスの脂肪組織で惹起されるとされる小胞体ストレス・低酸素を 3T3-L1 脂肪細胞に誘導した。3T3-L1 細胞への小胞体ストレス誘導剤 thapsigargin 添加（図 2b）、低酸素環境下（図 2c）での培養は、いずれも PHLDB1 の発現を有意に抑制した。この結果から、肥満マウスの脂肪組織における PHLDB1 発現は小胞体ストレス・低酸素により抑制されることが示唆された。

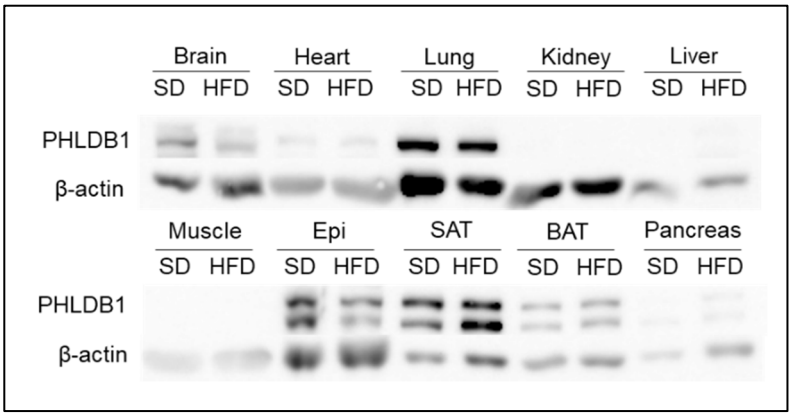


図 1. 野生型マウスの全身における PHLDB1 の発現分布
通常食（SD）か高脂肪食（HFD）で給餌した野生型マウスの各臓器を採取し、蛋白抽出を行い、ウェスタンブロット法により解析した（Epi：精巣周囲脂肪、SAT：皮下脂肪、BAT：褐色脂肪）。

2. 全身 *PHLDB1* ノックイン（KI）マウス・脂肪細胞特異的 *PHLDB1* KI マウスの解析

高脂肪食給餌全身 KI マウスは、対照マウスと比較して体重非依存的に耐糖能および Ins 抵抗性が改善し、血中遊離脂肪酸の低下、脂肪組織重量・脂肪細胞面積の増加、脂肪組織の炎症関連遺伝子の発現低下を認め、脂肪組織における Ins 依存的 Akt リン酸化の亢進および肝臓脂肪蓄積の減少を認めた（図 3）。さらに、脂肪細胞特異的 *PHLDB1* KI マウスを作製し、高脂肪食を給餌すると、対照マウスと比較した表現型は全身 KI マウスと同様であった。これら 2 種類の *PHLDB1* KI マウスで認めた、脂肪組織炎症の軽減を伴った脂肪細胞の肥大化は、“Healthy adipose expansion”と称されており、現在その機序を検討中である。

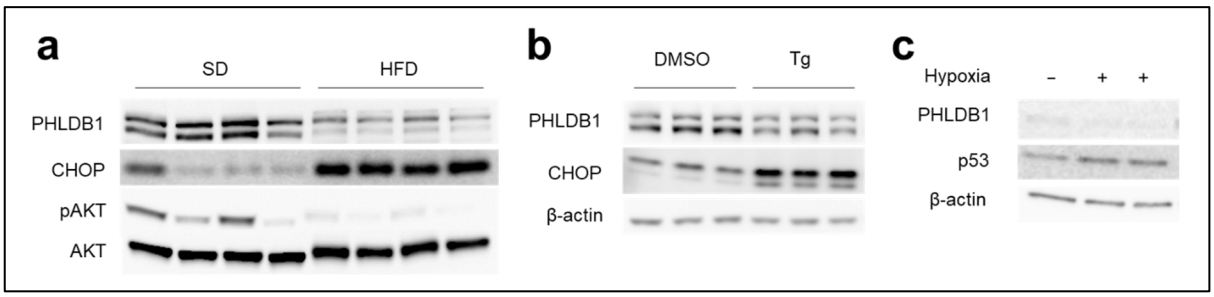


図 2. 肥満マウスの脂肪組織では PHLDB1 発現が抑制される

a）通常食か高脂肪食で飼育した 22 週齢の野生型マウスの精巣周囲脂肪における PHLDB1 発現をウェスタンブロット法により解析した。

b）DMSO か thapsigargin（Tg）で 24 時間処理した分化後 3T3-L1 脂肪細胞における PHLDB1 発現をウェスタンブロット法により解析した。

c）低酸素環境下（0.5% O_2）で 24 時間培養した分化後 3T3-L1 脂肪細胞における PHLDB1 発現をウェスタンブロット法により解析した。

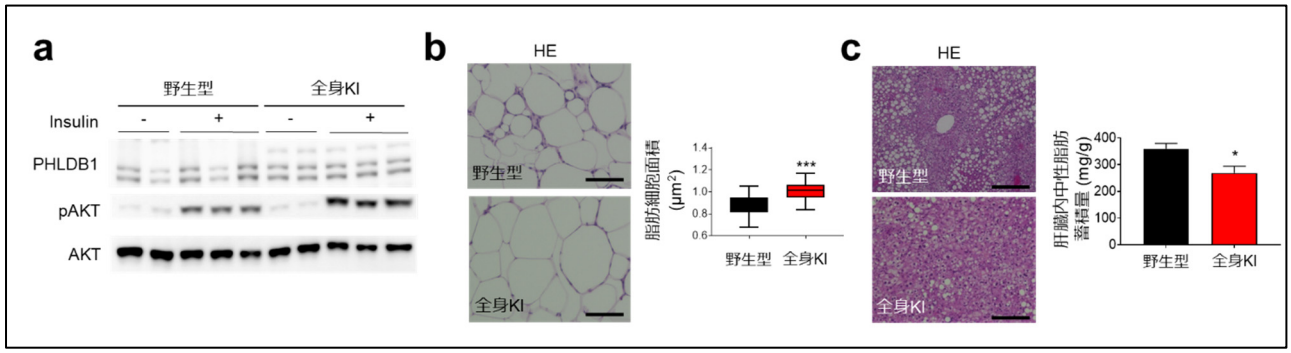


図 3. 全身 KI マウスの表現型

a）22 週齢まで高脂肪食で飼育した全身 KI マウスと同腹仔の野生型マウスにおいて、経門脈的に Ins（5 U/kg）を投与し、3 分後に精巣周囲脂肪を回収した。同組織における Ins シグナル（pAKT／AKT）をウェスタンブロット法により解析した。

b）22 週齢の高脂肪食給餌全身 KI マウスと同腹仔の野生型マウスの精巣周囲脂肪組織を HE 染色により解析し、脂肪細胞面積を両郡（n＝8～10）で比較した（倍率 200 倍、スケールバー：1 μ m）。***P＜0.001（Mann–Whitney U test）。

c）22 週齢の高脂肪食給餌全身 KI マウスと同腹仔の野生型マウスの肝臓を HE 染色により解析した。また、肝臓内中性脂肪を抽出し両群（n＝8～10）で比較した（倍率 200 倍、スケールバー：200 μ m。*P＜0.05（unpaired t-test）。

考　察

肥満に伴う脂肪組織の小胞体ストレスおよび低酸素状態は、PHLDB1 の発現を低下させることが分かった。また、肥満個体において PHLDB1 発現を増強することにより、脂肪組織における Ins シグナルの活性化が起き、Healthy adipose expansion が誘導され、肥満関連代謝障害の改善につながることが示唆された。PHLDB1 は肥満合併症治療薬の標的分子となる可能性がある。例えば、「PHLDB1 活性化剤」を全身投与した際にも、脂肪組織選択的にインスリンシグナルが活性化され、肝臓におけるインスリンシグナルの活性化に伴う脂質異常症およ

び脂肪肝を軽減できる可能性がある。本研究のような個体レベルでの分子制御を臓器選択的な分子制御につなげていくコンセプトは薬理学的手法による臓器選択的な分子制御を見据えた際の新規性も有し、従来の drug delivery system（DDS）的アプローチに加えて、新たな Ins シグナルの臓器選択的な活性化手法の開拓を目指している。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、山梨大学医学部内科学講座糖尿病・内分泌内科学教室の土屋恭一郎教授、理化学研究所の清末優子チームリーダー、東京都医学総合研究所の吉川欣亮プロジェクトリーダー、山梨大学大学院総合研究部医学域基礎医学系（生化学 1）の大塚稔久教授である。現在、共同研究者とともに研究を継続中である。本研究に多大なるご支援を頂きました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文　献

1） Ono H, Shimano H, Katagiri H, Yahagi N, Sakoda H, Onishi Y, Anai M, Ogihara T, Fujishiro M, Viana AY, Fukushima Y, Abe M, Shojima N, Kikuchi M, Yamada N, Oka Y, Asano T. Hepatic Akt activation induces marked hypoglycemia, hepatomegaly, and hypertriglyceridemia with sterol regulatory element binding protein involvement. Diabetes. 2003 Dec;52(12):2905-13. doi: 10.2337/diabetes.52.12.2905. PMID: 14633850.

2） Morley TS, Xia JY, Scherer PE. Selective enhancement of insulin sensitivity in the mature adipocyte is sufficient for systemic metabolic improvements. Nat Commun. 2015 Aug 5;6:7906. doi: 10.1038/ncomms8906. PMID: 26243466; PMCID: PMC4527086.

3） Zhou QL, Jiang ZY, Mabardy AS, Del Campo CM, Lambright DG, Holik J, Fogarty KE, Straubhaar J, Nicoloro S, Chawla A, Czech MP. A novel pleckstrin homology domain-containing protein enhances insulin-stimulated Akt phosphorylation and GLUT4 translocation in adipocytes. J Biol Chem. 2010 Sep 3;285(36):27581-9. doi: 10.1074/jbc.M110.146886. Epub 2010 Jun 28. PMID: 20587420; PMCID: PMC2934625.

4） Hotta A, Kawakatsu T, Nakatani T, Sato T, Matsui C, Sukezane T, Akagi T, Hamaji T, Grigoriev I, Akhmanova A, Takai Y, Mimori-Kiyosue Y. Laminin-based cell adhesion anchors microtubule plus ends to the epithelial cell basal cortex through LL5alpha/beta. J Cell Biol. 2010 May 31;189(5):901-17. doi: 10.1083/jcb.200910095. PMID: 20513769; PMCID: PMC2878951.