

氏名(生年月日) いけ た よしと  
池 田 義人 (1986年1月26日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 博 第147号

学位授与の日付 2014年3月15日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 メタボリックシンドローム治療を目指した脂肪細胞におけるレジスチン生理作用の解明

論文審査委員 (主査) 教授 小暮 健太郎

(副査) 教授 秋葉 聡

(副査) 教授 中山 祐治

## 論文内容の要旨

### はじめに

メタボリックシンドロームは、“内臓脂肪の蓄積に加えて、高血糖、高脂血症、高血圧のうちいずれか2つ以上を併発した病態”と定義され、脳梗塞、心筋梗塞、糖尿病等の重篤な疾患の発症リスクを上昇させると考えられている。そのため、肥満者の増加が深刻な状況にある先進諸国を中心に、メタボリックシンドロームの効果的な治療薬の開発が求められている。メタボリックシンドロームの増悪には、脂肪細胞から分泌される生理活性物質、すなわちアディポサイトカインの発現異常が関与することが報告されている。さらに、複数のアディポサイトカインの発現バランスの崩壊がメタボリックシンドロームの病態を複雑化し、治療を困難にしていると考えられている。本研究では、食事療法や運動療法を補助し、メタボリックシンドローム患者において崩壊したアディポサイトカイン発現バランスの是正を介して重篤な疾患の発症リスク減少を可能とする新規治療ターゲットの探索を目指した。脂肪細胞において産生、分泌されるアディポサイトカインは、本来、脂肪細胞の分化や成熟化、機能性維持などの生理作用を有していると考えられるが、その詳細については不明な点が多い。著者は、「アディポサイトカインの発現は各々が独立しているのではなく、相互に影響しあうことで発現連関を形成しているため、メタボリックシンドロームの病態をより複雑化させているのではないかと仮説を立てた。すなわち、複数のアディポサイトカイン発現に影響を及ぼすものは、メタボリックシンドローム治療のターゲットになり得るのではないかと考えた。

### 1. 脂肪細胞の分化・成熟過程における各アディポサイトカインの発現変動

脂肪細胞成熟化と複数のアディポサイトカイン発現との関係性を解明し、メタボリックシンドロームの治療ターゲット候補を見出すための検討を行った。はじめに、野生型及び肥満モデルラットの精巣上体白色脂肪組織における各種アディポサイトカイン遺伝子の発現量を評価した。その結果、肥満時に血中濃度が減少するアディポネクチンの発現量に減少がみられた。さらに、肥満時に血中濃度が増加する Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)、Heparin-binding EGF-like growth factor の発現量に増加傾向がみられた。一方、肥満時に血中濃度が増加すると報告されているレジスチンの発現量は予想外に減少していた。次に、野生型及び肥満モデルラットの脂肪細胞を初代培養し、分化・成熟過程における各アディポサイトカインの発現変動を評価した。その結果、野生型及び肥満モデルラット由来初代培養脂肪細胞の分化・成熟過程における各アディポサイトカインの遺伝子発現変動は非常

に高い類似傾向を示した。このことから、これら初代培養脂肪細胞の分化・成熟過程におけるアディポサイトカイン発現パターンは共通しており、肥満進展の過程とは独立していると考えられた。また、株化脂肪細胞 3T3-L1 の成熟過程におけるアディポサイトカインの遺伝子発現変動を評価したところ、アディポネクチン、レプチン、レジスチンの発現変動が初代培養脂肪細胞の成熟過程における発現変動と類似していることを見出した。そのため、これらアディポサイトカインは脂肪細胞成熟化において重要な役割を果たしていると考えられた。中でもレジスチンは、肥満時にみられる血中濃度の増加が多数の疾患の病態悪化に関与していると考えられていることから、著者はレジスチンが肥満時に血中濃度が増加する他のアディポサイトカインの発現を制御しているのではないかと推測した。すなわち、レジスチンがメタボリックシンドロームの治療ターゲット候補として最も有用ではないかと考えるに至った。

## 2. レジスチンの脂肪細胞における脂質蓄積への関与

肥満時にみられるレジスチンの血中濃度増大は全身性の慢性的な炎症を惹起し、インスリン抵抗性をはじめ、様々な疾患の病態悪化に関与していると考えられている。しかし、脂肪細胞におけるレジスチンの生理作用については不明な点が多い。そこで、3T3-L1脂肪細胞の成熟過程におけるレジスチン発現を制御することで、脂肪細胞に対するレジスチンの生理作用解明を試みるとともに、メタボリックシンドロームの治療ターゲット候補としての有用性を評価した。その結果、著者は、レジスチン発現をsiRNAによって抑制した脂肪細胞において脂質蓄積量が有意に減少することを初めて発見した。さらに、レジスチン発現プラスミドDNAを導入したCOS7細胞の培養上清を3T3-L1細胞に添加することで、レジスチン発現抑制による脂質蓄積量の減少が回復することを見出した。このことから、レジスチンが脂肪細胞における脂質蓄積に関与している可能性が示唆された。脂質蓄積メカニズムを検討したところ、レジスチン発現抑制時に、脂肪細胞への分化に重要な転写因子である Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ 、CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  の発現に変化はみられなかった。ところが、詳細な検討により、多数の脂質合成酵素の発現に関与する転写因子 Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) のタンパク質量の減少と転写活性の低下を見出すとともに、ChREBP の標的遺伝子である Fatty acid synthase、Acetyl-CoA carboxylase 2 の発現量が減少することを明らかにした。さらに、脂質 $\beta$ 酸化に関与する Carnitine palmitoyl transferase-1 の活性化も見出した。これらの結果より、レジスチン発現抑制は ChREBP 転写活性の抑制を介して、脂質合成の抑制及び脂質 $\beta$ 酸化の活性化(脂質消費)を誘導していることが示唆された。さらに、高脂肪食摂餌マウスに抗レジスチン抗体を定期的に投与した結果、脂肪組織/体重比や血中トリグリセリド濃度、肝臓内脂質含量の増大が抑制された。結論として、レジスチンは脂肪細胞における脂質蓄積の促進に関与することが強く示唆されたことから、メタボリックシンドローム時におけるレジスチンの生理作用を制御することが、肥満の改善に有用であると考えられた。

## 3. レジスチンを中心としたアディポサイトカイン発現連関の解析

上記の検討からレジスチンは、脂肪細胞の成熟化に重要であり、生理作用の1つとして脂質蓄積の促進に関与していることが示唆された。そのため、他のアディポサイトカインの発現にも大きく影響を与えていると考えられた。そこで、レジスチンと他のアディポサイトカインとの間に発現連関が存在するのかどうかを明らかにする為、レジスチン発現抑制が及ぼす他のアディポサイトカインの発現への影響について検討した。その結果、塞栓症の発症リスクを上昇させる PAI-1 の遺伝子発現量及びタンパク質分泌量に顕著な減少がみられた。また、レジスチン含有培養上清の添加によって、レジスチン発現抑制脂肪細胞における PAI-1 の遺伝子発現量及びタンパク質分泌量の減少が回復した。このことから、脂肪細胞においてレジスチンと PAI-1 との発現連関の可能性が示唆された。

## 総括

本研究では、メタボリックシンドロームの効果的な治療ターゲットの探索を目指して、アディポサイトカインの発現変動に注目した。その結果、アディポサイトカインの中でレジスチンが、脂肪細胞の成熟化に重要である可能性が示唆された。さらに、レジスチンの脂肪細胞に対する生理作用として脂質蓄積の促進への関与が示唆された。また、レジスチンは脂肪細胞において PAI-1 の発現を制御している可能性が示唆された。これらのことから、メタボリックシンドローム時におけるレジスチンの生理作用を制御することで、肥満の改善や PAI-1 発現制御による塞栓症の予防につながることが期待される。すなわち、レジスチンはメタボリックシンドロームの治療ターゲットとして有用であると考えられる。

## 課程博士学位論文 審査の結果の要旨

メタボリックシンドロームの増悪には、脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインの発現異常が関与するとともに、複数のアディポサイトカインの発現バランスの崩壊が病態を複雑化し、治療を困難にしている。本研究は、メタボリックシンドローム患者において崩壊したアディポサイトカイン発現バランスの是正を介して脳梗塞等の疾患発症リスクを減少させる新規治療ターゲットの探索を目指したものである。申請者は「各アディポサイトカイン発現は相互に影響しあい発現連関を形成することでメタボリックシンドローム病態を複雑化させている」と考え、複数のアディポサイトカイン発現に影響を及ぼすものが、メタボリックシンドローム治療のターゲットとして有用であると仮説を立て検討を行った。野生型と肥満モデルラットの精巢上体白色脂肪組織、野生型と肥満モデルラット由来の初代培養脂肪細胞、および株化脂肪細胞 3T3-L1 における各アディポサイトカインの発現変動を評価した。その結果、アディポサイトカインは脂肪細胞成熟化において重要な役割を果たしていることが示唆され、特にレジスチンは他のアディポサイトカイン発現制御に関与することでメタボリックシンドロームの病態を複雑化させている要因の 1 つであると推察され、レジスチンをメタボリックシンドロームの治療ターゲット候補として選定するに至った。脂肪細胞におけるレジスチンの生理作用を解明するために、レジスチン発現を siRNA によって抑制した結果、脂肪細胞において脂質蓄積量が有意に減少することを初めて発見した。さらに、レジスチン発現過剰発現 COS7 細胞の培養上清のレジスチン発現抑制 3T3-L1 細胞への添加で、脂質蓄積量減少の回復を見出した。これらから、レジスチンが脂肪細胞における脂質蓄積に関与している可能性が示唆された。さらに、レジスチン発現抑制時に、脂質合成酵素発現に関与する転写因子 Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) のタンパク質量と転写活性の低下を見出すとともに Fatty acid synthase、Acetyl-CoA carboxylase 2 発現量の減少と、脂質  $\beta$  酸化に関与する Carnitine palmitoyl transferase-1 の活性化を見出した。これらの結果より、レジスチン発現抑制は ChREBP 転写活性の抑制を介して、脂質合成の抑制及び脂質  $\beta$  酸化の活性化(脂質消費)を誘導していることが示唆された。さらに、高脂肪食摂餌マウスへの抗レジスチン抗体投与により、脂肪組織/体重比や血中トリグリセリド濃度、肝臓内脂質含量の増大が抑制されることを見出した。これらの知見から、レジスチンは脂肪細胞における脂質蓄積の促進に関与することが強く示唆され、メタボリックシンドローム時におけるレジスチン生理作用の制御が肥満改善に有用であることが推察された。さらに、レジスチン発現抑制による他のアディポサイトカイン発現への影響を検討した結果、塞栓症の発症リスクを上昇させる

Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)の遺伝子発現量及びタンパク質分泌量に顕著な減少がみられ、この減少がレジスチン含有培養上清の添加により回復することを見出した。このことから、レジスチンによる PAI-1 発現制御の可能性が示唆された。

以上、申請者は本研究において、アディポサイトカインの一つであるレジスチンが脂肪細胞における脂肪蓄積に重要な役割を担っていることを発見するとともに、他のアディポサイトカイン PAI-1 の発現制御を担っている可能性を見出し、メタボリックシンドローム治療ターゲットとしてのレジスチンの有用性を示した。これらの知見は、メタボリックシンドローム治療法の開発につながる貴重な成果である。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。