

令和 6 年 5 月 25 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06559

研究課題名（和文）白色脂肪細胞の分化と肥大化の新規制御機構とその破綻による病態の解明

研究課題名（英文）The elucidation of novel regulatory mechanisms for differentiation and hypertrophy of white adipocytes and diseases caused by their disorder

研究代表者

佐藤 孝哉（Sato, Takaya）

大阪公立大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：20251655

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、白色脂肪細胞の分化や肥大化におけるRhoファミリー低分子量GTPアーゼRac1の機能の解明を目指して、脂肪細胞特異的rac1ノックアウトマウスを解析した。このマウスにおいて白色脂肪組織の顕著な萎縮が観察されたので、そのメカニズムの解析を進めたところ、Rac1は、1) 骨格筋と同様のインスリン応答性グルコース取り込みシグナル伝達系を制御していること、2) 脂質合成に關与する酵素群の遺伝子発現制御に關与することが明らかとなった。本研究において、それぞれの制御機構の詳細な解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満における白色脂肪細胞の肥大化は、糖尿病などの様々な病態の原因となることが知られている。本研究では、白色脂肪細胞の分化や肥大化を制御する新規の細胞内シグナル伝達系を明らかにした。また、本研究で作成した遺伝子改変マウス（脂肪細胞特異的rac1ノックアウトマウス）は、糖尿病の病態を示すことも明らかとなり、脂肪萎縮症のモデルとなる可能性がある。このマウスの骨格筋や肝臓などの機能の解析を通じて、糖尿病発症の新たなメカニズムが明らかになるかもしれない。さらに、得られた知見が肥満や糖尿病の新規治療法の開発につながる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed mice lacking the Rho family small GTPase Rac1 specifically in adipose tissues to clarify the physiological roles for Rac1 in differentiation and hypertrophy of adipocytes. These mice exhibited atrophy of white adipose tissues, the molecular details of which were further analyzed. We found that 1) Rac1 is involved in insulin signaling that regulates glucose uptake, which is similar to that in skeletal muscle, 2) Rac1 regulates the expression of genes for enzymes responsible for the synthesis of triacylglycerol. The detailed regulatory mechanisms of these signaling pathways were investigated in this study.

研究分野：細胞内情報伝達

キーワード：低分子量GTP結合蛋白質 インスリンシグナル伝達 骨格筋 脂肪細胞 肥満

1. 研究開始当初の背景

(1) インスリンは血糖値を負に調節するホルモンで、主要な標的臓器として、肝臓、骨格筋、脂肪細胞が知られている。骨格筋や脂肪細胞においては、インスリン刺激に応答して、血中のグルコースの取り込みが誘導される。これらの臓器におけるインスリン応答性のグルコース取り込みは、グルコース輸送担体 GLUT4 を蓄積している小胞 (GLUT4 小胞) が細胞内区画から細胞表面に輸送され、細胞膜と結合・融合されることで、GLUT4 が細胞膜表面に蓄積することにより、誘導される。

(2) 研究代表者らは、骨格筋特異的 *rac1* ノックアウトマウスを作出し、その骨格筋を用いて、インスリン受容体の下流で GLUT4 小胞の細胞膜への移行を制御するシグナル伝達系の解析を進め、ホスホイノシチド 3 キナーゼ (PI3K) - タンパク質セリントレオニンキナーゼ Akt2 経路の下流で、Rho ファミリー低分子量 GTP アーゼ Rac1 が重要な役割を果たしていることを示してきた。また、インスリン応答性の Rac1 の活性化を制御するグアニンヌクレオチド交換因子として、FLJ00068 を同定した。さらに Rac1 の下流では、Ras ファミリー低分子量 GTP アーゼ RalA が機能していることも明らかにした。このシグナル伝達系は、研究代表者らが他のグループに先行して見出した新規の制御系である。

(3) 一方、白色脂肪細胞におけるインスリン応答性のグルコース取り込みシグナル伝達系は、骨格筋の場合と類似性が高いことが知られている。研究代表者らは、マウス白色脂肪細胞や 3T3-L1 脂肪細胞を用いた解析から、白色脂肪細胞におけるインスリン応答性のグルコース取り込みシグナル伝達系においても、骨格筋の場合と同様に、PI3K - Akt2 - FLJ00068 - Rac1 - RalA 経路が重要な機能を果たしていることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、白色脂肪細胞におけるインスリン応答性のグルコース取り込みシグナル伝達系における Rac1 を介するシグナル伝達系の重要性をマウス生体レベルで証明することを第 1 の目的とした。

(2) さらに、白色脂肪細胞の分化や肥大化における、グルコース取り込み誘導の制御以外の Rac1 の機能の解明を第 2 の目的とした。本研究では、白色脂肪細胞の分化や肥大化に伴う各種の中性脂肪合成酵素の発現誘導に着目した。

3. 研究の方法

(1) 脂肪細胞特異的 *rac1* ノックアウト (*adipo-rac1-K0*) マウスの作出
Cre-loxP システムを応用して、*adipo-rac1-K0* マウスを作出した。

(2) マウス前駆脂肪細胞の *in vitro* 分化誘導
マウス白色脂肪組織より分離した前駆脂肪細胞の *in vitro* 分化誘導系を応用し、白色脂肪細胞の分化と肥大化のメカニズムを解析した。

(3) GLUT4 の細胞膜移行の検出
エレクトロポレーション法による遺伝子導入により、マウス白色脂肪細胞において GLUT4 レポーターを一過性発現させ、マウス生体レベルで、インスリン応答性の GLUT4 の細胞膜移行を検出、定量した。細胞外領域に Myc タグを付加、C 末端に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を融合させた GLUT4 レポーター (GLUT4^{myc7}-GFP) は、細胞内小胞に存在するときは抗 Myc 抗体で認識されないが、細胞膜表面に局在すると認識される。レポーターの発現は、GFP で検出することが可能であり、二次抗体の蛍光強度と GFP の蛍光強度から GLUT4 の細胞膜への移行を検出、定量できる。本研究では、このシステムをマウス生体内の白色脂肪細胞に応用した。

(4) Rac1 および RalA の活性化の検出
インスリンを尾静注したマウスから白色脂肪組織を採取し、その凍結組織切片において、Rac1 および RalA の活性化を検出した。Rac1 および RalA それぞれの特異的標的タンパク質 (POSH および Sec5) の GTP アーゼ結合ドメインにエピトープタグを付加したポリペプチドをプローブとし、これを蛍光免疫染色法で検出することにより、Rac1 および RalA の活性化型 (GTP 結合型) を可視化した。

(5) リアルタイム PCR 法
リアルタイム PCR 法により、各種の中性脂肪合成酵素の発現を定量した。

4. 研究成果

(1) adipo-*rac1*-KO マウスの表現型の解析

adipo-*rac1*-KO マウスにおいては、精巣上体白色脂肪組織の顕著な萎縮が観察され、それを構成する白色脂肪細胞の小型化が観察された (図 1)。

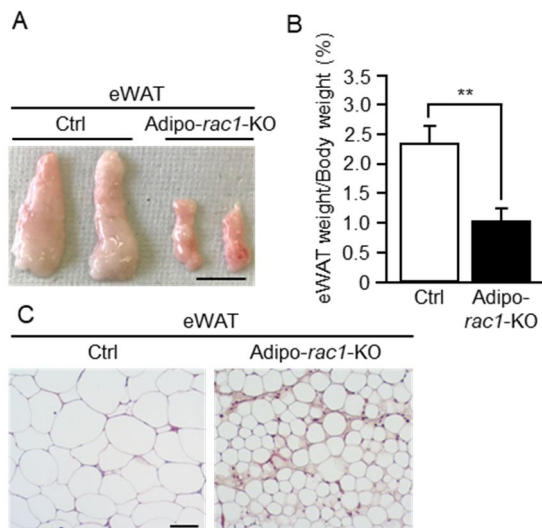


図 1 adipo-*rac1*-KO マウスの精巣上体白色脂肪組織の萎縮。 (A)コントロールマウスと adipo-*rac1*-KO マウスの精巣上体白色脂肪組織の外観。(B)コントロールマウスと adipo-*rac1*-KO マウスの精巣上体白色脂肪組織の相対重量。 $p < 0.01$ 。(C)コントロールマウスと adipo-*rac1*-KO マウスの精巣上体白色脂肪細胞の HE 染色像。スケールバー：50 μm 。Ctrl：コントロール。(Hasegawa *et al.* (2021)より改変)

(2) adipo-*rac1*-KO マウスの白色脂肪細胞における GLUT4 の細胞膜移行

インスリン、恒常的活性型 PI3K (Myr-p110)、恒常的活性型 Akt2 (Myr-Akt2)、恒常的活性型 FLJ00068 (FLJ68 N) による GLUT4 の細胞膜移行は、コントロールマウスの白色脂肪細胞においては観察されたが、adipo-*rac1*-KO マウスの白色脂肪細胞においては観察されなかった (図 2)。したがって、インスリン受容体の下流で、PI3K - Akt2 - FLJ00068 経路が Rac1 を活性化し、GLUT4 の細胞膜移行が誘導される可能性が支持された。

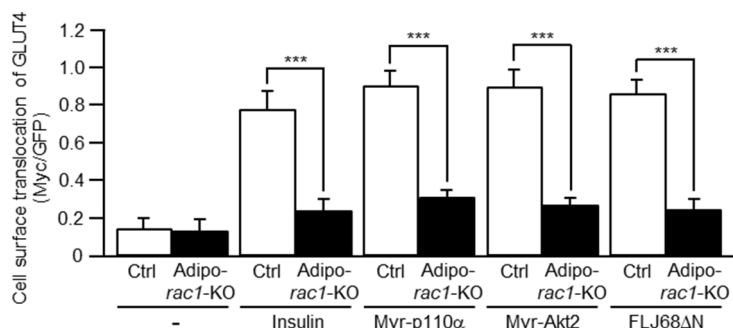


図 2 adipo-*rac1*-KO マウスの白色脂肪細胞における GLUT4 の細胞膜移行。 各種刺激に応答したコントロールマウスと adipo-*rac1*-KO マウスの白色脂肪細胞における GLUT4 の細胞膜移行。 $p < 0.001$ 。Ctrl：コントロール。(Hasegawa *et al.* (2021)より改変)

(3) マウス白色脂肪細胞における Rac1 の活性化

マウスの白色脂肪細胞においては、インスリン、Myr-p110 によって Rac1 が活性化されたが、この活性化は、Akt2 特異的阻害剤 AI-XII によって阻害された (図 3)。したがって、インスリン受容体の下流で、PI3K - Akt2 経路が Rac1 を活性化する可能性が支持された。

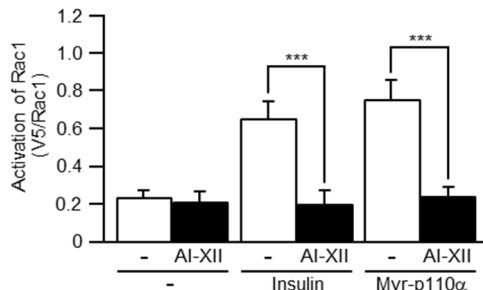


図 3 マウス白色脂肪細胞における Rac1 の活性化に対する Akt2 特異的阻害剤の効果。 マウス白色脂肪細胞における各種刺激に応答した Rac1 の活性化に対する Akt2 特異的阻害剤 AI-XII の効果。 $p < 0.001$ 。Ctrl：コントロール。(Hasegawa *et al.* (2021)より改変)

(4) マウス白色脂肪細胞における GLUT4 の細胞膜移行に対するドミナント・ネガティブ型 Ra1A の効果

マウスの白色脂肪細胞におけるインスリン、Myr-p110、Myr-Akt2、FLJ68 N、恒常的活性型 Rac1 (Rac1(G12V)) による GLUT4 の細胞膜移行は、ドミナント・ネガティブ型 Ra1A (Ra1A(S28N)) により阻害された。したがって、インスリン受容体の下流で、PI3K - Akt2 - FLJ00068 - Rac1 経路が Ra1A を活性化し、GLUT4 の細胞膜移行が誘導される可能性が支持された。

(5) adipo-*rac1*-KO マウスの白色脂肪細胞における Ra1A の活性化

インスリン、Myr-p110、Myr-Akt2、FLJ68 NによるRaiAの活性化は、コントロールマウスの白色脂肪細胞においては観察されたが、adipo-*rac1*-K0マウスの白色脂肪細胞においては観察されなかった。一方、Rac1(G12V)によるRaiAの活性化は、コントロールマウスの白色脂肪細胞においても、adipo-*rac1*-K0マウスの白色脂肪細胞においても観察された。したがって、インスリン受容体の下流で、PI3K - Akt2 - FLJ00068 - Rac1経路がRaiAを活性化する可能性が支持された。

(6) マウス前駆脂肪細胞の *in vitro* 分化誘導系における中性脂肪合成酵素の発現誘導

(1)~(5)の結果より、Rac1の欠損によるインスリン応答性のグルコース取り込みの不全が、adipo-*rac1*-K0マウスにおける精巢上体白色脂肪組織の顕著な萎縮の一因と考えられる一方、Rac1は、インスリン応答性のグルコース取り込み系の制御以外の機能も果たしている可能性が考えられたので、次に、中性脂肪合成酵素の発現を検討した。

コントロールマウスならびに adipo-*rac1*-K0マウスの白色脂肪組織より分離した前駆脂肪細胞の *in vitro* 分化誘導系を確立した (Hasegawa *et al.* (2023))。この系では、分化誘導培地中での7日間の培養により、前駆脂肪細胞が油滴をもつ脂肪細胞に分化する。adipo-*rac1*-K0マウスの白色脂肪組織より分離した前駆脂肪細胞の場合、分化誘導4日目以降、Rac1がノックアウトされる。

この系で、中性脂肪合成に関与する酵素であるATPクエン酸リアーゼ (*acly*)、アセチルCoAカルボキシラーゼ (*acc*)、脂肪酸合成酵素 (*fasn*)、ステアロイル-CoA不飽和化酵素1 (*scd1*)、グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ (*gpat1*)の発現誘導を検討した。その結果、コントロールマウス由来の細胞では、4~5日目以降、これらの酵素の発現上昇が認められたが、adipo-*rac1*-K0マウス由来の細胞では、認められなかった (図4)。したがって、Rac1は、中性脂肪合成に関与する酵素群の発現を調節することで、肥大化を制御している可能性が支持された。

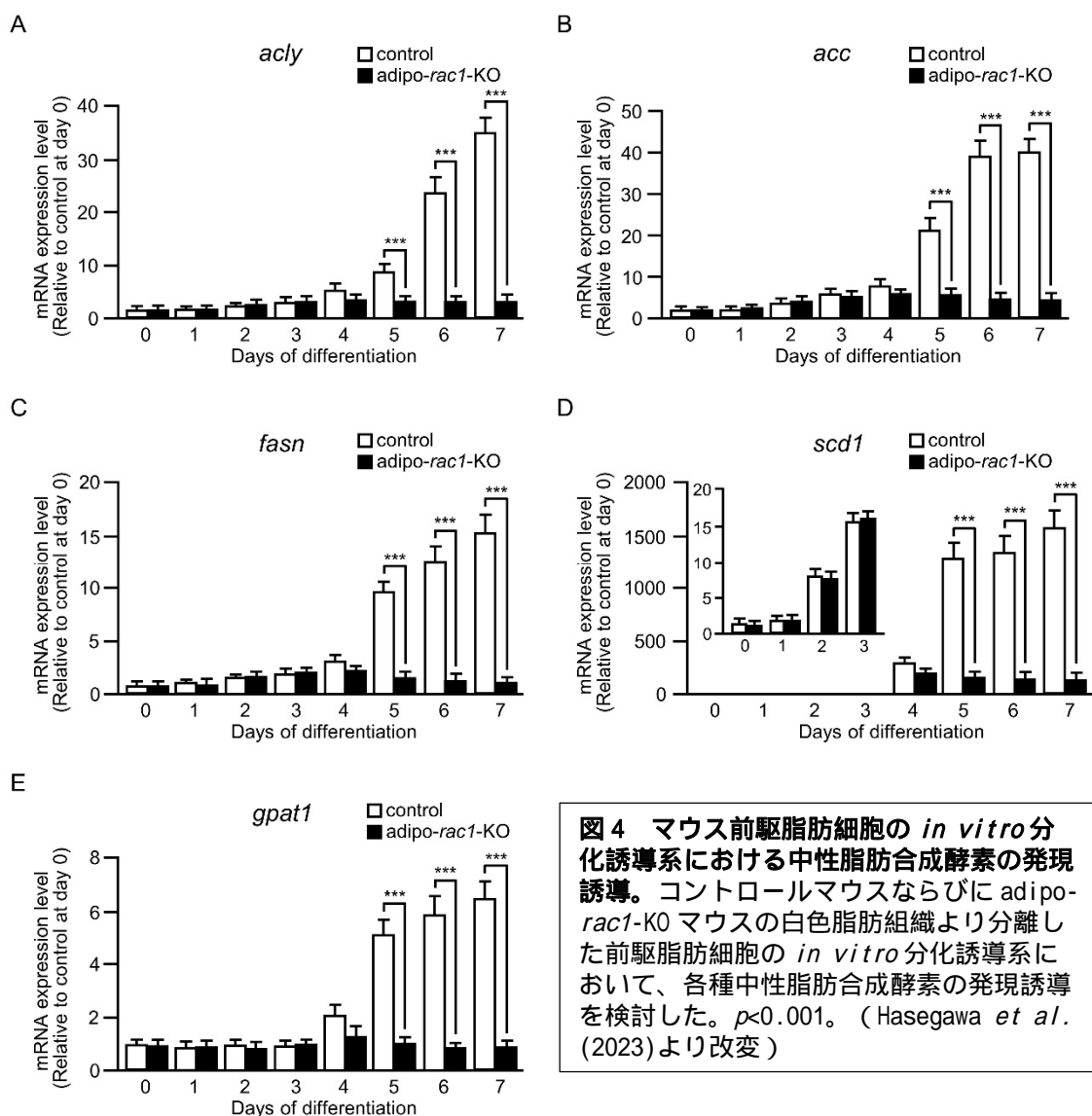


図4 マウス前駆脂肪細胞の *in vitro* 分化誘導系における中性脂肪合成酵素の発現誘導。コントロールマウスならびに adipo-*rac1*-K0マウスの白色脂肪組織より分離した前駆脂肪細胞の *in vitro* 分化誘導系において、各種中性脂肪合成酵素の発現誘導を検討した。p<0.001。(Hasegawa *et al.* (2023)より改変)

<引用文献>

1. Kiko Hasegawa, Nobuyuki Takenaka, Kenya Tanida, Man Piu Chan, Mizuki Sakata, Atsu Aiba, and Takaya Satoh: Atrophy of white adipose tissue accompanied with decreased insulin-stimulated glucose uptake in mice lacking the small GTPase Rac1 specifically in adipocytes. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 10753 (2021)
2. Kiko Hasegawa, Nobuyuki Takenaka, Maaya Yamamoto, Yoshiki Sakoda, Atsu Aiba, and Takaya Satoh: Regulation of de novo lipid synthesis by the small GTPase Rac1 in the adipogenic differentiation of progenitor cells from mouse white adipose tissue. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 4608 (2023)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Chan Man Piu, Takenaka Nobuyuki, Abe Yuki, Satoh Takaya	4. 巻 117
2. 論文標題 Insulin-stimulated translocation of the fatty acid transporter CD36 to the plasma membrane is mediated by the small GTPase Rac1 in adipocytes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 111102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cellsig.2024.111102	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chan Man Piu, Takenaka Nobuyuki, Satoh Takaya	4. 巻 24
2. 論文標題 Impaired Insulin Signaling Mediated by the Small GTPase Rac1 in Skeletal Muscle of the Leptin-Deficient Obese Mouse	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 11531
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms241411531	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hasegawa Kiko, Takenaka Nobuyuki, Yamamoto Maaya, Sakoda Yoshiki, Aiba Atsu, Satoh Takaya	4. 巻 24
2. 論文標題 Regulation of De Novo Lipid Synthesis by the Small GTPase Rac1 in the Adipogenic Differentiation of Progenitor Cells from Mouse White Adipose Tissue	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4608
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24054608	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hasegawa Kiko, Takenaka Nobuyuki, Tanida Kenya, Chan Man Piu, Sakata Mizuki, Aiba Atsu, Satoh Takaya	4. 巻 22
2. 論文標題 Atrophy of White Adipose Tissue Accompanied with Decreased Insulin-Stimulated Glucose Uptake in Mice Lacking the Small GTPase Rac1 Specifically in Adipocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10753
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms221910753	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sato Takaya	4. 巻 21
2. 論文標題 Diverse Physiological Functions and Regulatory Mechanisms for Signal-Transducing Small GTPases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7291 ~ 7291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21197291	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takenaka Nobuyuki, Nakao Mika, Hasegawa Kiko, Chan Man Piu, Sato Takaya	4. 巻 594
2. 論文標題 The guanine nucleotide exchange factor FLJ00068 activates Rac1 in adipocyte insulin signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 4370 ~ 4380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13939	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 陳敏彪、竹中延之、佐藤孝哉
2. 発表標題 レプチン欠損肥満マウスの骨格筋における低分子量GTPアーゼRac1を介するインスリンシグナル伝達系の障害
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 陳敏彪、竹中延之、阿部佑紀、佐藤孝哉
2. 発表標題 3T3-L1脂肪細胞での脂肪酸輸送担体CD36を介するインスリン応答性脂肪酸取込みにおける低分子量GTPアーゼRac1の役割の検討
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 阿部佑紀、竹中延之、陳敏彪、佐藤孝哉
2. 発表標題 3T3-L1脂肪細胞での脂肪酸輸送担体CD36を介するインスリン応答性脂肪酸取込みにおける低分子量GTPアーゼRa1Aの関与の検討
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中るいん、竹中延之、佐藤孝哉
2. 発表標題 褐色脂肪細胞でのインスリン応答性糖取り込みと中性脂肪合成における低分子量GTPアーゼRac1の機能.
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂田瑞希、竹中延之、佐藤孝哉
2. 発表標題 白色脂肪細胞でのインスリン応答性脂肪酸取込みにおける低分子量GTPアーゼRac1の役割.
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷川紀子、竹中延之、佐藤孝哉
2. 発表標題 白色脂肪細胞の肥大化における低分子量GTPアーゼRac1の役割.
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 陳敏彪、竹中延之、佐藤孝哉
2. 発表標題 肥満と2型糖尿病のモデルマウスの骨格筋におけるインスリンシグナル伝達系の解析.
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中るいん、竹中延之、佐藤孝哉
2. 発表標題 褐色脂肪細胞でのインスリン応答性糖取り込みにおける低分子量GTPアーゼRac1の機能.
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂田瑞希、竹中延之、佐藤孝哉
2. 発表標題 白色脂肪細胞でのインスリン応答性脂肪酸取り込みにおける低分子量GTPアーゼRac1の機能.
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長谷川紀子、陳敏彪、坂田瑞希、竹中延之、佐藤孝哉
2. 発表標題 白色脂肪細胞でのインスリン応答性糖取り込みにおけるRac1によるRalAの制御.
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒木菜摘、竹中延之、佐藤孝哉
2. 発表標題 骨格筋でのインスリン応答性糖取り込みにおけるAkt2によるRac1の活性制御.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷田賢哉、長谷川紀子、陳敏彪、竹中延之、佐藤孝哉
2. 発表標題 白色脂肪細胞でのインスリン応答性糖取り込みにおけるRac1の役割.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 陳敏彪、中尾美翔、長谷川紀子、竹中延之、佐藤孝哉
2. 発表標題 脂肪細胞でのインスリン応答性のRac1活性化を制御するグアニンヌクレオチド交換因子の同定.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 脂肪酸トランスポーターの細胞内動態の分析方法、及び脂肪酸トランスポーター改変タンパク質の利用	発明者 竹中延之、佐藤孝哉	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-028920	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	竹中 延之 (Takenaka Nobuyuki) (20610504)	大阪公立大学・大学院理学研究科 ・准教授 (24405)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関