

機関番号：30110
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790857
 研究課題名（和文） 脂肪細胞における脂質代謝酵素 lipin の発現調節機構解明と代謝異常治療への応用
 研究課題名（英文） Regulatory mechanisms of lipin, a multifunctional metabolic regulator, and its therapeutic application for metabolic diseases
 研究代表者
 高橋伸彦（TAKAHASHI NOBUHIKO）
 北海道医療大学・歯学部・准教授
 研究者番号：20372279

研究成果の概要（和文）：Lipin-1は様々な代謝機能を調節する分子であり、脂肪細胞の lipin-1 遺伝子発現と全身の糖代謝は逆相関する。本研究では、脂肪細胞の lipin-1 遺伝子発現が TNF- α により低下すること、逆に脂肪細胞の lipin-1 遺伝子発現の低下が単球の遊走促進に関わる MCP-1 の遺伝子発現を増加させることを見いだした。これらの知見は、脂肪細胞の lipin-1 遺伝子発現が脂肪組織の炎症に関与していることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：Lipin-1 is known as a multifunctional metabolic regulator. The gene expression of lipin-1 in adipocytes is closely related to whole body glucose metabolism, but the mechanism remains unclear. Here, we showed that TNF- α suppressed lipin-1 mRNA expression via Jak2 signal in 3T3-L1 adipocytes. Moreover, suppression of lipin-1 expression using RNAi method increases monocyte chemoattractant protein-1 mRNA expression in the adipocytes. We conclude that lipin-1 is implicated in one of crucial molecules related to adipose tissue inflammation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科臨床医学・代謝学

キーワード：脂肪細胞、メタボリックシンドローム、Lipin

1. 研究開始当初の背景

(1) これまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯：

私はこれまでに、leptin、adiponectin、resistin といった adipocytokine が糖・脂質代謝に及ぼす影響を検討し報告してきました。その中で糖代謝と脂質代謝を結びつけ

る分子メカニズムに興味を持ち、最近、細胞内脂質調節酵素である diacylglycerol kinase (DGK) と糖代謝の関連を報告 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 360: 244, 2007) しました。DGK は文字通り、diacylglycerol kinase をリン酸化し phosphatidic acid を生成する酵素ですが、

この研究を進展させる一つのアプローチとして、DGK の逆反応を司る酵素も糖代謝に影響を及ぼすのだろうかという疑問を持ちました。調べてみると、その酵素は phosphatidic acid phosphatase (PAP) と呼ばれ、長らく酵素活性こそ確認されていたものの、その酵素分子本体は最近まで不明でした。(2) PAP-1 の本体は lipin-1 であり、lipin-1 は多機能分子として働く：

2001 年に全身性 lipoystrophy を呈する fatty liver dystrophy (fld) mouse の病因遺伝子として lipin-1 がクローニング (Nat. Genet. 27: 121, 2001) され、最近、PAP-1 の本体が lipin-1 である事が報告 (J. Biol. Chem. 281: 9210, 2006) されました。つまり lipin-1 は PAP-1 という酵素としての働きを介して中性脂肪合成に対して促進的に働き、また細胞内脂質 signaling に重要な diacylglycerol や phosphatidic acid のバランスを調節します。

Lipin-1 は PAP として働く他に、以下 a), b) といった、代謝調節において多彩な機能を有します。a) lipin-1 は核局在シグナル (NLS) を持ち、PGC-1 α と伴に転写共役因子として働き、PPAR (Peroxisome proliferators-activated receptor)- α 、 $-\gamma$ の転写因子を活性化すること (Cell Metab. 4: 199, 2006)、b) 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化過程において PPAR γ の上流で促進的に働くこと (J. Biol. Chem. 279: 29558, 2004) などが挙げられます。

また、lipin には lipin-1A、-1B、-2、-3 といった isoform が存在し、それぞれ組織発現の相違が報告されています (J. Biol. Chem. 282:3450, 2007)。lipin-2、-3 は弱いながらも lipin-1 と同様な PAP 活性が存在すること、NLS 配列を持つことは報告されていますが、lipin-2、-3 の機能についての検討

は十分ではありません。

(3) 肥満・メタボリックシンドロームにおける lipin の変化 (これまでの知見から)：

これまでのヒトにおける検討においても、脂肪組織の lipin-1 遺伝子発現量低下と BMI の上昇やインスリン抵抗性の増大とが相関し (Hum. Mol. Genet. 15: 377, 2006、Diabetes 55: 2811, 2006)、さらに減量により脂肪細胞の lipin-1 の発現量が増加するという報告 (J Lipid Res. 48: 201, 2007) もなされ、マウスでの実験結果はヒトにも当てはまることを裏付けています。さらにヒトにおいて lipin-1 の SNPs が基礎代謝率や空腹時インスリンレベルと相関する (Obesity 15: 2723, 2007) という、遺伝学的関連も示唆されています。

(4) Lipin 研究を代謝異常治療へ進展させるには、どのような疑問を解決すべきか？：

以上の事実から、lipin は酵素としての働きを超えた多機能分子として機能し、全身の糖代謝と脂質代謝をつなげる分子の一つなのではないかと考えます。さらに、肥満などで低下している lipin の発現量もしくは機能を高めることは、全身の糖代謝を改善させる有効な手段になると考えられますが、その分子機構は未解決です。

2. 研究の目的

本研究では lipin に関するどのような疑問が解決できれば、将来の代謝異常治療へ応用出来るのか、まず問題点 Q1-3) を抽出しました。その上で、解決に必要な具体的目的 1-4) を設定しました。

Q1) 肥満状態の脂肪細胞において lipin の発現量が低下するメカニズムは何か？ — 低下させる因子は何か？もしくは上昇させる因子は何か？

Q2) lipin-1 の発現量が上昇すると何故全身の糖代謝が改善するのか?-逆に、lipin-1 の発現量が低下すると何故全身の糖代謝が悪化するのか?-そのメカニズムは?

そしてQ1、2)の解明後、脂肪細胞以外の lipin はどのように影響を受けるのか、全身の lipin の役割が問題になります。そこで、第3の疑問を設定します。

Q3) 脂肪細胞以外の各臓器において、lipin-1 や lipin-2,3 はどのように調節され、脂質代謝と糖代謝をどのように制御しているのか?脂肪細胞 lipin-1 増強剤は各臓器にどのような影響を及ぼすのか?

[具体的目的] 上記の疑問に答えるために解決すべき具体的研究目的を挙げます。

(1) 肥満における脂肪細胞の lipin 遺伝子発現調節機構の解明

(2) 脂肪細胞の lipin 遺伝子発現と全身糖代謝との相関の分子メカニズムの解明

-余裕があれば以下の(3)まで進む-

(3) 脂肪細胞における lipin を増強させた場合の全身への効果を検証する

3. 研究の方法

(1) 肥満における脂肪細胞の lipin 遺伝子発現調節機構の解明:

- ・脂肪細胞のモデルとして十分に分化した 3T3-L1 脂肪細胞を用いた。分化方法はインスリン、イソブチルメチルキサンチン、デキサメサゾンを使用した常法にしたがっている。
- ① 培養培地に異なる濃度の TNF- α を添加し、lipin-1A、lipin-1B の遺伝子発現量を Real-time PCR 法を用いて測定した。また、0.2 nM の TNF- α を添加し、lipin-1A、lipin-1B の遺伝子発現量を変化を追った。
- ② TNF- α の細胞内シグナル分子に対する各種阻害剤を TNF- α 処置一時間前に添加し、

TNF- α による lipin-1 遺伝子発現変化への影響を検討した。

(2) 脂肪細胞の lipin 遺伝子発現と全身糖代謝との相関の分子メカニズムの解明:

- ・脂肪細胞における lipin-1 の遺伝子発現低下が、全身の糖代謝にどのような影響を及ぼすのか、脂肪細胞の lipin-1 遺伝子発現をノック・ダウンし、その遺伝子発現が低下した細胞でどのような変化があるのか検討した。

- ・脂肪細胞のモデルとして目的(1)と同様に十分に分化した 3T3-L1 脂肪細胞を用いた。

① 配列の異なる lipin-1 特異的 siRNA を 2 種類 (si-lip1-2、si-lip1-3)、対照として negative control RNA (NC) を用い、lipofection 法にて遺伝子ノック・ダウンを試みた。

② Lipin-1 遺伝子の knock down が確認されたサンプルを用い、脂肪細胞の機能に関与する分子各種 (Adiponectin、RBP4、PAI-1、MCP-1、PPAR γ 、GLUT4、TLR4、UCP1) の遺伝子発現を real-time PCR 法にて定量した。尚、各サンプルは 18S の遺伝子発現量にて補正を行い、n=3~4 にて検討を行った。

③ NF- κ B 活性化阻害剤である qinazoline を si-lipin-1 のトランスフェクションと同時に培地に添加し、lipin-1 遺伝子発現変化による脂肪細胞機能の変化への影響を検討した。

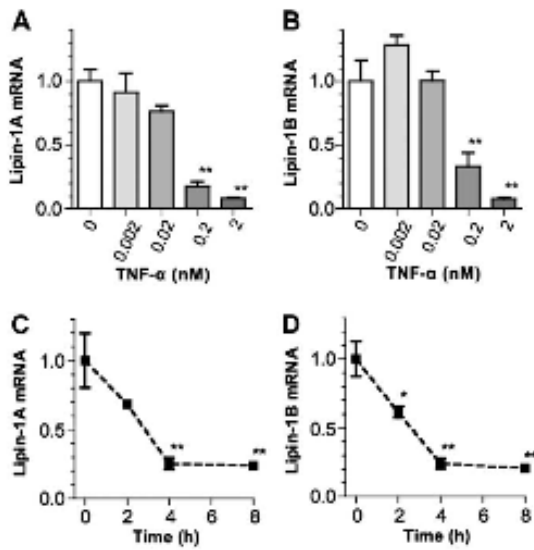
- ・統計処理: 以上の実験における、各群間の比較には ANOVA による検証後に post-hoc test を用い、 $p < 0.05$ を有意(*)と見なした。

4. 研究成果

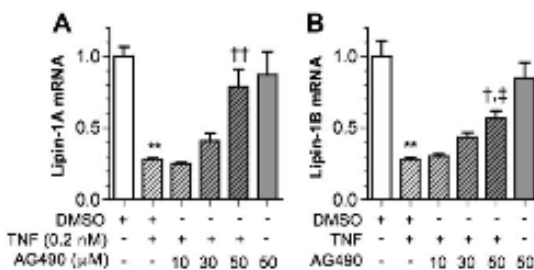
(1) 肥満における脂肪細胞の lipin 遺伝子発現調節機構の解明:

① TNF- α は 3T3-L1 脂肪細胞における lipin-1A、-1B の遺伝子発現を濃度及び時間

依存的に低下させた。



②-1 TNF- α の lipin-1A 及び-1B 低下作用は、NF- κ B 阻害剤、MAPK 阻害剤、セラミド合成阻害剤ではブロックできず、細胞透過性セラミドにても lipin-1 の低下は認めなかった。
 ②-2 TNF- α の lipin-1A 及び-1B 低下作用は、Janus tyrosine kinase 2 (Jak2) 阻害剤：AG490 でブロックされた。



(2) 脂肪細胞の lipin 遺伝子発現と全身糖代謝との相関の分子メカニズムの解明：
 ① Lipin-1 特異的 siRNA を処置することにより、その遺伝子発現量は対照に比し約 40% ノック・ダウンされた。
 ② Lipin-1 遺伝子のノック・ダウンが確認されたサンプルを用いて、Adiponectin、RBP4、PAI-1、MCP-1、PPAR γ 、GLUT4、TLR4、UCP1 の遺伝子発現を検討したところ、MCP-1 の遺伝子発現量は対照に比較し約 60-100%増加し

た。その他の遺伝子発現量に有意な変化は認めなかった。尚、対照として用いた negative control RNA 自体は MCP-1 遺伝子発現に影響を与えないことを、siRNA を添加しない群 (リポフェクション試薬は添加) と比較し確認した。

③ Lipin-1 遺伝子のノック・ダウンにより上昇した MCP-1 遺伝子発現は NF- κ B 活性化阻害剤である quazoline により阻害された。

【成果のまとめ】

これまでにヒトや実験動物における検討から、多機能代謝調節分子 lipin-1 の脂肪細胞における遺伝子発現量は、全身の糖代謝と相関することが知られています。具体的には、肥満、耐糖能異常などでは脂肪細胞の lipin-1 遺伝子発現量が低下し、肥満者に減量手術を施すとその発現量は上昇します。また、脂肪細胞特異的 lipin-1 強制発現させた実験動物では高脂肪食負荷にて肥満をきたしますが、興味深いことに全身の糖代謝に悪化は見ません。

本研究では脂肪細胞における lipin-1 の遺伝子発現は、炎症性サイトカインの一種である TNF- α の作用により低下することがわかりました。肥満に伴い脂肪細胞自身で TNF- α が分泌されることが知られています。また近年、肥満や代謝異常における脂肪組織に炎症細胞がリクルートされることが認知され、その炎症細胞より TNF- α の分泌が認められています。これらの肥満の病態に伴う TNF- α の上昇が、lipin-1 の遺伝子発現低下に関与していることが示唆されました。

また、本研究では脂肪細胞における lipin-1 の低下は NF- κ B を介して MCP-1 を増加させることが示唆されました。MCP-1 は単球を脂肪細胞にリクルートする分子であり、脂肪組織の炎症の発症・増悪に関与します。このこ

とから、肥満や代謝異常における lipin-1 の低下が能動的に脂肪組織の炎症惹起・増悪に関与していることが示唆され、そのような炎症に伴って増加した TNF- α がさらに lipin-1 を低下させるという悪循環に陥ることが考えられます。これらの結果より、脂肪細胞の lipin-1 による MCP-1 遺伝子発現を抑えることが、臨床応用する上で脂肪組織の炎症の悪循環を立ちきるターゲットの一つになると予想されます。

*尚、目的(2) 脂肪細胞の lipin 遺伝子発現と全身糖代謝との相関の分子メカニズムの解明について行った研究で得られた知見は、現在データをまとめており、英語論文として投稿予定です。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

① Tsuchiya Y, Takahashi N, Yoshizaki T, Tanno S, Ohhira M, Motomua W, Tanno S, Takakusaki K, Kohgo Y, Okumura T. A Jak2 inhibitor, AG490, reverses lipin-1 suppression by TNF- α in 3T3-L1 adipocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有、Vo. 382, 2009, pp. 348-352

② 土屋 慶容、高橋 伸彦、奥村 利勝、脂質代謝調節酵素 lipin-1 のメタボリックシンドロームにおける意義、旭川医科大学研究フォーラム、査読無、Vo. 10, 2010, pp. 102-103

③ 高橋 伸彦、藤谷 幹浩、高後 裕、消化管上皮および脂肪細胞における lipin の機能と発現解析、分子消化器病、査読無、Vo. 6, No. 4,

2009, pp. 375-382

[学会発表] (計3件)

① 高橋 伸彦、吉崎 隆之、高後 裕、家子 正裕、3T3-L1 脂肪細胞において lipin-1 遺伝子発現の knock down は MCP-1 遺伝子発現上昇を引き起こす、第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、平成 23 年 5 月 21 日、札幌市

② 高橋 伸彦、土屋 慶容、高後 裕、家子 正裕、Lipin-1, a multifunctional metabolic regulator, is suppressed by TNF- α via Jak2 pathway in 3T3-L1 adipocytes, 第 15 回アディポサイエンス研究会シンポジウム、平成 22 年 8 月 21 日、大阪市

③ 土屋 慶容、高橋 伸彦、高後 裕、TNF- α は 3T3-L1 脂肪細胞の lipin-1 遺伝子発現を低下させる-Jak2 経路の検証-、第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会、平成 22 年 5 月 27 日、岡山市

[その他]

ホームページ等

(1) 研究代表者のホームページ

<http://www.hoku-iryo-u.ac.jp/~ntkhs/homepage/home.html>

(2) 研究代表者の前任地である北海道旭川市において、地域の産学連携推進を目的に研究シーズ集が公開されています。本研究はその中の一つとして取り上げられ紹介されています。

① 旭川知的資源活用集 (旭川市経済観光部ものづくり推進室 産業振興課)

<http://www.city.asahikawa.hokkaido.jp/files/sangyousinkou/seeds/top.html>

② 旭川ウェルビーイングコンソーシアム

<http://awbcd.ask.u-tokai.ac.jp/formhp/am00tn00.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 伸彦 (TAKAHASHI NOBUHIKO)

北海道医療大学・歯学部・准教授

研究者番号：20372279

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

土屋 慶容 (TSUCHIYA YOSHIHIRO)

旭川医科大学・医学部・医員

研究者番号：00516990

吉崎 隆之 (YOSHIKAZI TAKAYUKI)

鹿児島大学・産学官連携推進機構・特任講師

研究者番号：70515189