

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：84416

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591353

研究課題名(和文) 分化脂肪細胞内におけるアディポネクチンの分泌経路の同定と調節機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of adiponectin secretion passway

研究代表者

大屋 健(Ohya, Takeshi)

独立行政法人国立病院機構(大阪南医療センター臨床研究部)・その他部局等・副室長

研究者番号：70599315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪細胞由来の抗炎症性サイトカイン、アディポネクチン(APN)の分泌を促す効果的な方法は現在知られておらず、分泌機構を解明する事で創薬開発に繋げる事を目的とする。脂肪細胞に脂肪酸7種のカクテルを生理的な混合比で負荷したところAPNの分泌亢進が見られた一方、バランスを欠いた組成では分泌は低下した。APN分泌はVAMPという分子の制御で小胞輸送により行われる。APN分泌が亢進する脂肪酸カクテル負荷でVAMP2の発現亢進が、分泌が低下する飽和脂肪酸過剰でVAMP3の発現低下が見られた。両者の発現を阻害するとAPN細胞内貯留量が減少した事より細胞内プール形成の候補分子と考えられた。

研究成果の概要(英文)：It is still obscure how native anti-inflammatory adipocytokine, adiponectin (APN) secretion can be promoted effectively. The aim of this study is to elucidate the mechanism of APN secretion and to develop a new anti-inflammatory drug for atherosclerosis and diabetes mellitus. The cocktail of seven fatty acids in a physiological ratio could accelerate APN secretion from mouse 3T3-L1 adipocytes. However, even in the same concentration excess of one component of saturated or monounsaturated fatty acid, made it reduced. APN secretion is carried out with intracellular vesicle transport systems, which are governed with membrane-attached proteins called SNARE family including VAMP sub-family. VAMP2 expression was promoted with the fatty acid cocktail load. VAMP3 was suppressed along with saturated fatty acid excess. Inhibition of these molecules made the intracellular APN pool down-sizing. This indicates that they might be candidates for building intracellular APN pools.

研究分野：内分泌代謝内科

キーワード：アディポサイトカイン 細胞内小胞輸送 SNARE蛋白 脂肪酸 分泌機構 インスリン抵抗性 炎症性反応

1. 研究開始当初の背景

(1) 脂肪組織は体内最大の内分泌器官である。かつては単なるエネルギーの貯蔵庫、体温維持のための発熱器官と考えられていたが、この 20 年の間に脂肪細胞由来のホルモンが多数発見され、内分泌器官としての地位が定着した。脂肪細胞に発現する分子には、脂質代謝に関する因子を始め、ステロイド代謝、免疫関連、線溶系関連因子に加え、炎症性のサイトカインとしてレプチン、レジスチン、TNF、IL-6 などが、抗炎症性サイトカインとして唯一アディポネクチン (APN) が挙げられる。また、これら自身も含め、インスリン、グルカゴン、成長ホルモンなど多岐にわたるサイトカインに対する受容体が存在し、脂肪組織は実に多数のホルモン産生器官であり、同時に感受性器官でもある。

(2) 脂質は三大栄養素の一つであり、単位重量当たり変換可能なエネルギーが最大となる貯蔵に最も適した物質である。また、生命の単位である細胞を成り立たせる“膜”そのものであり、ステロイドホルモンやビタミン D など多数の生理活性物質の原材料にもなる。高コレステロール血症が動脈硬化性疾患の促進因子である事は、数多くの研究により裏付けられて来た。一方、脂肪酸においてもインスリン抵抗性惹起の原因として、近年、多くの研究がなされている。飽和脂肪酸の過剰摂取が心血管系疾患発症・進行を促す事は明白である一方で、EPA や DHA など 3 系脂肪酸の摂取が動脈硬化に対し抑制的に働くことは古くから知られている。これは脂肪酸が単にエネルギー源として利用されるだけでなく、別の生理活性を有する事を示している。脂肪酸はリン脂質の構成素因となり、形質膜や細胞内小器官の膜の柔軟性や生理活性に影響を与える。更に、脂肪酸はそれ自身が脂質代謝に関する遺伝子転写因子のリガンドであり、あるものは脂肪酸から中性脂肪を合

成して脂質の細胞内貯留を促し、あるものは中性脂肪の分解、脂肪酸の燃焼を促進させるという様に、多様性が見られる。脂肪組織を取り巻く遊離脂肪酸の組成や濃度が、脂肪細胞の分化、増殖、肥大化を促すと同時に、脂肪酸放出、組織縮小、細胞死にも影響を与えていると考えられている。

2. 研究の目的

APN は現時点では脂肪細胞が分泌する唯一の抗炎症性サイトカインであり、低 APN 血症が動脈硬化性疾患の危険因子である事は多くの報告がある。また、 $\mu\text{g/ml}$ オーダーのサイトカインとしては極めて高い血中濃度を有しているが、部分欠損体も含めた四種類の多量体が存在しており、それぞれ活性は均一ではなく、分泌調節機構も異なるとされている。未だその作用機序は十分には解明されておらず、更に、現時点では有効な再合成蛋白が存在しない。薬剤として体外から投与する事が不可能な為、生体自身の分泌を亢進させる方法が望まれ、それ故に分泌のメカニズムを知ることが重要性と考える。

本研究はそれらを同定する事で、病的状態での分泌低下の理解とより効果的な分泌促進の開発を企図するものである。

3. 研究の方法

脂肪細胞のモデルとして、マウス 3T3-L1 前駆脂肪細胞にデキサメタゾン、イソブチルメチルキサンチン、インスリンの三剤を作用させる標準的方法で誘導された脂肪細胞を用いた。

この分化誘導法では分化度に不均一性が見られ、脂肪滴の蓄積と APN の分泌に乖離が出現する事が知られている。そこで、生理的組成の 7 種の脂肪酸から成るカクテルを負荷し、更なる分化を促した。カクテルは、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、パルミトレイン酸、DHA、アラキドン酸から成り、分化誘導後 2 日目から 5 日

目まで 400 μM で添加したところ、小脂肪滴を数個含む類円形の形態学的にほぼ均一の分化脂肪細胞群が得られた。

特定の分子の発現を抑えるために、分化後 5 日目に siRNA (small interfering RNA) を感染させた。接着している細胞を一旦浮遊させ、コラーゲン I がコートされた 96 穴プレートに、siRNA と Lipofectamine® RNAiMAX™ (invitrogen) の混合液を先に入れ、60000 個の細胞を後から添加した。

分化後 6 日目から 8 日目までの 48 時間に、脂肪酸やインスリン濃度などの条件を種々に変えて培養を行った。8 日目に、培養液交換後 6 時間で分泌された APN と細胞内に残留した APN の量を、Western Blotting 法にて半定量的に測定した。

回収した細胞の総蛋白量は BCA 法で定量を行い、二重鎖 DNA 量は DNA Quantity Kit (コスモバイオ) を用いて、蛍光色素 Hoechst33258 による蛍光発色法で定量を行った。

4. 研究成果

(1) 従来、細胞内の蛋白質の含有量を定量的に測定する際には、 β -アクチンや α -チューブリン等の発現量を内因性コントロールとして、その比で現す場合が多かった。しかし、脂肪細胞は環境によりその体積を大きく変化させる細胞であり、それに伴い細胞骨格に大きな変化が生じるので、細胞骨格系蛋白をコントロールとして使用する事に疑問が生じる。そこで、補正を行わなかった場合と、 β -アクチンで補正を行った場合、総蛋白量で補正を行った場合、二重鎖 DNA 量で補正を行った場合で比較検討を行った。細胞内の小胞上に存在する蛋白 VAMP7 の発現量は補正を行った 3 種類全てで、補正しない場合に比べ有意差が生じた。 β -アクチン補正は他の補正との間で有意差は生じなかったが、低値を示す傾向にあった。また、DNA 量で補正した β -アクチン自身の発現量は脂肪酸負荷にて

低下、インスリン抵抗性状態で上昇と変化が見られる為、 β -アクチンによる補正は不適切と判断し、以後、DNA 補正でデータを処理した。

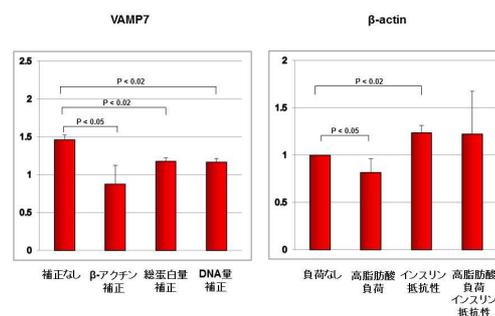


図1 内因性コントロールの比較検討

(2) 脂肪酸カクテルは総脂肪酸濃度を低濃度 150 μM と高濃度 800 μM で設定し、モル比による含有率で各組成の濃度を決定した。生理的組成で含有率 1% を超える以下の 7 種、パルミチン酸 (16:0) 31%、ステアリン酸 (18:0) 13%、オレイン酸 (18:1) 20%、リノール酸 (18:2) 14%、パルミトレイン酸 (16:1) 5%、DHA (22:6) 2.5%、アラキドン酸 (20:4) 2% をこの比率で混合して計 87.5% (131 μM または 700 μM) とし、通常の培養条件である 10% 血清に上乗せして培養を行った。また、低濃度カクテル条件に主要 4 組成のうち 1 種を過剰に加え、総脂肪酸濃度を高濃度条件と同じにして、組成バランスについての検討を行った。

培養液交換後 6 時間での APN 分泌量と細胞内残留量を測定し、全体における分泌量の比率をもって分泌機能の指標とした (分泌率)。低濃度脂肪酸カクテル負荷を基準に、高濃度カクテルでは分泌量、分泌率共に有意に増加した。一方、飽和脂肪酸であるパルミチン酸、ステアリン酸過剰負荷条件では分泌量、分泌率共に低下した。一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸負荷では、高濃度脂肪酸カクテル負荷より大きな脂肪滴を形成し、細胞体積も最大となったが、APN 分泌率は高濃度カクテル負荷に及ばなかった。2 価不飽和脂肪酸であ

るリノール酸過剰負荷ではバラツキが大きく、一定の傾向が確認できなかった。いずれの条件においても分泌された APN は約 10% 程度であり、細胞内外の発現量総和に有意差は認められなかった。

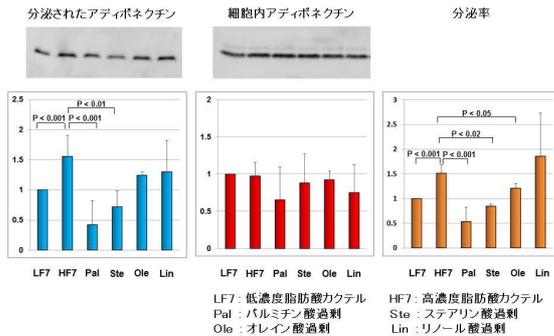


図2 脂肪酸組成がアディポネクチン分泌に与える影響

(3) APN は細胞内小胞輸送で分泌され、細胞内にプールを形成していることが報告されている。また、インスリン応答性に分泌する経路と恒常的に分泌する複数の経路が想定されている。細胞内小胞輸送は SNARE 蛋白と呼ばれる膜蛋白質によって制御されている。小胞と標的器官の相対する両膜上に存在する SNARE 分子の 4 ドメインが強固な複合体を形成することで、膜を十分に近づけ、もって膜リン脂質を融合させて内部の積荷を輸送する。その 4 つの組合せは各膜融合ステップで特異的に決まっている。分泌小胞上の SNARE は VAMP と呼ばれる一群の蛋白が担っているが、脂肪細胞の分化と共に発現量が増加するアイソフォームとして、VAMP2、VAMP3、VAMP5、VAMP7 が挙げられる。これらの SNARE 蛋白について脂肪酸負荷によるその動向を検討した。

APN 分泌率が上昇する高濃度脂肪酸カクテルを負荷で、VAMP2 は発現が亢進し、飽和脂肪酸であるパルミチン酸過剰条件で、APN の分泌低下と共に VAMP3 の発現も低下が見られた。そこで、この 2 分子を APN 分泌制御関連因子と捉え、siRNA にて強制的に発現を抑制し、その影響を検討した。

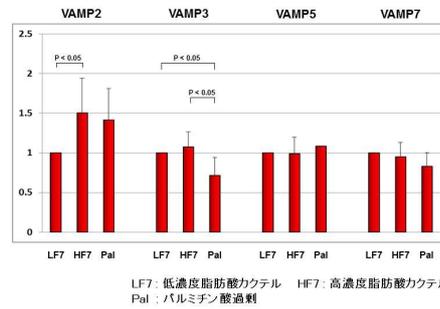


図3 脂肪酸負荷がVAMPの発現に与える影響

(4) VAMP2 と VAMP3 に対する siRNA は脂肪細胞分化誘導後 5 日目に行った。8 日目の細胞回収時の発現阻害率は蛋白レベルで VAMP2 が 56%、VAMP3 が 67% であった。

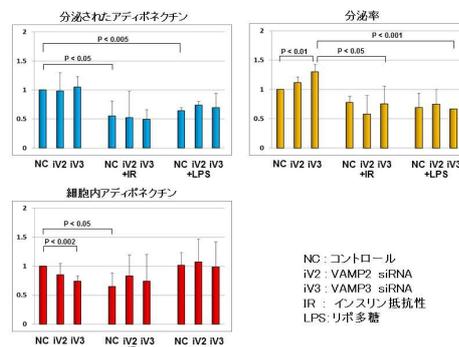


図4 VAMP2、VAMP3発現阻害がアディポネクチン分泌に与える影響

VAMP2、VAMP3 いずれの発現を阻害しても分泌された APN 量に変化は無かったが、細胞内の貯留量は減少し、特に VAMP3 阻害の場合は結果として分泌率の上昇が認められた。APN はインスリン刺激に即応して分泌が行われる為の細胞内プールの存在が考えられている。インスリン抵抗性を惹起してシグナルを遮断すると、コントロールにおいては細胞内の貯蔵量が減少するのに対し、VAMP2、VAMP3 阻害条件ではそれ以上の減少は見られず、抵抗性出現前からすでにインスリン作動性プールの形成に影響が出ていた事が示唆される。分泌量は 3 条件共に著しく低下しており、コントロールで見られた様な VAMP3 阻害による分泌率の上昇も消失した。また、内毒素であるリポ多糖は、細胞表面の TLR-4 という受容体を介して炎症性サイトカインの分泌を促す作用を有する。脂肪細胞表面にも TLR-4 は発現しており、TNF- や IL-6 などの炎症性サイトカインを分泌する。IL-6 の分泌にも細胞内小胞輸送系が用いられている

事が知られているが、脂肪細胞での分泌経路の同定は行われていない。リポ多糖を作用させると、アディポネクチンの分泌は3条件全てで低下が見られたが、インスリン抵抗性の場合と異なり細胞内貯留量の低下は見られず、VAMP2、VAMP3 阻害条件ではむしろ貯留が亢進している傾向が見て取れた。

脂肪細胞におけるインスリン抵抗性惹起と炎症性反応惹起、いずれの場合も APN の分泌が低下するという病的状態を再現した。両者は同じように分泌率が低下し、APN 分泌能が低下していると考えられるが、細胞内プール形成という面で両者は異なった動向を見せた。今回、VAMP2 が関与するプールと VAMP3 が関与するプールの存在が示唆されたが、脂肪酸カクテルで誘導されるのは VAMP2 のみで、過剰な飽和脂肪酸で抑制が掛かるのは VAMP3 のみである。今後も両者の違いに注視しつつ、幾つかの経路を介した APN 分泌不全という病態の理解を深めたいと考える。

<引用文献>

Arita Y, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*, 257, 1999, 79-83

Susan A, et al. Selective regulation of cellular and secreted multimeric adiponectin by antidiabetic therapies in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 297, 2009, E767-E773

Loo LH, et al. Heterogeneity in the physiological states and pharmacological responses of differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J. Cell Biol.* 187, 2009, 375-384

Cao H, et al. Identification of a Lipokine, a Lipid Hormone Linking Adipose Tissue to Systemic Metabolism, *Cell*. 134, 2008, 933-944

Xie L. et al. Adiponectin and leptin are secreted through distinct trafficking pathways in adipocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1782, 2008, 99-108

Bogan JS, Lodish HF. Two Compartments

for Insulin-stimulated Exocytosis in 3T3-L1 Adipocytes Defined by Endogenous ACRP30 and GLUT4. *J. Cell Biol.* 146, 1999, 609-620

Williams D, Pessin JE. Mapping of R-SNARE function at distinct intracellular GLUT4 trafficking steps in adipocytes. *J. Cell Biol.* 180, 2008, 375-387

Schaeffler A, et al. Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor- κ B pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity. *Immunology*. 126, 2008, 233-245

Sanjay V, et al. SNAP-23 and VAMP-3 contribute to the release of IL-6 and TNF α from a human synovial sarcoma cell line. *FEBS J.* 281, 2014, 750-765

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)

[学会発表](計4件)

大屋 健、幸原晴彦、脂肪細胞におけるアディポネクチン分泌経路の同定とその調節機構の解明、第45回日本動脈硬化学会 総会・学術集会、平成25年7月18日-19日、東京、

大屋 健、大月道夫、下村伊一郎、脂肪細胞におけるアディポネクチン分泌経路の同定とその調節機構の解明、第55回日本糖尿病学会年次学術集会、平成24年5月17日-19日、横浜、

大屋 健、大月道夫、下村伊一郎、脂肪滴含有 3T3-L1 細胞の選択的培養による、アディポネクチン分泌能を半定量し得る系の確立、第32回日本肥満学会、平成23年9月23日-24日、淡路、

大屋 健、大月道夫、下村伊一郎、脂肪滴含有 3T3-L1 細胞による選択的培養系を用いたアディポネクチン分泌能の半定量的検討、第54回日本糖尿病学会年次学術集会、平成24年5月19日-21日、札幌、

6. 研究組織

(1)研究代表者

大屋 健 (Ohya, Takeshi)

独立行政法人国立病院機構・大阪南医療センター・臨床研究部・再生医療研究室・副室長

研究者番号：70599315