

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659443

研究課題名(和文) 脂肪細胞の脂肪分解により放出される新規インスリン分泌刺激物質の探索

研究課題名(英文) Molecular identity and mechanisms of lipolysis-stimulated insulin secretion

研究代表者

岡崎 啓明 (Okazaki, Hiroaki)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：80610211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：カテコラミン刺激によるインスリン分泌という生理現象があるがその分子機構は未解明である。申請者は、脂肪細胞における脂肪水解を担うリパーゼであるホルモン感受性リパーゼ(HSL)の欠損マウス(HSLKO)において検討を行った結果、この現象がHSLKOでは全く認められないことを見出した。この現象はインスリン分泌に影響する既知のホルモンの変動では説明できず、カテコラミン刺激による脂肪細胞のHSL依存性脂質水解により産生される代謝産物がインスリン分泌を促進している可能性が示唆された。メタボロミクス解析により複数の候補物質を同定し、現在in vivo、in vitroでの検証を進めている。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed at elucidating the molecular mechanisms of catecholamine-induced insulin secretion. We have previously identified a profound defect of this phenomenon in mice with a targeted disruption of HSL, which is one of the major lipases involved in adipocyte lipolysis. As the plasma levels of hormones that affect insulin secretion were similar between wild-type and HSLKO mice, we reasoned some lipolytic products of HSL in adipocytes stimulate insulin secretion from beta cells in pancreas. Through metabolomics approach, we have identified several candidates, which have been further tested for the ability to stimulate insulin secretion.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 代謝学

キーワード：糖尿病 脂質 インスリン分泌 脂肪細胞 リパーゼ

1. 研究開始当初の背景

カテコラミン刺激によるインスリン分泌 (図1) は、古くから知られている現象であるが (Yoshida T et al. *Am J Clin Nutr* 1992; Yaney GC and Corkey BE *Diabetologia* 2003) その分子機構は未知であった。しかし、近年の遺伝子改変マウスを用いた研究により、その分子機構が解明されつつある。

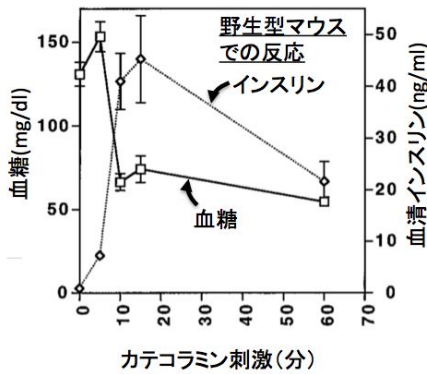


図1: 野生型マウスにおけるカテコラミン刺激時のインスリン分泌 (Grujic D et al. *J Biol Chem* 1997)

3AR 欠損マウスによる解析から、この現象には脂肪細胞の 3AR が必須であることが明らかとなった (図2) (Grujic D et al. *J Biol Chem* 1997)。すなわち、野生型マウスでは、カテコラミン刺激により顕著な血清インスリン濃度の上昇を認めるが (図1)、3AR 欠損マウスにおいてはこの現象が完全欠失している (図2)。3AR 欠損マウスの脂肪組織に aP2 プロモーターを用いて 3AR を過剰発現すると (WAT/BAT only 3AR) この現象が rescue されることなどから、カテコラミン刺激は脂肪細胞の 3AR を介する作用により、膵島からのインスリン分泌を亢進させていることが強く示唆される。

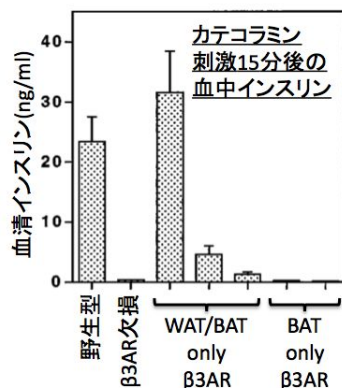


図2: β 3AR欠損マウスにおける報告 (Grujic D et al. *J Biol Chem* 1997)

その後、カテコラミン刺激のインスリン分泌は、脂肪萎縮のモデルマウスにおいて完全欠失 (Pajvani UB et al. *Nat Med* 2005)、脂

肪細胞の脂肪水解が減弱している aP2 欠損マウスにおいて部分欠失 (Scheja L et al. *Diabetes* 1999)、脂肪酸の受容体の一つである GPR40 の欠損マウスにおいて部分欠失 (Pang Z et al. *Mol Cell Endocrinol* 2010) していると報告され、3AR を介した脂肪細胞での脂肪水解に伴い産生される何らかの脂質がインスリン分泌を刺激していると推察されるが、その責任物質は同定されていない。

さて、申請者は、脂肪細胞の脂肪水解を担う酵素、中性脂肪 (TG) 水解酵素 (TGHs) の同定に携わり、ホルモン感受性リパーゼ (HSL) 以外の TGH として TGH-2 を発見した (Okazaki H et al. *Diabetes* 2006)。その他、ATGL、TGH-1 が脂肪細胞の TGH として見出されている。これらのリパーゼは 3AR の下流にあり、カテコラミン刺激によるインスリン分泌刺激因子はこれらの全てあるいはいずれかのリパーゼの代謝産物と示唆されるが、申請者らは、HSL 欠損マウス (Osuga J et al. *PNAS* 2000) ではこのカテコラミン刺激によるインスリン分泌が全く認められない (イソプロテレノール (0.3 mg/kg) 腹腔内投与による血清インスリン値の上昇を認めない) ことを発見した。即ち、この未知のインスリン分泌刺激因子は特に HSL の代謝産物であり、他のリパーゼの代謝産物ではない。

2. 研究の目的

そこで本研究課題では、他のリパーゼでは放出されないこれらの HSL 特有の代謝産物に着目した脂質分析 / リピドミクス解析から、新規インスリン分泌刺激因子の同定を行うことを目的とした。

HSL は、TG 水解に特異的な他のリパーゼ (ATGL、TGH-1/2) とは異なり、多機能酵素である。HSL は TG 水解酵素活性の他、ジアシルグリセロール (DG)、コレステロールエステル (CE)、レチニルエステル (RE) などを水解する酵素活性を有する (図3)。これらの HSL 特有の代謝産物のいずれか、あるいは未知の HSL の代謝産物がこの未解明の現象の責任分子である可能性がある。

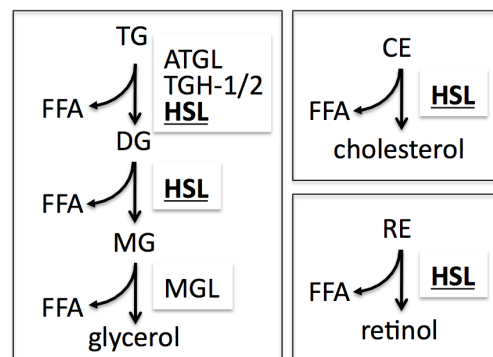


図3: HSLは多機能脂肪分解酵素である

3. 研究の方法

現象の *in vitro* への還元

カテコラミン刺激によるインスリン分泌の機序として、前述の通り、カテコラミンが 3AR を介して脂肪細胞に作用し、HSL を介した脂肪水解を刺激、その結果生じる何らかの代謝産物により、膵島からのインスリン分泌が刺激される、というメカニズムが推察される。そこでまず、この *in vivo* での現象を *in vitro* の系に還元し、この現象のより詳細な検討を試みる。

具体的には、野生型 (Wild-type (WT)) および HSL 欠損マウス (KO) をカテコラミンで刺激し、その血清を得る。これを単離膵島あるいは膵細胞株 (INS-1、MIN6 等) の培養液中に添加することにより、血清中におけるインスリン分泌刺激活性が野生型と HSL 欠損マウスで異なるかを検討する。血清で上手くいかない場合には、野生型および HSL 欠損マウスの初代培養脂肪細胞、マウス胎児繊維芽細胞由来脂肪細胞 (MEF-A) (Okazaki H et al. Diabetes 2002) をカテコラミン刺激した conditioned medium を用いる。

これにより、脂肪細胞における HSL の代謝産物が膵島に作用しインスリン分泌を促進している、という仮説の *in vitro* での証明を行う。

カテコラミン刺激により脂肪細胞から分泌されるインスリン分泌刺激物質の同定

さて、同定を目指す新規インスリン分泌刺激因子は、カテコラミン刺激により脂肪細胞から放出される HSL の代謝産物であり、かつ、HSL 以外のリパーゼの代謝産物ではない。そこで、次にこの新規生理活性脂質の同定を行う。

具体的には、野生型あるいは HSL 欠損マウス由来の脂肪細胞をカテコラミンで刺激した培地 (conditioned medium) あるいは、カテコラミンで刺激した野生型あるいは HSL 欠損マウスの血清、あるいはその脂質抽出物を、LC-TOFMS あるいは CE-TOFMS で解析するリポミクス解析を行う。カテコラミン刺激有無の脂質代謝産物のプロファイルから、HSL 欠損において産生されない代謝産物 (候補物質) を同定する。

候補物質の生理活性の *in vitro*、*in vivo* での検証

上記で得られたインスリン分泌刺激 (候補) 物質が、カテコラミン刺激のインスリン分泌の責任物質であるかを確立するため、候補物質について、上記の *in vitro*、*in vivo*

の系において、インスリン分泌能を検証する。

全ての遺伝子組換え実験は、遺伝子組換え生物等規制法および東京大学遺伝子組換え生物等の使用等実施規則を遵守して行われ、適切な拡散防止措置がとられる。全ての動物実験は倫理委員会の承認を経て東京大学動物実験実施規則に基づき実施される。廃棄物処理や実験場所に関して、関係法令・指針および研究施設の設けた基準を遵守する。

4. 研究成果

in vitro 系での検討に入る前に、*in vivo* 系において、カテコラミン刺激のタイムコースと、用量依存性の検討を行った。カテコラミンとしてイソプロテレノール (ISO) を用いた。野生型マウスにおける予備検討の結果、ISO 0.3 mg/kg、投与 10 分後において、血中インスリン濃度が最大 (6.3 ng/ml) であった。この条件において、野生型マウスと HSL 欠損マウスを ISO 刺激し、予備的知見を確認した。すなわち、野生型マウス (WT) においては、カテコラミン刺激後に血漿インスリン濃度の有意な増加を認める一方、HSL 欠損マウス (KO) においては生食群 (Ns) に比べてカテコラミン刺激群 (ISO) 群で有意なインスリン値の増加を認めなかった。(図 4)

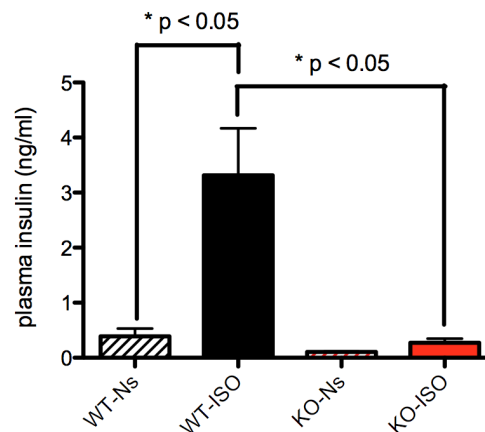


図 4. カテコラミン刺激 (ISO, 0.3 mg/kg) 10 分後の血漿インスリン濃度

次に、これらのマウスから摘出した脂肪細胞をコラゲナーゼ処理して得た単離脂肪細胞を ISO 刺激し、conditioned medium (CM) を調整した。これを MIN6 細胞に添加したところ、野生型マウス由来の CM では有意なインスリン分泌の増加を認めたが、HSL 欠損マウス由来の CM ではこの反応が欠如していた。

以上から、カテコラミン刺激によって HSL による脂肪水解の結果放出される何らかの物質がインスリン分泌を促進している可能性が考えられた。

次に、この新規物質が既知のホルモンである可能性を検討した。野生型マウス、および HSL 欠損マウスを ISO 刺激 (0.3 mg/kg) し、刺激前と刺激後 (5, 10, 30 分後) の血漿を採取、糖脂質代謝関連ホルモン (グレリン、GIP、GLP-1、インスリン、レプチン、PAI-1、グルカゴン、レジスチン) の血漿中濃度を Bio-Rad の Bio-Plex マルチプレックスアッセイにより測定した。インスリンについて再現性が得られた (図 5) 一方、その他のホルモンについては、カテコラミン刺激によるインスリン分泌を説明しうる変動は示さなかった。例えば、グレリンの血漿中濃度はカテコラミン刺激によって増加していたが、WT と KO でほぼ同程度 (WT: 2.2 倍; HSL 欠損: 2.0 倍) であり、ほぼ同様のタイムコースを示していた。

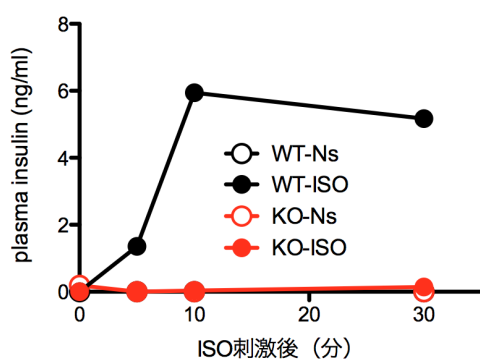


図5. カテコラミン刺激 (ISO, 0.3 mg/kg) 後の血漿インスリン濃度

カテコラミン刺激は、HSL や ATGL などの脂肪細胞のリパーゼを介して、脂肪細胞の中性脂質の水解を亢進させる。そこで次に、HSL 固有の脂質代謝産物がインスリン分泌を促進する可能性を考え、カテコラミン刺激後に血中に放出される HSL の代謝産物の同定を試みた。具体的には、野生型と HSL 欠損マウス (KO) をカテコラミン刺激 (ISO, 0.3mg/kg, 10 分) し、血漿を採取、血漿中の代謝物を、CE-TOFMS、LC-TOFMS を用いて、メタボロミクス解析を行った。CE-TOFMS においては、1) ISO 刺激により野生型で有意に増加 (>1.5 倍, $p < 0.05$)、2) ISO 刺激により KO で増加せず ($p > 0.05$)、3) ISO 刺激後に野生型に比べて KO で有意に減少 (<0.7 倍, $p < 0.05$) している代謝物を検索した結果、有意な変動を示す代謝物が 2 個得られた。一方、血清をプールして行った LC-TOFMS 解析では、1) ISO 刺激により野生型で増加 (>1.5 倍)、2) KO で増加せず (<1.5 倍)、3) ISO 刺激後に野生型に比べて KO で有意に減少 (<0.6 倍) している代謝物を検索した結果、9 個の候補代謝物が得られた。例として、CE-TOFMS 解析の結果得られた候補代謝物 (X1 と X2) の結果を示す (図 6)。

これらの代謝物は、カテコラミン刺激に

よるインスリン分泌の責任物質である可能性がある。現在これらの候補物質について、*in vitro*, *in vivo* の系を用いて、膵臓細胞からのインスリン分泌刺激効果について、検証実験を行っている。

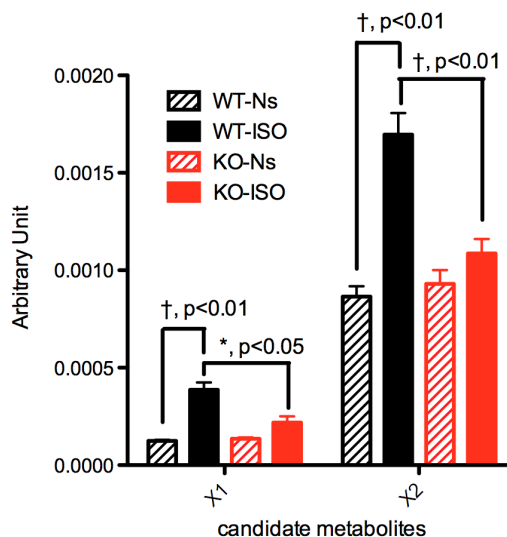


図6. カテコラミン刺激 (ISO, 0.3 mg/kg) 10分後の血漿中代謝産物の解析

この研究から、インスリン分泌機構の新知見、インスリン分泌を促進する新規生理活性脂質の同定、糖尿病治療薬の開発につながる研究成果が期待され、現在更に解析を進めている。

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 1 件)

「リパーゼとメタボリックシンドローム：新たな分子標的の探索」岡崎啓明. 転写代謝セミナー (文部科学省新学術領域研究招待講演). 2014 年 2 月 6 日、群馬県前橋市.

[その他]

ホームページ等
<http://lipid.umin.ne.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡崎 啓明 (Okazaki, Hiroaki)
 東京大学医学部附属病院 特任准教授
 研究者番号: 80610211

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

高梨 幹生 (Takanashi, Mikio)
東京大学医学部附属病院 特任助教
研究者番号 : 70610799

高本 偉碩 (TAKAMOTO, ISEKI)
東京大学医学部附属病院 特任助教
研究者番号 : 60431871