

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：36102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790133

研究課題名(和文) 加齢関連疾患に係わるインスリンシグナル伝達に対するメタロチオネインの関与

研究課題名(英文) Involvement of Metallothionein in Insulin Signaling Associated with Aging-Related Diseases.

研究代表者

門田 佳人 (Kadota, Yoshito)

徳島文理大学・薬学部・助教

研究者番号：60461365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、加齢性疾患に係わるインスリンシグナル伝達に対するメタロチオネイン(以下、MT)の関与をMT遺伝子欠損マウス(以下、MTKOマウス)を用いて検討した。MTKOマウスは、野生型マウスと比較して寿命が短いことが明らかとなった。このマウスの脂肪組織形成能は、野生型マウスのものより高く、高脂肪食摂取下では糖代謝能の亢進も見られた。またMT遺伝子を発現抑制した前駆脂肪細胞は、脂肪細胞への分化能が高かった。さらにMTKOマウス由来の線維芽細胞は、インスリンシグナル伝達の亢進が認められた。以上から、MTがインスリンシグナル伝達を制御し、加齢性疾患を抑制するという仮説の一端を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated involvement of metallothionein (MT) in insulin signaling pathways responsible for aging-related diseases. We showed that MT gene knockout mice (MTKO mice) had shorter lifespans than wild-type mice. MTKO mice had larger amounts of adipose tissues than wild type mice, and glucose metabolic capacity was greater in MTKO mice fed a high-fat diet than in the corresponding wild-type mice. Gene expression levels of adipocyte enlargement factor, Mest and lipoprotein receptor, Vldlr in adipose tissues were higher in MTKO mice than in wild type mice. We characterized gene and protein expression patterns of MT in adipogenesis model in vitro, 3T3-L1 cell line. In addition, pretreatment of MT siRNA promoted adipocyte differentiation in 3T3-L1 preadipocytes. MT knockout increased insulin-stimulated phosphorylation of Akt in mouse fibroblasts. Taken together, MT may protect against aging-related diseases through negative regulation of insulin signaling pathways.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：環境系薬学

キーワード：メタロチオネイン インスリンシグナル伝達 加齢性疾患 老化・寿命

1. 研究開始当初の背景

(1) インスリンシグナル伝達と老化の関係

インスリンシグナル伝達は、インスリンあるいはインスリン様成長因子 (insulin-like growth factor, 以下 IGF) が、インスリン/IGF 受容体に結合することで起こり、肝臓、骨格筋や脂肪組織へのグルコースの取り込みを制御する。一方、インスリンシグナル伝達が過栄養により過剰かつ持続的に活性化すると、活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) の生成を増大させて老化を促進させるといわれている。このインスリンシグナル伝達の亢進が、過栄養から肥満や糖尿病を含む加齢性疾患発症に至るメカニズムの1つと考えられる。一方、インスリン受容体ホモログ *daf-2* 遺伝子が変異した線虫は、1.5~2 倍程度高寿命となることが知られている (Jennie B. ら、*Genetics*, 1995)。この線虫の高寿命化は、インスリン受容体の欠損が栄養分の少ない環境に順応するのと同じように自らの成長を抑制して長く生きるようにする、いわゆるカロリー制限による老化抑制・寿命延長のモデルと考えられている。このインスリンシグナル伝達経路の機構は、ヒトに至るまで高度に保存されているが、この高寿命化現象が線虫と同様に起こるかどうかは不明である。

(2) メタロチオネインと寿命の関係

メタロチオネイン (metallothionein, 以下 MT) は、分子量約 7,000 の低分子量タンパク質で、I~IV の 4 つのアイソフォームが存在する。そのアミノ酸組成の 1/3 がシステインであり、チオール基を介して銅や亜鉛イオンなどの必須微量元素と結合し、またカドミウムや無機水銀イオンなどの有害重金属元素と結合し無毒化する。このチオール基は、フリーラジカルとも容易に反応するため、MT は、ROS を強力に消去する抗酸化タンパク質としてもはたらく。上述の高寿命線虫 *daf-2* 遺伝子変異体において、MT のホモログ *mtl-1* 遺伝子の発現が増大することが示されている (Barsyte D. ら、*FASEB J*, 2001 および Murphy C. T. ら、*Nature*, 2003)。一方で、*daf-2* 遺伝子変異体の *mtl-1* をノックダウンすると、延長した寿命が短縮する。しかし、MT が哺乳類などの高等生物で寿命を制御するかどうかはあまりよく分かっていない。

2. 研究の目的

本研究は、以下の2点について検討した。

(1) MT 発現は寿命に関与するのか?

線虫の研究から、MT は、抗老化効果を有し、老化を促進するインスリンシグナル伝達経路に拮抗すると考えられるが、MT 発現が寿命に与える影響はあまり検討されていない。そこで MT-I, MT-II 遺伝子欠損マウス (MTKO) マウスを用いて、MT が寿命に与える影響を検討することとした。

(2) MT 欠損による肥満や老化にはインスリンシグナル伝達が関与するのか?

当研究室では、雌性 MTKO マウスが、高脂肪

食摂取下において野生型 (WT) マウスと比べて有意に肥満を発症することを示した (Sato ら、*FASEB J*, 2010)。この高脂肪食誘導性の肥満は、線虫における *mtl-1* と *daf-2* の関係同様に MT の欠損によりインスリンシグナル伝達が亢進し、糖取り込みおよび脂質合成能が増大することに起因し、遂には寿命に至ると仮定した。そこで、インスリンシグナル伝達に対する MT の関与に着目し、MT 欠損の糖・脂質代謝から肥満を含む加齢性疾患に与える影響について検討することとした。また、特にインスリンシグナル伝達と肥満などの加齢性疾患と密接にかかわる臓器として脂肪組織がある。この脂肪組織・脂肪細胞に着目し、MT 発現が、インスリンシグナル伝達と加齢性疾患にどう関わるかを *in vivo* および *in vitro* で検討した。

3. 研究の方法

(1) MTKO マウスの寿命の調査

雌雄 MTKO および WT マウス (ともに 129/SV バックグラウンド、n=11~18) を使用した。恒温恒湿下、明暗周期 12:12 時間で飼育した。自由摂食、自由飲水条件下で寿命まで飼育した。マウスの寿命は、Kaplan-Meier の生存曲線を作成し、比較検定 (ログランク検定および一般化ウィルコクソン検定) によって評価した。

(2) MTKO マウスにおける各種パラメータの解析

8 週齢雌雄マウスを通常飼料 (343 kcal/100 g、粗脂肪率 3.8%) で長期 (35 週) 飼育した後、その体重、生殖器周囲の脂肪組織重量を測定した。生殖器周囲脂肪細胞面積は、HE 染色像を蛍光顕微鏡 BIOREVO (キーエンス社) の計測モジュールを使用して測定した。血糖値は、ニプロフリースタイルセンサー (ニプロ社) を用いた。血中インスリン値およびレプチン値は ELISA 法により測定した。また通常食あるいは高脂肪食 (508 kcal/100 g、粗脂肪率 32%) で 13~16 週間飼育したマウスの腹腔内糖負荷試験では、12 時間絶食後、グルコース 2 g/kg で腹腔内に投与し、0, 15, 30, 60, 120 および 180 分後に血糖値を測定した。各遺伝子発現量は、RT-PCR 法により評価した。

(3) 培養脂肪細胞を用いた *in vitro* 研究

汎用される *in vitro* 培養脂肪細胞分化モデル 3T3-L1 前駆脂肪細胞株および分化させた脂肪細胞を用いて以下の実験を行った。

① 3T3-L1 脂肪細胞分化過程における MT の発現変動

分化誘導剤カクテル (インスリン (以下、INS)、デキサメタゾン (以下、DEX)、キサンチン誘導体 (以下、IBMX)) およびその各コンポーネントで刺激した際 MT mRNA の発現を RT-PCR により解析した。また各コンポーネントで刺激した際の MT タンパク質の発現を一次

抗体として抗 MT 抗体を、二次抗体として Alexa Fluor 488 標識抗体を用いた間接蛍光抗体法で観察した。

② MT 遺伝子の機能喪失実験

3T3-L1 前駆脂肪細胞株に対して 50 nM siRNA をトランスフェクションして MT 遺伝子をノックダウンさせた。この時の MT mRNA の発現を RT-PCR 法で、タンパク質の発現を間接蛍光抗体法で確認した。この MT siRNA と siRNA control を処理した 3T3-L1 細胞に脂肪細胞分化誘導処理し、脂肪細胞の分化度を Oil Red O による中性脂肪染色を指標に検討した。

③ MTKO マウス由来線維芽細胞株のインスリン曝露によるインスリンシグナルの活性化

MTKO および WT 両系統マウスの脂肪組織から単離した線維芽細胞株に対して無血清培地下で 0~100 ng/mL インスリンを 10 分間処理後に細胞抽出液を調製し、インスリンシグナル伝達の下流に存在する Akt タンパク質のリン酸化をウェスタンブロット法により検出した。

4. 研究成果

(1) MTKO マウスの寿命

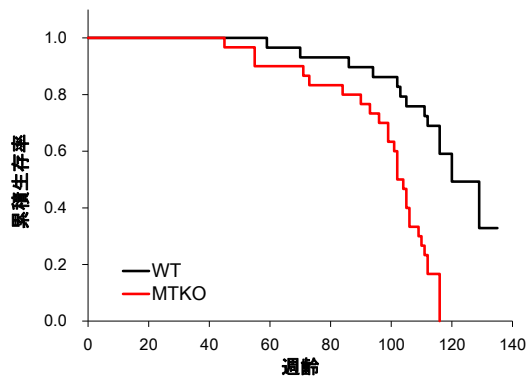


図 1: 雌雄 WT および MTKO マウスの生存曲線
黒線: WT マウス群、赤線: MTKO マウス群

研究当初の計画通り、研究期間内に全マウスが死亡しなかったため、途中結果を示す。雌雄 MTKO マウスの寿命 (平均値 97.6 週齢、中央値 102.0 週齢) は、雌雄 WT マウスの寿命 (平均値 117.8 週齢、中央値 120.0 週齢) と比較し、有意に短いことが確認された (ログランク検定および一般化ウィルコクソン検定いずれも $P < 0.001$) (図 1)。雌性マウスにおいても、WT マウス (平均値 112.3 週齢、中央値 120.0 週齢) と比較して MTKO マウス (平均値 90.3 週齢、中央値 99.0 週齢) は有意 ($P < 0.001$) に短く、雄性マウスに関して、死亡例数が少ないものの、同様の傾向が認められた ($0.01 < P < 0.05$)。このことから MT の欠損は、マウスの寿命を短縮化することが初めて示された。

(2) MTKO マウスにおける各種パラメータ

WT および MTKO マウスを通常食で 35 週間飼育した際の各種パラメータを表 1 に示した。

性別	WT	MTKO
雌性		
体重 (g)	26.0 ± 0.3	24.9 ± 0.8
脂肪重量 (g)	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.1
平均脂肪細胞面積 (μm ²)	1031 ± 82	1554 ± 33*
血糖値 (mg/dL)	121.9 ± 9.8	104.0 ± 4.5
血漿インスリン値 (mg/mL)	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.2
血漿レプチン値 (ng/mL)	4.0 ± 0.6	6.9 ± 1.0*
雄性		
体重 (g)	29.2 ± 0.6	32.6 ± 1.6*
脂肪重量 (g)	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.2*
平均脂肪細胞面積 (μm ²)	957 ± 62	1208 ± 72*
血糖値 (mg/dL)	109.2 ± 4.5	123.0 ± 4.4*
血漿インスリン値 (mg/mL)	1.3 ± 0.2	1.0 ± 0.2
血漿レプチン値 (ng/mL)	5.6 ± 0.7	16.7 ± 3.5*

表 1: 雌雄 WT および MTKO マウスの各種パラメータ値は平均値 ± 標準誤差で示した。* $P < 0.05$, 対 WT 群。

雌性 MTKO マウスと WT マウス間の体重は、有意な差は認められなかったが、脂肪重量は、MTKO マウスの方が重い傾向を示し、脂肪細胞面積は、WT マウスと比較して顕著に高値を示した。雄性マウスでは、WT マウスと比較して MTKO マウスの方が有意に体重、脂肪重量、脂肪細胞面積が大きかった。この WT マウスと MTKO マウスの脂肪組織の大きさは、全身の脂肪組織量と比例するアディポカインであるレプチン量と相関した。一方、血漿インスリン値には、有意な差は、認められなかった。

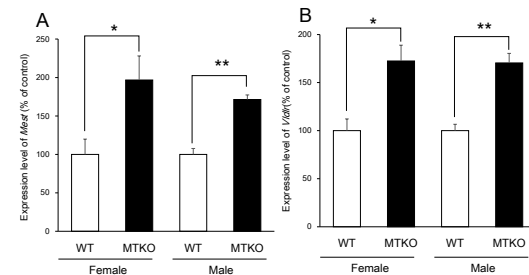


図 2: A, *Mest* 遺伝子発現; B, *Vldlr* 遺伝子発現
値は平均値 ± 標準誤差で示した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

次にマウスの脂肪組織中の脂肪組織関連遺伝子について RT-PCR 法によりその発現を比較解析した。その中で脂肪細胞肥大化促進遺伝子 *Mest* (図 2A) および脂質代謝の活発な組織で発現の高いリポタンパク質受容体遺伝子 *Vldlr* (図 2B) の発現が、雌雄共に WT マウスと比較して MTKO マウスで高値を示した。これらの結果は、脂肪細胞サイズと相関したため、MTKO マウスは、摂取カロリーおよび血漿インスリン値が WT マウスと同等であるにもかかわらず、脂肪組織が肥大化しやすく、食餌に対する感受性が高いと考えられる。しかし、糖の取り込み (*Slc2a4* など)、脂質の取り込み (*Ldlr* や *Cd36* など) や脂質生成や分解に関

わる遺伝子 (*Fasn* や *Acaca* など) の発現は、WT と MTKO マウス間で有意な差は認められず、どのように脂肪細胞が肥大していくのかは、今後の検討課題である。

次に、WT および MTKO マウスに対して腹腔内糖負荷試験を行った。

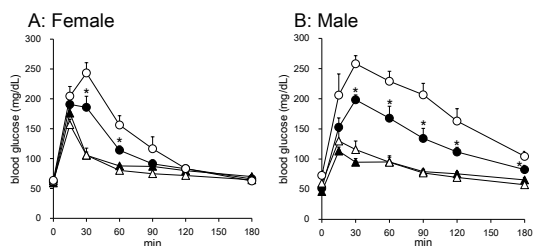


図 3: 腹腔内糖負荷試験

A, 雌性; B, 雄性; Δ : 通常食摂取 WT マウス; \blacktriangle : 通常食摂取 MTKO マウス; \circ : 高脂肪食摂取 WT マウス; \bullet : 高脂肪食 MTKO マウス。 $P < 0.05$, 対高脂肪食摂取 WT 群。

糖負荷による血糖値の変動は、通常食摂取の WT と MTKO マウス間において、雌雄とも同程度であった (図 3A, 3B: Δ と \blacktriangle)。一方、高脂肪食を摂取したマウス間において、WT マウスと比較して MTKO マウスの最高血糖値は有意に低く、血糖の濃度時間曲線下面積は、低い傾向を示した (図 3A, 3B: \circ と \bullet)。したがって、MTKO マウスは、高脂肪食摂取時において WT マウスと比較して糖代謝能が高いことを示している。この高脂肪食摂取した MTKO マウスの高い糖代謝能は、MT 遺伝子欠損によりインスリンシグナル伝達が亢進している可能性を示唆しており、これが MTKO マウスの短寿命化に影響を与えているのかもしれない。しかし、糖代謝能に差が認められない通常食摂取下において MTKO マウスの短寿命化が認められることから、今後、MTKO マウスの通常食摂取下におけるインスリン感受性について検討する必要がある。

(3) *In vitro* における MT と脂肪細胞に関する研究

① 脂肪細胞分化過程における MT の発現

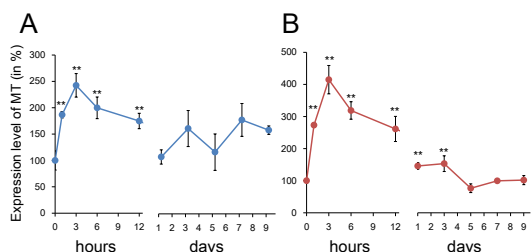


図 4: 3T3-L1 脂肪細胞分化モデルにおける MT mRNA の発現変動 A, MT-I; B, MT-II $P^{**} < 0.01$, 対 0 時間。

汎用される *in vitro* 脂肪細胞分化モデルである 3T3-L1 前駆脂肪細胞株を用いて、その分化過程における MT の発現を検討した。MT-I mRNA の発現量

は、分化誘導開始 3 時間後をピークに有意

に増大し、その後 1 日以降は、分化誘導開始前の発現レベルに戻った (図 4A)。一方、MT-II mRNA の発現量は、分化誘導開始 3 時間後をピークに有意に増大し、その後緩やかに減少していき、5 日目には基底レベルへ戻った (図 4B)。次に、この脂肪細胞分化による MT の発現が、分化誘導剤カクテル (以下、DIM) に含まれる各コンポーネントによる影響かどうかを検討するため、それぞれを単独処理した場合の MT mRNA およびタンパク質の発現を解析した。

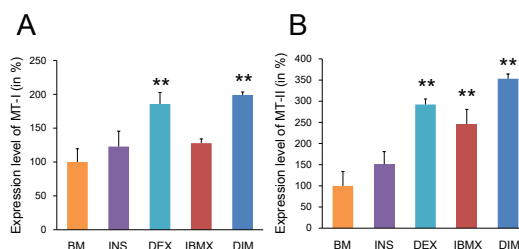


図 5: 分化誘導剤カクテルとその各コンポーネント刺激による MT mRNA の発現変動 A, MT-I; B, MT-II $P^{**} < 0.01$, 対基礎培地 (BM)。

MT-I および MT-II の mRNA 発現量は、DIM 同様に DEX の単独処理によって有意に増大した (図 5A, 5B)。また IBMX 単独処理では、MT-II の有意な発現増大が観察された (図 5B)。これらの mRNA の発現変動は、MT-I と MT-II 両タンパク質を認識する抗体を用いた間接蛍光抗体法の結果と一致し、DEX 単独処理群および DIM で MT タンパク質の顕著な増大が細胞質で認められ、IBMX 単独処理群ではわずかな増大が観察された (図 6)。

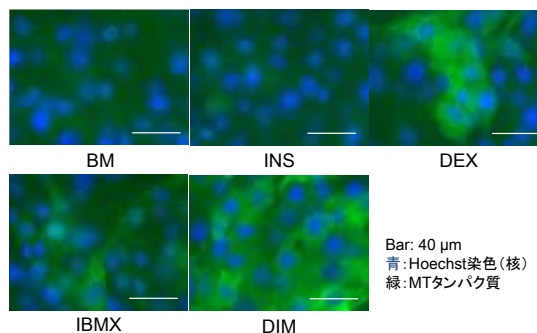


図 6: 分化誘導剤カクテルとその各コンポーネント刺激による MT-I/-II タンパク質の発現

したがって、当該分化系における MT の発現増大は、脂肪細胞分化過程に伴った反応ではなく、脂肪細胞分化には不十分な IBMX や DEX によるものだと考えられる。また INS によって発現増大しなかったため、インスリンシグナル伝達は、MT の発現自体に直接関与しないと考えられる。

② 脂肪細胞分化に及ぼす MT 発現抑制の影響

MTKO マウスの脂肪組織中の脂肪細胞は、WT マウスと比較して肥大化し、脂肪組織が大きくなる傾向を示した。したがって、MT は、脂

肪組織形成および加齢性疾患、特に肥満を制御すると考えられる。そこで *in vitro* において MT の発現を siRNA によって発現抑制したときの 3T3-L1 脂肪細胞分化系に与える影響を検討した。まず MT siRNA の効果を検討した。分化誘導剤刺激による MT mRNA (図 7A) およびタンパク質 (図 7B) の発現増大は、siRNA 処理により有意に抑制された。

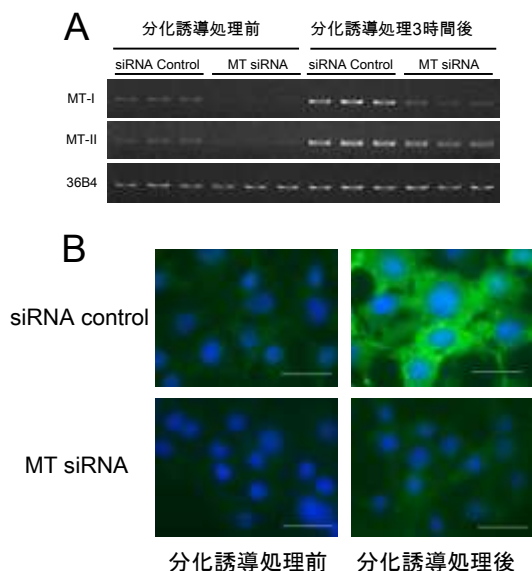


図 7: 3T3-L1 細胞株に対する MT siRNA の効果
A, mRNA 発現; B, MT タンパク質発現; Bar=40 μ m, 青、核染色; 緑、MT タンパク質

3T3-L1 前駆脂肪細胞株に対して MT siRNA を前処理し、脂肪細胞分化誘導処理を行った。その結果、MT siRNA を処理した 3T3-L1 細胞株は、siRNA control を処理した細胞と比較して中性脂肪の指標となる Oil Red O 色素の保持量が増大し、脂肪滴を有する脂肪細胞が多く認められた (図 8A と 8C)。

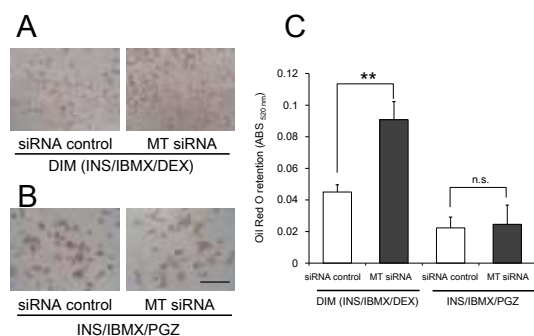


図 8: 3T3-L1 脂肪細胞の脂肪蓄積に対する MT siRNA の効果
A, 通常の脂肪細胞分化誘導カクテル (DIM) で分化誘導した場合の細胞像。B, DEX の代わりに PGZ を用いた場合の細胞像 (Bar=250 μ m; 赤, Oil Red O 色素)。C, Oil Red O 色素の保持量 ($P^{**}<0.01$; n. s., not significant)

次に、MT の発現誘導作用を有する DEX の代わりに MT 誘導作用をもたないが脂肪細胞分化

を誘導するピオグリタゾン (PGZ) を用いて同様に MT siRNA 処理を行った。その結果、脂肪蓄積量は、MT siRNA と siRNA control 間で有意な差は認められなかった (図 8B と 8C)。これらの結果から、MT の発現抑制は、3T3-L1 脂肪細胞分化系においても脂肪蓄積を増大させることを示し、MT の発現が脂肪組織の形成を制御する可能性の一端を明らかにした。詳細なメカニズムは、さらなる解析が必要となる。一方でこの発現抑制効果は、合成ステロイドである DEX を含まない分化系では認められないことから、MT が発現誘導されるような環境下、例えば環境ストレスが多い条件などで起こる現象である可能性が示唆される。これは、MTKO マウスが高脂肪食誘発性肥満であることと関係するかもしれない。

③MTKO マウス由来線維芽細胞株のインスリンシグナル伝達

本研究のこれまでの結果から、MTKO マウスは、野生型マウスと比較して糖代謝能が高く、インスリンシグナル伝達が亢進している可能性が示唆された。そこで、この可能性を検証するため、*in vitro* 細胞系を用いた。MTKO および WT 両系統マウスの脂肪組織から単離した線維芽細胞株を樹立している (Sato ら、*FASEB J*, 2010)。この細胞株に対して各濃度のインスリンを処理し、インスリンシグナル伝達の下流に存在するタンパク質キナーゼ Akt の活性化 (リン酸化) を指標に検討した。

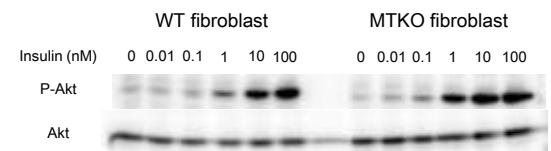


図 9: インスリン暴露した WT および MTKO マウス由来線維芽細胞株の Akt のリン酸化

その結果、野生型と比較して MTKO マウス由来線維芽細胞株において 1 nM インスリン添加群で顕著な Akt のリン酸化 (P-Akt) が観察され、MTKO マウス由来細胞は、より低濃度のインスリンでシグナル伝達が活性化することが分かった。したがって、MT 遺伝子欠損によってインスリンシグナル伝達が亢進していることが *in vitro* の系で明らかとなった。このインスリンシグナル伝達の亢進が、肥満を含む加齢性疾患および寿命に影響を与えているかどうかに関し、さらなる研究が必要がある。

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)

[雑誌論文] (計 4 件)

Kawakami T, Yoshimi M, Kadota Y, Inoue M, Sato M, Suzuki S. Prolonged endoplasmic reticulum stress alters placental morphology and causes low birth weight.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 2014, 275, 134-44. 査読有

Kawakami T, Nishiyama K, Kadota Y, Sato M, Inoue M, Suzuki S. Cadmium modulates adipocyte functions in metallothionein-null mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013, 272, 625-36. 査読有

Sato M, Kawakami T, Kadota Y, Mori M, Suzuki S. Obesity and Metallothionein. *Curr Pharm Biotechnol.* 2013, 14, 432-40. 査読有

佐藤政男、川上隆茂、門田佳人、鈴木真也 小胞体ストレスと加齢性疾患におけるメタロチオネインの関与 *生体の科学*, 2012, 63, 382-3 査読有

〔学会発表〕(計6件)

鳥内有里子、門田佳人、川上隆茂、佐藤政男、鈴木真也

In vitro 脂肪細胞分化モデルにおけるメタロチオネインの発現とその機能に関する研究
日本薬学会 第134年会 2014/3/28 熊本・熊本市総合体育館

Shinya Suzuki, Takashige Kawakami, Satoshi Takasaki, Yoshito Kadota, Masao Sato Possible inhibitory function of Metallothionein in Obesity X ISTERH 2013 2013/11/19 Keio Plaza Hotel Tokyo in Tokyo, Japan.

門田佳人、安藝 友香、鳥内 有里子、川上隆茂、佐藤 政男、鈴木真也

培養脂肪細胞分化系におけるメタロチオネインの発現とその機能に関する研究 メタルバイオサイエンス研究会 2013 2013/9/27 静岡・静岡県立大学

門田佳人、川上隆茂、高崎智士、佐藤政男、鈴木真也

マウスの白色脂肪組織、肝臓および骨格筋における糖・脂質代謝関連遺伝子発現の性差に関する研究 フォーラム2013 衛生薬学・環境トキシコロジー 2013/9/14 福岡・九州大学医学部百年講堂

門田佳人、中矢 誠子、安藝 友香、川上隆茂、佐藤 政男、鈴木 真也 メタロチオネインの欠損が脂肪細胞分化能に与える影響 2013/3/30 日本薬学会 第133年会 横浜・パシフィコ横浜

川上 隆茂、西川 裕、門田佳人、佐藤 政男、鈴木 真也

高脂肪食誘導性脂肪肝発症におけるテストステロンとメタロチオネインの相互作用の解析

2012/10/25 フォーラム2012 衛生薬学・環境トキシコロジー 名古屋・名古屋観光ホテル

〔その他〕

ホームページ等

<http://ph.bunri-u.ac.jp/lab11>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

門田 佳人 (KADOTA, Yoshito)

徳島文理大学・薬学部・助教

研究者番号：60461365