

機関番号：84404

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790900

研究課題名（和文）皮下脂肪組織由来インスリン抵抗性改善因子の同定とその機能解明

研究課題名（英文） Searching for the subcutaneous adipose tissue-derived factor that improves insulin resistance.

研究代表者

宮澤 崇 (MIYAZAWA TAKASHI)

独立行政法人 国立循環器病研究センター・生化学部・客員研究員

研究者番号：30443500

研究成果の概要（和文）：心筋梗塞や脳血管障害などの疾患をひきおこすメタボリックシンドロームの患者は、我が国において約1960万人いると推定されており、メタボリックシンドロームの病態の解明及び治療法の開発が緊急の課題となっている。本研究では、メタボリックシンドロームの病態の基盤となるインスリン抵抗性を改善する因子の同定を目的として、新しい生理活性因子の探索法を開発し、脂肪組織から分泌されるインスリン感受性改善因子を同定した。

研究成果の概要（英文）：The metabolic syndrome, which is a recognized risk factor for cardiovascular diseases, is associated with visceral fat accumulation and insulin resistance. In this study, to identify newly endogenous factors that improve insulin resistance in liver, we developed the new assay systems and identified the insulin-like growth factor II (IGF-2) from the adipose tissues.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：内分泌代謝学、ペプチド化学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：内分泌、インスリン抵抗性、生理活性ペプチド、脂肪組織

1. 研究開始当初の背景

糖尿病、高血圧、高脂血症などのリスクファクターが単一個体に重複して発症すると、虚血性心疾患や脳梗塞などの動脈硬化性疾患の発症頻度がきわめて高率になることが明らかとなり（Sattar N et al. Circulation 108:414-419, 2003）、これらの病態を一元的に捉える疾患概念としてメタボリックシ

ンドロームが注目を集めている。最近の研究により、メタボリックシンドロームの発症基盤として、肥満（内臓脂肪の蓄積）及びインスリン抵抗性が重要であり、脂肪細胞が内分泌臓器として様々なアディポサイトカインを分泌し、肥満に伴って生じるアディポサイトカインの分泌異常が、インスリン標的臓器で

ある肝臓や骨格筋、脂肪細胞におけるインスリン抵抗性を引き起こすことが明らかとなっている。一方、インスリン抵抗性の分子メカニズムに関しても精力的な研究が行なわれ、インスリンシグナルの骨格をなす分子（インスリン受容体、インスリン受容体基質（IRS）、PI3 キナーゼ、Akt など）のインスリン抵抗性における役割が明確になってきた。特に、PI3 キナーゼの下流でインスリンによる糖代謝調節作用における重要なエフェクター分子として作用する Akt に関して、Akt ノックアウトマウス（Cho H et al. Science 292:1728-31, 2001）や、ヒトの Akt の遺伝子変異（George S et al. Science 304:1325-28, 2004）が重篤なインスリン抵抗性を引き起こすことより、インスリン抵抗性における Akt リン酸化シグナル障害の重要性が示唆される。

我々はこれまで、生体の脂肪組織から分泌される生理活性因子の探索を行い、脂肪組織抽出物から複数の活性画分を得ている。この過程で明らかになったこととして、皮下脂肪及び内臓脂肪組織から別々にサンプルを調整して活性検出を行ったところ、脂肪組織部位特異的な活性を見出した。このことは皮下脂肪と内臓脂肪がアディポサイトカインを分泌する内分泌臓器として、生体内で異なる機能を有していることを意味している。さらに、皮下脂肪と内臓脂肪組織の違いに着目した最近の研究（Tran TT et al. Cell metabolism 7:410-20, 2008）において、脂肪組織の解剖学的部位の違いにより生体のエネルギー代謝調節に与える影響が異なるかを明らかにする目的で、マウスの皮下脂肪及び内臓脂肪組織をそれぞれ、別のマウスの皮下及び内臓部位に移植する実験を行った。この結果、皮下脂肪組織を内臓脂肪部位に移植したマウスでのみ、体重、体脂肪量が減少し、

インスリン抵抗性の改善が認められた。詳細な検討により、このマウスで認められたインスリン抵抗性改善作用は主に肝臓での糖放出抑制によるものであった。さらに、既知のアディポサイトカインの血中濃度や遺伝子発現を検討したが、いずれも移植マウス間における差が認められないことから、皮下脂肪移植マウスにおけるインスリン抵抗性改善のメカニズムとしては、既知のアディポサイトカインは関与しておらず、皮下脂肪組織より分泌される新規のインスリン抵抗性改善因子の存在が想定された。

2. 研究の目的

本研究では、皮下脂肪組織から分泌される新規インスリン抵抗性改善因子の同定とその機能解析を目指す。具体的には、インスリン標的臓器である肝臓の株化培養細胞に対して皮下脂肪組織抽出サンプルを添加し、インスリン作用において重要な Akt のリン酸化を高感度でハイスループットなアッセイ系を用いて検出する。

3. 研究の方法

(1) 標的細胞

インスリン標的臓器である肝臓の株化培養細胞（HepG2 細胞）を用いる。

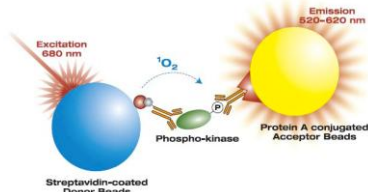
(2) 脂肪組織抽出サンプルの調製

ラット皮下及び内臓脂肪組織を 100℃で 5 分間熱処理後、1N 酢酸にて抽出した。アセトン沈殿、Sep-Pak C18 カートリッジによる処理の後、陽イオン交換クロマトグラフィー及びゲル濾過クロマトグラフィーにより脂肪組織抽出サンプルを調製した。

(3) アッセイ系の構築

HepG2 細胞に脂肪組織抽出サンプルを添加し、Akt のリン酸化を Fusion- α を用いた高感度・ハイスループットアッセイ系（図 1）を用いて検出する。

AlphaScreen SureFire™ Cellular Kinase Assays



【図1】リン酸化 Akt アッセイの原理

レーザー照射によりドナービーズから化学的シグナルが発生し、Akt 抗体、リン酸化 Akt 抗体及びリン酸化 Akt を介して2つのビーズが近接すると、大きく増幅された蛍光がアクセプタービーズから発生する。この蛍光強度を測定することにより Akt のリン酸化を高感度に定量する。

(4) 生理活性因子の精製及び構造解析

上記アッセイにて得られた活性画分を、イオン交換クロマトグラフィー及び逆相高速液体クロマトグラフィーを用いて精製を進める。精製した生理活性因子は質量分析計及びペプチドシーケンサーを用いて、分子量と構造を決定し同定する。

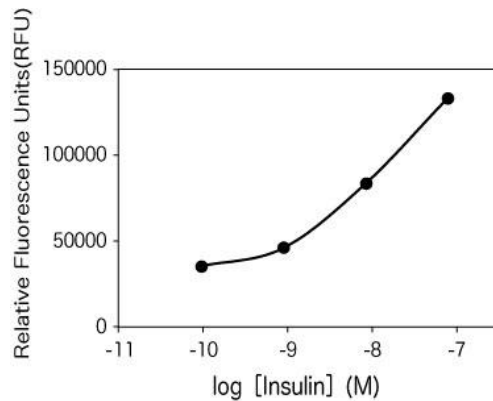
4. 研究成果

(1) リン酸化 Akt の高感度アッセイ系の構築

インスリン下流シグナルにおいて重要な Akt のリン酸化を高感度に検出するアッセイ系を構築する目的で、インスリン刺激による Akt のリン酸化を Fusion- α を用いて蛍光強度の変化として検出するための基礎検討を行った。インスリンの標的臓器である肝臓 (HepG2 細胞) を標的として、細胞の播種濃度、血清の有無、反応時間などの条件検討を行ったところ、インスリンの容量依存的に蛍光強度の変化として検出することが可能となった。(図2)

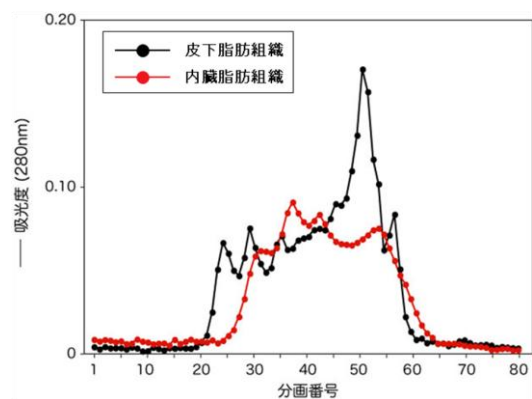
(2) 皮下及び内臓脂肪組織抽出サンプルの調製

同一個体のラットから皮下脂肪及び内臓脂肪組織を採取し、酢酸による抽出の後、イ



【図2】HepG2 細胞に対するインスリン添加による蛍光強度の増強

オン交換クロマトグラフィー及びゲル濾過クロマトグラフィーにて分画した脂肪組織抽出サンプルを調整した。調製したサンプルの吸光度は採取した脂肪組織の部位特異的なパターン (図3) を呈しており、皮下脂肪組織と内臓脂肪組織で抽出物を構成する成分が異なることが明らかとなった。

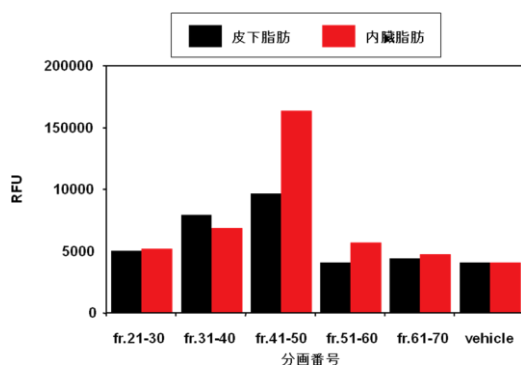


【図3】皮下及び内臓脂肪抽出物の吸光度パターン

(3) 脂肪組織由来インスリン抵抗性改善因子の探索

上記にて調整した皮下脂肪及び内臓脂肪組織サンプルを HepG2 細胞に添加して Akt のリン酸化を測定したところ、分子量約 3000-5000 の画分に強い Akt リン酸化活性を

認めた(図4)。当初の予想に反して、皮下脂肪よりも内臓脂肪組織抽出物でより強い活性を認めた。この活性画分を逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて分離したところ、皮下脂肪及び内臓脂肪組織抽出物は同じ溶出位置に活性を認め、各種クロマトグラフィーの溶出時間から同一の活性物質である可能性が示唆された。



【図4】皮下及び内臓組織抽出物の活性画分

この活性画分を陽イオン交換 HPLC 及び複数の逆相 HPLC により精製し、最終的に単一の活性画分を得た。この活性画分をプロテインシーケンサーによるアミノ酸配列解析及びマススペクトロメーターによる質量分析を行ったが、同定には至らなかった。そこで、活性物質をトリブシン消化したところ、逆相 HPLC による溶出時間が変化し、活性の消失を認めたことから、この活性物質はアミノ酸結合を持った物質であることが示唆された。

(4) ブタ内臓脂肪組織を用いた活性物質の同定

活性物質の同定を可能にするため、出発材料をブタの網脂(内臓脂肪組織)に変更して同定を行った。ブタ内臓脂肪組織、約4kgを酢酸抽出し、イオン交換及びゲル濾過クロマトグラフィーにて調整したサンプルを HepG2 細胞に添加したところ、ラットの脂肪組織と同様の性質を持った活性画分を得た。陽イオ

ン交換 HPLC 及び複数の逆相 HPLC により精製した活性画分をプロテインシーケンサーによりアミノ酸配列解析したところ、N 末端から 27 アミノ酸が同定され、ブタの Insulin-like growth factor II (IGF-2) の配列と完全に一致していた。また、合成品の逆相 HPLC による溶出時間や、HepG2 細胞に対する Akt リン酸化活性の比活性の検討から、今回脂肪組織より精製した活性物質は IGF-2 であることが明らかとなった。

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)

Miyazawa T, Miyazato M, Yoshida M, Sawai K, Mori K, Kangawa K. Identification of bioactive peptides associated with the metabolic syndrome. 14th International Congress of Endocrinology, March 30, 2009, Kyoto, Japan.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮澤 崇 (MIYAZAWA TAKASHI)

独立行政法人 国立循環器病研究センター・
生化学部・客員研究員

研究者番号：30443500

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし