

令和 2 年 5 月 3 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08282

研究課題名(和文) 脂肪細胞のインスリン抵抗性惹起におけるカリウムチャネルの役割と機能の解明

研究課題名(英文) The role of potassium channels on the regulation of the insulin signaling pathway

研究代表者

西塚 誠 (Nishizuka, Makoto)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：00363953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病患者数増加が世界規模で大きな問題となっている。その解決のためには、主要な原因である肥満の増加とインスリン抵抗性の惹起機構の解明が必要不可欠である。本研究において、カリウムチャネルの一つKCNMA1のチャネル活性がインスリン感受性制御に、さらに、同じくカリウムチャネルに属するKCa3.1が脂肪細胞分化制御に重要な役割を担うことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、インスリン抵抗性惹起と脂肪細胞分化制御に重要な役割を担うカリウムチャネルを見出すことができた。この成果は、インスリン感受性ならびに脂肪細胞分化の制御機構の全容解明の解明だけでなく、新しい肥満および糖尿病治療薬の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To develop new medicine for insulin resistance, it is important to clarify the molecular mechanisms of regulation of the insulin signaling pathway and adipocyte differentiation. In this study, we demonstrated that activation of KCNMA1 channels is required for the regulation of insulin signaling in mature adipocytes. Furthermore, we revealed that the expression of KCa3.1 was upregulated in WAT of mice fed a high fat diet, and was quickly elevated after induction of adipocyte differentiation. In addition, knockdown and overexpression experiments showed that KCa3.1 negatively regulates adipocyte differentiation. Further analyses of KCNMA1 and KCa3.1 will help to understand the molecular mechanisms of insulin signaling pathway and adipocyte differentiation.

研究分野：分子生物学

キーワード：脂肪細胞 カリウムチャネル インスリンシグナル

1. 研究開始当初の背景

2016年にWHOが発表した調査結果によると、2014年の糖尿病罹患者は約4億人であり、2025年には7億人を超えると予測されている。この結果が示すように、糖尿病患者数増加が世界規模で大きな問題となっているが、その根本的要因は、高脂肪食や運動不足による肥満の増加とそれに伴うインスリン抵抗性の増大である。肥満を呈すことにより、骨格筋や肝臓、白色脂肪組織においてインスリン抵抗性が惹起され、II型糖尿病の発症につながる。特に、白色脂肪組織に含まれる成熟脂肪細胞においてインスリン抵抗性が惹起されると、アディポネクチンなどのアディポサイトカインの発現、分泌に異常が生じ、骨格筋や肝臓における糖の取り込み能の減弱を加速させる。それゆえ、II型糖尿病に対する有効な創薬開発には、肥満の原因となる脂肪細胞の分化、肥大化の分子機構に加え、成熟脂肪細胞におけるインスリン抵抗性惹起の分子機構を解明することが極めて重要である。

申請者らは脂肪細胞分化の分子メカニズムを明らかにすることを目的とし、脂肪細胞分化初期過程に発現が増加する遺伝子群を数多く単離し、その解析を進めてきた。これまでに、単離した遺伝子群の多くが脂肪細胞分化に重要な役割を担うことを明らかにした(1, 2)。さらに、遺伝子改変マウスを用いた検討により、肥満形成、糖代謝能の維持だけでなく、骨分化、肺形成、がん細胞の浸潤にも重要な役割を担う遺伝子が存在することも明らかにした(3, 4)。

近年、カリウムチャンネルが自己免疫疾患やがんなどの疾患に対する創薬標的として注目されている(5)。また、不整脈の一種であるQT延長症候群やてんかんの原因遺伝子の一つがカリウムチャンネルであることも知られている(6)。その一方、脂肪細胞におけるカリウムチャンネルの役割とその機能はよくわかっていなかった。そのため上記検討に加えて、脂肪細胞におけるカリウムチャンネルの役割について検討も進めてきた。

これまでの検討により、two-pore型カリウムチャンネルに属するpotassium channel, subfamily K, member10 (KCNK10)が、脂肪細胞分化初期において分化を促進する機能を有することを明らかにした(7)。さらに、肥満を呈した脂肪組織ならびに肥大化した成熟脂肪細胞において、カルシウム活性型カリウムチャンネルに属するcalcium activated large conductance subfamily M alpha, member 1 (KCNMA1)の発現が顕著に減少すること、KCNMA1の発現抑制およびチャンネル阻害剤の添加により成熟脂肪細胞におけるインスリンシグナルが減弱することを明らかにした(8)。また、脂肪組織におけるKCNMA1を含めた複数のカリウムチャンネルの発現が肥満を呈することにより大きく変動することも見出している。これらの知見は、カリウムチャンネルが脂肪細胞の分化や機能の制御を介して肥満形成やインスリン抵抗性の惹起に深く寄与することを強く示唆する。しかしながら、各種カリウムチャンネルがどのような分子機構で制御しているのか、また、生体レベルにおいてどのような役割を担うのかについては未だ不明である。

2. 研究の目的

そこで本研究ではまず、KCNMA1による成熟脂肪細胞のインスリンシグナル制御の分子メカニズムを明らかにする。さらに、肥満誘発により発現が変動することが明らかになったカリウムチャンネルに着目し、脂肪細胞における役割とその機能の解明をめざす。

3. 研究の方法

KCNMA1 のチャンネル活性がインスリンシグナルに与える影響を解析するため、3T3-L1 細胞や C2C12 細胞などの株価培養細胞を用いた。また、Akt のリン酸化レベルの評価には主に Western blot 法を用いた。

肥満形成ならびに脂肪細胞分化過程において発現が変動するカリウムチャンネルの探索するため、*ob/ob* マウスの白色脂肪組織から RNA を抽出し、Q-PCR 法により、種々のカリウムチャンネルの発現を検討した。脂肪細胞分化における $K_{Ca3.1}$ の役割を検討には、 $K_{Ca3.1}$ を標的とする siRNA を用いた発現抑制系ならびにレトロウイルスを用いた過剰発現系により評価した。

4. 研究成果

(1) KCNMA1 のチャンネル活性がインスリンシグナルに与える影響の解析

KCNMA1 のチャンネル阻害剤である Paxilline およびチャンネル活性化剤である NS1619 を用いて、チャンネル活性制御剤が成熟脂肪細胞のインスリンシグナルに与える影響を検討した。Paxilline を用いた検討の結果、インスリン刺激により上昇したリン酸化 Akt は Paxilline 添加により低下することが明らかになった。次に、NS1619 が成熟脂肪細胞のインスリンシグナルに与える影響を検討した結果、インスリン刺激により上昇したリン酸化 Akt は NS1619 添加により低下した。

KCNMA1 は骨格筋において発現が高いこと、骨格筋はインスリンの標的組織の一つであることから、筋芽細胞 C2C12 を分化させた筋管細胞のインスリンシグナルに KCNMA1 チャンネル活性制御剤が与える影響について検討した。その結果、成熟脂肪細胞を用いた検討と同様、Paxilline および NS1619 の添加により、インスリン刺激による Akt のリン酸化レベルが抑制された。これらの結果より、KCNMA1 のチャンネル阻害剤 Paxilline および活性化剤 NS1619 のどちらを添加しても、インスリン刺激後のリン酸化 Akt が低下することが明らかになった。この結果は、KCNMA1 のチャンネル活性がインスリンシグナルに關与する可能性を示唆するものであるが、阻害剤、活性化剤いずれでもインスリンシグナルが抑制された機構については不明である。NS1619 は、KCNMA1 だけでなく電位依存性カリウムチャンネルを制御することが報告されている。そのため、KCNMA1 のチャンネル活性阻害および活性化が、共にインスリン刺激後のリン酸化 Akt を低下させた原因の一つとして、Paxilline および NS1619 が KCNMA1 以外のカリウムチャンネルに作用している可能性も考えられる。

(2) 肥満形成ならびに脂肪細胞分化過程において発現が変動するカリウムチャンネルの探索

高脂肪食を負荷したマウスの白色脂肪組織における各種カリウムチャンネルの発現について検討を行った。その結果、 $K_{V1.1}$ 、 $K_{V7.1}$ 、 $K_{ir2.2}$ 、 $K_{ir6.2}$ は高脂肪食を負荷することにより発現が低下した。一方、 $K_{V1.5}$ 、 $K_{Ca3.1}$ 、 $K_{2P3.1}$ は高脂肪食を負荷することにより発現が上昇した。次に、脂肪細胞分化に關与するカリウムチャンネルを探索するため、マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 における分化誘導 20 日後までの各種カリウムチャンネルの発現変化について検討を行った。その結果、 $K_{Ca3.1}$ は分化初期に一過性に発現上昇し、その後速やかに発現が低下した。一方、 $K_{2P3.1}$ は分化後期に発現上昇し、肥大化に伴って発現低下した。

(3) 脂肪細胞分化における $K_{Ca3.1}$ の役割

肥満形成および脂肪細胞分化過程で発現が変動した $K_{Ca3.1}$ は脂肪細胞分化に深く關与してい

る可能性があると考え、脂肪細胞分化における $K_{Ca}3.1$ の機能について検討を行った。3T3-L1 細胞に $K_{Ca}3.1$ を標的した siRNA を導入し、 $K_{Ca}3.1$ の発現抑制が脂肪細胞分化に与える影響について検討を行った。その結果、 $K_{Ca}3.1$ 発現抑制により脂肪滴の蓄積が増加した。転写因子 $PPAR\gamma$ 、 $C/EBP\alpha$ 、脂肪酸結合タンパク質 $Fabp4$ は脂肪細胞の分化マーカーとして用いられる。 $K_{Ca}3.1$ の発現抑制がこれらの脂肪細胞分化マーカーに与える影響について評価を行った。検討の結果、 $K_{Ca}3.1$ の発現抑制により $PPAR\gamma$ 、 $C/EBP\alpha$ 、 $Fabp4$ の発現が上昇した。以上の結果から、 $K_{Ca}3.1$ 発現抑制により脂肪細胞分化が促進されることが明らかになった。次に、レトロウイルスを用いて $K_{Ca}3.1$ を過剰発現させ、脂肪細胞分化に与える影響を検討した。その結果、 $K_{Ca}3.1$ 過剰発現により脂肪滴の蓄積が減少した。さらに、 $PPAR\gamma$ 、 $C/EBP\alpha$ 、 $Fabp4$ の発現が低下した。以上の結果より、 $K_{Ca}3.1$ の過剰発現により脂肪細胞分化が抑制されることが分かった。発現抑制および過剰発現実験の結果から、 $K_{Ca}3.1$ が脂肪細胞分化を抑制していることが明らかになった。 $K_{Ca}3.1$ は脂肪細胞分化初期に発現上昇することから、脂肪細胞分化初期においてネガティブフィードバック因子としての役割を有していると考えられた。

(4) 脂肪細胞分化における $K_{Ca}3.1$ の機能

$K_{Ca}3.1$ が脂肪細胞分化を抑制するメカニズムを明らかとするために、脂肪細胞分化に関連するシグナル伝達因子に与える影響について検討を行った。CREB は cAMP 応答配列に結合する転写因子であり、脂肪細胞分化初期にリン酸化され、 $PPAR\gamma$ や $C/EBP\alpha$ を含めた脂肪細胞関連遺伝子の発現誘導を介して脂肪細胞分化を正に制御することが知られている。そこで、 $K_{Ca}3.1$ 発現抑制が CREB のリン酸化レベルに与える影響を検討した。その結果、 $K_{Ca}3.1$ 発現抑制により CREB のリン酸化レベルが上昇することが明らかになった。さらに、 $K_{Ca}3.1$ 発現抑制により Smad1/5/8 のリン酸化レベルも上昇することが明らかになった。以上の結果から、 $K_{Ca}3.1$ は CREB および Smad1/5/8 のリン酸化レベルを制御することによって脂肪細胞分化を抑制している可能性が示唆された。

以上の研究により、インスリンシグナル制御における $KCNMA1$ のチャネル活性の重要性を明らかにすることができた。また、肥満形成ならびに脂肪細胞分化に寄与する複数のカリウムチャネルを同定し、その中の一つである $K_{Ca}3.1$ が脂肪細胞分化制御に重要な役割を担うことを明らかにできた。今後、脂肪細胞における $KCNMA1$ ならびに $K_{Ca}3.1$ の機能の詳細を明らかにすることにより、インスリンシグナルならびに脂肪細胞分化の制御機構の全容解明や新しい肥満治療法の開発に繋がることが期待される。

<引用文献>

1. *J. Biol. Chem.* 2008; 283:2265-2274
2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010; 397:187-191
3. *J. Biol. Chem.* 2013; 288:31772-31783
4. *Plos One* 2015; 10(2):e0117197
5. *Biochim. Biophys. Acta* 2015; 1848:2747-2755
6. *Pharmacol. Rev.* 2000; 52:557-593
7. *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15:22743-22756
8. *FEBS Lett.* 2016, 590:4372-4380

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Goto M, Osada S, Imagawa M, Nishizuka M.	4. 巻 7
2. 論文標題 FAD104, a regulator of adipogenesis, is a novel suppressor of TGF- β -mediated EMT in cervical cancer cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 16365
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-16555-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nishizuka M., Komada R., Imagawa M.	4. 巻 20
2. 論文標題 Knockdown of RhoE Expression Enhances TGF- β -Induced EMT (epithelial-to-mesenchymal transition) in Cervical Cancer HeLa Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 E4697
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20194697	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西塚 誠
2. 発表標題 脂肪細胞分化関連因子による上皮間葉転換制御機構
3. 学会等名 第37回生体と金属・化学物質に関する研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西塚 誠、駒田莉奈、今川正良
2. 発表標題 RhoEの発現抑制はTGF- β 1誘導性EMTを促進する
3. 学会等名 日本農芸化学会東北・北海道合同支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野友香、西塚 誠
2. 発表標題 肥満形成および脂肪細胞分化における各種カリウムチャネルの発現とKCa3.1の役割
3. 学会等名 第39回日本肥満学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西塚 誠、駒田莉奈、今川正良
2. 発表標題 上皮間葉転換 (EMT) におけるRhoEの役割と機能の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 駒田 莉奈、長田 茂宏、白根 道子、今川 正良、西塚 誠
2. 発表標題 TGF- β 1誘導性EMTにおける低分子量Gタンパク質RhoEの役割と機能解析
3. 学会等名 衛生薬学・環境トキシコロジー フォーラム2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中野 友香、成田 沙智世、長田 茂宏、白根 道子、今川 正良、西塚 誠
2. 発表標題 Ca ²⁺ 活性型カリウムチャネルKCa3.1は脂肪細胞分化を抑制する
3. 学会等名 衛生薬学・環境トキシコロジー フォーラム2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中野友香、成田沙智世、長田茂宏、白根道子、今川正良、西塚 誠
2. 発表標題 脂肪細胞分化におけるCa ²⁺ 活性型カリウムチャネルKCa _{3.1} の役割
3. 学会等名 第40回 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西塚 誠、中野友香、野崎未紗、今川正良
2. 発表標題 Ca ²⁺ 活性型カリウムチャネルKCa _{3.1} は脂肪細胞分化を負に制御する
3. 学会等名 第40回日本肥満学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野崎未紗、西塚 誠
2. 発表標題 低分子量Gタンパク質RhoJによるTGF- β 誘導性EMTの制御
3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部第154回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西塚 誠、中野友香、野崎未紗、今川正良
2. 発表標題 脂肪細胞分化におけるCa ²⁺ 活性型カリウムチャネルKCa _{3.1} の役割
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野崎未紗、西塚 誠
2. 発表標題 低分子量Gタンパク質RhoJの発現抑制はTGF-b誘導性EMTを促進する
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----