

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09829

研究課題名(和文) 脂肪細胞SDF-1の生理病態学的意義と肥満病態治療

研究課題名(英文) Physiological and pathological roles of SDF-1 in adipocytes

研究代表者

福原 淳範 (Fukuhara, Atusnori)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：00437328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪細胞は様々なアディポサイトカインを分泌し、生体のホメオスタシスが制御されている。申請者は脂肪細胞が産生するSDF-1が生理的な条件や肥満病態における作用を解析した。IRS-1蛋白は培養脂肪細胞のインスリンシグナル伝達に重要な因子であるが、SDF-1はIRS-1蛋白分解を促進することで、IRS-1発現量を抑制しており、インスリンシグナルを阻害して糖取り込みを阻害する。SDF-1欠損マウスでは脂肪組織のIRS-1発現量が増加しており、耐糖能が改善し、インスリン感受性が増強した。以上の結果から、脂肪細胞が産生するSDF-1は脂肪細胞自身のインスリン感受性を制御する因子である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

インスリン感受性は副腎からのカテコラミンやコルチゾールなどの内分泌因子によって制御されると考えられてきた。しかし、脂肪細胞が産生するSDF-1は脂肪細胞自身に作用してインスリン感受性を制御する分泌因子である。

肥満2型糖尿病の症例では脂肪組織や肝臓、骨格筋のインスリン抵抗性によって血糖が上昇する。脂肪細胞のSDF-1や受容体CXCR4の経路を制御することで、脂肪組織のインスリン感受性を改善する新たな糖尿病治療開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Adipocytes secrete bioactive molecules, called adipocytokines which regulate metabolic homeostasis under conditions of physiologic or pathological stress.

We identified SDF-1 as a new adipocytokine. SDF-1 induced extracellular signal-regulated kinase signal, which phosphorylated and degraded IRS-1 protein in adipocytes, decreasing insulin-mediated signaling and glucose uptake. In contrast, knockdown of endogenous SDF-1 or inhibition of its receptor in adipocytes markedly increased IRS-1 protein levels and enhanced insulin sensitivity, indicating the autocrine action of SDF-1. In agreement with these findings, adipocyte-specific ablation of SDF-1 enhanced insulin sensitivity in adipose tissues and in the whole body. These results point to a novel regulatory mechanism of insulin sensitivity mediated by adipose autocrine SDF-1 action.

研究分野：肥満症、脂肪細胞、糖尿病

キーワード：SDF-1 脂肪細胞 インスリン IRS-1 アディポサイトカイン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は、肥満脂肪組織の病態解明と脂肪組織から分泌されるアディポサイトカインの解析を行ってきた。そして、肥満脂肪組織が組織灌流不全による低酸素状態に陥り、アディポネクチンの産生低下やインスリン抵抗性を引き起こすことを世界に先駆けて報告した (Hosogai, Fukuhara et al. *Diabetes*, 2007)。また、脂肪血管由来分泌因子である Favine を同定し (Kobayashi, Fukuhara et al. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010)、本因子が脂肪分化および脂肪合成に重要な役割を果たすことを明らかにしている (Kobayashi, Fukuhara et al. *J Biol Chem*. 2015)。肥満状態の脂肪組織ではマクロファージ等の免疫細胞が炎症惹起細胞へと変化する。申請者は肥満脂肪組織では ATF2 を高発現するマクロファージが集積することや (Miyata, Fukuhara et al. *Obesity* 2013)、脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンがマクロファージに作用してリンパ管形成因子である VEGFC を誘導することを報告してきた (Hu, Fukuhara et al. *PLoS One* 2013)。

申請者は新たなアディポサイトカインとして SDF-1 を同定した。SDF-1 の脂肪細胞における役割やインスリン抵抗性に対する作用は不明であり、全く報告がない。

### 2. 研究の目的

申請者が新たにアディポサイトカインとして同定した SDF-1 のインスリン抵抗性や脂肪細胞への作用を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

#### 1) SDF-1 の発現制御機構の解明

データベース解析から、脂肪細胞機能に関与する肥満や栄養制御、炎症による SDF-1 発現量の変化を解析する。

#### 2) 培養脂肪細胞における SDF-1 の機能解明

培養 3T3-L1 に対して SDF-1 を添加し、脂肪細胞機能に対する作用を解析する。

#### 3) SDF-1 のインスリンシグナルに対する作用のメカニズム解明

SDF-1 のインスリンシグナルに対する作用のメカニズムを培養 3T3-L1 細胞を用いた解析する。

#### 4) 脂肪細胞特異的 SDF-1 欠損マウスの解析

脂肪細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現するアディポネクチン Cre マウスと SDF-1 flox マウスを交配し、脂肪細胞特異的 SDF-1 欠損マウスを作成する。

本 KO マウスを用いて脂肪細胞におけるインスリンシグナルや脂肪細胞機能を解析する。

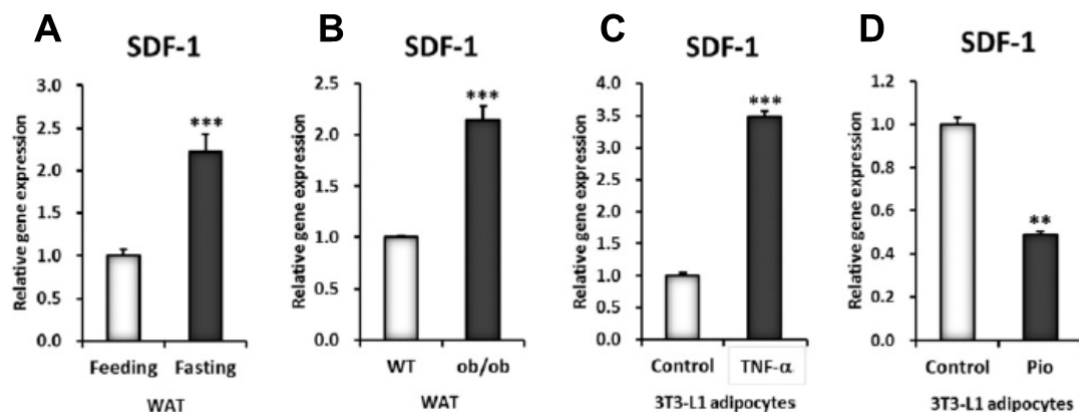
### 4. 研究成果

#### 1) SDF-1 の発現制御機構の解明

既存のマイクロアレイデータベースを用いた解析を行った結果、SDF-1 は、絶食状態のマウス脂肪組織で発現量が増加した。ヒト肥満脂肪組織で発現量が増加した。3T3-L1 脂肪細胞で炎症性サイトカインである TNF $\alpha$  によって発現量が増加した。ラットに対してインスリン抵抗性改善作用のある PPAR $\gamma$  アゴニストによって発現量が低下した。

これらのデータを確認したところ、マウスの絶食において、脂肪組織で SDF-1 の発現量は増加した (図 1A)。WT マウスに対して過食肥満マウスである ob/ob マウスの脂肪組織において SDF-1 の発現量は増加した (図 1B)。3T3-L1 脂肪細胞に対して TNF $\alpha$  によって SDF-1 発現量は増加した (図 1C)、PPAR $\gamma$  アゴニストである pioglitazone によって低下した (図 1D)。以上より SDF-1 は肥満状態と絶食状態の 2 つの条件で発現が誘導される因子であることが明らかになった。

図 1

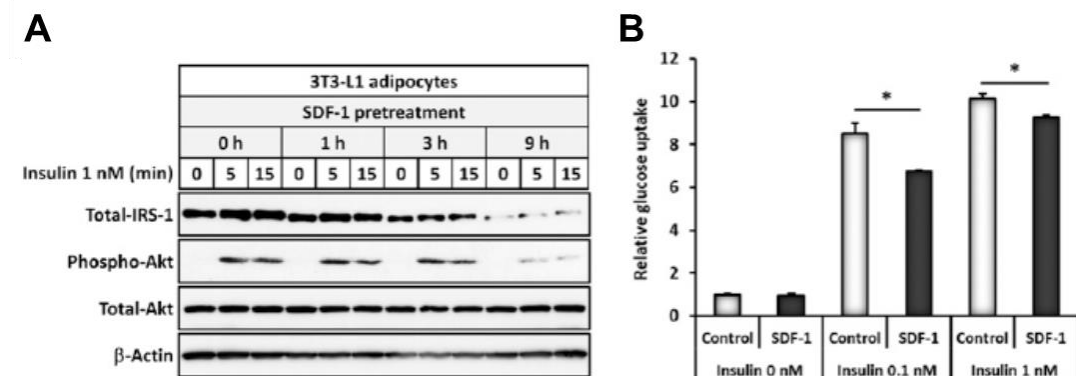


## 2) 培養脂肪細胞における SDF-1 の機能解明

脂肪細胞における SDF-1 の作用を明らかにするためにリコンビナント SDF-1 の添加実験を行った。インスリンシグナル伝達に重要な因子である IRS-1 蛋白は、TNF $\alpha$  添加によって発現量が減少するが、SDF-1 添加でも同様に IRS-1 蛋白発現量が低下した。

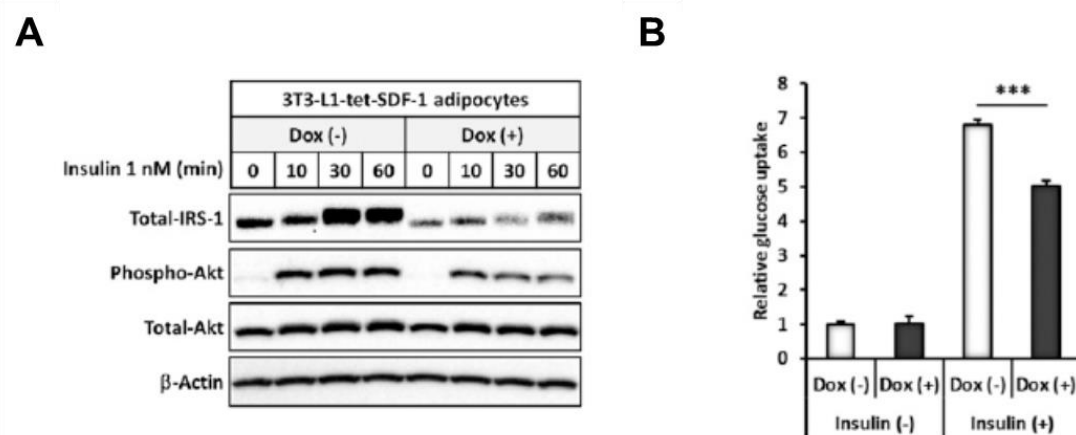
そこで、インスリンシグナルに対する作用を確認するために、SDF-1 処理後にインスリンを短時間処理し、インスリンシグナルを解析した。インスリンは IRS-1 の下流で Akt のリン酸化を誘導し、細胞にグルコースが取り込まれる。SDF-1 処理によって IRS-1 が減少した状態ではインスリン誘導性の Akt リン酸化も低下しており、グルコース取り込みも低下した (図 2 A, B)。

図 2



上記作用をさらに確認するために、SDF-1 を Doxycycline 誘導性に過剰発現する 3T3-L1 細胞を作成した。SDF-1 の過剰発現によっても同様に IRS-1 蛋白の発現量が低下し、インスリン誘導性の Akt リン酸化とグルコース取り込みが低下した (図 3 A, B)。

図 3



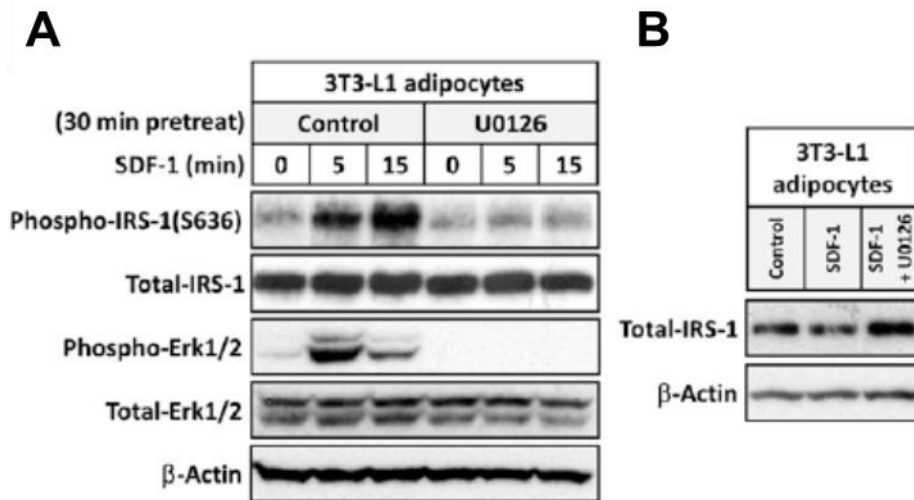
## 3) SDF-1 のインスリンシグナルに対する作用の解明

SDF-1 による IRS-1 発現低下のメカニズムを解析した。

培養 3T3-L1 脂肪細胞に対して SDF-1 を添加すると IRS-1 蛋白発現量が低下したが、この時 proteasome 阻害剤である Lactacystin によって、この作用は解除された。したがって、プロテアソームを介した degradation の関与が示唆された。

そこで、SDF-1 によって誘導されるシグナルを解析したところ、既報どおり SDF-1 は ERK を活性化した。この時 IRS-1 の Ser636 リン酸化が誘導されていた。ERK 経路阻害剤である U0126 を添加すると SDF-1 による ERK リン酸化は阻害され、IRS-1 の Ser636 リン酸化も消失した (図 4 A)。IRS-1Ser636 リン酸化はプロテアソームを介した degradation を誘導することが報告されている。実際に U0126 で SDF-1 による ERK リン酸化を阻害すると IRS-1 蛋白の発現量低下は阻害された (図 4 B)。

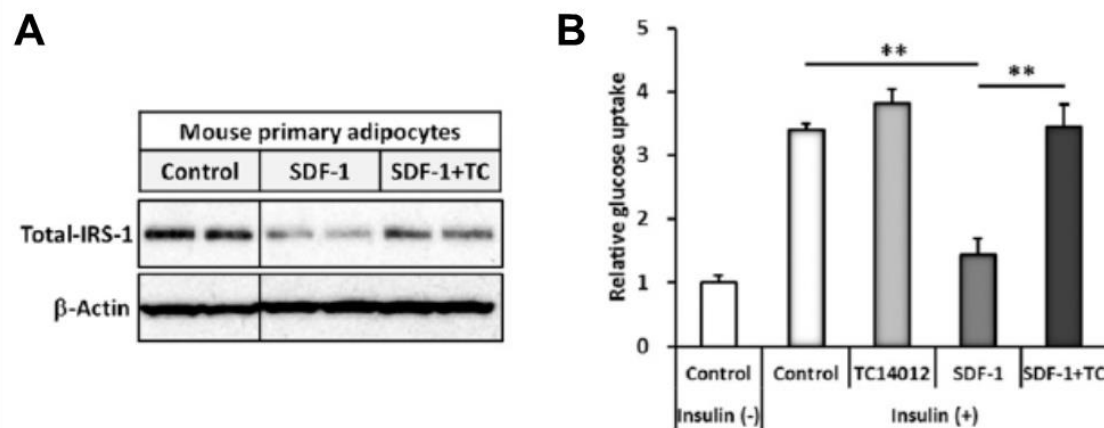
図4



次に SDF-1 の受容体を介したシグナルを解析するために、SDF-1 受容体 CXCR4 の阻害剤である TC14012 を用いた実験を行った。

ERK リン酸化、IRS-1Ser636 リン酸化、IRS-1 蛋白発現量低下、糖取り込み低下などの SDF-1 による作用は TC14012 によって減弱した (図 5 A, B)。

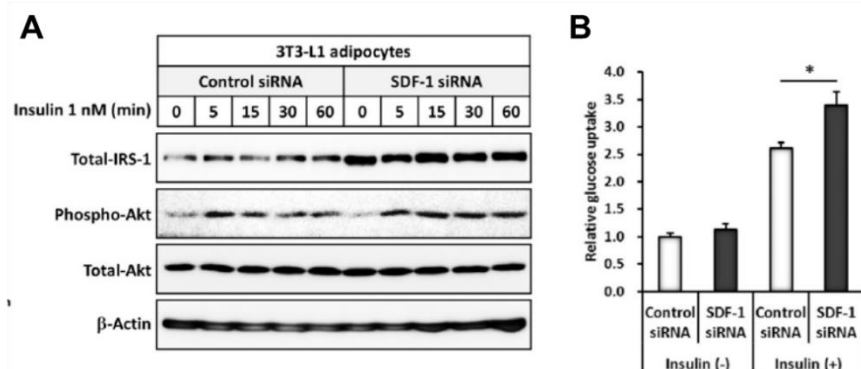
図5



以上より脂肪細胞において SDF-1 は CXCR4 を介して ERK をリン酸化する。ERK は IRS-1Ser636 をリン酸化することでプロテアソームを介した分解によって IRS-1 発現量が低下する。その結果インスリン誘導性の糖取り込みが障害されることが明らかになった。

内因性の SDF-1 の作用を解析するために、3T3-L1 脂肪細胞に対して SDF-1 の siRNA を行った。SDF-1 の siRNA によって IRS-1 蛋白発現量は増加し、インスリン誘導性の Akt リン酸化とグルコース取り込みは増強した (図 6 A, B)。同様の結果はマウス初代培養脂肪細胞でも得られた。

図6

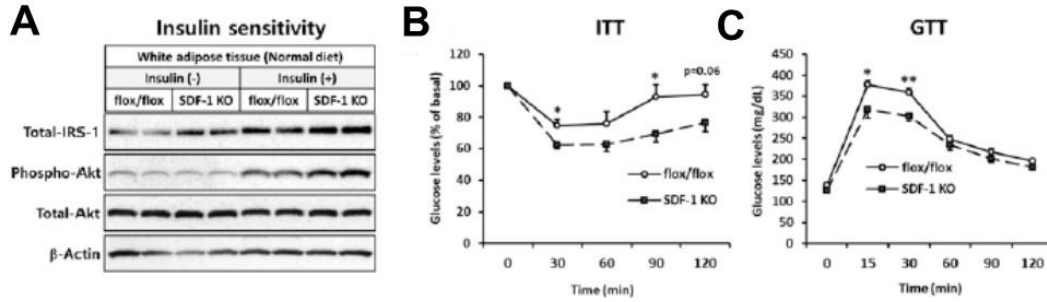


#### 4) 脂肪細胞特異的 SDF-1 欠損マウスの解析

上記の *in vitro* での減少を確認するために、脂肪細胞特異的 SDF-1 欠損マウスを作成した。本 KO マウスの脂肪組織では IRS-1 発現量が増加しており、インスリン誘導性の Akt リン酸化も増強していた (図 7A)。GTT、ITT を行ったところ、グルコース負荷による血糖上昇は抑制されており、インスリン誘導性の血糖低下反応が増強していた (図 7B, C)。本結果は高脂肪食負荷を行った肥満糖尿病モデルでも同様であった。

以上から、*in vivo* においても内因性 SDF-1 欠損によって脂肪細胞の IRS-1 が増加し、インスリン誘導性糖取り込みが増加したことで、全身性の糖代謝とインスリン感受性が亢進したと考えられた。

図7



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Shin Jihoon, Fukuhara Atsunori, Onodera Toshiharu, Kita Shunbun, Yokoyama Chieko, Otsuki Michio, Shimomura Iichiro | 4. 巻<br>67                |
| 2. 論文標題<br>SDF-1 Is an Autocrine Insulin-Desensitizing Factor in Adipocytes  | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>Diabetes   | 6. 最初と最後の頁<br>1068 ~ 1078 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.2337/db17-0706   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                 |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>福原淳範, Shin Jihoon, 奥野 陽亮, 大月 道夫, 下村 伊一郎           |
| 2. 発表標題<br>インスリン抵抗性の病態から治療への展開 脂肪組織酸化ストレスとSDF-1によるインスリン感受性制御 |
| 3. 学会等名<br>第61回日本糖尿病学会年次学術集会                                 |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Shin Jihoon, 福原淳範, 小野寺俊晴, 大月道夫, 下村伊一郎 |
| 2. 発表標題<br>脂肪細胞由来SDF-1はインスリン感受性自己抑制因子である         |
| 3. 学会等名<br>第60回日本糖尿病学会年次学術集会                     |
| 4. 発表年<br>2017年                                  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>福原淳範, Shin Jihoon, 大月道夫, 下村伊一郎 |
| 2. 発表標題<br>脂肪細胞由来SDF-1によるインスリン感受性制御       |
| 3. 学会等名<br>第38回日本肥満学会                     |
| 4. 発表年<br>2017年                           |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Shin Jihoon、福原淳範、小野寺俊晴、大月道夫、下村伊一郎        |
| 2. 発表標題<br>脂肪細胞由来SDF-1はAutocrineに作用するインスリン非感受性因子である |
| 3. 学会等名<br>第38回日本肥満学会                               |
| 4. 発表年<br>2017年                                     |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>福原淳範                                 |
| 2. 発表標題<br>肥満2型糖尿病の病態形成メカニズム                    |
| 3. 学会等名<br>肥満2型糖尿病の病態形成メカニズム 第56回 日本糖尿病学会 近畿地方会 |
| 4. 発表年<br>2019年                                 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                      | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)             | 備考 |
|-------|--|-----------------------------------|----|
| 研究分担者 | 大月 道夫<br><br>(Otsuki Michio)<br><br>(00403056) | 大阪大学・医学系研究科・講師<br><br><br>(14401) |    |
| 研究分担者 | 奥野 陽亮<br><br>(Okuno Yosuke)<br><br>(10534513)  | 大阪大学・医学系研究科・助教<br><br><br>(14401) |    |