

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06665

研究課題名(和文) 白色脂肪細胞での脂肪蓄積制御機構とその破綻による脂肪肝、2型糖尿病発症機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism for triacylglycerol storage in white adipocytes and the mechanism of fatty liver and type 2 diabetes due to its disruption

研究代表者

竹中 延之 (Takenaka, Nobuyuki)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20610504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、白色脂肪細胞でのRac1を介したインスリン応答性の脂肪酸取り込み機構とこの機構の破綻による脂肪肝発症メカニズムを解明するため、脂肪細胞特異的rac1ノックアウト(adipo-rac1-KO)マウスを用いた解析を行った。解析の結果、Rac1はホスホイノシチド3キナーゼ(PI3K)-Akt2経路の下流で活性制御され、脂肪酸取り込みを誘導することを示し、白色脂肪細胞でのRac1を介した新たな脂肪酸取り込み機構を明らかにした。また、白色脂肪細胞でのRac1欠損により白色脂肪組織の炎症が引き起こされ、これが脂肪肝の原因である可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、脂肪酸輸送担体CD36の細胞内動態イメージング法を世界で初めて開発し、この手法とマウス白色脂肪組織を用いた解析から、Rac1を介した新たな脂肪酸取り込み機構を明らかにした。本研究成果は、白色脂肪細胞での脂肪蓄積を制御する分子機構の新たな生物学的知見だけでなく、脂肪蓄積異常による脂肪肝や2型糖尿病の発症メカニズムの解明につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Insulin is a hormone that reduces the blood glucose and free fatty acid (FFA) level by stimulating glucose uptake in white adipose tissue. Impaired insulin signaling in white adipocytes cause hepatic steatosis. However, the molecular mechanisms for FFA uptake and hepatic steatosis remain incompletely understood. We have recently demonstrated that the Rho family small GTPase Rac1 plays an important role downstream of Akt2 in insulin-stimulated glucose uptake in white adipocytes. However, it remains unclear whether Rac1 is involved in insulin-stimulated FFA uptake. In this study, we aimed to clarify the involvement of Rac1 in insulin-stimulated FFA uptake and pathogenesis of hepatic steatosis by using adipo-rac1-KO mice. We found that Rac1 was implicated in insulin-dependent FFA uptake in white adipocytes. Furthermore, we identified a deficiency of Rac1 promotes inflammation in white adipose tissue, which leads to hepatic steatosis.

研究分野：細胞内シグナル伝達

キーワード：Rac1 白色脂肪細胞 インスリン 脂肪酸 脂肪肝 糖尿病

### 1. 研究開始当初の背景

近年、2 型糖尿病や脂肪肝、特に非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の罹患者が急増しており社会的な問題となっている。これら疾患の発症には、白色脂肪細胞での中性脂肪蓄積の異常が大きく関与していると考えられている。白色脂肪細胞での中性脂肪蓄積は、インスリンにより制御されている。白色脂肪細胞にインスリンが作用すると、糖輸送担体 GLUT4 および脂肪酸輸送担体 CD36 が細胞膜へ移行・露出し、糖および脂肪酸が取り込まれる。これら輸送担体の制御系としては、ホスホイノシチド 3 キナーゼ (PI3K)-タンパク質キナーゼ Akt2 経路が重要であるとされている。このように、白色脂肪細胞でのインスリン応答性の糖および脂肪酸取り込み機構には共通点が多いが、これら機構の全容は不明である。

我々はこれまでに、白色脂肪細胞において、Rho ファミリー低分子量 GTPase Rac1 がインスリンにより活性化されることを発見してきた。さらに、Rac1 を介したインスリン応答性の糖取り込み機構を明らかにし、白色脂肪細胞での中性脂肪蓄積制御機構の一端を明らかにしてきた (Cell signal. 39;108, 2017)。また、脂肪細胞特異的 rac1 ノックアウト (adipo-rac1-KO) マウスを創出し、このマウスが白色脂肪組織の萎縮ならびに脂肪肝を示すという知見も得ている。

これらのことから、Rac1 は白色脂肪細胞での糖および脂肪酸取り込みを制御し、中性脂肪蓄積に重要な役割を担い、Rac1 を介したインスリンシグナル伝達機構の破綻が脂肪肝の原因である可能性が高い。しかし、白色脂肪細胞でのインスリン応答性の脂肪酸取り込み機構への Rac1 の関与ならびにこの機構の破綻による肝臓への脂肪蓄積メカニズムは不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、adipo-rac1-KO マウスを用いて、白色脂肪細胞における Rac1 を介したインスリン応答性の脂肪酸取り込み分子メカニズムを明らかにし、白色脂肪細胞での中性脂肪蓄積制御機構を解明することである。第二の目的は、このメカニズムの破綻による脂肪肝を引き起こす分子メカニズムを明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

#### (1) Rac1 を介したインスリン応答性の脂肪酸取り込みシグナル伝達経路の解析

コントロールマウス、adipo-rac1-KO マウス由来の白色脂肪組織を用いて、脂肪酸取り込み量の測定を行った。

CD36 の細胞膜移行の検出には、我々が世界に先駆けて確立したレポーターアッセイを利用した。このアッセイでは、エレクトロポレーション法による遺伝子導入により、マウス白色脂肪細胞において CD36 レポーターを一過性発現させ、インスリン応答性の CD36 の細胞膜移行をマウス生体レベルで検出、定量することが可能である。コントロールマウス、adipo-rac1-KO マウスの白色脂肪細胞に CD36 レポーター遺伝子と PI3K または Akt2 の活性型変異体を異所性発現させ、CD36 の細胞膜移行の検討を行った。

Rac1 の活性化の検出には、我々が世界に先駆けて確立した動態イメージング法を利用した。この方法は、活性型 Rac1 に特異的に結合するタンパク質ドメイン (POSH(251-489)) に V5 タグを付加させたポリペプチドを活性型 Rac1 特異的プローブとして使用し、これを細胞に添加して、抗 V5 抗体を用いた蛍光免疫染色法にて検出する方法である (図 1)。

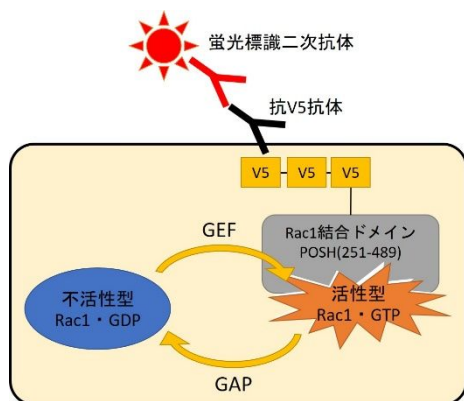


図 1 Rac1 活性動態イメージング法

#### (2) Rac1 欠損による白色脂肪細胞の機能に対する影響の解析

各種マウスの白色脂肪組織のパラフィン切片を作成し、HE 染色による白色脂肪組織の組織学的解析を行った。また、蛍光免疫染色法による炎症細胞の浸潤の検討、シリウスレッド・ファストグリーン・コラーゲン染色にて線維化の検討を行った。

同定した炎症細胞種の浸潤に必要なサイトカイン、ケモカイン類の発現変動について検討を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) Rac1 を介したインスリン応答性の脂肪酸取り込みシグナル伝達経路の解析

コントロールマウス由来の白色脂肪細胞では、インスリン刺激により脂肪酸取り込み量の有意な増加が認められた。一方、*adipo-rac1-KO* マウス由来の白色脂肪細胞では、脂肪酸取り込み量の増加は認められなかった。このことから、白色脂肪細胞において Rac1 は脂肪酸取り込みにも関与することが明らかとなった (図 2)。

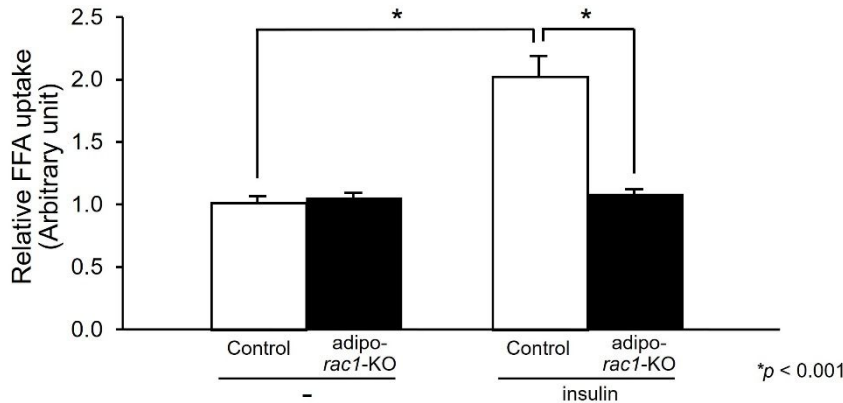


図 2 インスリン刺激による脂肪酸取り込み量の測定

各種マウス白色脂肪細胞に PI3K または Akt2 の恒常的活性型変異体を異所性発現させ、CD36 の細胞膜への移行誘導を検討した。その結果、コントロールマウス由来の白色脂肪細胞では、恒常的活性型 PI3K または恒常的活性型 Akt2 による CD36 の細胞膜移行の増加が認められた。しかし、これらは *adipo-rac1-KO* マウス由来の白色脂肪細胞では有意な抑制が認められた (図 3)。また、インスリン刺激および恒常的活性型 PI3K または恒常的活性型 Akt2 による Rac1 の活性化誘導も認められた。しかし、インスリン刺激および恒常的活性型 PI3K による Rac1 の活性化誘導は、Akt2 特異的阻害剤処理により完全に抑制された (図 4)。これらのことから、マウス白色脂肪細胞において、Rac1 は Akt2 経路の下流で活性制御され、インスリン応答性の脂肪酸取り込み機構に関与することが明らかとなった。

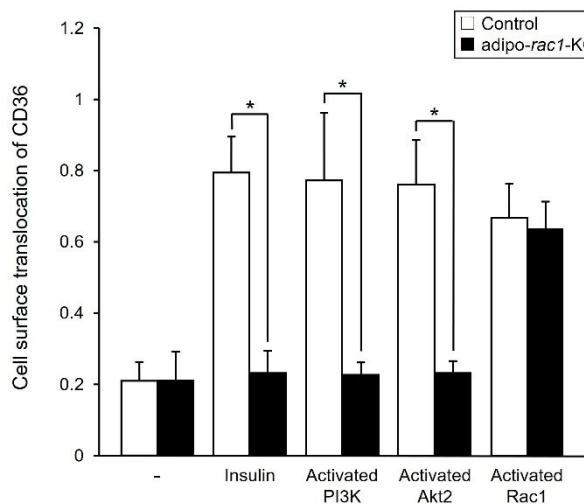


図 3 インスリン刺激による CD36 の細胞膜移行への Rac1 の関与

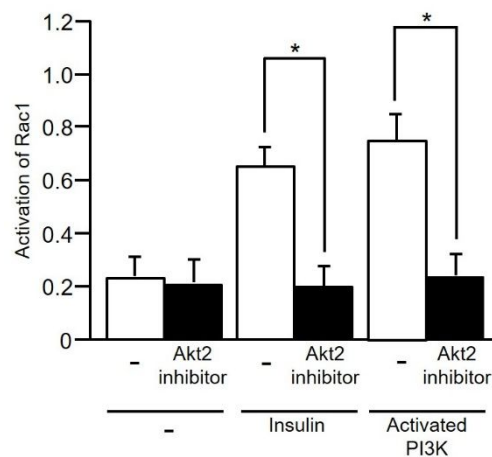


図 4 Rac1 の活性化に対する Akt2 阻害剤の影響

インスリン刺激により活性化された Rac1 が CD36 の細胞膜移行を誘導する機構の解析を行うため、骨格筋細胞でのインスリン応答性の糖取り込み機構で Rac1 の下流で機能している Ras ファミリー低分子量 GTPase RalA との関係について検討を行った。図 1 に示す Rac1 の活性動態イメージング法を応用し、活性型 RalA 特異的プローブを用いた RalA の活性化を検討したところ、コントロールマウス由来の白色脂肪細胞ではインスリン刺激、恒常的活性型 PI3K、恒常的活性型 Akt2 による RalA の活性化誘導が認められた。一方、*adipo-rac1-KO* マウス由来の白色脂肪細胞では完全に抑制された (図 5)。

以上の結果より、白色脂肪細胞において、Rac1 は PI3K-Akt2 経路の下流で活性制御を受け、RalA を介してインスリン応答性の脂肪酸取り込みシグナル伝達機構に関与している可能性を示し

た。

(2) Rac1 欠損による白色脂肪細胞の機能に対する影響の解析

白色脂肪組織の組織学的解析を行ったところ、adipo-rac1-KO マウスの白色脂肪組織において、マクロファージの浸潤数の増加(図 5)が認められた。そこで、白色脂肪細胞での炎症性サイトカインの発現を検討したところ、adipo-rac1-KO マウスでは、ケモカインである単球走化性因子(monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1))の発現の有意な増加が認められた。一方、抗炎症性アディポカインであるアディポネクチンの発現は、adipo-rac1-KO マウスの白色脂肪細胞において有意な減少が認められた。これらのことから、白色脂肪細胞での Rac1 欠損は、白色脂肪組織の炎症を引き起こすことが明らかとなった。白色脂肪細胞での炎症亢進は、肝臓でのインスリン抵抗性を誘導するとともに、糖脂脂肪酸代謝に影響を与えることが知られている。現在、MCP-1 の発現制御機構への Rac1 の関与について解析を進め、脂肪肝の発症分子メカニズムの解明を目指している。

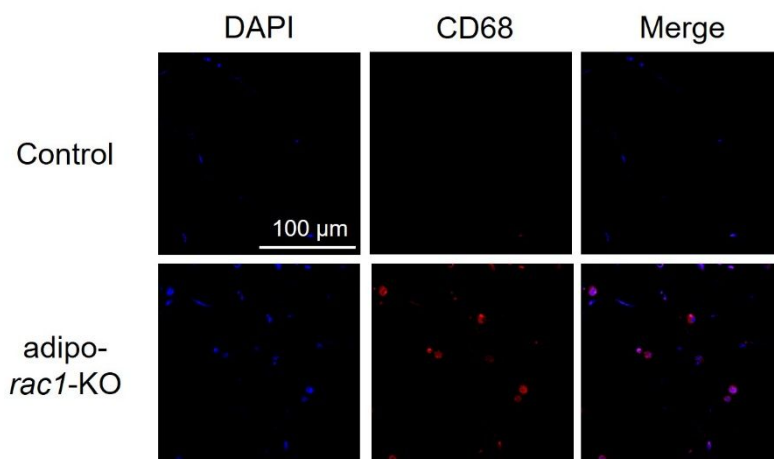


図 5 マウス白色脂肪組織におけるマクロファージの検出

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 1件）

1. 著者名 Takenaka Nobuyuki, Nakao Mika, Hasegawa Kiko, Chan Man Piu, Satoh Takaya	4. 巻 594
2. 論文標題 The guanine nucleotide exchange factor FLJ00068 activates Rac1 in adipocyte insulin signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 4370 ~ 4380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13939	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Hasegawa Kiko, Takenaka Nobuyuki, Tanida Kenya, Chan Man Piu, Sakata Mizuki, Aiba Atsu, Satoh Takaya	4. 巻 22
2. 論文標題 Atrophy of White Adipose Tissue Accompanied with Decreased Insulin-Stimulated Glucose Uptake in Mice Lacking the Small GTPase Rac1 Specifically in Adipocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10753 ~ 10753
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms221910753	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 荒木菜摘、竹中延之、佐藤孝哉
2. 発表標題 骨格筋でのインスリン応答性糖取り込みにおけるAkt2によるRac1の活性制御
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷田賢哉、長谷川紀子、陳敏彪、竹中延之、佐藤孝哉
2. 発表標題 白色脂肪細胞でのインスリン応答性糖取り込みにおけるRac1の役割
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 陳敏彪、中尾美翔、長谷川紀子、竹中延之、佐藤孝哉
2. 発表標題 脂肪細胞でのインスリン応答性のRac1活性化を制御するグアニンヌクレオチド交換因子の同定
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長谷川紀子、陳敏彪、坂田瑞希、竹中延之、佐藤孝哉
2. 発表標題 白色脂肪細胞でのインスリン応答性糖取り込みにおけるRac1によるRalAの制御
3. 学会等名 第94回日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 陳敏彪、竹中延之、佐藤孝哉
2. 発表標題 肥満と2型糖尿病のモデルマウスの骨格筋におけるインスリンシグナル伝達系の解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中るいん、竹中延之、佐藤孝哉
2. 発表標題 褐色脂肪細胞でのインスリン応答性糖取り込みにおける低分子量GTPアーゼRac1の機能
3. 学会等名 第94回日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂田瑞希、竹中延之、佐藤孝哉
2. 発表標題 白色脂肪細胞でのインスリン応答性脂肪酸取り込みにおける低分子量GTPアーゼRac1の機能
3. 学会等名 第94回日本生化学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 脂肪酸トランスポーターの細胞内動態の分析方法、及び脂肪酸トランスポーター改変タンパク質の利用	発明者 竹中延之、佐藤孝哉	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-028920	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

大阪府立大学大学院理学系研究科生物科学専攻細胞生物学研究室ホームページ <a href="http://www.b.s.osakafu-u.ac.jp/~tsato/index.html">http://www.b.s.osakafu-u.ac.jp/~tsato/index.html</a>
--

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
研究分担者	佐藤 孝哉  (Satoh Takaya)  (20251655)	大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・教授    (24403)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------