

平成22年 3月 5日現在

研究種目：若手研究（A）
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20689018
 研究課題名（和文） 脂肪・骨格筋細胞における AMPK 関連因子の代謝調節作用と病態生理学的意義
 研究課題名（英文） Energy metabolism and pathophysiological role of AMPK-related kinase in adipocytes and skeletal muscle cells.
 研究代表者
 鈴木 敦（SUZUKI ATSUSHI）
 国立国際医療センター研究所・臨床薬理研究部・特任研究員
 研究者番号：50418993

研究成果の概要（和文）：AMPK 関連因子である ARK5 の骨格筋および脂肪細胞における発現・生理機能について解析を行った。その結果、骨格筋において ARK5 は糖取り込み反応に関与して、また肥満個体の白色脂肪組織に特異的に発現する ARK5 は、細胞生存活性による脂肪組織の肥大化や炎症反応に関与する事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Expression and role of AMPK-related kinase, ARK5, in skeletal muscle cells and adipocytes were analyzed. In skeletal muscle cell, ARK5 promotes insulin-induced glucose uptake. Addition to muscular ARK5, I showed that ARK5 expressed in white adipose tissue (WAT) of obese animals and that promotes WAT hypertrophy and inflammation via its cell survival promotion-activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
年度			
総計	10,200,000	3,060,000	13,260,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：ARK5、脂肪細胞、骨格筋、糖尿病、肥満

1. 研究開始当初の背景

AMP-activated protein kinase (AMPK)は、生体のエネルギー代謝を制御する重要な酵素である。近年、多くの因子が AMPK ファミリーとして単離・同定された。このうち ARK5 は、申請者が前所属である国立がんセンター研究所支所で単離・同定した因子であり、その発現は悪性腫瘍に特異性が高く、また腫瘍の悪性化（腫瘍成長や浸潤・転移活性）

に関与する重要な因子であった。ARK5 の発現は、非癌部組織では脳・心臓・骨格筋にも認められるが、これら組織での生理機能は明らかになっていない。また、肥満において脂肪組織の肥大化は最も顕著な反応であり、糖尿病への移行等にも関わるリスク・ファクターの一つである。

2. 研究の目的

ARK5 が属する AMPK は、本来生体エネルギー代謝制御因子として単離・報告されたものである。故に、その同族因子である ARK5 も、正常組織、特に代謝制御に関わる重要な組織の一つである骨格筋で発現している事からエネルギー代謝制御やその破綻に関与している可能性が伺える。そこで本研究は、骨格筋における ARK5 の代謝制御機能、および準備研究において明らかとなった肥満個体の白色脂肪細胞における ARK5 の病態生理学的意義を明らかにするため行われた。

3. 研究の方法

(1) 骨格筋における ARK5 の生理機能解析
in vitro 実験方法として、骨格筋細胞株である C2C12 細胞を使用した。この細胞は、内在的に ARK5 を発現している事から、DN-ARK5 を安定的に発現する細胞株を取得し、インスリン・レプチン・アディポネクチン刺激による糖取り込み能への影響について解析を行った。また in vivo 実験として、骨格筋特異的プロモーターである HSA (human skeletal muscle actin) を用い、DN-ARK5 を骨格筋特異的に発現するマウスを作製し糖取り込み能などの解析を行った。

(2) 脂肪細胞における ARK5 の病態生理学的意義

発現解析として、肥満モデルマウス（食事性および遺伝的）およびヒト皮下脂肪における ARK5 の発現を解析。In vitro 事件では、脂肪細胞に分化する繊維芽細胞 (3T3-L1) が ARK5 を発現している事から安定的に DN-ARK5 を発現する細胞株を取得し、分化誘導後の細胞生存活性や炎症性サイトカインの発現について解析を行った。In vivo 実験としては、脂肪細胞特異的プロモーターである aP2 を使用し、脂肪細胞特異的に DN-ARK5 を発現するマウスを作成し、高脂肪食を与える肥満モデルでの DN-ARK5 の効果について解析した。

4. 研究成果

(1) 骨格筋における ARK5 の代謝制御機能

- ①ARK5 の発現は、赤筋・白筋の区別無く骨格筋の広範囲に認められた。
- ②C2C12 細胞は、インスリンに対し 2 倍程度の糖取り込み誘導を示したが、レプチンやアディポネクチンにたいしては 1.2 倍程度と非常に感受性が低かった。このような状態の細胞において DN-ARK5 を恒常的に発現すると、インスリンに対する感受性が極めて低下した。
- ③骨格筋特異的 TG マウスは、運動能に目立った差はなかったが、DN-ARK5 の発現が認められないにもかかわらず、拡張性心筋様症状が解剖所見で認められた。
- ④骨格筋における糖取り込み反応に関する分子機構には未だ不明な点が多い。その最も

パラドキシカルな現象は、AMPK の上流因子である LKB1 を骨格筋で特異的に抑制すると糖取り込み能が低下するのに対し、AMPK 発現を骨格筋で特異的に抑制しても糖取り込み能が低下しないという現象である。これらの結果から、多くの AMPK 研究者が関連因子の解析を開始し、ARK5 と同様に AMPK 関連因子である Snark を候補因子とする報告がある。しかしながら Snark は核タンパク質であり、糖取り込み反応が起きていると考えられる細胞質とは物理的な齟齬が生じる。よって、本研究成果より、LKB1 の下流で骨格筋の糖取り込みに関与する最も有力な候補因子として ARK5 があげられると考えられる。今後、KO マウスを含む遺伝子改変動物のよりいっそうの解析や、運動（骨格筋収縮）やインスリンの効果など様々なシチュエーションでの解析が必要となると考えられる。

(2) 脂肪細胞における ARK5 の病態生理学的意義

- ①通常食を与えたマウスの白色脂肪組織（睾丸周囲および皮下）では、ARK5 の発現は認められない。しかしながら肥満モデルマウス（高脂肪食を与えた diet-induced obesity: DIO マウスおよびレプチン欠損 ob/ob マウス）の白色脂肪組織では、睾丸周囲および皮下脂肪組織の両方で強い ARK5 の発現が認められる。
- ②ヒトの皮下脂肪組織（京都大学医学部との共同研究）における ARK5 の発現を解析すると、肥満の指標の一つである BMI 値の上昇に伴い、ARK5 の発現上昇が認められた。
- ③上記 2 点から、肥満と ARK5 の発現に生理学的関係が存在する事が示唆される。
- ④脂肪細胞に分化する繊維芽細胞 3T3-L1 に DN-ARK5 を恒常的に発現する細胞株を取得し、脂肪細胞に分化させた後、様々なストレス（代謝ストレスや炎症性サイトカイン暴露など）で細胞を刺激すると、ARK5 の機能が抑制されると、細胞の生存活性が著しく低下する事が明らかとなった。
- ⑤分化 3T3-L1 細胞では、インスリン刺激や炎症性サイトカイン刺激により IL-6 の転写活性が亢進するが、DN-ARK5 の発現によりこの転写亢進活性が著しく低下する。
- ⑥脂肪細胞特異的に DN-ARK5 を発現する TG マウスを作製し、高脂肪食を与えた際の動向を解析した。その結果、高脂肪食摂食による体重増加・白色脂肪組織の肥大化・血糖値上昇・脂肪組織での炎症性サイトカイン発現が、DN-ARK5 発現により著しく低下している事が明らかになった。
- ⑦TG マウスにおける高脂肪食誘導性白色脂肪組織肥大化抑制では、同組織内で著しい細胞死反応が起きている事を明らかにした。
- ⑧高脂肪食摂食により肥大化している脂肪

組織では、HIF (hypoxia-inducible factor)-1alpha のタンパク量が増加している。脂肪組織の肥大化には血管新生が必要である事が報告されているが、その急激な肥大化に伴い脂肪組織では部分的な虚血状態が起きている事が示唆される。これは血管新生速度との齟齬によると示唆される。

⑨以上の結果から、高脂肪食の摂食等により脂肪組織が肥大化する際に、脂肪細胞は血管新生速度との齟齬から部分的な代謝ストレス下におかれると考えられる。肥満とともに発現が亢進する ARK5 は細胞生存因子であり、その機能抑制は代謝ストレス等による細胞死反応が容易に起こりやすいことから、脂肪細胞の生存活性を亢進する事で白色脂肪組織の肥大化に関与していると考えられる。また、肥満とともに脂肪組織では炎症性サイトカインの発現が亢進するが、ARK5 はこれら炎症性サイトカインによる細胞死誘導に対する抵抗性を脂肪細胞にもたらすと同時に、炎症性サイトカインのひとつである IL6 の産生に関与している。この炎症性サイトカインは、2型糖尿病の原因でもあるインスリン抵抗性の協力なリスクファクターであることから、ARK5 は肥満から2型糖尿病への進行にも関与する因子である事が示唆された。

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)

[雑誌論文] (計3件)

Toda, C., Shiuchi, T., Lee, S., Yamato-Esaki, M., Fujino, Y., Suzuki, A., Okamoto, S. and Minokoshi Y. Distinct effects of leptin and a melanocortin receptor agonist injected into medial hypothalamic nuclei on glucose uptake in peripheral tissues. *Diabetes*, 査読あり, 58, 2009, 2757-2765

Kuga, W., Tsuchihara, K., Ogura, T., Kanehara, S., Saito, M., Suzuki, A. and Esumi H. Nuclear localization of SNARK: Its implication on gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読あり, 377, 2008, 1062-1066

Iida, S., Yano, H., Kayukawa, S., Nakagawa, C., Oguri, T., Ding, J., Mori, F., Ito, A., Ri, M., Inagaki, A., Kusumoto, S., Ishida, T., Komatsu, H., Inagaki, H., Suzuki, A. and Ueda, R. Overexpression of carboxyesterase-2 results in enhanced efficacy of topoisomerase I inhibitor, irrinotecan (CPT-11), for multiple myeloma. *Cancer Sci.*, 査読あり, 99, 2008,

2309-2314

[学会発表] (計2件)

鈴木 敦、李 順姫、岡本 士毅、大和 摩耶、藤野 裕介、戸田 知得、志内 哲也²、泰江 慎太郎、益崎 裕章、中尾 一和、箕越 靖彦、ARK5 の細胞生存活性は高脂肪食摂取による脂肪組織の肥大・増殖を促進する、第29回日本肥満学会総会、2008年10月17日、大分

Suzuki, A., Lee, S., Okamoto, S., Shiuchi, T., Minokoshi, Y., AMPK family member ARK5 is essential for white adipose tissue hypertrophy in response to high-fat diet feeding, The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS2009)、2009年7月28日、京都

[図書] (計2件)

鈴木 敦、箕越 靖彦、メディカルレビュー社、糖尿病ナビゲーター (改訂版)、印刷中

鈴木 敦、箕越 靖彦、フジメディカル出版、アディボサイエンス『特集：糖尿病とアディボサイエンス Update』、2009年、33-39

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
成果無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 敦 (SUZUKI ATSUSHI)

国立国際医療センター研究所・臨床薬理
研究部・特任研究員

研究者番号：50418993