

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08883

研究課題名(和文) 脂肪細胞のPHLDB1を介した糖脂質代謝とアディポカイン分泌機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of PHLDB1-mediated glycolipid metabolism and adipokine secretion in adipocytes

研究代表者

土屋 恭一郎 (Tsuchiya, Kyoichiro)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：60451936

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)：野生型マウスにおいてPHLDB1蛋白が骨格筋および肝臓に低発現であり、脂肪組織(精巣周囲および皮下)の脂肪細胞画分に高発現していた。高脂肪食誘導性肥満マウスの脂肪組織においてPHLDB1蛋白発現が減少していた。全身性PHLDB1ノックインマウスは、野生型マウスと比較してインスリン投与後のAktリン酸化が脂肪組織で亢進し、肝臓では亢進していなかった。通常食及び高脂肪食負荷全身性PHLDB1ノックインマウスは、対照野生型マウスと比較して体重および肝臓の脂肪蓄積を増加させずに耐糖能異常とインスリン抵抗性が改善した。さらに、脂肪細胞特異的PHLDB1ノックインマウスにおいても同様の表現型を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪細胞における微小管捕捉因子の生理的意義は未知であり、糖脂質代謝のみならず、PHLDB1の細胞生物学的な意義を有すると考えられる。加えて、糖脂質代謝の改善を目的とした薬理学的手法による臓器選択的な分子制御を考慮する際にも、標的とする病態に関連する分子の臓器間差異に着目してアプローチする本研究手法は臨床医学的な意義も有すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In wild-type mice, PHLDB1 protein was lowly expressed in skeletal muscle and liver and highly expressed in the adipocyte fraction of adipose tissue (periventricular and subcutaneous). PHLDB1 protein expression was decreased in adipose tissue of high-fat diet-induced obese mice. Systemic PHLDB1 knock-in mice had enhanced Akt phosphorylation in adipose tissue and not in liver after insulin administration compared to wild-type mice. Normal- and high-fat diet-loaded systemic PHLDB1 knock-in mice had improved glucose intolerance and insulin resistance without increased body weight and liver fat accumulation compared to control wild-type mice. Furthermore, similar phenotypes were observed in adipocyte-specific PHLDB1 knock-in mice.

研究分野：内分泌・代謝学

キーワード：インスリン抵抗性

1. 研究開始当初の背景

インスリンは細胞表面に存在するインスリン受容体に結合し、チロシン残基をリン酸化する。その後、PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) を活性化して PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) を PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate) に変換し、Aktをリン酸化する。リン酸化されたAktは糖輸送担体 (glucose transporter: GLUT) 4 を細胞表面に移行させ、ブドウ糖取り込みを促進することで血中グルコース濃度 (血糖値) が低下する。このインスリンシグナル (インスリン作用) が障害されることをインスリン抵抗性と呼ぶ。臨床医学的には、インスリン抵抗性は肥満に合併する糖脂質代謝異常の基盤的要因である。過剰に脂肪が蓄積した状態では、インスリン抵抗性が脂肪細胞由来内分泌物質 (アディポカイン) の分泌異常をきたすことに加えて、脂肪細胞分解により脂肪酸の遊離が増加して肝臓のインスリン抵抗性の一因となる。

これまで、肥満に伴う糖脂質代謝異常の治療戦略として、臓器選択的にインスリンシグナルを活性化する基礎的な試みが報告されてきた。しかし、肝臓にアデノウイルスベクターを用いて恒常活性型Aktを導入すると、肝臓の脂肪蓄積が促進し、高中性脂肪血症が惹起される (Onoら, *Diabetes* 2004)。これは、肝細胞においてインスリン作用は新規中性脂肪合成を促進することによる。申請者はこれまで、インスリン作用の観点から肥満に伴う糖脂質代謝異常および臓器合併症の発症進展機序に関する研究に従事し、インスリン作用の活性化が病態の改善に寄与するか否かは、細胞種および臓器依存的であることを示してきた (土屋ら, *Cell Metab* 2012等)。従って、肝臓を含めた各臓器一様にインスリンシグナルを活性化させることが、必ずしも糖脂質代謝異常の改善に寄与しないことが示唆される。

一方、PIP3を脱リン酸化してPIP2に変換する酵素PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) を脂肪細胞特異的に欠損させると、脂肪組織のAktリン酸化が亢進し、アディポカインの分泌異常の是正に加えて肝臓の脂肪蓄積を増加させずに糖脂質代謝異常が改善する (Morleyら, *Nat Commun* 2015)。従って、肝臓よりも脂肪細胞優位にインスリン作用を高めることにより、肝臓への脂肪蓄積を促すことなく肥満に伴う糖脂質代謝異常の改善に寄与する可能性がある。この点から、肝臓より脂肪組織において強く発現するインスリンシグナル構成分子を制御標的とすることが病態改善に有効である可能性があるが、現状ではそのような検討は報告されていない。

そこで申請者は、文献的検索および発現データベースを用いた比較より、肝臓や骨格筋には低発現であるが脂肪組織において豊富に発現するpleckstrin homology-like domain family B member 1 (PHLDB1) に着目した。PHLDB1は3T3-L1脂肪細胞において細胞膜上のPIP2、PIP3と相互作用し、インスリン依存的にAktのリン酸化を亢進させるインスリンシグナル活性増幅因子として報告されている (Hottaら, *J Biol Chem* 2010)。興味深いことに、肥満者の内臓脂肪組織において、PHLDB1遺伝子プロモーター領域のDNAメチル化レベルが皮下脂肪組織と比較して有意に高く (Hayesら, *Diabetes* 2007)、PHLDB1遺伝子多型が2型糖尿病発症リスクや脂質異常症に関連することが示されている (Willerら, *Nat Genet* 2013)、詳細な機能解析は行われていない。

また、共同研究者の清末らの成果により、PHLDB1は微小管先端に特異的に結合し、他の分子と複合体を形成して細胞膜に“連結”させることにより、微小管の向きや配置を決める微小管捕捉因子としての側面も知られている (清末ら, *Dev Cell* 2006; *J Cell Biol* 2010)。微小管補足因子は微小管端が正しく細胞膜上を連結することにより、微小管上を移動するモーター蛋白質の正確な物質輸送、および分泌因子の放出が可能になる。微小管が物質輸送のためのレールであることを考えれば、細胞表面における微小管捕捉領域は細胞の内外をつなぐ輸送のターミナルとして機能していると予想されるが、微小管捕捉因子によるアディポカインを含めた分泌因子の制御機構については未知である。

2. 研究の目的

上記の背景をもとに、本研究では、個体レベルの糖脂質代謝制御における脂肪組織 PHLDB1 の病態生理的役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

個体レベルにおける PHLDB1 の制御が糖脂質代謝に及ぼす影響を、臓器単位におけるインスリン作用の差異の観点から明らかにする。

a) PHLDB1 遺伝子改変マウスの解析

既に共同研究者の清末優子博士 (理化学研究所) より以下 i) ~ iii) の PHLDB1 遺伝子改変マウスの分与を受け、解析に着手している。iv) は現在 PHLDB1^{fllox/fllox} マウス作成の準備中であり、完成後に *Adipoq*-Cre マウスとの交配により作成する。

i) R26-TagRFP-T-PHLDB1 マウス (ROSA26 遺伝子座へ PHLDB1 遺伝子をノックインしたマウス = 以後「全身性 PHLDB1 ノックインマウス」)

ii) rlc2 マウス (PHLDB1 遺伝子の突然変異により膜結合能を欠損した PHLDB1 を発現するマウス)

加えて、以下のマウスの解析を準備している。

iii) *Adipoq*-Cre: R26R-TagRFP-T-PHLDB1 マウス (脂肪細胞特異的 PHLDB1 ノックインマウス)

iv) *Adipoq*-Cre: PHLDB1^{fllox/fllox} マウス (脂肪細胞特異的 PHLDB1 欠損マウス)

これらのマウスを、野生型マウスを対照として通常食および高脂肪食により飼育し、耐糖能 (ブドウ糖およびインスリン負荷試験等)、血清糖脂質パラメータの解析に加えて、脂肪細胞の組織学的解析 (脂肪細胞径、炎症細胞浸潤等)、遺伝子発現解析 (炎症性遺伝子等)、インスリンシグナル解析等を施行する。i) および ii) のマウスにより、個体レベルの PHLDB1 発現調節が、脂肪組織選択的なインスリン作用の変化を伴って糖脂質代謝の改善に寄与するかを検証する。iii) および iv) のマウスにより、脂肪細胞の PHLDB1 の発現変化が個体レベルの糖脂質代謝を調節し得るかを検証する。

b) 培養細胞を用いた PHLDB1 の脂肪細胞における糖脂質代謝における意義の解明

PHLDB1 または PHLDB1 shRNA 発現ベクターを 3T3-L1 脂肪細胞に導入し、脂肪細胞分化およびインスリン作用への影響を検証する。また、インスリン刺激後の Akt 活性化ならびに GLUT4 の細胞膜移行をリアルタイムイメージングにて視覚化し、PHLDB1 のインスリンシグナルを介した糖取り込みへの作用を多角的に解析する。

脂肪細胞機能における微小管捕捉因子としての PHLDB1 の病態生理的意義を、PHLDB1 に分泌制御されるアディポカインの同定により明らかにする。

PHLDB1 によるインスリン作用亢進がもたらす個体および細胞レベルの表現型解析に加えて、脂肪細胞における PHLDB1 の微小管捕捉因子としての新規機能探索を進める。本研究では、微小管捕捉因子としての PHLDB1 に分泌制御されるアディポカインの同定を試みる。

a) PHLDB1 との相互作用を有するアディポカインのプロテオーム解析による抽出

エレクトロポレーション法またはウイルスを用いて、PHLDB1 shRNA 発現または対照ベクターを分化誘導後の 3T3-L1 脂肪細胞に導入する。抗 PHLDB1 抗体にて免疫沈降し、外部受託解析により液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析器 (LC-MS/MS) によるショットガン解析を実施する。並行して、3T3-L1 脂肪細胞の培養上清を濃縮して同様のショットガン解析を実施する。両解析において共通して変化する蛋白を抽出する。

b) 脂肪細胞特異的 PHLDB1 欠損マウス血清のプロテオーム解析

通常食負荷下における脂肪細胞特異的 PHLDB1 欠損マウスおよび野生型マウスの血清をショットガン解析に供する。b) において a) と同様の変化が確認された蛋白質を、「微小管捕捉因子としての PHLDB1 に分泌制御されるアディポカイン候補」とし、ELISA 法またはウェスタンブロット法にて確認する。

c) イメージングによる、候補物質の PHLDB1 に分泌制御されるアディポカインとしての確認

b) における「微小管捕捉因子としての PHLDB1 に分泌制御されるアディポカイン候補」の脂肪細胞における PHLDB1 の被輸送物質としての可能性を検証するため、共同研究者の清末優子博士 (理化学研究所) の協力により、全反射および 2 光子 *in vivo* 顕微鏡等によるイメージングを行う。候補物質を内包する分泌小胞と微小管、および PHLDB1 の時間的・空間的局在性を明らかにし、微小管捕捉因子としての PHLDB1 に分泌制御されるアディポカインを同定する。

4. 研究成果

野生型マウスにおいて PHLDB1 蛋白が骨格筋および肝臓に低発現であり、脂肪組織 (精巣周囲および皮下) の脂肪細胞画分に高発現していること、また、高脂肪食誘導性肥満マウスの脂肪組織において PHLDB1 蛋白発現が減少することを確認した。加えて、全身性 PHLDB1 ノックインマウスは、野生型マウスと比較してインスリン投与後の Akt リン酸化が脂肪組織で亢進し、肝臓では亢進しないことを見出した。通常食及び高脂肪食負荷全身性 PHLDB1 ノックインマウスは、対照野生型マウスと比較して体重および肝臓の脂肪蓄積を増加させずに耐糖能異常とインスリン抵抗性が改善し、個体レベルでの PHLDB1 発現調節が脂肪組織でのインスリン作用の変化を伴って耐糖能改善とインスリン作用増加に寄与することが示唆された。脂肪細胞特異的 PHLDB1 ノックインマウスにおいても同様の表現型を確認した。

細胞実験においては、分化前の 3T3-L1 細胞にウイルスベクターを用いて PHLDB1 を過剰発現させることにより、分化誘導刺激を行わずに Akt のリン酸化増加を伴って脂肪滴が蓄積することを確認した。加えて、3T3-L1 脂肪細胞の分化に従って PHLDB1 遺伝子および蛋白発現が増加することから、PHLDB1 がインスリンシグナルの活性化を介して脂肪分化を促進することが示唆された。PHLDB1 はインスリン刺激後に膜への局在が増加し、GLUT4 と共局在した。PHLDB1 は Rho-ROCK シグナルを抑制し、コラーゲン VI 産生を抑制した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大熊英之、清末優子、吉川欣亮、大塚稔久、土屋恭一郎
2. 発表標題 微小管捕捉因子PHLDB1の脂肪蓄積と肥満関連代謝障害における病態生理学的意義
3. 学会等名 第42回日本肥満学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大熊 英之、清末 優子、吉川 欣亮、大塚 稔久、土屋 恭一郎
2. 発表標題 微小管捕捉因子PHLDB1の脂肪蓄積と糖脂質代謝における病態生理学的意義
3. 学会等名 第41回日本肥満学会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------