

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22936

研究課題名(和文)臓器間ネットワークを司る多機能ペプチダーゼによる糖代謝制御機構の解明

研究課題名(英文) Investigations into regulatory mechanisms of glucose metabolism by a multifunctional peptidase controlling inter-organ networks

研究代表者

松田 真太郎 (Matsuda, Shintaro)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：80881838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：M16ファミリーに属するメタロプロテアーゼであるNardilysin(NRDC)を脂肪細胞特異的に欠失させたマウスに対して高脂肪食を給餌して肥満を誘導させたところ、対照マウスと比較して耐糖能・インスリン感受性が改善したという先行結果に基づき、同マウスおよび3T3-L1脂肪細胞を用いてそのメカニズムの解明に取り組んだ。NRDCをノックダウンさせた脂肪細胞は細胞の酸素消費量が低下しており、また低酸素環境下において低酸素誘導因子(HIF1- α)の発現が有意に低下していたことから、NRDCが細胞の酸素環境を介して脂肪組織における炎症や糖代謝を制御していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満は様々な疾病を引き起こす危険因子であることが知られており、中でも糖代謝異常すなわち糖尿病は世界的にも大きな健康問題の1つである。しかしながら、肥満者が皆糖尿病を発症するとは限らず、糖代謝異常は肥満以外にも様々な因子が関連していることが推察される。今回の研究では、脂肪組織内においてNardilysinというペプチダーゼを欠失したマウスが肥満になっても糖代謝異常が軽微であったという背景をもとに、その分子機構を解明することを主眼とした。Nardilysinは脂肪細胞の酸素環境を制御することによって糖代謝異常に関連していることを示した。

研究成果の概要(英文)：Based on previous results that glucose tolerance and insulin sensitivity were improved in mice with adipocyte-specific deletion of Nardilysin (NRDC), a metalloproteinase belonging to the M16 family, by feeding them a high-fat diet compared to control mice, we worked to elucidate the mechanisms using these mice and 3T3-L1 adipocytes. Adipocytes with NRDC knockdown had decreased cellular oxygen consumption and significantly decreased expression of hypoxia-inducible factor (HIF1- α) under hypoxic conditions, suggesting that NRDC regulates inflammation and glucose metabolism in adipose tissue through the cellular oxygen environment.

研究分野：循環器内科学

キーワード：肥満 脂肪組織 インスリン抵抗性 脂肪細胞 低酸素誘導因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病は世界的にも非常に大きな健康問題の一つであり、その原因の一つが高脂肪食などの過剰摂取に伴う肥満がある。肥満は過剰な脂肪組織の蓄積として定義され、その結果脂肪組織の慢性炎症が進行し、それに引き続きインスリン抵抗性が出現する。しかしながら、肥満個体であっても必ずしもインスリン抵抗性を示さないこともあり、その詳細なメカニズムは明らかでない。

当研究室では M16 ファミリーに属するメタロプロテアーゼである Nardilyisin(NRDC)が生体内で様々な機能を有することを示してきた。その中で、NRDC を欠損したマウスはやせ型の表現型を示し、インスリン感受性の亢進を認めるが、膵細胞からのインスリン分泌能が低下し、結果的に耐糖能の悪化が認められた。

本研究者はこれまでに、脂肪細胞特異的に NRDC をノックアウトしたマウスに対して、高脂肪食を加えると、同様に肥満を呈するにも関わらず、インスリン感受性および耐糖能の悪化が抑制され、内臓脂肪組織における慢性炎症が軽減されることを示した。

2. 研究の目的

脂肪細胞における NRDC がどのようなメカニズムを介して、高脂肪食誘導性肥満の状態において、脂肪組織の炎症やインスリン抵抗性を誘導するのかを解明する。

3. 研究の方法

脂肪細胞特異的 NRDC ノックアウトマウスは、C57BL/6バックグラウンドの NRDC-floxed/floxed マウスと、同バックグラウンドの Adipoq-Cre トランスジェニックマウスを交配することにより作成した。実験には全て雄の個体を用いた。

(1)脂肪細胞特異的 NRDC ノックアウトマウスに高脂肪食を 2 週間給餌させてから新鮮精巢上体脂肪組織を回収した。脂肪組織を手術用剪刀にて 1mm 大に細断し、コラゲナーゼ Type1 を加えて 37 °C で 30 分間処理を加えた後に遠心にて脂肪細胞分画を単離した。脂肪細胞分画から RNA を抽出し、網羅的解析 (RNA-seq) を行った。RNA 抽出には Tripure Isolation Reagent (シグマアルドリッチ社)を用いた。抽出した RNA に対して網羅的解析 (mRNA-seq) を行った。

培養細胞実験では 10%ウシ胎児血清(FBS)と 1%ペニシリン/ストレプトマイシンを混合した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培地を用いて、5% CO₂、37 °C 下に培養した (O₂濃度は諸条件にて異なるインキュベーターを用いた)。

3T3-L1 脂肪前駆細胞に対して、siRNA を用いて NRDC をノックダウンさせたのちに、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、デキサメタゾン、インスリンを添加した培地で 2 日間培養し、インスリンのみを添加した培地で引き続き 2 日間培養し、さらに維持培地にて 2 日間培養することにより脂肪細胞に分化誘導させ、この細胞を用いて以下の実験を行った。

(2)脂肪細胞の細胞呼吸状態を細胞外フラックスアナライザー(Agilent Technologies)を用いて (1)オリゴマイシン、(2)FCCP、(3)ロテノン+アンチマイシン A の順に添加し (Mito-stress test)、各投与時点での Oxygen consumption rate(OCR)、Extracellular acidification rate(ECAR)を測定した。

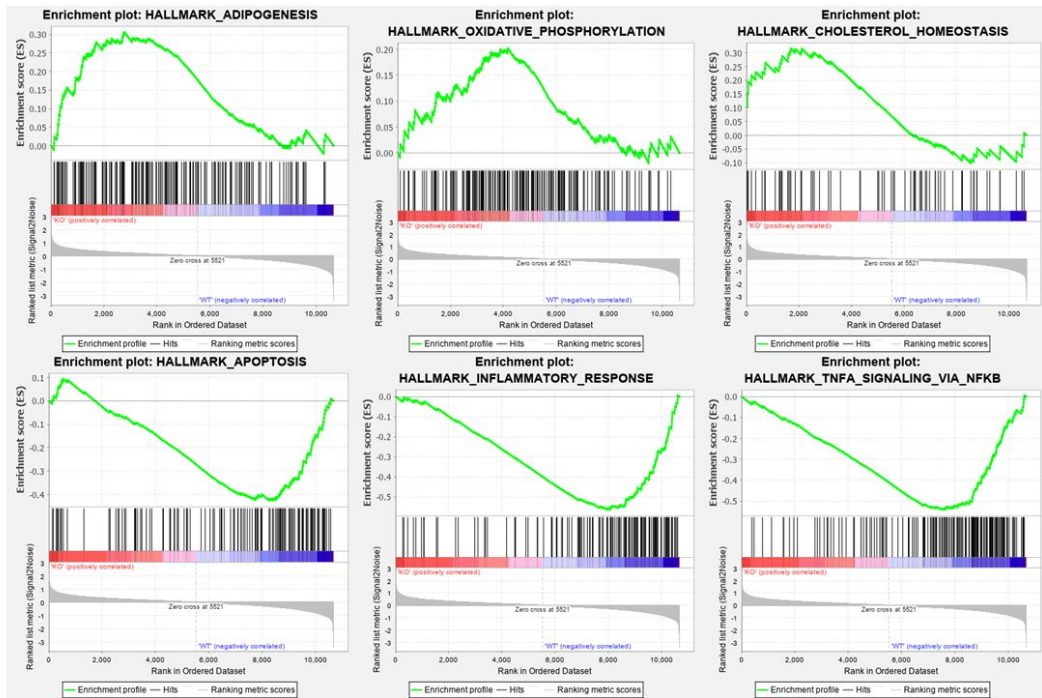
(3)一晩の血清フリー培地にて培養後、17nM インスリンを添加した培地にて 15 分間培養後、RIPA バッファーを用いてタンパク分画を抽出し、T308 リン酸化 Akt、total Akt (tAkt)、HIF1、NRDC、GAPDH、COX4 発現についてウェスタンブロット法にてについて解析した。さらに、通常のインキュベーター下 (20% O₂) に加え、低酸素インキュベーター (3% O₂) で 24 時間培養した条件下でも同様の実験を行った。また、脂肪細胞に対して Daprodustat を一定濃度で 24 時間投与した後に、同様にインスリン添加を行った系についても解析した。

4. 研究成果

(1)マウス脂肪組織由来の脂肪細胞の mRNA-seq

2 週間の高脂肪食を給餌した脂肪細胞特異的 NRDC ノックアウトマウス (AdipoK0) とコントロールマウス (NRDC-floxed/floxed) の脂肪組織から単離した脂肪細胞について次世代シーケンサーを用いて、その遺伝子発現を解析した。Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) の結果、AdipoK0 由来の脂肪細胞では Adipogenesis, Oxidative Phosphorylation, Cholesterol homeostasis に関連する遺伝子群等の発現の増強を認める一方で、コントロール由来の脂肪細胞では Inflammatory response, Angiogenesis, TNF α signaling に関連する遺伝子群等で発現の増強を認めた。(図 1)

図 1



(2) NRDC をノックダウンした 3T3-L1 脂肪細胞ではその分化傾向に明らかな差を認めないにも関わらず、48 時間培養時点での維持培地の phenol red の変色、すなわち培地の酸性化が抑制されることが分かった。(図 2) 細胞外フラックスアナライザーにより解析を行ったところ NRDC をノックダウンした脂肪細胞では OCR / ECAR の有意な低下が認められた。(図 3)

図 2

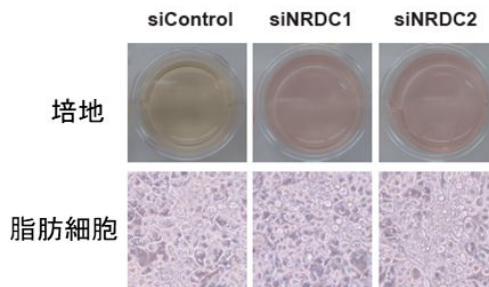
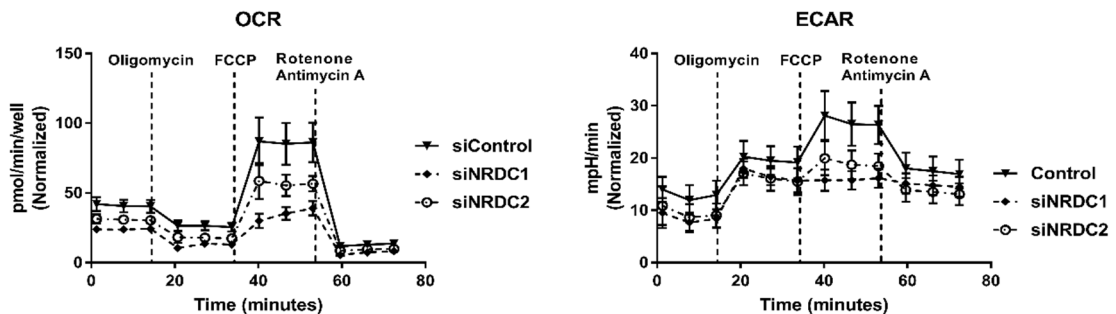


図 3



(3) 3T3-L1 脂肪細胞を 3% O₂ にコントロールした低酸素インキュベーターにて 24 時間培養し、タンパク成分を抽出し、ウェスタンブロットを行った。NRDC をノックダウン (KD1、KD2) した 3T3-L1 脂肪細胞ではコントロール脂肪細胞(C)と比較して Hif1 の発現の低下が認められた。この現象は脂肪前駆細胞では認められなかった。(図 4) また、通常酸素培養下 (20% O₂) で NRDC をノックダウンした 3T3-L1 脂肪細胞ではインスリン刺激による T308 リン酸化 Akt の発現の増強が認められるが、HIF-PH 阻害薬である Daprodustat を投与し、Hif1 を恒常的に活性化させた状態でインスリン刺激を加えると、T308 リン酸化 Akt の発現は抑制され、NRDC ノックダウンによる発現増強効果も消失した。(図 5)

图 4

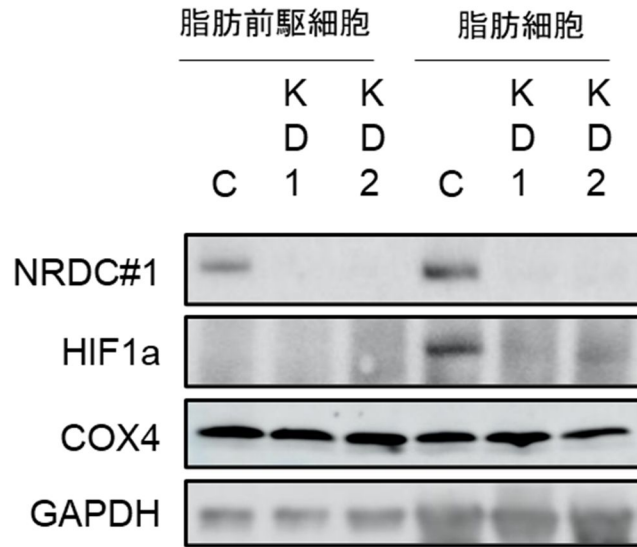
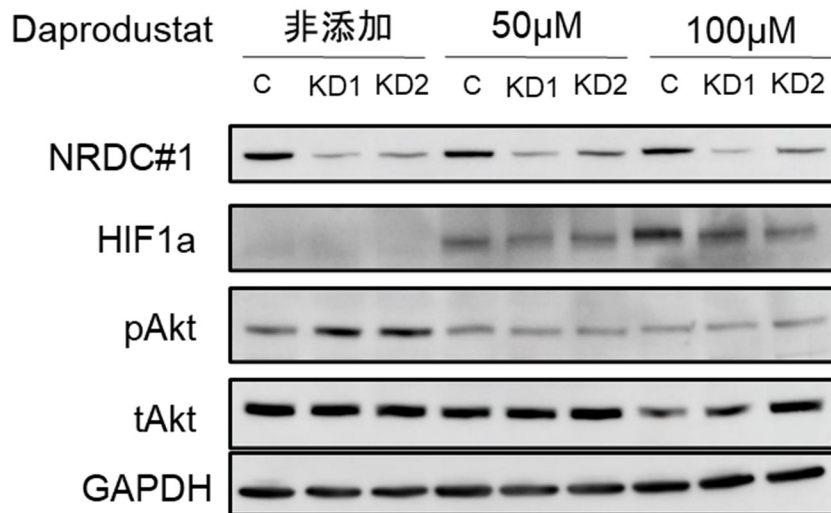


图 5



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 松田 真太郎
2. 発表標題 脂肪細胞のNardi lysinは細胞における酸素需要および低酸素誘導因子（HIF1- ）シグナルを介してインスリン感受性を制御する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田 真太郎
2. 発表標題 脂肪細胞のNardi lysinは酸素需要およびインスリン感受性を制御する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
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
研究協力者	西 英一郎 (Nishi Eiichiro)	滋賀医科大学・薬理学講座・教授 (14202)	
研究協力者	大野 美紀子 (Ohno Mikiko)	滋賀医科大学・薬理学講座・准教授 (14202)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	西 清人 (Nishi Kiyoto)	滋賀医科大学・薬理学講座・助教 (14202)	

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