

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790089

研究課題名(和文)塩基性繊維芽細胞増殖因子の脂肪細胞に対する代謝調節因子としての役割

研究課題名(英文)The role of basic fibroblast growth factor in regulation of metabolism of adipocyte

研究代表者

木平 孝高(Kihira, Yoshitaka)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：90377276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：塩基性繊維芽細胞増殖因子が、脂肪細胞の低酸素誘導因子を発現誘導し、糖代謝を変化することにより、脂肪細胞の機能異常を引き起こすことを明らかとした。このことから、低酸素誘導因子が脂肪細胞に発現することが、肥満糖尿病の進展に重要ではないかと考えられた。そこで、脂肪細胞特異的に低酸素誘導因子を欠損したマウスを作製し、解析を行ったところ、この欠損マウスでは、肥満が生じても良好なインスリン感受性および耐糖能を示すことが明らかとなった。これらの結果から、脂肪細胞の低酸素誘導因子が肥満による糖尿病の進展に重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We observed that basic fibroblast growth factor dysregulates glucose metabolism of adipocyte via expression of hypoxia-inducible factor-1alpha, indicating that expression of hypoxia-inducible factor-1alpha involves in development of diabetes mellitus. Therefore, we prepared an adipocyte-specific hypoxia inducible factor-1alpha knockout mice and observed the phenotype. The mice exhibited improved insulin sensitivity and glucose tolerance under obese conditions compared with wild type mice. These results suggested that hypoxia-inducible factor-1alpha plays an important role in development of obesity-induced diabetes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：塩基性繊維芽細胞増殖因子 低酸素誘導因子 肥満 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

肥満により脂肪組織が肥大化すると、脂肪細胞において低酸素誘導因子(HIF-1)が発現することが知られている。HIF-1が発現する理由として、脂肪細胞が肥大化することにより、脂肪細胞の直径が酸素の拡散距離を上回り、脂肪組織が低酸素環境となるためと考えられているが、近年の解析から、HIF-1の発現誘導には、成長因子、サイトカインなどの液性因子も関与していることが明らかとなった。脂肪細胞におけるHIF-1の発現誘導に対する液性因子の役割についてはほとんど解析がなされていない。また、脂肪細胞におけるHIF-1の発現が、生体の肥満に伴う糖尿病発現にどのような役割を果たすかは不明な点が多い。

2. 研究の目的

近年の解析から、HIF-1の発現誘導には、成長因子、サイトカインなどの液性因子も関与していることが明らかとなった。申請者は、脂肪細胞においても、液性因子がHIF-1の発現に関与すると考え、解析を行った。その結果、肥満により脂肪細胞が肥大化する際に血管新生因子として働く塩基性繊維芽細胞増殖因子(bFGF)が、脂肪細胞に直接作用し、HIF-1の発現誘導を引き起こすことを見いだした。しかしながら、その生理的意義は明らかとなっていない。そこで本研究では、脂肪細胞特異的HIF-1ノックアウトマウスを用いた解析から、特に肥満糖尿病におけるbFGFとHIF-1の役割を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

脂肪細胞に分化させた3T3-L1細胞を無血清培地にて終夜培養した後、bFGFを添加し、RNAおよびタンパク質サンプルを調製した。RT-PCRおよびウエスタンブロッティングにより、HIF-1とその標的因子の発現を解析した。

HIF-1のshRNA発現ベクターを3T3-L1脂肪細胞に導入し、HIF-1をノックダウンさせた際の影響を解析した。

クロマチン免疫沈降法を用いて、HIF-1の標的遺伝子プロモーターへの結合を解析した。

脂肪細胞の代謝変化を解析するために、乳酸の培地中への分泌およびglucoseの細胞内取り込みを解析した。

脂肪細胞HIF-1ノックアウト(ahK0)マウスは、ap2プロモーター下流にcreリコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスとHIF-1 floxedマウスを交配することにより作製した。

ahK0マウスに高脂肪食を負荷することにより肥満を誘発し、インスリン負荷試験および糖負荷試験により、それぞれインスリン抵抗性および耐糖能の解析を行った。

ahK0マウスの精巣上体脂肪組織を免疫染色

することで、脂肪組織へのマクロファージの浸潤について解析を行った。また、脂肪組織中の炎症性サイトカインのmRNA発現をreal time PCRにより解析し、脂肪組織炎症について解析を行った。

血中のインスリン、レプチン、レジスチン、アディポネクチン、プラスミノゲン活性化抑制因子、単球走化性因子、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)の濃度をMilliplexまたはELISAを用いて測定した。腸管L細胞のモデル細胞であるGLUTag細胞にアディポカインを添加し、細胞外に分泌されたGLP-1をELISAにて測定した。

マクロファージ特異的HIF-1ノックアウト(mhK0)マウスは、Lys-Mプロモーター下流にCreリコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスと、HIF-1 floxedマウスを交配することにより作製した。ahK0マウスと同様にインスリン抵抗性、耐糖能、精巣上体脂肪組織中炎症性サイトカインのmRNA発現レベルを解析した。

4. 研究成果

bFGFを脂肪細胞に添加すると、HIF-1が発現誘導され、これに伴い、グルコーストランスポーター (GLUT1)が発現誘導されることが明らかとなった。また、マウスにbFGFを腹腔内投与すると、精巣上体脂肪組織においてGLUT1の発現上昇が観察されることから、bFGFによるGLUT1の制御は、生体内においても生じていることが確認された。脂肪細胞において、shRNAによりHIF-1を発現抑制すると、bFGFによるGLUT1の発現上昇が抑制されたこと、bFGF刺激により、HIF-1がGLUT1プロモーターに結合することから、GLUT1の発現調節は、HIF-1により直接なされていることが明らかとなった。HIF-1の発現により、細胞内代謝の変化が生じているかどうかを解析した結果、グルコースの取り込みが上昇し、乳酸の分泌が上昇していたことから、嫌氣的な解糖系が促進されており、糖のATP合成への利用が抑制されていることが示唆された。

ahK0マウスを用いた解析から、脂肪細胞のHIF-1を欠損すると、インスリン抵抗性が改善し、耐糖能が上昇することが明らかとなった。また、ahK0マウスにおいて、肥満に伴う脂肪組織の炎症が抑制されていることが明らかとなった。さらに、インスリンの血中濃度について解析を行ったところ、空腹時においては変化が観察されなかったものの、随時インスリン値が、野生型マウスに比べahK0マウスにおいて上昇していることが明らかとなった。このことは、ahK0マウスにおいては、食後のインスリンの分泌が上昇しており、これが耐糖能の上昇につながっていることを示唆している。また、血中のGLP-1濃度が上昇しており、GLP-1受容体阻害剤を投与した後、糖負荷試験を行った結果、ahK0マウスの耐糖能の上昇がキャンセルされたことが

ら、GLP-1によるインスリン分泌促進作用が、ahKOマウスの耐糖能の改善に参与していることが明らかとなった。さらに、ahKOマウスの血中濃度が上昇していたアディポネクチンが、腸管L細胞からGLP-1分泌を促進することを見いだした。

以上より、bFGFが脂肪細胞のHIF-1の発現誘導を介し、脂肪細胞の代謝異常を引き起こすこと、脂肪細胞のHIF-1は、インスリン抵感受性および耐糖能に影響を及ぼすこと。また、アディポネクチンを起点とした、脂肪-腸管-膵臓の連関により全身の糖代謝が維持されていることが示唆された。

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 2 件)

Kihira Y, Miyake M, Hirata M, Hoshina Y, Kato K, Shirakawa H, Sakaue H, Yamano N, Izawa-Ishizawa Y, Ishizawa K, Ikeda Y, Tsuchiya K, Tamaki T, Tomita S. Deletion of hypoxia-inducible factor-1 in adipocytes enhances glucagon-like Peptide-1 secretion and reduces adipose tissue inflammation. PLoS One. 2014, 9(4):e93856 査読有り

Kihira Y, Yamano N, Izawa-Ishizawa Y, Ishizawa K, Ikeda Y, Tsuchiya K, Tamaki T, Tomita S. Basic fibroblast growth factor regulates glucose metabolism through glucose transporter 1 induced by hypoxia-inducible factor-1 in adipocytes.

Int J Biochem Cell Biol. 2011, 43(11):1602-11 査読有り

[学会発表](計 11 件)

木平孝高, BURENTOGTOKH Ariunzaya, 伊藤麻里, 山野範子, 石澤有紀, 石澤啓介, 池田康将, 土屋浩一郎, 玉置俊晃, 腸管L細胞のグルカゴン様ペプチド-1分泌に対する低酸素の影響, 日本薬学会第134年会, 2014年3月27-30日, 熊本県, ホテル日航熊本, 熊本大学黒髪キャンパス, 熊本市総合体育館

木平孝高, 富田修平, 山野範子, 石澤有紀, 石澤啓介, 池田康将, 土屋浩一郎, 玉置俊晃, 肥満に伴う脂肪組織炎症に対する低酸素誘導因子の役割, 第124回日本薬理学会近畿部会, 2013年11月1日, 京都府, 京都ガーデンパレス

三宅真理子, 木平孝高, 富田修平, 山野範子, 石澤有紀, 石澤啓介, 池田康将, 土屋浩一郎, 玉置俊晃, 脂肪細胞の低酸素誘導因子欠損による耐糖能改善メカニズムの解析, 第52回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 2013年10月26-27日, 愛媛県, 松山大学文

京キャンパス

保科耀司, 木平孝高, 富田修平, 三宅真理子, 山野範子, 石澤有紀, 石澤啓介, 池田康将, 土屋浩一郎, 玉置俊晃, Adipocyte-specific hypoxia-inducible factor-1alpha knockout stimulated GLP-1 and insulin secretions in mice, 第86回日本薬理学会年会, 2013年3月21-23日, 福岡県, 福岡国際会議場

伊藤麻里, 木平孝高, 山野範子, 石澤有紀, 石澤啓介, 池田康将, 土屋浩一郎, 富田修平, 玉置俊晃, Secretion of glucagon-like peptide-1 from Intestinal L cell in hypoxia, 第86回日本薬理学会年会, 2013年3月21-23日, 福岡県, 福岡国際会議場

木平孝高, 富田修平, 三宅真理子, 保科耀司, 山野範子, 石澤有紀, 石澤啓介, 池田康将, 土屋浩一郎, 玉置俊晃, 脂肪細胞特異的低酸素誘導因子欠損マウスに観察される耐糖能の改善には glucagon-like peptide-1が関与する, 第42回日本心臓血管作動物質学会, 2013年2月8-9日, 奈良県, 奈良県立新公会堂

三宅真理子, 木平孝高, 平田愛美, 石澤有紀, 石澤啓介, 池田康将, 土屋浩一郎, 玉置俊晃, 富田修平, 脂肪細胞における低酸素誘導因子1a欠損は高脂肪食負荷による耐糖能異常の発現を抑制する, 日本薬学会第132年会, 2012年3月28-31日, 北海道, 北海道大学札幌キャンパス

平田愛美, 木平孝高, 三宅真理子, 石澤有紀, 石澤啓介, 池田康将, 土屋浩一郎, 玉置俊晃, 富田修平, High fat diet-induced inflammation in adipose tissues is reduced in adipocyte-specific hypoxia-inducible factor-1a knockout mice, 第85回日本薬理学会年会, 2012年3月14-16日, 京都府, 国立京都国際会館, グランドプリンスホテル京都

木平孝高, 三宅真理子, 平田愛美, 石澤有紀, 石澤啓介, 池田康将, 土屋浩一郎, 玉置俊晃, 富田修平, 肥満に伴う耐糖能異常の発現に対する脂肪細胞の低酸素誘導因子の役割/第41回心臓血管作動物質学会, 2012年2月10-11日, 秋田県, 秋田キャッスルホテル

木平孝高, 石澤啓介, 池田康将, 土屋浩一郎, 富田修平, 玉置俊晃, 脂肪細胞における塩基性繊維芽細胞増殖因子による低酸素誘導因子誘導とそれを介した糖輸送担体発現誘導, 第118回日本薬理学会近畿部会, 2011年11月19日, 大阪府, 千里ライフサイエンスセンター

Yamaguchi K, Kihira Y, Yamano N, Ishizawa Y, Ishizawa K, Ikeda Y, Tsuchiya K, Tomita S, Tamaki T. Glucose Metabolism of Adipocytes is Regulated by Basic Fibroblast Growth Factor via Hypoxia-inducible Factor-1a, High Blood

Pressure Research Scientific Sessions
2011 Scientific Sessions, 2011, Sep 20-24,
USA, Orlando, Fla. Walt Disney World
Dolphin Resort

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木平 孝高 (KIHIRA, Yoshitaka)
徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究
部・助教
研究者番号：90377276

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：