

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790912

研究課題名(和文)細胞周期調節因子 p21 の未知の糖代謝制御機能の解明

研究課題名(英文) Investigation of unknown mechanism of glucose metabolism regulated by cell cycle control related protein p21.

研究代表者

久保田 みどり (Kubota, Midori)

東京大学・保健・健康推進本部・助教

研究者番号：20383804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：p21は細胞周期を調節する主要な因子であるが、肥満モデルマウスの脂肪細胞および肝細胞では細胞周期はG0期であるにも関わらず、p21の発現が亢進している。これまでの研究から、培養脂肪細胞におけるp21の過剰発現はインスリンによる糖取り込み能を低下させ、またp21欠損マウスは高脂肪食負荷時にインスリン抵抗性を呈しにくいことが判明している。p21の既知のターゲット分子としてはCDKs(cyclin-dependent kinases)が知られている。そこでCDKs阻害作用を持つ複数の化合物を3T3-L1脂肪細胞に添加すると、インスリン刺激による糖取り込みが減少することを確認できた。

研究成果の概要(英文)：p21 is the main factor which controls cell cycle and accelerated in hepatocyte and adipocyte of obese model mice, but though cell cycle of those cells is G0 periods. Previous research has shown that overexpression of p21 decrease insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 cultured adipocytes and p21 knockout mice fed high fat diet has reduced insulin resistance. CDKs (cyclin-dependent kinases) is known as a target molecule of p21. So when several CDK inhibitors were treated in 3T3-L1 adipocytes, insulin-stimulated glucose uptake was decreased.

研究分野：糖尿病

キーワード：細胞周期 インスリン抵抗性 p21

1. 研究開始当初の背景

近年、食生活の欧米化が進んだことにより、我々の摂取するエネルギーは増加する一方で、自動車やコンピューター等の工業技術の発達により、我々が消費するエネルギーは減少する一方である。この摂取エネルギーと消費エネルギーのアンバランスにより、現在、先進諸国では肥満が流行している。肥満は心血管疾患や糖尿病の主要な危険因子であり、肥満の発症機序の解明や、それに伴うインスリン抵抗性といった病態との関連の解明は現代医学にとって最重要課題のひとつである。肥満は脂肪細胞の過形成と細胞の増大によって説明される脂肪組織の脂質の過剰な蓄積により特徴づけられる。脂肪細胞への分化には前脂肪細胞の増殖の停止を含む一連の流れが必要なことが知られている。細胞周期の制御に関わる因子は脂肪細胞の分化や機能において重要な役割をもつことが推定できる。

p21^{WAF1/CIP1} は細胞周期を調節する主要な因子であり、肥満モデルマウスの脂肪細胞および肝細胞において p21 の発現が亢進している。また、高脂肪食負荷をした p21KO マウスにおいては脂肪組織や脂肪細胞が縮小しインスリン抵抗性の著明な改善が認められる。しかし、肥満による p21 の上昇とインスリン抵抗性を結ぶメカニズムは未だ明らかとなっていない。

2. 研究の目的

哺乳類の細胞における細胞周期の進行は、Cyclin family や CDKs (Cyclin-dependent kinase) と呼ばれる kinase、そして CDKs の作用を阻害する CKIs (Cyclin-dependent kinase inhibitors) などの様々なタンパク質により調節されている。p21^{WAF1/CIP1} と p27^{KIP1} は主要な CKI であり細胞周期を G1 で停止させる。p21 と p27 は様々な分野に関連付けられた研究がなされており、脂肪細胞への分化の過程においては p21 と p27 の発現

が変化することが知られている。p21 は細胞に対するストレスに応答する転写因子である p53 のターゲット遺伝子であり、G1 arrest を引き起こすのみならずアポトーシスから細胞を守る働きがあることがよく知られているが、最近の我々の報告において、マウスの脂肪組織における p21 の発現がインスリン抵抗性と関連していることが示されていることから、本研究では培養脂肪細胞の系において p21 およびその関連因子がインスリン抵抗性と関わりがあるかを明らかにすることを目的とした¹⁻⁴⁾。

3. 研究の方法

これまでにラット精巢上体白色脂肪組織から単離した primary mature adipocytes や脂肪細胞に分化した 3T3-L1 細胞にアデノウイルスにて p21 を過剰発現させ、インスリン刺激によるグルコースの取り込みや、反対に p21-shRNA 発現アデノウイルスにより 3T3-L1 脂肪細胞の p21 をノックダウン下でのグルコースの取り込みを検出する方法を確立している。そこで、p21 のターゲット分子として良く知られている CDKs (Cyclin-dependent kinases) に対するノックダウンを 3T3-L1 脂肪細胞にて行うため、CDKs のノックダウンベクターの作成を行い、それらの遺伝子がノックダウンできているかを調べるために、ウェスタンブロットング法やリアルタイム PCR 法を用いた解析を行った。さらに、p21 のターゲット分子である CDKs の阻害薬を脂肪細胞に分化した 3T3-L1 細胞に添加した際のインスリン刺激によるグルコースの取り込み量の変化の再現性を確認した。

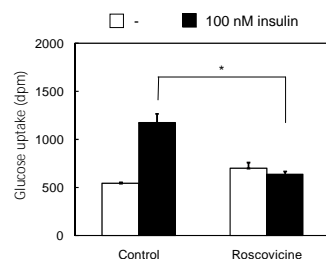
4. 研究成果

p21 とインスリン抵抗性の関係を明らかにする初めのステップとして CDKs に注目し、CDKs のノックダウンベクターの作成を行った。p21 がターゲットとする CDKs

には cdk1、cdk2、cdk4 が知られているが、リアルタイム定量的 PCR での解析の結果、脂肪細胞においては cdk2 と cdk4 の発現が比較的高いことが確認された。そこでマウスの cdk2 と cdk4 の mRNA を標的とした siRNA(cdk2i、cdk4i) の候補配列を siDirect2 アルゴリズムにて各 4 種類ずつ設計し、U6 プロモーター下にそれぞれの siRNA 配列を持った shRNA を発現させるノックダウンベクターを作成した。また HA タグ付きマウス cdk2、cdk4 発現ベクターも作成し、それら発現ベクターと各ノックダウンベクターを共トランスフェクトした 293 細胞のタンパク質を用いて HA 抗体にてイムノプロットを行いノックダウン効率の確認を行った。その結果、効果的にマウス cdk2、cdk4 をノックダウンできる siRNA 配列を各 2 種類ずつ得ることができた。脂肪細胞でのノックダウンの方法として U6 プロモーター下で shRNA を発現させるアデノウィルスベクターを感染させる方法が適しているため、クロナゼ反応を介したゲートウェイ法を用いて上記で選定された shRNA を組み込んだノックダウンアデノウィルスベクターを作成した。得られたマウス cdk2、cdk4 ノックダウンアデノウィルスベクターを 3T3-L1 脂肪細胞に感染させ、細胞内の cdk2、cdk4 の mRNA をリアルタイム定量的 PCR にて確認したところ、cdk2、cdk4 の有意な抑制効果は確認できなかった。今後は 3T3-L1 脂肪細胞で有意にノックダウンできる shRNA 配列のさらなる改良やウィルスベクターの感染方法の改善が必要であると考えられる。一方、CDKs 阻害作用を持つ Roscovitine および Puvalanol A を 3T3-L1 脂肪細胞に添加し細胞内の CDKs を阻害すると、再現良くインスリン刺激による糖取り込みが減少したことから、脂肪細胞でのインスリン抵抗性に CDKs が関与していることが示唆

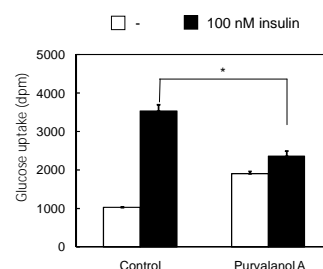
された。

CKI Roscovitineを作用させた3T3-L1脂肪細胞におけるインスリンによる糖取り込み



3T3-L1脂肪細胞に50 μM Roscovitineを作用させた後、インスリン刺激により取り込まれた2-deoxy-D-[3H]glucoseの量をシンチレーションカウンターにより測定した。(n=4)

CKI Puvalanol Aを作用させた3T3-L1脂肪細胞におけるインスリンによる糖取り込み



3T3-L1脂肪細胞に10 μM Puvalanol Aを作用させた後、インスリン刺激により取り込まれた2-deoxy-D-[3H]glucoseの量をシンチレーションカウンターにより測定した。(n=4)

引用文献

- Inoue, N., Shimano, H., Nakakuki, M., Matsuzaka, T., Nakagawa, Y., Yamamoto, T., Sato, R., Takahashi, A., Sone, H., Yahagi, N., Suzuki, H., Toyoshima, H., and Yamada, N. (2005) *Mol Cell Biol* 25(20), 8938-8947
- Yahagi, N., Shimano, H., Matsuzaka, T., Najima, Y., Sekiya, M., Nakagawa, Y., Ide, T., Tomita, S., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., Gotoda, T., Nagai, R., Kimura, S., Ishibashi, S., Osuga, J., and Yamada, N. (2003) *J Biol Chem* 278(28), 25395-25400
- Yahagi, N., Shimano, H., Matsuzaka, T., Sekiya, M., Najima, Y., Okazaki, S., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Inoue, N., Nakagawa, Y., Takeuchi, Y., Ohashi, K., Harada, K., Gotoda, T.,

Nagai, R., Kadowaki, T., Ishibashi, S.,
Osuga, J., and Yamada, N. (2004) *J Biol
Chem* 279(20), 20571-20575

4. Inoue, N., Yahagi, N., Yamamoto, T.,
Ishikawa, M., Watanabe, K., Matsuzaka,
T., Nakagawa, Y., Takeuchi, Y.,
Kobayashi, K., Takahashi, A., Suzuki,
H., Hasty, A. H., Toyoshima, H.,
Yamada, N., and Shimano, H. (2008) *J
Biol Chem* 283(30), 21220-21229

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 1 件)

Izumida, Y., Yahagi, N., Takeuchi, Y.,
Nishi, M., Shikama, A., Takarada, A.,
Masuda, Y., Kubota, M., Matsuzaka, T.,
Nakagawa, Y., Iizuka, Y., Itaka, K.,
Kataoka, K., Shioda, S., Nijima, A.,
Yamada, T., Katagiri, H., Nagai, R.,
Yamada, N., Kadowaki, T., Shimano, H.
(2013) *Nat Commun.* 4, 2316-2323

〔学会発表〕(計 3 件)

第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会
(2013 年 5 月 16 日~5 月 18 日) ホテル日
航熊本

脂肪細胞のインスリン抵抗性における
p21 WAF1/CIP1 の関与の分子機構

日本動脈硬化学会総会・学術集会
(2013 年 7 月 18 日、19 日) 京王プラザホ
テル

脂肪細胞のインスリン抵抗性における
p21 WAF1/CIP1 の関与の分子機構

第 34 回日本肥満学会
(2013 年 10 月 11 日~12 日) 東京国際フォー
ラム

脂肪細胞のインスリン抵抗性における
p21WAF1/CIP1 の関与の分子機構の解明

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(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:
出願年月日:
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

久保田みどり (KUBOTA, Midori)
東京大学保健・健康推進本部 助教
研究者番号: 20383804