

受賞者

益崎 裕幸

京都大学大学院医学研究科内科学講座内分泌代謝内科

研究テーマ

脂肪毒性の新規メカニズム解明

ー代謝ストレス応答シグナルとしての脂肪組織セラミド系の病態的意義ー

1. はじめに 緒言 目的 背景 序論

緒言:メタボリックシンドロームの分子基盤として 糖毒性、脂肪毒性、組織特異的・作用特異的なインスリン抵抗性、酸化ストレス、小胞体ストレス、ミトコンドリア機能異常、中枢神経系・交感神経系の代謝調節異常、血管内皮細胞の機能異常など多彩なメカニズムの複合的関与が明らかになってきており、個々のメカニズムに焦点を当てた創案の試みが加速している。メタボリックシンドロームの診断基準では内臓脂肪の過剰蓄積を病態の最上流に位置付けており、内臓脂肪蓄積の感受性に関与する分子機構の解明は最も重要な解決課題のひとつと言える。

目的:肥満脂肪組織で作用が亢進している飽和脂肪酸、炎症性サイトカイン、グルココルチコイドはいずれもインスリン標的臓器におけるセラミドシグナルを活性化することが知られており、脂肪毒性の基盤分子としてのセラミド代謝産物の役割が注目されている。本研究では 細胞内グルココルチコイド活性化酵素、11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type1(11 β -HSD1)が担うグルココルチコイド作用の過剰が肥満脂肪組織の機能変化に及ぼす影響を解明する目的で、近年、肥満脂肪組織における病態的意義が注目されている 未分化脂肪細胞における11 β -HSD1の役割を検討した。

背景:私達は2001年という早い段階でA transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndromeというタイトルの論文を発表し(**Science** 294:2166-2170,2001)、メタボリックシンドロームの病態解明の鍵として 脂肪組織機能異常 の重要性を明らかにしてきた。

序論:糖尿病や高血圧症、脂質異常症などが重積する肥満症診療の究極の目標のひとつは それぞれの疾病に対して薬剤を多重に処方することではなく 病態基盤に立脚し、可能であれば一剤で個々の病態を改善しうる **oligopharmacy** を実現することである。私達が研究を行ってきた11 β -HSD1はこの要請に応える標的分子の候補のひとつであり、臨床応用に向けた発展が大いに期待されている。脂肪組織の機能異常から出発した細胞内グルココルチコイド作用過剰の病態的意義に関する研究は脂肪細胞のみならず マクロファージ機能や視床下部機能 にも広がっており、メタボリックコントロール異常を 一元的に説明する鍵分子としての11 β -HSD1の意義が広く認識されるようになった(**Nature Rev.5:295,2006**)。

2. 方法

1)セラミド代謝に関わる分子として C2 ceramide(C2)、sphingomyelinase(SMase)、sphingosine 1-phosphate (S1P)、AMP K活性化剤としてAICARを3T3-L1前駆脂肪細胞及びヒト内臓前駆脂肪細胞(Cambrex社)に添加し、24時間後の11 β -HSD1遺伝子発現及び酵素活性を検討した。

2)ウェスタン ブロットにて C2 ceramide(C2)や AICAR 添加における C/EBP β の発現様式を11 β -HSD1遺伝子発現のパターンと比較解析した。さらにChIPアッセイによって11 β -HSD1遺伝子プロモーター領域に対する C/EBP β 蛋白の結合を検討した。また、C/EBP β に対する RNA 干渉を行

い、セラミドシグナルによって誘導される **11 β -HSD1** 発現に与える影響を検討した。

3. 結果

1) 3T3-L1前駆脂肪細胞における11 β -HSD1 mRNA 発現は膜透過型セラミドアナログである C2 ceramide を作用させることにより約2.5倍に増加した。セラミドの生合成経路には細胞膜からのスフィンゴミエリンの加水分解(急性反応)を介する経路とパルミトイルCoA, セリンからの新規の合成(慢性反応)の経路があるため、SMaseやS1Pを添加することにより、同様に11 β -HSD1発現を検討したところ、それぞれ約1.7倍、3.0倍に増加することが明らかとなった。さらに、培養ヒト前駆脂肪細胞に対して C2 ceramideやAICARを添加し、同様に11 β -HSD1発現を検討したところ、それぞれ約5倍、約3倍に増加することが明らかとなった。SMaseやS1Pの添加でも同様の結果が観察された。次に、前駆脂肪細胞において炎症性サイトカインによって惹起された11 β -HSD1の誘導がセラミドシグナルを介する可能性を検証するためにSMase阻害剤である Desipramineを添加して検討した結果、IL-1 β やTNF α の作用によって数倍に上昇した11 β -HSD1発現レベルは初期値まで抑制されることが明らかとなった。

2) 3T3-L1前駆脂肪細胞に対するC2 ceramideやAICARの添加は3時間後から明らかな C/EBP β 蛋白発現の増加をもたらした。この時間経過は12時間後から遺伝子発現が誘導される**11 β -HSD1**に先行していた。ChIPアッセイの結果、C2 ceramide(C2)とAICARのいずれにおいても C/EBP β 蛋白量の増大に伴う転写活性化を介する**11 β -HSD1**の発現誘導が示唆された。C/EBP β に対する二種類のsiRNAをリボフェクションで導入し、C2 ceramideやAICARを添加したところ、3時間後のC/EBP β 蛋白の発現誘導は完全に遮断されていた。このときの**11 β -HSD1**遺伝子発現レベルは いずれにおいても初期値まで抑制されていた。

4. 考察

マウス、ヒトの前駆脂肪細胞においてセラミドシグナルが11 β -HSD1 遺伝子発現を誘導することが明らかとなり、炎症性サイトカインによる発現誘導においてセラミドシグナルが中心的な役割を担っている可能性が示唆された。肥満の脂肪組織においてセラミドシグナルが亢進していることを踏まえ、セラミドシグナルによる 11 β -HSD1活性化が肥満脂肪組織における11 β -HSD1活性化、グルココルチコイド作用の過剰の一因となっている可能性が示唆された。また、前駆脂肪細胞においてセラミド及びAMPKシグナルがC/EBP β を介して11 β -HSD1発現を誘導することを新規に見出した。炎症や相対的な異(低)栄養、低酸素、酸化ストレスなどの代謝ストレスが脂肪細胞の11 β -HSD1発現を亢進させ、脂肪組織機能異常に関与するメカニズムの一端が明らかになった。

肥満脂肪組織において増加している脂肪酸や炎症性サイトカイン、グルココルチコイド作用はセラミドシグナルを活性化し、一方で、肥満脂肪組織で惹起されている相対的な異(低)栄養、低酸素などの代謝ストレスはAMPKシグナルを活性化させ、これらは未分化な脂肪細胞においてC/EBP β を誘導する。このような局面においてC/EBP β は**11 β -HSD1**遺伝子の転写を促進し、細胞の中で新たに活性化されたグルココルチコイドは SMase を活性化してセラミドシグナルを増強する悪循環を形成していることが本研究で明らかとなった。肥満の脂肪組織ではセラミドシグナルとグルココルチコイドシグナルが互いに作用を増強しあう悪循環を構成し、脂肪組織の機能異常と向炎症形質の獲得に関わる新

しいメカニズムが示唆された。肥満の脂肪組織にはマクロファージが浸潤し、脂肪組織の炎症に深く関与している。私達は 11β -HSD1 が活性化マクロファージからの炎症性サイトカイン、ケモカインの分泌を促進すること、 11β -HSD1 が炎症シグナルの増強に関与することも新規に明らかにしている。肥満の脂肪組織における病態的意義が長い間 不明であった前駆脂肪細胞は 炎症刺激によって脂肪細胞分化能が障害され、マクロファージ的な形質を獲得することが注目されており、内臓脂肪肥満の病態形成に関与することも報告されている。脂肪組織機能異常の病態における細胞内グルコルチコイド活性化の意義がさらに解明され、組織特異性に優れた低分子阻害剤が新しいメタボリックシンドローム治療薬として臨床応用されることが期待される。

5. 発表論文、参考文献

- 1) N. Arai, H. Masuzaki (corresponding author) et al.
Endocrinology 148:5268–5277, 2007
- 2) T. Ishii, H. Masuzaki (corresponding author) et al.
FEBS Lett. 581:349–354, 2007