

褐色脂肪組織の維持及び再生に関わる新規標的分子解析

熊本大学大学院 生命科学研究部 代謝内科学講座

阪口 雅司

【研究の背景】

脂肪組織のインスリン抵抗性のインパクト：申請者らは、脂肪細胞インスリン抵抗性のプライマリー効果を確認する目的で、胎生期の脂肪組織から欠損するのではなく、adult に成熟した状態で欠損を誘導することのできる遺伝子変異マウスの実験系を開発した。成熟脂肪細胞において特異的に遺伝子発現を誘導するアディポネクチン遺伝子プロモーターの制御下に、タモキシフェンの投与により任意の時期に遺伝子発現を制御することにより、インスリン受容体(IR)と IGF1 受容体(IGF1R)の脂肪細胞特異的 inducible ダブルノックアウトマウス (IR/IGF1R-inducible DKO) を作製した。このマウスはタモキシフェンの投与によって 3 日以内に急激な脂肪の分解および脂肪組織における細胞死を起こし、全身の白色脂肪組織および褐色脂肪組織が消失し、メタボリックシンドロームを呈した(図 1)。IGF1R の単独のノックアウトマウスにおいてこれらの重篤な症状はみられなかったことから、成熟した脂肪組織の維持においてはインスリン受容体シグナルが優位に機能することが明らかになった。これらの結果から、成熟した脂肪組織におけるインスリン受容体シグナルが個体の糖、脂質代謝に重要な役割を果たすことが直接的に示された(Sakaguchi M. et al. *Cell Metabolism*. 2017)。

メタボリックシンドローム下における脂肪組織再生の発見：

興味深いことに、IR/IGF1R の欠失により発現した、高血糖、インスリン抵抗性、脂肪肝は 2 週間程度の経過の後に著しく回復した。これらの急激な代謝異常の回復に脂肪組織の再生が関与しているかどうかを明らかにするために、IR/IGF1R-inducible DKO の脂肪組織における td-Tomato/GFP レポーターの導入による細胞系譜解析を行った(図 2)。その結果、白色脂肪組織のみならず褐色脂肪組織の再生も観察され、褐色脂肪組織の再生により、マウスはほぼ正常な熱産生および耐寒能をもつ状態にまで改善された。このことにより、成体になってからでも褐色脂肪前駆細胞の増殖や褐色脂肪細胞分化を誘導することが可能であり、褐色脂肪組織の再生が誘導されることを明らかにした。

【目的】

本研究では脂肪組織のインスリン抵抗性を脂肪細胞におけるインスリニングナルの減弱した状態と捉え、脂肪組織におけるインスリン抵抗性が全身の糖、脂質代謝にどのように関与するのかを明らかにすることを目的としている。特に褐色脂肪細胞の活性化の観点から、脂肪組織の再生に関して、褐色脂肪細胞前駆細胞の増殖や分化を誘導する因子の解析を行う。本研究計画では IR/IGF1R-inducible DKO の褐色脂肪細胞再生期における前駆細胞の増殖、分化に関わるシグナル、因子等の解明に焦点を当てて解析を行い、褐色脂肪細胞の分化誘導の分子機序を明らかにする。その成果は、インスリン抵抗性を病態の基盤とするインスリン抵抗性および 2 型糖尿病に対する新たな治療法の開発に繋がると期待される。

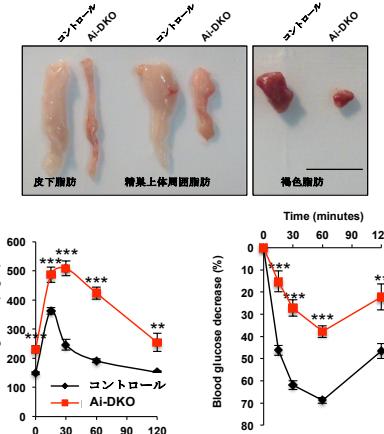


図 1：タモキシン誘導性の脂肪組織特異的 IR/IGF1R ダブルノックアウトマウスにおけるメタボリックシンドローム発症
上段) タモキシフェン投与後 3 日目の白色および褐色脂肪組織。
下段) 糖負荷試験、インスリン負荷試験

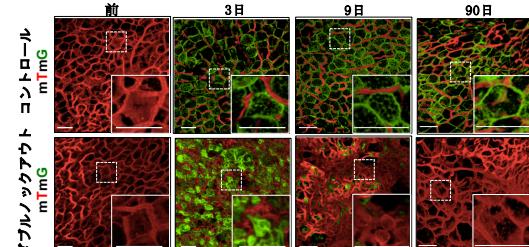


図 2：褐色脂肪における細胞分化再生の追跡
Lineage tracingのシステムによりタモキシフェン処理により脂肪細胞が緑色にマーキングされる。その後新しい再生が起こると赤色の細胞が出現する。コントロールマウスでは緑色にマーキング後に新たな再生は見られず、緑色のままであるが、ダブルノックアウトマウスでは緑色から赤色に変化し、脂肪細胞の再生が起こっている。

【方法および結果】

IR 及び IGF1R の β サブユニット特異的結合分子の検索：脂肪前駆細胞特有の分化、増殖の分子機構を解明するためには、カギとなる機能分子を同定することが重要である。レセプターシグナル解析では IR が概ね細胞分化、機能に関わる遺伝子発現を担い、一方、IGF1R は細胞増殖に関する遺伝子発現を促すとされる。

申請者は褐色脂肪前駆細胞の内因性 IR と IGF1R の両者をノックアウトした細胞株を作製し、野生型の IR、IGF1R もしくは細胞内ドメインをお互いにスイッチして構成したキメラの 4 種類の受容体を、それぞれ再導入させた細胞株を樹立した。さらにこれらの受容体の C 末端に 6XHis を付加させ、受容体に結合するタンパクを探査した。4 種類の脂肪前駆細胞株をそれぞれ 4 株揃え、Insulin または IGF1 で刺激を行い、Talon ビーズを用いて pull-down を行い、その抽出物を用いて褐色脂肪前駆細胞におけるリガンド刺激誘導性の IR/IGF1R 結合タンパクをマススペクトロメトリーに基づくプロテオミクスによって網羅的に検索した（図 3）。

IR 及び IGF1R の β サブユニット特異的結合分子 FoxK1 の同定：

プロテオミクス解析から 1,469 ペプチドを同定し、5 倍以上の変化するタンパク 707 に着目し、このうち 11 個の新規分子が、リガンド刺激に依存して有意に結合することが確認された。これらは「脂肪組織の維持及び再生に関わる分子」の候補として、新規に核内因子 FoxK1 を同定した（図 4）。FoxK1 の挙動は、図 5 のように、FoxO1 がインスリン刺激前は核内に存在するが、インスリン刺激後次第に細胞質に移動するのに対し、FoxK1 は刺激前の細胞質から、次第に核内に移動し、最終的にクロマチン分画に存在するようになる事がわかった。このようにインスリン刺激で IR や IGF1R の β サブユニットとともに核内に移動し、そのままクロマチンに結合して機能する新たなインスリンシグナルの担い手であることが示唆された。

IR 及び IGF1R 依存的 FoxK1/2 のリン酸化経路の検索：

FoxK1/2 のインスリン刺激による変化するリン酸化領域を、ホスホプロテオミクス解析を用いて詳細に解析した。図 7 のように、インスリン刺激依存的にリン酸化が上昇する領域と逆に低下する領域に分かれたが、いずれも GSK3 キナーゼのコンセンサス配列を有している（図 6）。そこで、インヒビターによる局在の解析を行ったところ、FoxK1/2 の細胞質への移動は GSK3 キナーゼによって制御されていることが明らかになった。GSK3 ノックダウン細胞においても確認された。一方、核への移行は m-TOR シグナルによって制御されていた。

IR 及び IGF1R 依存的 FoxK1/2 の遺伝子制御標的の検索：

転写因子として標的となる分子群を FoxK1 及び FoxK2 ノックダウン細胞株を樹立し、RNA-seq 解析及び motif を用いた網羅的データベース解析を行い、制御経路を解析した。その結果、FoxK1/2 のノックダウンは脂肪細胞の apoptosis、細胞分裂、ミトコンドリア機能に関連することが示された（図 7）。さらに、FoxK1/2 の機能の解析を進め、細胞増殖に関連する Cdkn1B の転写制御プロモーターに直接結合することを確認した。その結合はインスリン刺激で 10 倍程度も上昇した。

IR 及び IGF1R 依存的 FoxK1/2 の機能の解析：

FoxK1/2 の遺伝子制御に関して、脂肪細胞に果たして実際にどの程度機能しているかを解析した。遺伝子ノックダウンによって脂肪細胞のミトコンドリアの形態異常をきたした（図 8）。さらに細胞増殖、DNA 合成が著しく低

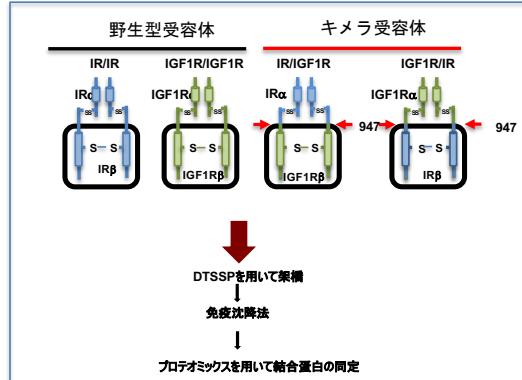


図3:褐色脂肪前駆細胞におけるIR及びIGF1R結合分子の探索

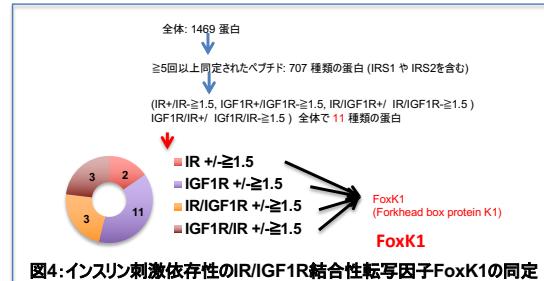


図4:インスリン刺激依存性のIR/IGF1R結合性転写因子FoxK1の同定

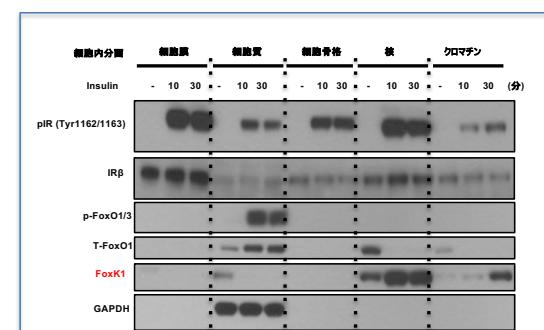


図5:FoxO1とFoxK1の交代による遺伝子制御

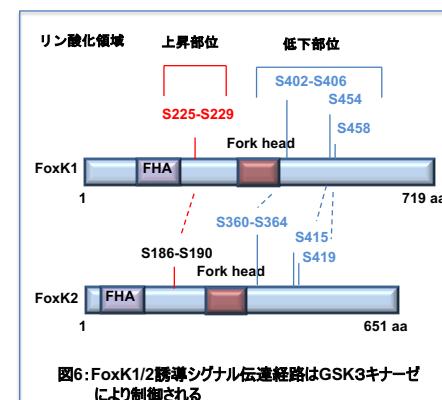


図6:FoxK1/2誘導シグナル伝達経路はGSK3キナーゼにより制御される

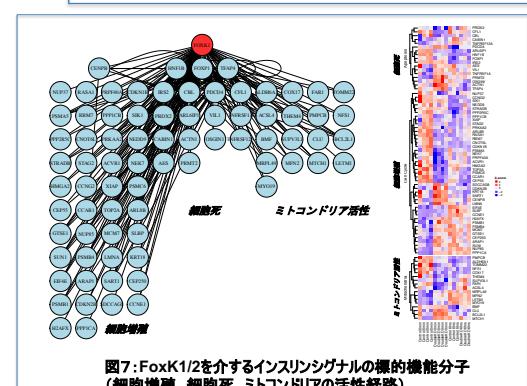


図7:FoxK1/2を介するインスリンシグナルの標的機能分子（細胞増殖、細胞死、ミトコンドリアの活性経路）

下し（図9）、Seahorse解析における細胞のミトコンドリア代謝測定によって、著しく機能が低下していることを確認した（図10、11）。これらによって、FoxK1/2は褐色脂肪前駆細胞の増殖、細胞死やミトコンドリア活性のpositive制御を担うことを明らかとした。

【考察】

本研究の第一段階の成果として、脂肪細胞におけるインスリンシグナルの標的転写因子として FoxK1/2 を明らかにした。インスリンシグナルは従来、IR のチロシンキナーゼ活性を誘導し、その下流に IRS、PI3K 活性から ERK/AKT の経路を介して mTOR 制御、及び FoxO1 の不活性化が主要な経路と考えられていた（図12）。今回の研究で脂肪細胞における新規ミトコンドリア機能制御経路を見出した。この経路は従来の FoxO1 とは全く逆の機能をする新たな経路として注目される。FoxO1 は通常は核内に存在する転写因子として様々な遺伝子に対する negative regulator として機能しているが、一方、今回見出した FoxK1/2 は同じファミリーの転写因子であるものの、全く反対の作用をする positive regulator としてエネルギー消費の観点から、ミトコンドリアの機能亢進の作用として β酸化亢進、細胞死抑制、細胞分裂促進に機能することを明らかにした（Sakaguchi M. et al. Nature Commun. 2019.）。この知見は、これまで盲点となっていた、脂肪細胞のインスリン抵抗性の新たな側面を明示したものであり、今後、さらに脂肪細胞の分化、再生、機能の分子機能を明らかにすることにつながるものと考えている。

【今後の課題】

今回、明らかにしたように、インスリンシグナルに関して、我々はまだ分子経路の全容を明らかにしているとは言えない。FoxK1/2においても、脂肪細胞以外の細胞、組織、特に肝臓や筋肉においてその役割はどのようなものかを明らかにする必要がある。そして、インスリン刺激が細胞の働きを negative と positive に制御しているスイッチとして存在することが明確にされたことから、全身組織の生理恒常性を保つための調節機構をより詳細に明らかにする必要がある。このような観点に基づき、申請者らは本研究の展開をさらに進めている。我々の IR/IGF1R-inducible DKOマウスがメタボリックシンドローム状態に陥った状態下での末梢循環中の生理活性分子、及び脂肪細胞内での遺伝子発現の変化の解析を進めている。そのうち、一つの分子が褐色脂肪細胞の分化に伴って遺伝子発現が上昇することを突き止めることができている。この遺伝子の欠損を成熟マウスで誘導したところ、IR/IGF1R-inducible DKOの脂肪組織における変化とほぼ同等のLipodystrophyを呈することが明らかになった（論文作成準備中）。この分子はインスリンシグナルの調節因子の一つではないかと考えられることから、その詳細な分子機構を明らかにすることで、新たなインスリン抵抗性の局面を明らかにできるものと考えている。

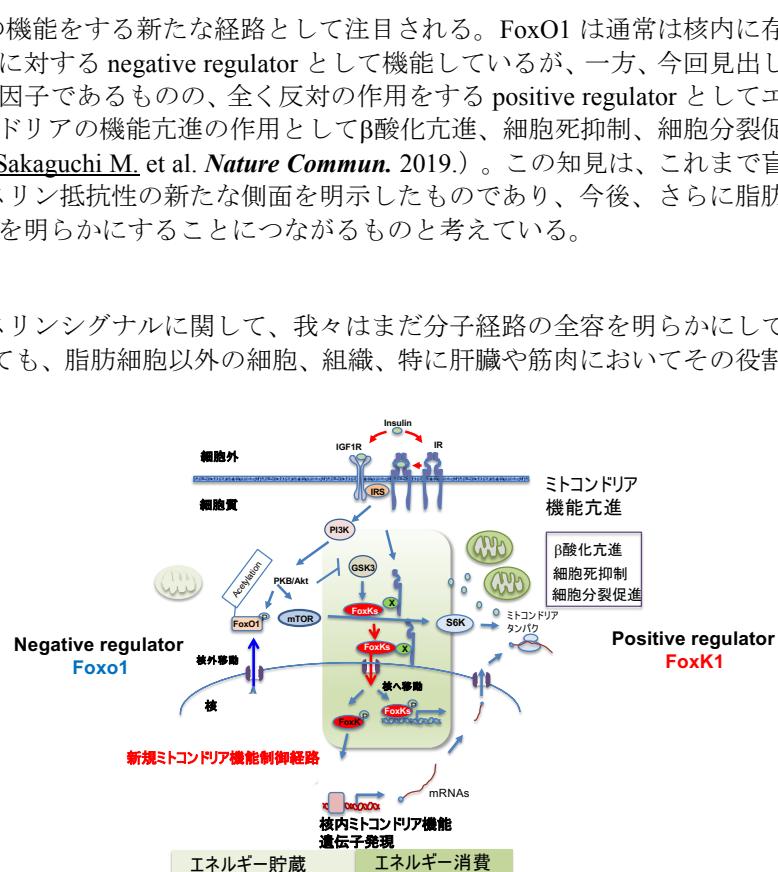
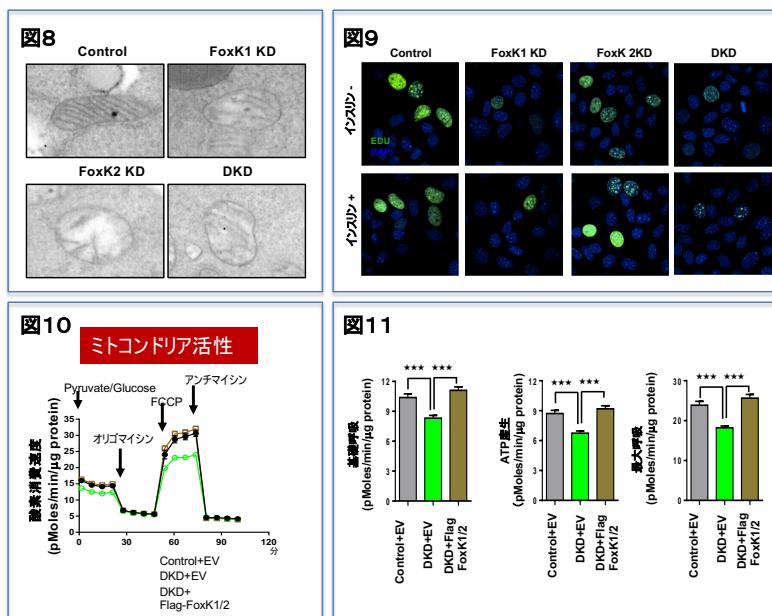


図12:インスリンシグナル依存性新規ミトコンドリア機能制御経路
(褐色脂肪細胞)