

学 位 論 文 の 要 旨

論文題目 肥満・2型糖尿病に関連した分子群の生理学的意義の解明

広島大学大学院生物圏科学研究科

生物機能開発学専攻

学生番号 D186378

氏 名 岡崎 優利

【研究背景、および目的】

2型糖尿病は、インスリン感受性の低下により慢性的な高血糖状態が生じた病態であり、冠動脈疾患や腎障害など様々な合併症を引き起こす原因として患者の QOL を著しく損なう。骨格筋はエネルギー代謝が活発な組織であり、血中のグルコースの 75%以上が骨格筋に取り込まれることから、骨格筋におけるエネルギー代謝は 2型糖尿病の発症に大きく関連する。また肥満症がインスリン感受性の低下に関与することから、2型糖尿病の発症予防においては白色脂肪組織の肥大化の抑制が重要である。以前の研究により、2型糖尿病の発症に密接に関連する骨格筋のエネルギー代謝、および白色脂肪組織の肥大化において、AT-rich interactive domain 5B (ARID5B)、および glycerophosphodiester phosphodiesterase 5 (GDE5) の関与が示唆されており、これら分子の生理的役割の解明は、2型糖尿病の病態の理解や治療法の開発へ貢献できるものと考えられる。

ARID ファミリーに属する ARID5B は転写因子としてその生理機能が研究されており、ヒストンタンパク質の脱メチル化を介して、細胞分化や癌細胞における糖新生に関与する遺伝子群の発現を調節することが報告されている。全身性の *Arid5b* ノックアウト(KO)マウスにおいては、白色脂肪組織重量の低下や肥満発症への抵抗性が認められ、また高脂肪食下において *Arid5b* KO マウスの耐糖能は上昇し、*Arid5b* KO マウスの単離骨格筋へのグルコースの取り込み量が増加していたことから、骨格筋のエネルギー代謝における ARID5B の関与が示唆されている。しかし、*Arid5b* 遺伝子を欠損した初代筋幹細胞においては、プロスタグランジン I₂ の分泌量の低下により筋分化が抑制された研究報告がある一方で、骨格筋でのミトコンドリアの好氣的エネルギー産生への ARID5B の関与など未だ不明であり、*Arid5b* KO マウスの骨格筋におけるエネルギー代謝に関する表現型の解析が不可欠である。

また、白色脂肪組織の肥大化は白色脂肪細胞の増殖、および細胞内への中性脂肪の蓄積による脂肪滴 (LD) の増大によって引き起こされる。GDE ファミリーの一つである GDE5 は、哺乳動物細胞においてグリセロホスホコリン (GPC) の分解活性を有し、細胞内でコリンを生成することで細胞内コリン濃度の調節への関与が示唆されている。一方、GPC は細胞内の浸透圧調節物質であることが広く知られているが、細胞内のコリン代謝、および浸透圧調節における GDE5 の生理的意義は未だに不明である。細胞内コリンは細胞膜や LD のリン脂質膜の主成分であるホスファチジルコリン (PC) の生合成に必要なことから、GDE5 は細胞内のコリン供給を介して PC の生合成を調節し、白色脂肪組織の肥大化において重要な白色脂肪細胞の増殖、および白色脂肪細胞内の LD の形成を制御するとの仮説を立てた。

本研究では、*Arid5b* KO マウスを用いて骨格筋の代謝に関する表現型を解析することによって骨格筋のエネルギー代謝における ARID5B の生理的役割を解明することを目的とし、さらに白色脂肪細胞の *in vitro* でのモデル細胞を利用し、白色脂肪細胞内での LD の形成、および細胞分化における

GDE5 の役割を解明することを目指した。

【実験方法、および結果】

Arid5b KO マウス由来骨格筋のエネルギー代謝に関する表現型は、生理学的手法、および分子生物学的手法を用いて解析を行った。その結果、*Arid5b* KO マウスにおいて酸素消費量が野生型と比較して有意に上昇していた。ミトコンドリア内の好氣的なエネルギー産生の活性を解析したところ、*Arid5b* KO マウス由来骨格筋でのグルコースによる好氣的なエネルギー産生の活性は野生型と比較して有意に上昇していたものの、ミトコンドリア量、およびミトコンドリアの形態に関しては野生型との差異は認められなかった。また、耐糖能試験により *Arid5b* KO マウスにおいて血中のグルコースクリアランスが上昇しており、さらに興味深いことに、*Arid5b* KO マウス由来骨格筋においてはインスリン刺激下でのグルコースの取り込み量は野生型と有意な差は認められなかったが、インスリン非依存的なグルコースの取り込み量が増加していた。以上の結果から、*Arid5b* KO マウス由来骨格筋においてインスリン非依存的なグルコースの取り込み量が最大にまで増加している可能性が示唆された。そこでインスリン非存在下においてもインスリンシグナル経路の恒常的な活性化が引き起こされた可能性を考え、AKT タンパク質のリン酸化量を指標として評価したところ、*Arid5b* KO マウス由来骨格筋における AKT のリン酸化量に野生型との差は認められなかった。また AMPK はインスリン非依存的にグルコースの取り込みを活性化するが、AMPK のリン酸化量に野生型との差は認められず、*Arid5b* KO マウスの運動量にも野生型との差は認められなかったことから、*Arid5b* KO マウス由来骨格筋へのグルコースの取り込みはインスリンシグナルや運動シグナル以外のメカニズムによって促進されている可能性が示唆された。そこで骨格筋でのグルコースの取り込み量に大きく関与する glucose transporter 4 (GLUT4)小胞の形質膜への輸送に関与するタンパク質の発現量を解析したところ、*Arid5b* KO マウス由来骨格筋においては、GLUT4 小胞の形質膜への輸送を阻害する TBC domain family member 1 (TBC1D1)タンパク質の発現量が野生型と比較して有意に減少していた。さらに *Arid5b* KO マウス由来骨格筋において、形質膜上での GLUT4 タンパク質の局在量は野生型と比較して有意に増加していた。従って、*Arid5b* KO マウス由来骨格筋へのグルコースの取り込み量の増加と TBC1D1 タンパク質の発現量の減少との関連性が強く示唆された。

次に、マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 細胞を用いた白色脂肪細胞の分化誘導モデルを利用し、白色脂肪細胞の増殖、および細胞内への LD の形成における GDE5 の役割について解析を行なった。3T3-L1 細胞の脂肪細胞への成熟過程において、GDE5 の発現誘導、および細胞内 GPC 量の減少を確認した。GDE5 の発現抑制は siRNA の形質導入により行なった。GDE5 の発現抑制により細胞内への顕著な GPC の蓄積が確認され、白色脂肪細胞の分化マーカーの発現量の減少とともに、3T3-L1 脂肪細胞内への LD の形成が抑制された。白色脂肪細胞の分化初期には、一過性の細胞増殖が引き起こされる mitotic clonal expansion (MCE)の現象があるが、GDE5 の発現抑制の影響を細胞増殖のマーカーである BrdU の取り込み試験により解析したところ、GDE5 の発現抑制により MCE が阻害されていた。GDE5 の発現抑制によって PC の生合成が抑制され、MCE が阻害されたことが示唆されたが、GDE5 を発現抑制した細胞において PC 量にはコントロール細胞との間に差が認められなかった。そこで、GDE5 の発現抑制による MCE の阻害メカニズムを探索することを目的とし、DNA マイクロアレイ法により網羅的に遺伝子の発現変動を解析したところ、コントロール細胞と比較して細胞の形態維持や浸透圧調節に関わる遺伝子群の発現変動が認められた。特に、複数の proteoglycan 類の発現量が増加した一方で、glycine トランスポーターの発現量は減少しており、さらに GDE5 の発現抑制により細胞内の glycine 量が減少していたことから、GDE5 の発現抑制によって生じた低浸透圧ストレスが細胞外マトリックスを再構成し、細胞増殖に影響を与えた可能性が考えられた。

【考察および結論】

本研究では、*Arid5b* KO マウス由来骨格筋のエネルギー代謝に関する解析によって、*Arid5b* KO マウス由来骨格筋においては、GLUT4 小胞の形質膜への輸送を阻害する TBC1D1 タンパク質の発現量が減少したことで、インスリン非依存的な細胞内へのグルコースの取り込みが促進される新たな知見を見出した。*Arid5b* KO マウスにおいては、骨格筋以外の他組織におけるグルコースクリアラ

ンスの増加や他組織との相互作用を介して骨格筋へのグルコースの取り込みが促進した可能性も否定できない。今後は、*Arid5b* KO マウス由来初代筋幹細胞を用いて、ARID5B による *Tbc1d1* 遺伝子の転写調節、およびグルコースの取り込みについて解析することで、骨格筋におけるグルコースの取り込みに関する新たな調節機構が提案できるものと期待される。

また白色脂肪細胞の分化誘導モデルを利用し、GDE5 の発現抑制による細胞内への GPC の蓄積が浸透圧ストレスを誘導することによって MCE を阻害し、白色脂肪細胞の分化を抑制することを示した。また、細胞の浸透圧バランスの変化により細胞外マトリックスの再構成に関与する遺伝子の発現が変動することを初めて明らかにした。GDE5 の発現抑制により細胞内への GPC の蓄積を誘導する細胞実験系は、低浸透圧ストレスを模倣した細胞応答の解析に有用なモデルであると考えられた。

以上の本研究による成果は、2 型糖尿病の発症の予防や治療を目的とした医薬品や機能性食品の開発への貢献を通じて、人々の健康維持に役立つ情報を提供できるものと考えられる。

【参考文献】

1. Yuri Okazaki, Jennifer Murray, Ali Ehsani, Jessica Clark, Robert H. Whitson, Lisa Hirose, Noriyuki Yanaka and Keiichi Itakura. Increased glucose metabolism in *Arid5b*^{-/-} skeletal muscle is associated with the down-regulation of TBC1 domain family member 1 (TBC1D1). *Biological Research*. 53, Article number: 45 (2020).
2. Yuri Okazaki, Keishi Nakamura, Shuto Takeda, Ikumi Yoshizawa, Fumiyo Yoshida, Noriyasu Ohshima, Takashi Izumi, Janet D Klein, Thanutchaporn Kumrungsee, Jeff M Sands, Noriyuki Yanaka. GDE5 inhibition accumulates intracellular glycerophosphocholine and suppresses adipogenesis at a mitotic clonal expansion stage. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 316(2):C162-C174. 2019.