

トピックス

遺伝子欠損マウス胎児由来繊維芽細胞を用いた脂肪細胞分化における転写因子の研究

東京大学医学部糖尿病・代謝内科

三木 啓司, 山内 敏正, 窪田 直人, 門脇 孝

はじめに

脂肪細胞の分化メカニズムの解明は、脂肪細胞の異常が原因となり得る疾患、例えば肥満症・糖尿病・高脂血症などの発症および病態の分子機構の解明につながる重要なテーマである。脂肪細胞分化にかかわる転写因子およびそのカスケードに関する研究は、脂肪細胞特異的な遺伝子の発現を考えるうえで特に重要であり、NIH-3T3細胞への遺伝子導入実験や前駆脂肪細胞株3T3-L1を用いた実験などで進められてきた。これら実験に加え、遺伝子ノックアウト技術による遺伝子欠損マウス胎児由来繊維芽細胞を用いた脂肪細胞への分化誘導実験は、転写因子のカスケードおよびその役割の解明に多くの情報を与えてくれた。本稿では、この欠損マウス胎児由来繊維芽細胞を用いた*in vitro*の脂肪細胞分化誘導実験の報告を取り上げ、脂肪細胞分化過程における転写因子のカスケードとその役割、また、それらのカスケードを制御するシグナル伝達分子としてのinsulin receptor substrate-1(IRS-1)およびIRS-2について最近の知見を報告する。

1. 脂肪細胞分化に関連する転写因子

(1) C/EBP β , C/EBP

α およびC/EBP β は、そのカスケードとしてC/EBP β , PPAR α の上流に位置し、C/EBP β やPPAR α の遺伝子発現を調節していると考えられている^{1,2)}。TanakaらによりC/EBP β 欠損マウス、C/EBP α 欠損マウスさらにC/EBP β , C/EBP α ダブル欠損マウスが作製され、その胎児由来繊維芽細胞を用いた*in vitro*の分化誘導実験が行われた³⁾。その結果、それぞれ単独欠損細胞では脂肪細胞分化は軽度障害されており、C/EBP β , C/EBP α ダブル欠損細胞はPPAR α , C/EBP β の発現は認められず全く成熟脂肪細胞へ分化しなかった。これは、カスケードとしてC/EBP β , C/EBP α がC/EBP β やPPAR α の上流にあることを証明している。

(2) C/EBP

α は、PPAR α とともに脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである。WangらによりC/EBP α 欠損マウスが作製された結果、白色脂肪細胞、褐色脂肪細胞とも脂肪滴の沈着がほとんどなかった⁴⁾。その後、C/EBP α 欠損マウスから調製した胎児繊維芽細胞の分化誘導実験がWuらにより行われた⁵⁾。その結果、PPAR α の発現は認められず、脂肪細胞へは全く分化しなかった。この細胞にPPAR α を強制発現させた場合は、脂肪滴が認められた。また、この実験から、GLUT 4は

PPAR α 強制発現下ではC/EBP β (-/-)でも発現は減少しないこと、Insulin receptor(IR), insulin receptor substrate-1(IRS-1)は、C/EBP β (-/-)で70%減少すること、IRは主にC/EBP β がその発現を制御していると考えられるが、C/EBP β , C/EBP α でもIRのpromotorに対する転写活性を有していること、C/EBP β (-/-)細胞ではIRとIRS-1のチロシンリン酸化が減少しており、なんらかのgene expressionを介してのIRに対するprotein tyrosine phosphatase(PTP)activityの上昇が原因であることが示唆されること、などの知見が得られている。PTP-1B欠損マウスは野生型に比しインスリン感受性が上昇しており⁶⁾、C/EBP β , PPAR α のループから起こるイベントのなかでPTPの活性を抑制する何かがあるのかもしれない。

(3) PPAR

α これまで、NIH-3T3細胞にPPAR α 遺伝子を細胞に導入した実験系によって、PPAR α は脂肪細胞分化を促進することは報告されていた^{7,8)}。しかし、PPAR α 遺伝子を欠損した細胞は存在しなかったため、PPAR α が脂肪細胞分化に必須であるのかどうかは不明のままであった。われわれは、PPAR α は脂肪細胞分化において必須であるのかどうかを確認するために、われわれの作製したPPAR α 欠損マウス胎児由来繊維芽細胞を用いて脂肪細胞の分化誘導実験を行った⁹⁾。その結果、PPAR α ホモ欠損型細胞は全く脂肪細胞に分化せず、PPAR α が脂肪細胞分化に必須であることを証明した。このPPAR α ホモ欠損型細胞にチアゾリジン誘導体を作用させても脂肪細胞への分化は全く認められず、チアゾリジン誘導体の脂肪細胞分化誘導作用は

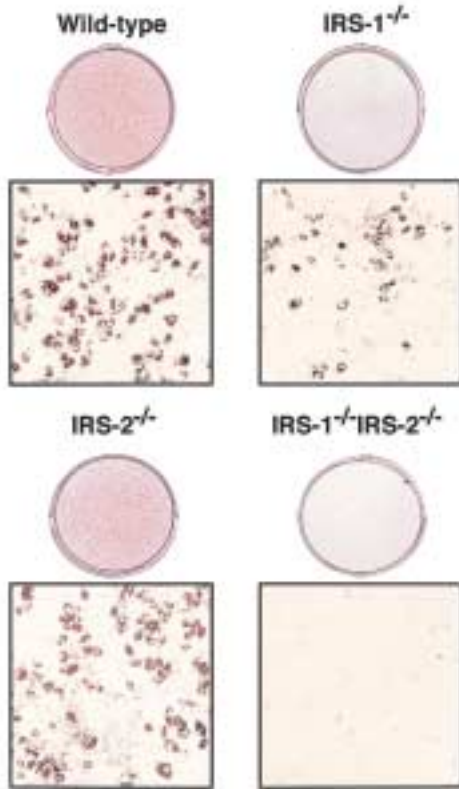


図1 Oil-Red O染色
4種(野生型, IRS-1欠損型, IRS-2欠損型, IRS-1/IRS-2ダブル欠損型)のマウス胎児由来繊維芽細胞を脂肪細胞へと分化させ, その分化の程度をOil-Red O染色にて評価した.
(Miki Hほか, Moll Cell Biol, 2001, 21 : 2521-2532.)

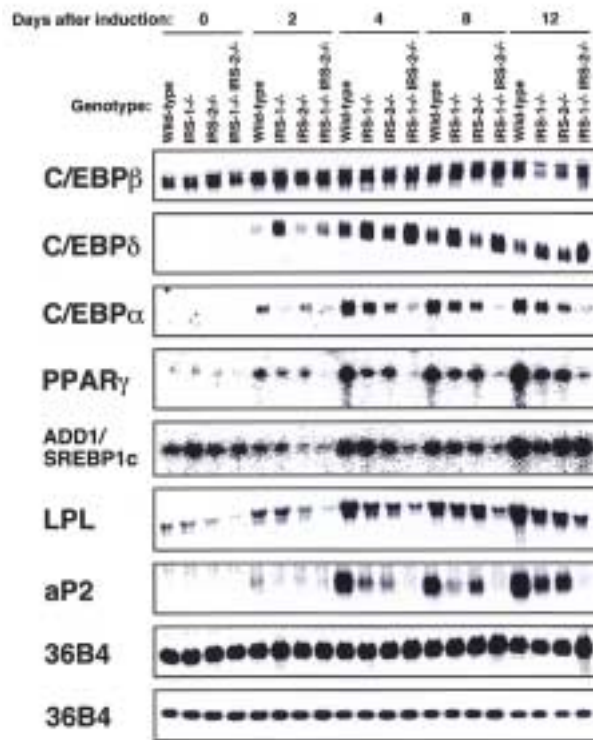


図2 脂肪細胞分化にかかわる転写因子および脂肪細胞特異的発現遺伝子のmRNAの脂肪細胞分化過程での経時的な発現
(Miki Hほか, Moll Cell Biol, 2001, 21 : 2521-2532.)

PPAR を介していることが示された。また興味深いことにPPARヘテロ欠損型細胞の脂肪細胞分化の程度は野生型細胞の約50%で, 脂肪細胞分化の程度はPPARの発現量に依存することを明らかにした。またレトロウイルスを用いてPPAR遺伝子をPPARホモ欠損型細胞に導入したところ, 脂肪細胞分化能が回復した。mRNA発現を調べたところ, PPARホモ欠損細胞でもC/EBPの発現が低下していたが認められたことから, C/EBPの発現にはPPARは必須ではないが, その発現の一部はPPARが調節していることが明らかとなった。C/EBP欠損細胞にPPARを強制発現させると脂肪滴が認められたというWuらの実験結果, およびPPAR

ホモ欠損細胞はC/EBPの発現が低下していたが認められたというわれわれの実験結果を考え合わせると, 転写因子のカスケードとしてC/EBPはPPARより上流側に位置していると考えられることができる。ES細胞を用いた実験においても, PPAR(-/-)ES細胞は脂肪細胞に分化せず, PPAR(+/-)ES細胞は野生型に比較し, 分化の程度が低いという結果が得られている¹⁰⁾。

2. 脂肪細胞分化を制御するホルモン・シグナル

脂肪細胞分化を制御する分子として転写因子について考えてきたが, これら転写因子以外にも, ホルモン・サイトカインおよびその下流のシグナルも

脂肪細胞分化の制御に複雑にかかわっている。例えば, 脂肪細胞の促進因子としてIGF-1, インスリン, 成長ホルモン, cAMP, Akt¹¹⁾, PI-3キナーゼ(PI-3K)¹²⁾, p38 MAPkinase¹³⁾などが報告^{14,15)}されており, 抑制因子として, IL-1, TNF, Pref-1, p42/p44MAPkinase¹⁶⁾などが報告されている。このように脂肪細胞分化の過程ではさまざまなシグナルが正または負に脂肪細胞分化のプログラムを制御しているが, その分子メカニズムの詳細な解析は未だ十分ではない。

私たちはこれら脂肪細胞分化を制御するホルモン・シグナルを考えていく第一歩としてinsulin receptor, IGF-1 receptorなどの下流に位置するシグナル伝達分子であるIRS-1およびIRS-2の

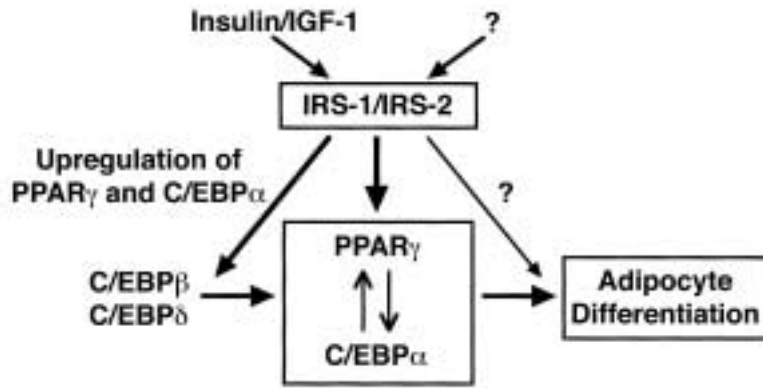


図3 脂肪細胞分化におけるIRS-1/IRS-2の役割

(Miki H ほか, Moll Cell Biol, 2001, 21 : 2521-2532.)

脂肪細胞分化過程における役割を検討した¹⁷⁾.

IRS-1欠損マウス¹⁸⁾とIRS-2欠損マウス¹⁹⁾より4種(野生型, IRS-1欠損型, IRS-2欠損型, IRS-1/IRS-2ダブル欠損型)の胎生13.5日齢の胎児由来繊維芽細胞を調製し脂肪細胞へ分化させることで, 脂肪細胞分化過程におけるIRS-1およびIRS-2の役割を検討した. 4種の細胞を脂肪細胞に分化させ, Oil-Red O染色と細胞内中性脂肪含量で分化の程度を評価したところ, IRS-1欠損細胞およびIRS-2欠損細胞は野生型に比してそれぞれ約60%, 約15%, 脂肪細胞分化が抑えられていた. また, IRS-1/IRS-2ダブル欠損細胞は脂肪細胞に全く分化しなかった(図1). 次に, 脂肪細胞分化過程のPI-3K活性の上昇を測定したところ, IRS-1欠損細胞は野生型に比し約50%低下していたのに対し, IRS-1/IRS-2ダブル欠損細胞では著明に低下していた. PI-3K阻害剤LY294002の添加で野生型細胞の脂肪細胞分化が抑制された結果を含めて, 脂肪細胞分化過程に上昇するPI-3K活性は脂肪細胞分化に必要であるという報告¹²⁾と一致した. 脂肪細胞分化過程のp42/p44MAPkinaseのリン酸化を測定したところ, 4種の細胞間で差は認められなかった. その次に,

脂肪細胞分化にかかわる転写因子のmRNAの発現をみたところ(図2), C/EBPは4種間で変わらず, C/EBPはIRS-1欠損, IRS-1/IRS-2ダブル欠損細胞で上昇していた. 一方, C/EBP, PPARの発現はIRS-1/IRS-2ダブル欠損細胞で著明に低下しており, 蛋白レベルでも低下していることを確認した. IRS-1/IRS-2ダブル欠損細胞へのレトロウイルスを用いたPPAR遺伝子の導入で脂肪滴は認められたが, その分化の程度は完全には回復しなかった. これらの結果より, IRS-1とIRS-2は, C/EBP, PPARの発現をmRNAレベルでコントロールすることで, 脂肪細胞分化に重要な役割を果たしていることが明らかとなった(図3). 脂肪細胞分化におけるIRS-1の同様の役割については, Joslin Diabetes CenterのKahnらのグループによっても最近, 報告されている²⁰⁾.

おわりに

遺伝子欠損マウス胎児由来繊維芽細胞を用いた*in vitro*の脂肪細胞分化誘導実験は, このように転写因子の役割とホルモンおよびそのシグナルの解明に多くの情報を与えてくれた. しかし, *in vitro*で得られた情報が*in vivo*で必ずしもあてはまらないという問題が残さ

れた. 例えば, TanakaらのC/EBP, C/EBPダブルノックアウトマウスは*in vivo*でBATの分化が抑制されているが, C/EBP, PPARのmRNAは認められた³⁾. また, IRS-1/IRS-2ダブルノックアウトマウスの*in vivo*でのWATの量は著明に低下しているが, 存在していた. このように*in vitro*と*in vivo*との間に乖離が認められ, これは*in vivo*においては脂肪細胞分化に関与している因子がさらに多様であることを示唆するものであり, 今後の検討すべき課題である.

文献

- 1) Yeh WC, Cao Z, Classon M, et al.: Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev* 1995, **9**: 168-181.
- 2) Wu Z, Xie Y, Bucher NL, et al.: Conditional ectopic expression of C/EBP in NIH-3T3 cells induces PPAR and stimulates adipogenesis. *Genes Dev* 1995, **9**: 2350-2363.
- 3) Tanaka T, Yoshida N, Kishimoto T, et al.: Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBP and/or C/EBP gene. *EMBO J* 1997, **16**: 7432-7443.
- 4) Wang N, Finegold MJ, Bradley A, et al.: Impaired energy homeostasis in C/EBPalpha knockout mice. *Science* 1995, **269**: 1108-1118.
- 5) Wu Z, Rosen ED, Brun R, et al.: Cross-Regulation of C/EBP and PPAR controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell* 1999, **3**: 151-158.
- 6) Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, et al.: Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science*, 1999, **283**: 1544-1548.
- 7) Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM.: Stimulation of adipogenesis in

- fibroblasts by PPAR γ , a lipid-activated transcription factor. *Cell* 1994, 79, 1147-1156.
- 8) Brun RP, Tontonoz P, Forman BM, et al. : Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev* 1996, 10, 974-984.
- 9) Kubota N, Terauchi Y, Miki H, et al. : PPAR γ mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 1999, 4 : 597-609.
- 10) Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, et al. : PPAR γ is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 1999, 4 : 611-617.
- 11) Kohn AD, Summer SA, Birnbaum MJ et al. : Expression of constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem* 1996, 271, 31372-31378.
- 12) Sakae H, Ogawa W, Matsumoto M. et al. : Posttranscriptional control of adipocyte differentiation through activation of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 1998, 273, 28945-28952.
- 13) Engelman JA, Lisanti MP, Scherer PE. : Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem* 1998, 273 : 32111-32120.
- 14) Mandrup S, Lane MD : Regulating adipogenesis. *J Biol Chem* 1997, 272 : 5367-5370.
- 15) Gregoire FM, Smas CM, Sul HS : Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 1998, 78 : 783-809.
- 16) Hu E, Kim JB, Sarraf P, et al. : Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPAR γ . *Science* 1996, 274 : 2100-2103.
- 17) Miki H, Yamauchi T, Suzuki R, et al. : Essential Role of Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1) and IRS-2 in Adipocyte Differentiation. *Mol Cell Biol* 2001, 21 : 2521-2532.
- 18) Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, et al. : Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 1994, 372 : 182-186.
- 19) Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, et al. : Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes* 2000, 49 : 1880-1889.
- 20) Fasshauer M, Klein J, Kriauciunas KM, et al. : Essential role of insulin receptor substrate 1 in differentiation of brown adipocytes. *Mol Cell Biol* 2001, 21 : 319-329.