

氏名	白井智美
学位(専攻分野の名称)	博士(農芸化学)
学位記番号	乙第919号
学位授与の日付	平成28年12月20日
学位論文題目	インスリン抵抗性がレチノール結合タンパク質(RBP4)およびビタミンA代謝に与える影響の解析
論文審査委員	主査教授・農学博士 山本祐司 教授・博士(農芸化学) 内野昌孝 教授・農学博士 上原万里子 博士(農芸化学) 山内淳*

論文内容の要旨

I. 背景

レチノール結合タンパク質(Retinol Binding Protein 4)は主に肝臓から合成され、ビタミンA(Retinol)と結合してビタミンAを末梢組織へ輸送するのに重要な役割をしているタンパク質である。近年、KahnらがRBP4は肝臓のみならず、脂肪組織でも発現・分泌されることや、肥満に起因したインスリン抵抗性を伴う糖尿病(2型糖尿病)状態では脂肪組織由来のRBP4発現量が増加していることを報告した。しかし、Kahnらは、RBP4の変動がいつ起こるのかについては明確にしておらず、2型糖尿病の主要原因である肥満の関与については不明であった。また、RBP4の変動が末梢組織におけるビタミンA代謝に及ぼす影響については、いまだ報告例がない。加えて、インスリン抵抗性における脂肪組織のRBP4の遺伝子発現調節機構についても不明である。

そこで、本研究ではRBP4の変動メカニズムおよびビタミンA代謝への影響を明らかにする目的で、食餌による単純性肥満モデルと自然発症的にインスリン抵抗性を惹起する2つの異なるモデルラットを用い、解析を行った。さらに脂肪組織におけるRBP4遺伝子発現制御メカニズムをインスリン抵抗性モデル細胞を用いて解析した。

II. 実験および結果

実験1 食餌性肥満と非肥満型糖尿病がRBP4発現量とRetinol代謝に及ぼす影響解析

(1) 食餌性肥満モデルと非肥満型2型糖尿病モデルの作製

今回の実験では、肥満モデルと明確に区別出来るインスリン抵抗性を惹起するモデルとして非肥満型2型糖尿

病モデルの作製を検討した。一般に糖尿病モデルラットとして、OLETFラットやZuckerラットが多く実験に用いられているが、これらのモデルは食欲中枢に作用し、過食によって肥満を呈し、インスリン抵抗性から糖尿病を発症するモデルである。一方、GKラットは、後藤・柿崎らによって作出された2型糖尿病モデルラットであり、肥満を伴わないことを特徴とすることから、非肥満型2型糖尿病モデルとして用いることとした。

具体的な飼育条件としては、以下のように設定した。Wistar系4週齢の雄性ラットに、コントロール食(AIN-93G)を給餌した群をコントロール群(Wistar-Control)、また高脂肪食(40%脂肪)を給餌した群を肥満群(Wistar-HFD)とし、高脂肪食による影響の解析群とした。一方、非肥満型2型糖尿病モデルラットであるGKラットにAIN-93Gを給餌した群を糖尿病群(GK-Control)、GKラットに高脂肪食を給餌した群(GK-HFD)とし、Wistar-Control群に対しての糖尿病発症群を設定するとともに、GKラットに対する高脂肪食の影響を解析した。摂取するビタミンAの量を揃えるためにコントロール群を基準としPair-feedingを行い、それぞれの群のラットを10週間飼育した。解剖3日前に経口糖負荷試験(OGTT)を実施した結果、GK-Control、GK-HFD両群は、Wistar両群に比べて空腹時血糖値が有意に高いこと、また経口負荷2時間後でも高血糖状態が維持されていることが示された。これらは糖尿病の特徴であったことから、両GK群が糖尿病状態であることを判断した。また、Wistar-HFD群は、他の群と比較し、最終体重と脂肪組織重量において有意な増加が認められたが、高血糖状態は認められなかったため、糖尿病を伴わない肥満状態であることを確認した。

* 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 国立健康・栄養研究所 食品栄養・表示研究室長

以上の結果より、Wistar-Control 群をコントロール群、高脂肪食の影響のみによる変化が解析出来る Wistar-HFD 群を肥満群とし、また糖尿病モデルとして GK ラットを用い、さらに高脂肪食を給餌することで高脂肪食の影響を解析できる計 4 群のモデル系を構築できたものと考えた。

(2) 血中 RBP4 の解析

はじめに血中 RBP4 の変動が肥満に起因するのか、インスリン抵抗性に起因するのかを明らかにする目的で、ウエスタンブロッティング法を用いて RBP4 の発現量の解析を行った。その結果、血中 RBP4 は非肥満型 2 型糖尿病モデル (GK 両群) では増加していたが、肥満モデル (Wistar-HFD) では変化しなかった。血中 RBP4 の増加は、これまで肥満やインスリン抵抗性で起こるとされてきたが、今回の実験で肥満ではなくインスリン抵抗性によって惹起されることを初めて明らかにした。

(3) 肝臓・腎臓・脂肪組織中の RBP4 遺伝子の発現解析

血中 RBP4 の増加が、RBP4 合成の器官である肝臓・腎臓・脂肪組織のいずれに由来するのかについて解析を行った。各組織より、RNA を抽出し特異的プライマーにより、qRT-PCR 法にて解析を行った。その結果、RBP4 の発現量は、肝臓ではコントロール群と比較して肥満・糖尿病による影響はなかったのに対し、脂肪組織では、RBP4 の遺伝子発現量はコントロール群と比較して糖尿病群で有意に上昇していた。また、腎臓の RBP4 遺伝子発現量はコントロール群と比較して糖尿病群で有意に低下していた。

以上の結果より、RBP4 の発現量は、脂肪組織において従来の報告通り糖尿病によって上昇することを確認した。それに対して肝臓では、糖尿病でも肥満でも発現量は影響を受けないこと、腎臓では糖尿病によってのみ著しく低下することを新たに見出した。

(4) 血中、肝、腎、および脂肪組織における Retinol, Retinyl palmitate 量の測定

血中 RBP4 レベルが、肥満モデルとインスリン抵抗性モデルで異なることから、血中 retinol の輸送にも影響が出ている可能性があると考えた。そこで、血中 retinol 量および、主要なビタミン A 代謝臓器である肝臓、腎臓、脂肪組織の retinol 量とその貯蔵型である retinyl palmitate 量を測定した。

常法に従い、retinol、および、retinyl palmitate を試料より抽出し HPLC 法により定量解析を行った。その結果、血中 retinol 量は、肥満・糖尿病のどちらもコ

ントロール群と比較して有意に減少していた。従って、retinol と結合しない RBP4 (アポ型 RBP4) が増加していることが示唆された。さらに、肝臓中の retinol 量はコントロール・糖尿病群共に高脂肪食により有意に減少した。また、肝臓中の retinyl palmitate 量については、retinol と同様の挙動を示した。一方、脂肪組織では、コントロール群では高脂肪食の影響を受けなかったものの、糖尿病群では高脂肪食により retinol 量は有意に増加し、retinyl palmitate 量については、retinol と同様の挙動を示した。さらに、腎臓では、高脂肪食による影響は見られなかったものの retinol 量は糖尿病群で有意に上昇しており、retinyl palmitate 量は、糖尿病群に高脂肪食を給餌することで増加していた。

以上の結果から、肥満と糖尿病におけるビタミン A 代謝が各臓器で異なることを明らかにした。

(5) 各臓器中の RALDH, RAR β の遺伝子発現解析

Retinol は retinal を経て retinoic acid へと代謝され核内受容体を介して細胞の分化・増殖などの遺伝子発現を制御することが知られている。そこで、活性本体である retinoic acid について解析した。はじめに retinoic acid へ変換させる酵素 RALDH の遺伝子発現と retinoic acid 量によって遺伝子発現量が制御されている RAR β の遺伝子発現を解析した。

その結果、RALDH は肝臓では変化が見られなかったが、脂肪組織において、糖尿病群で有意な減少がみられた。脂肪組織の retinoic acid 量は糖尿病群によって影響を受けていることが推察された。また、腎臓の RALDH も糖尿病で有意に低下した。RAR β の解析から、脂肪組織では各群で変化が見られなかったものの、腎臓においてはコントロール群と比較して高脂肪食群で有意に増加し、糖尿病群において有意に減少していた。

このことから、腎臓では糖尿病によって RALDH の発現量の低下に伴って retinoic acid の生産量が低下し、ビタミン A の活性本体である retinoic acid の生産量が脂肪組織と腎臓において大きくことなることを初めて明らかにした。

実験 2 転写因子 PSMB1 の核内移行による RBP4 遺伝子発現調節機構の解析

実験 1 の結果から、インスリン抵抗性によって脂肪組織の RBP4 の遺伝子発現が変動することが明らかになった。しかし、インスリン抵抗性時の脂肪組織における RBP4 遺伝子発現の調節機構については転写因子も含めて不明な点が多かった。そこで、井上らはインスリン抵抗性をミミックした脂肪細胞 (GLUT4 knockdown

3T3-L1 adipocytes) を用いて、RBP4 の転写機構を解析した結果、これまでプロテアソーム構成因子として知られていた 20S proteasome subunit beta type 1 (PSMB1) が RBP4 の転写調節因子として機能することを明らかにした。しかし、PSMB1 が RBP4 の遺伝子発現にどのように作用するかについては明確ではなかった。そこで、アミノ酸配列から PSMB1 の機能ドメインの同定を試みた。

(1) PSMB1 のドメイン解析

PSMB1 の機能ドメインを Silico 分析により解析した結果、149 番目のチロシン残基 (Y149) が推定上のリン酸化サイトであることが示された。Y149 と隣接したアミノ酸のシーケンスは、ヒトやマウス、ラットでよく保存されていることから、このモチーフが機能的に重要であることが示唆された。

(2) PSMB1 の Y149 のリン酸化が核移行と RBP4 の転写に及ぼす影響の解析

次に、このリン酸化が PSMB1 の機能性へ及ぼす影響を解析する目的で、Y149 のチロシンをフェニルアラニンに置き換えた変異体 (Y149F) を GFP 発現ベクターに組み込み 3T3-L1 細胞に強制発現させて、細胞内局在性に及ぼす影響を解析した。その結果、Y149 (WT) は細胞全体に存在しているのに対し、Y149F は核内に局在していることを明らかにした。従って、Y149 のリン酸化が核移行に重要であることが示された。次に、PSMB1 の核移行が RBP4 の転写に及ぼす影響につい

て、RBP4 プロモーターアッセイを用いて測定した結果、Y149F では濃度依存的に転写活性が増加した。これらのことから、PSMB1 の Y149 のリン酸化が PSMB1 の細胞内局在と RBP4 の転写活性化の両方に重要であることが明らかとなった。

Ⅲ. 総括

今回、食餌性肥満モデルラット、および非肥満 2 型糖尿病モデルラットを用い、肥満から糖尿病に至る経過の 2 つのモデルを用いて RBP4 およびビタミン A 代謝に及ぼす変動を解析した。

その結果、RBP4 は肥満ではなくインスリン抵抗性の影響を受けて脂肪組織より分泌され、血中 RBP4 が上昇することを明らかにした。また、肝臓ではビタミン A 代謝が肥満により強く制御されるのに対して、脂肪組織および腎臓では、糖尿病により強く影響を受けることを明らかにした。さらに、脂肪組織での RBP4 遺伝子発現がインスリン抵抗性によるリン酸化を介したシグナル伝達の変化に起因することを示した。

本結果によって、ビタミン A の従来の視覚や成長・生殖などの機能のみならず、メタボリックシンドロームの発症メカニズムにも深く関与していることを明らかにすることができた。今後のビタミン A 代謝をターゲットとした新たな病態の予防や、健康改善の方向性を示す結果であると考えられる。

審査報告概要

レチノール結合タンパク質 (RBP4) が、新規のアディポサイトカインとして機能することが先行研究により明らかになった。しかし、RBP4 が肥満や糖尿病のどちらの影響で上昇するのか、RBP4 の変動がレチノールの動態にどのような影響を与えるのか、RBP4 の遺伝子発現はどのような制御を受けているのかについては不明であった。そこで、本研究では肥満から糖尿病に至る経過の 2 つのモデルを用いて RBP4 およびビタミン A 代謝に与える影響を解析した結果、RBP4 およびビタミン A

代謝が肥満・糖尿病で各臓器特異的に影響を受けることを新たに明らかにし、さらに脂肪細胞での RBP4 遺伝子発現がインスリン抵抗性によるリン酸化を介したシグナル伝達の変化による可能性を示した。これは、ビタミン A 代謝をターゲットとした新たな病態の予防や、健康改善の方向性を示すものと考えられる。これらの研究成果等を詳細に検討した結果、審査員一同は博士 (農芸化学) の学位を授与する価値があると判断した。