

3. 脂肪細胞の機能と制御 —アディポサイトカインと転写因子—

下村 伊一郎*

脂肪組織は、生理状況に応じて種々の内分泌因子(アディポサイトカイン)を産生・分泌し、糖・脂質代謝、動脈壁の恒常性維持に重要な役割を果たしている。肥満・脂肪蓄積によるアディポサイトカインの産生異常が、糖尿病、高脂血症、高血圧、動脈硬化症を引き起こす。

アディポネクチンは、ヒト脂肪組織より同定した脂肪組織特異的に産生されるアディポサイトカインである。血中濃度は肥満、糖尿病、虚血性心疾患において低下する。ヒト、サル、マウスを用いた検討により、高カロリー摂取・脂肪蓄積により引き起こされる低アディポネクチン血症が、インスリン抵抗性・動脈硬化を引き起こしていることが示された。今後、アディポネクチンの機能を上昇させることが未来医療として考えられる。その意味で、アディポネクチンの遺伝子転写制御は重要であり、われわれはリガンド依存性に活性が調節される核内受容体型転写因子の制御下にアディポネクチンの産生・分泌が調節される機構を明らかとした。本成果を利用して、今後アディポネクチンの産生・分泌を制御する薬剤の同定・開発が期待される。

ビスファチンは、ヒト内臓脂肪と皮下脂肪に対して differential display 法を行い、ヒト内臓脂肪 (Visceral fat) に多く発現している遺伝子産物として同定したアディポサイトカインである。ヒト・マウスにおいて、内臓脂肪の蓄積に伴い内臓脂肪での発現・産生が亢進し、その血中濃度は内臓脂肪蓄積と強く相関した。今後、その血中濃度は内臓脂肪蓄積マーカーとしての利用が考えられる。生理作用として、前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化誘導作用および成熟脂肪細胞での中性脂肪蓄積作用を有していた。つまりビスファチンは、肥大化した脂肪細胞から産生・分泌され、他の脂肪細胞の分化・肥大化を促進する因子と考えられる。今後、肥満症・内臓脂肪型肥満の各種病態への関与が推察され、治療応用が期待される。かつ将来、分化度・脂肪蓄積度といった脂肪細胞そのものの性質を制御することを考えるうえで重要な因子となる可能性が高く、未来の肥満治療薬開発への期待がかかる。

Adipocytokines and Transcriptional Factors

ICHIRO SHIMOMURA Department of Medicine and Pathophysiology, Graduate School of Frontier Bioscience, Graduate School of Medicine, Osaka University



*しもむら・いいちろう：大阪大学大学院生命機能研究科病態医科学教授。平成5年大阪大学大学院修了。同年市立豊中病院内科。平成11年テキサス大学サウスウエスタンメディカルセンター助教授。平成13年大阪大学医学部分子制御内科学学振特別研究員。平成14年現職。主研究領域/内分泌代謝学。分子細胞生物学。

Key words

アディポネクチン
PPAR γ
LRH-1
ビスファチン

1. アディポネクチン

われわれは、脂肪組織がさまざまな生理活性因子を産生・分泌し、全身の代謝・動脈壁の恒常性維持にかかわることを示し、このような脂肪細胞に由来する生理活性因子をアディポサイトカインとして総称し、概念化した^{1,2)}。アディポネクチンは、ヒト脂肪組織に最も豊富に発現する遺伝子としてわれわれが同定した³⁾。アディポネクチンは脂肪組織特異的に生産、分泌され、血中に豊富に存在する。アディポネクチンは抗糖尿病、抗動脈硬化作用を有するホルモンであり⁴⁻⁸⁾、代謝疾患の発症、進展に深く関与する。肥満・脂肪蓄積により早期に起こる低アディポネクチン血症が、そのインスリン感受性機能の低下によるインスリン抵抗性症候群（糖尿病、高脂血症、高血圧）の発症、および動脈壁への直接的な抗動脈効果の低下により、全身的なメタボリックシンドローム・動脈硬化症の発症につながると考えられる（図1）。その意味で、低アディポネクチン血症を伴う代謝異常症候群の患者の血漿アディポネクチン濃度を上昇させる治療が重要となる。

われわれは、PPAR γ アゴニストであるチアゾリジンジオン誘導体が、ヒトにおいて血中アディポネクチン濃度を顕著に上昇させる作用があることを見いだした⁹⁾。糖尿病患者への1日400mgのトログリタゾン治療（2カ月間）は、血中アディポネクチン濃度を約4倍に上昇させた（図2）。サル・マウスにおいてもPPAR γ アゴニストによる血中アディポネクチン濃度の上昇、脂肪組織アディポネクチン遺伝子発現量の上昇がみられた。さらに、3T3-L1脂肪細胞へのPPAR γ アゴニスト添加によっても、アディポネクチン遺伝子発現の上昇に引き続いて培養上清への分泌増強がみられた。これらの事実より、アディポネクチ

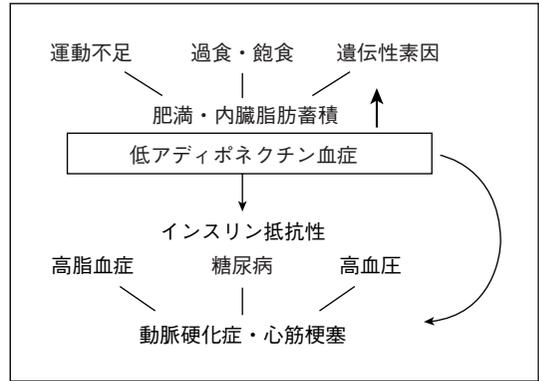


図1 生活習慣病の病態

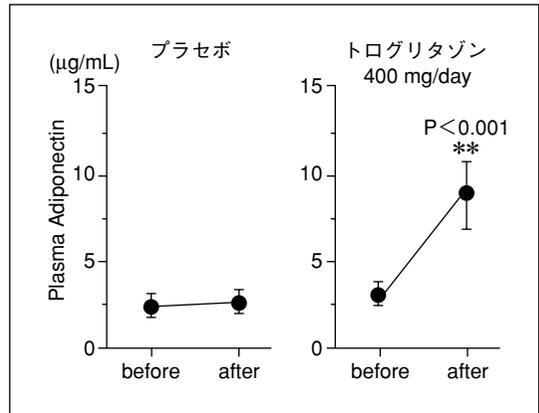


図2 PPAR γ アゴニスト治療による血中アディポネクチン濃度の上昇

ンがPPAR γ の直接のターゲット、つまりアディポネクチン遺伝子プロモーター領域上にPPAR γ response element (PPRE)が存在することが考えられた。しかしながら、われわれそして他の研究者らも、アディポネクチン遺伝子のプロモーター領域内にPPREなどの発現促進にかかわるレギュレーター配列を同定することができず、チアゾリジンジオン誘導体によるアディポネクチン上昇作用は、アディポネクチン遺伝子に対する直接的な作用なのか、それとも脂肪細胞分化促進あるいは他の標的遺伝子の誘導を介した間接的なもの

であるのか、その分子メカニズムは長い間不明であった。

われわれは、ヒトアディポネクチン遺伝子5'上流のプロモーター領域の詳細な解析を行った¹⁰⁾。アディポネクチン遺伝子プロモーター上流域の-908 bpを含むルシフェラーゼコンストラクトを作成し、核内受容体であるPPAR γ /RXRの二量体によって活性化されることを検討した。ヘルペスウイルス蛋白質VP 16の転写活性化領域と核内受容体PPAR γ およびRXR α を結合させたキメラ蛋白質VP 16-PPAR γ とVP 16-RXR α の両発現プラスミドを用いて、リポーターコンストラクトの転写活性を追った。欠失変異、点変異体を用いて、ヒトアディポネクチンプロモーター領域の-286 bpから-267 bpの間に、PPAR γ /RXR二量体が作用するレギュレーター配列PPREが存在することを推定し、-273 bpから-285 bpまでの間に非典型的なDR1 typeのPPREを同定、さらにgel shift assayで本領域へのPPAR γ /RXRの二量体の結合を証明した。

さらに、ヒトアディポネクチンプロモーター領域にPPRE以外のレギュレーター配列が存在しないか、その塩基配列を詳細に解析したところ、LRH-1 (Liver Receptor Homologue-1) と呼ばれる別のオーファン核内受容体が結合するレギュレーター配列LRH-RE (LRH-1 responsive element) と推定される配列が、上述のPPREと転写開始点の間の-237 bpから-229 bpまでに存在した。LRH-1発現プラスミドを用いて、本領域がLRH-1により認識結合され、転写活性化が起こることを示した。

LRH-1は、主に肝臓、副腎に発現していることが知られていたが、われわれはラット副睾丸周囲脂肪組織からコラゲナーゼ消化により得られた成熟脂肪細胞、および分化した3T3-L1脂肪細胞において、PPAR γ とともに

LRH-1の発現を認めた。LRH-1の働きとして、それそのものでは転写活性可能を有さないが、LXR/RXR複合体およびFXR/RXR複合体といった、RXRを含むヘテロダイマー型の転写因子による転写活性化を補助的に増強する作用が知られていた。そこで、アディポネクチンプロモーター活性増強におけるPPAR γ とLRH-1の相互連関を調べるために、PPAR γ /RXR、LRH-1発現ベクター、アディポネクチンプロモーターのルシフェラーゼコンストラクト、およびLRH-REに変異の入ったアディポネクチンプロモーターのルシフェラーゼコンストラクトを用いてリポーターアッセイを行った(図3)。PPAR γ /RXRの発現によりアディポネクチンプロモーター活性は約2倍増強し、PPAR γ アゴニストであるピオグリタゾン添加により約3倍に増強した。LRH-1単独の発現でアディポネクチンプロモーター活性は全く変化しなかったが、LRH-1の発現下ではPPAR γ /RXRの発現はアディポネクチンプロモーター活性を著明に上昇させた。このさらなる増強は、LRH-REに変異の入ったアディポネクチンプロモーターのルシフェラーゼコンストラクトではみられなかった。この結果は、LRH-1がアディポネクチンのプロモーターに対し、PPAR γ /RXRによる転写活性化を補助的に増強することを示している。

LRH-1によるRXRを含むヘテロダイマー型の転写因子による転写活性化増強作用が、いかなるメカニズムで起こるのかについて詳細な検討はなされていない。おそらくRXRを含むヘテロダイマー型の転写因子を含む、複数の転写共役因子とともに形成される転写因子・共役因子複合体にLRH-1が加わることで、複合体としての転写活性可能が上昇すると考えられる。PPAR γ アゴニストにはインスリン感受性増強という薬効以外に、浮腫、脂肪蓄積、肝障害といった複数の副作用の発

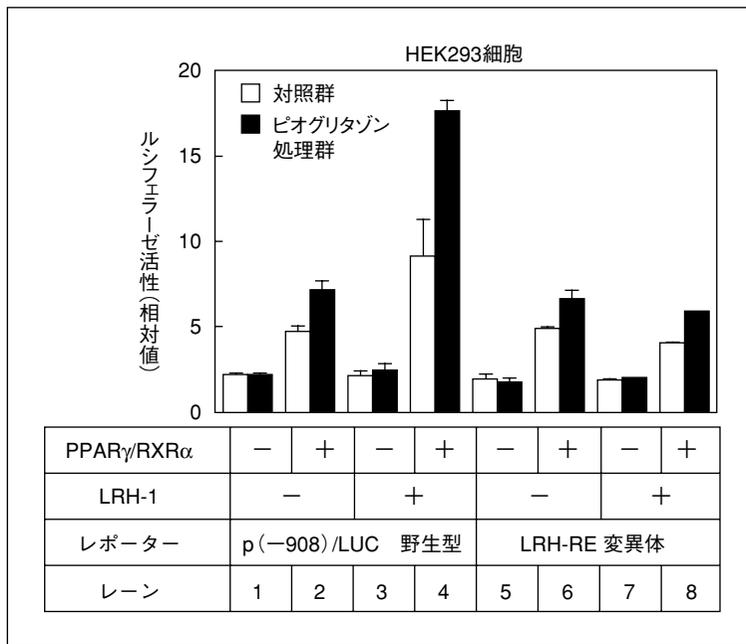


図3 PPAR γ とLRH-1によるアディポネクチンプロモーター制御

現がみられる。今後、アディポネクチンの産生増強剤をスクリーニングするうえで、PPAR γ /RXRヘテロダイマーおよびLRH-1を含む転写因子・共役因子複合体をターゲットにすることは、より効果的・選択的にアディポネクチンの転写活性化をおこなう薬剤を探しだせる可能性を提供する(図4)。

2. ビスファチン

肥満の合併症である糖尿病、高脂血症、高血圧症は、全身の脂肪量および皮下脂肪蓄積量よりも腹腔内臓脂肪の蓄積量と強く相関することが、多数の臨床研究により証明されている。近年概念づけられている糖尿病、高脂血症、高血圧などの動脈硬化症の危険因子が、合併した状態であるメタボリックシンドロームの病態の源流に内臓脂肪蓄積が存在していることを今や疑う者はいない。

われわれは、皮下脂肪に比し内臓脂肪で発

現の多いアディポサイトカインがあるとの仮説を立て、複数のヒト皮下脂肪と内臓脂肪を用いて、それぞれcDNAライブラリーを作成し、differential display法を行い、約8,000個のクローンを解析し、最終的に内臓脂肪で発現の多い6つのクローンを得た。その一つであるクローンは、ヒト内臓脂肪で皮下脂肪の約10倍の発現量がみられ、内臓脂肪由来因子ビスファチンと命名した。ビスファチン全長cDNAを単離したところ、アミノ末端にシグナルシーケンスを有し、分泌蛋白である可能性を示唆した。抗体を作成し、ヒト、マウス血中に本蛋白が存在していることを確認した。脂肪細胞分化過程で、本遺伝子発現量の著明な増強が見られ、かつ本因子のメディアウム中への分泌がみられた。したがって、本因子が成熟脂肪細胞より分泌され、かつ血液へ分泌されるアディポサイトカインであることがわかった。

さらにヒトの検討で、内臓脂肪蓄積とも

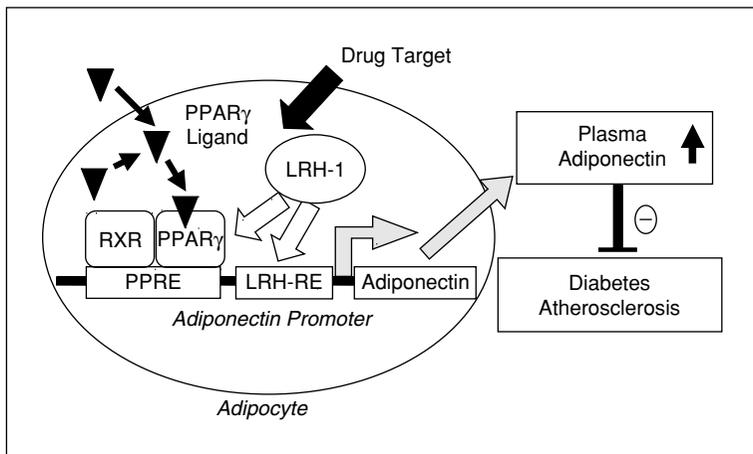


図4 PPAR γ とLRH-1によるアディポネクチン転写制御

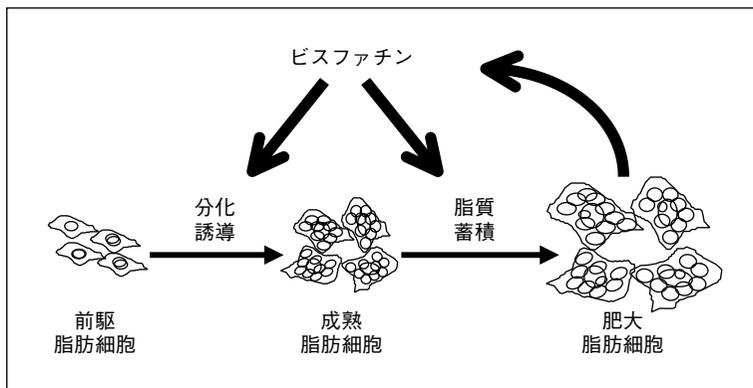


図5 ビスファチンの脂肪細胞への作用

に、内臓脂肪でのビスファチン遺伝子発現量の上昇がみられ、かつ血中ビスファチン濃度の上昇がみられた。このような現象は、皮下脂肪蓄積ではみられなかった。今後、その血中濃度は内臓脂肪蓄積マーカーとしての利用が考えられる。

生理作用として、前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化誘導作用および成熟脂肪細胞での中性脂肪蓄積作用を有していた(図5)。特に成熟脂肪細胞での中性脂肪蓄積作用に関しては、IRS-1 蛋白のチロシンリン酸化、PI 3 キナーゼの活性化、Akt のリン酸化を介し

て、糖輸送の上昇、糖から中性脂肪合成の増強を起こすことがわかっている。ビスファチンは、肥大化した脂肪細胞から産生・分泌され、他の脂肪細胞の分化・肥大化を促進する因子と考えられる。ビスファチンは、以前から培養細胞レベルでその存在が推察されていた成熟脂肪細胞から分泌される脂肪細胞分化誘導因子であると考えられる。今後、脂肪細胞以外の他の臓器・細胞への生理作用も考えられ、肥満症・内臓脂肪型肥満の各種病態にどのように貢献しているかが注目される。その関与が明らかにされれば、ビスファチンを

ターゲットにした生活習慣病への新たな治療法を開発することが期待される。さらに将来、分化度・脂肪蓄積度といった脂肪細胞そのものの性質を制御することを考えるうえで重要な因子となる可能性が高く、未来の抗肥満治療薬開発への可能性に対しても期待がかかる。

〔文献〕

- 1) Shimomura I, Funahashi T, Takahashi M, *et al* : Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat : Possible contributor to vascular disease in obesity. *Nature Medicine* 1996 ; 2 : 800—803.
- 2) Maeda K, Okubo K, Shimomura I, *et al* : Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue. *Gene* 1997 ; 190 : 227—235.
- 3) Maeda K, Okubo K, Shimomura I, *et al* : cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM 1 (AdiPose Most Abundant Gene transcript 1). *Biochim Biophys Res Commun* 1996 ; 221 : 286—289.
- 4) Hotta K, Funahashi T, Arita Y, *et al* : Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 ; 20 : 1595—1599.
- 5) Ouchi N, Kihara S, Arita Y, *et al* : Novel modulator for endothelial adhesion molecules : adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 1999 ; 100 : 2473—2476.
- 6) Kondo H, Shimomura I, Matsukawa Y, *et al* : Association of adiponectin/ACRP 30/AdipoQ mutation with type 2 diabetes mellitus. A candidate gene for the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 2002 ; 51 : 2325—2328.
- 7) Maeda N, Shimomura I, Kishida K, *et al* : Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP 30. *Nature Medicine* 2002 ; 8 : 731—737.
- 8) Matsuda M, Shimomura I, Sata M, *et al* : Role of adiponectin in preventing vascular stenosis—the missing link of adipo-vascular axis—. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 37487—37491.
- 9) Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, *et al* : PPAR gamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 2001 ; 50 : 2094—2099.
- 10) Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, *et al* : Induction of Adiponectin, a Fat-Derived Anti-Diabetic and Anti-Atherogenic Factor, by Nuclear Receptors. *Diabetes*

質 疑 応 答

座長(永井) ありがとうございます。ご質問がありましたらお願いいたします。

岸本忠三(日本医学会副会長) 前半のアドイポネクチンのことで聞きたいのですが、プロモーター領域にミュートーションを入れて創薬のスクリーニングをするという話です。その前段階としてもっと重要なことは、朝にも聞きましたが、なぜ脂肪細胞から出るものが、脂肪細胞が増えたらレベルが下がるのか。大量に mg/dL のオーダーで血中にあるものをノックアウトしても、ドラマチックな効果が何も出ない。プロモーターにミュートーションを入れたら何か引つついてくるというのは大学院の実習の実験ですが、それより前にそのようなことの解決を考えたほうがよいのではないかと。そうでないと薬にはつながらないと思います。

下村 たしかにおっしゃるとおりで、脂肪組織が増えたときに、なぜアドイポネクチンの血中濃度が下がるかということに関しては、今日私は話しませんでした。一部メカニズムを詰めています。脂肪細胞が肥大してくる時に産生が上昇する TNF- α によって、アドイポネクチンの転写、産生・分泌が抑制されることを見いだしております。脂肪が肥大したときには、悪玉のアドイポサイトカインの一つと考えられる TNF- α の産生・分泌が上昇し、パラクラインあるいはオートクライン的に作用して、脂肪細胞からのアドイポネクチンの産生・分泌が抑制されることが、少なくとも一つのメカニズムだと考えています。

しかし、この肥大脂肪細胞でいったいどの

ようなことが起こってくるのか为中心的な疑問だと思えますが、まだ必ずしも解明できていません。たとえば転写因子のうちどの転写活性が増強するのか、あるいは抑制されるのかということとはあまり調べられていません。あるいは、さまざまなシグナルトランスダクションに関しても、どのような経路が肥大脂肪細胞で修飾されるのかということとは調べられていません。私どもは調べようと思っていますが、系として難しく、十分調べられていない部分があります。

ですから私はTNF- α だけでなく、大きくなった脂肪細胞でどのような転写因子のカスケードの変化が起こるのか、あるいはシグナルトランスダクションの変化が起こるのかをさらに詰めることが、アディポネクチンの産生・分泌抑制のメカニズムを詰めることにつながると考えています。

中尾一和(京都大) アディポネクチンのプロモーター解析の点で一つだけ確認しておきたいのは、先生が新しくアディポネクチンのプロモーター領域に見つけられたPPREです。PPREがあって、それからLRH-REがある。この二つがセットになっていることがどれだけ一般化できるかという問題です。たまたまここにあるという組み合わせなのか、従来ないもので、これがあって初めてワークするというかたちで、ほかのプロモーターにもある可能性が高いとお考えなのでしょうか。

下村 それは非常に大事な点だと思っています。この部分をターゲットにして、アディポネクチンの選択的な産生増強が起こるかということに関しては、先生がいまおっしゃられたように、ほかにPPREかLRH-REを持っている遺伝子があるかということが大事だと思います。私たちが調べた限りでは、PPAR γ のターゲットで、同じようにプロモーターにLRH-REを持っているのはアディポネクチンだけでした。

中尾 もう一つはビスファチンのほうですが、先生は今日述べておられないのですが、僕の記憶が正しければ、ビスファチンは内臓脂肪以外のところでも発現している。そうしますと、内臓脂肪が容積を持って増えている方、絶対的な量が多い方ではたしかに血中濃度は比例するかもしれない。それはおそらく内臓脂肪から由来するものがメジャーであろう。だから比例するというのはよくわかります。機能的には、ほかの組織での機能とトータルのボディから考えたら、それほど多くないところでもワークしている可能性がある。細胞当たりの発現量、組織当たりの発現量が内臓脂肪と同じくらいの組織もあったような気がします。それを考えますと、たしかに体脂肪量が非常に多いボリュームを占めているので血中濃度にも反映されますが、機能的にいまの発想だけが続けていったら危険ではないでしょうか。

下村 たしかにビスファチンは内臓脂肪だけでなく肝臓にも少し発現があります。

中尾 肝臓だけでしたか。

下村 肝臓と腎臓にも少しあったと思います。大事なことは、たとえば肥満が起こる過程で、発現誘導、発現増強がかかるのは内臓脂肪がほぼスペシフィックです。皮下脂肪も少しかかりますが、内臓脂肪が非常に上がります。ほかの臓器はそうした変動がほとんど起こりません。私たちは以前、PAI-1というアディポサイトカインは肥満の形成過程において内臓脂肪ではどんどん上がる、皮下脂肪ではあまり上がらない、肝臓でもほとんど動かない、それが血中レベルと相関するというデータを出しています。ビスファチンもイメージとしてはPAI-1に近いアディポサイトカインではないかと考えています。

中尾 脂肪だけを考えていたら、おそらくそのストーリーでよいでしょう。しかし生体の中でたまたまアップレギュレーションを受

けるかどうかというのは、肥満にかかわったところだけを見ている可能性がある。それ以外のところで、そのレギュレーションがかからないとはいえないと思います。

下村 ビスファチンの生理的な調節に関しては、私たちもあまりデータを持っていません。

松澤佑次(住友病院) 岸本先生のコメントや中尾先生の話もそうですが、基本的にはわれわれが対応している生活習慣病、少なくとも動脈硬化にフォーカスした糖尿病その他のものは、過栄養というか脂肪細胞が一番反応して起こっている病態だと思います。だから中尾先生のご質問でも、下村先生もお答えしたように、ほかの細胞にも普遍的にあるとしても、運動不足で飽食の時代に脂肪細胞の機能が破綻してきた病態である。そういう意味で脂肪細胞から出てくるアディポサイトカインは極めて重要だと思っています。

それと何がよいものか、何が悪いものかというのは神のみぞ知るところがあります。特に生活習慣病は、基本的にいま太っていることが悪いと言っていますが、先ほど申しましたように50年以上前は太っている人のほうが元気で、栄養がよいといわれて、病気の質が違ってみんなバタバタ死んでいたわけです。

たとえばアディポネクチンが非常に大量にあるのに、ノットアウトしても何も起こらないというのは、おそらく攻撃因子との兼ね合いだと思います。たとえば警察がなくても泥棒がいなければ何とか平穏無事に過ごせる。火事が起こらなければ消防隊はなくてもよい。アディポネクチンはそういうものに備えて常に非常に大量につくっている。ひょっとしたら無駄かもしれませんが、つくっている。

しかし、いま攻撃因子がどんどん増えていて、タバコを吸えば内皮の異常が起こるし、高脂血症なら酸化LDLが血管をアタックす

る。あるいはインスリンのセンシティブリティを落とすような病態が起こる。そのときに初めて必要になる。ノックアウトして僕らは最初がっかりしましたが、負荷して非常に悪くなるというのはまさしく生活習慣病のすばらしいモデルだと考えています。ですから、これから攻撃因子も同時に明らかにしていきたいと思っています。

岸本 僕が言いたいのは、脂肪を貯めているだけだと思っていた脂肪細胞がさまざまなものをつくっているというのは、ロマンのあるおもしろい話だし、非常に大事だと思います。しかし、その次のステップとして転写因子がどうの、プロモーターにミューテーションを入れてゲルシフトでどうの、それは製薬会社の研究所が行えばよいことです。大学はもっとはっとするような方向からのアプローチができないかということ、その分野のリーダーは考えなくてはいけないと思います。

プロモーターにミューテーションを入れてゲルシフトして、創薬のターゲットはそれだというよりも、もっとおもしろい問いかけはいっぱいあるはずではないか。先ほどの人もその前の人も、転写因子を消したり入れたりというのはどうなのか。こういう場だからあえて言っているわけです。みなさんきっちりしているし、重要なことだとは思いますが、そういうことは製薬会社の研究所が行えばよいので、大阪大学の生命機能研究科はもうちょっとロマンのあることをやったらどうかと思います。

下村 その部分も行っていきますので、もう少しお待ちください。

益崎裕章(京都大) ビスファチンのインスリンシグナル増強作用を非常に興味深く聞かせていただきましたが、解釈として内臓脂肪はインスリンシグナルを増強し、糖取り込みを促進して、その場ではあまりインスリン抵

抗性になっていない。むしろ貯まった内臓脂肪から出てくるアディポサイトカインによって、遠隔臓器のインスリン抵抗性を起こしていると解釈してもよいのでしょうか。

下村 それは先ほど松澤先生が言われたアディポサイトカインが善玉なのか悪玉なのかという問題に通じますが、それは慢性的に増強が続いているのか、あるいはワンポイントで添加したときにどうかという部分になると思います。ビスファチンに関しても慢性的に内臓脂肪から出て、血中の高濃度がずっと続いたときにどのようなフェノタイプになるのかは、もう少しさまざまなことを調べないと何とも言えないのではないかと思います。

杉原 甫(佐賀大) 大変すばらしい報告でした。私は内臓あるいは皮下の成熟脂肪細胞を培養していますが、成熟脂肪細胞から未熟脂肪細胞が新生されてきますので、結果的には成熟脂肪細胞と未熟脂肪細胞の混合培養に

なります。その条件下で、未熟脂肪細胞の脂肪合成が大変高まるということを観察してきました。その理由がわからなかったのですが、先生のご発表でその理由がよくわかりました。

もう一つは、インスリンというのは脂肪合成作用だけでなく、たとえば無血清培地でもインスリンとトランスフェリンとEGF等の成長因子は絶対に必要であるという、細胞にとって不可欠の因子です。脂肪細胞は、そういう基本的な物質を産生していることになります。

もう一つは、Endocrinology (2003;144:585)に、魚の脂肪細胞でインスリンがつくられているのではないかという発表があったように思います。あの論文をどのように評価しますか。

下村 申し訳ありませんが読んでいません。

座長 どうもありがとうございました。