

学位論文要約

Extended Summary in Lieu of the Full Text of a Doctoral Thesis

氏 名: 北 田 善 彦
Full Name Kitada Yoshihiko

学位論文題目: Blockade of sphingosine 1-phosphate receptor 2 signaling
Thesis Title attenuates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and systemic glucose intolerance in mice

学位論文要約:

Summary of Thesis

肥満に起因するインスリン抵抗性は、慢性炎症の関与が指摘されているメタボリックシンドロームの原因となっており、その治療戦略の確立は重要な課題である。一方、細胞膜の構成成分であるスフィンゴ脂質より生成される Sphingosine 1-phosphate (S1P) が、G 蛋白を介して細胞の増殖、遊走、細胞周期を制御し、免疫、神経、循環で様々な働きをもっていることが報告されている。S1P 受容体 (S1pr) は S1pr1 から S1pr5 までの 5 種類が同定されているが、S1P の脂肪細胞における役割は明らかになっていない。今回、申請者らは S1P が脂肪細胞の分化、増殖に及ぼす影響について *in vivo* と *in vitro* で検討した。

10 週齢の雄性の C57BL/6 マウスの wild type (WT) と S1P receptor 2 knockout マウス (S1pr2^{-/-}) を、high fat diet (HFD) を 4 週間負荷した群 (WT+HFD, S1pr2^{-/-}+HFD) と負荷しなかった群 (WT, S1pr2^{-/-}) に分け、糖負荷試験 (GTT)、インスリン負荷試験 (ITT) を行った。傍精巣脂肪組織を採取して脂肪重量、脂肪細胞径を測定し、脂肪組織における細胞増殖マーカーである proliferating cell nuclear antigen (PCNA) の発現を western blot で測定した。脂肪組織特異的遺伝子である peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)、fatty acid binding protein 4 (FABP4)、lipoprotein lipase (Lpl)、adiponectin, C1q and collagen domain containing (Adipoq)、leptin (Lep)、脂肪代謝に関連する sterol binding element binding protein 1 (Srebp1)、fatty acid synthase (Fasn)、M1 macrophage マーカーである CD11c (Cd11c)、Nitric oxide synthase 2 (Nos2)、M2 macrophage マーカーである arginase 1 (Arg1) の mRNA の発現を real time PCR で定量した。また、脂肪組織の慢性炎症を示す crown-like structures (CLSs) の数を WT+HFD, S1pr2^{-/-}+HFD で比較した。

脂肪前駆細胞の増殖に対する S1P/S1pr の影響を検討するために、3T3-L1/3T3-F442A 脂肪前駆細胞に S1P、S1pr1/3 阻害薬 VPC-23019、S1pr2 阻害薬 JTE-013、S1pr4 阻害薬 CMY-50358 を添加し、5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) 取り込みと water soluble tetrazolium salts (WST) assay で細胞増殖の速さを評価した。脂肪細胞分化に対する S1P シグナルおよび S1pr の働きを検討するために、insulin で分化誘導した 3T3-F442A 脂肪細胞にこれらの阻害薬を添加し、中性脂肪含量、脂肪細胞特異的遺伝子の発現量で分化の程度を評価した。これらの結果を確認するために、small interfering RNA (siRNA) により S1pr1、S1pr2 の knockdown を行い、脂肪前駆細胞増殖、脂肪細胞への分化の程度を評価した。

遺伝的肥満 2 型糖尿病動物である ob/ob マウスと対照で非肥満の C57BL/6 マウスに、餌 1kg 当たり 40 mg の JTE-013 を 4 週間投与後、体重、脂肪細胞重量、脂肪細胞径の測定、GTT、ITT を行い、S1pr2 阻害の効果を確認した。

通常食では S1pr2^{-/-}は WT より体重、脂肪重量が低かったが、HFD により両者の体重、脂肪重量の差は無くなった。しかし、WT+HFD に比べ S1pr2^{-/-}+HFD において、GTT、ITT でのインスリン抵抗性は改善していた。S1pr2^{-/-}、S1pr2^{-/-}+HFD は、WT、WT+HFD と比較して、いずれも S1pr2^{-/-}で脂肪細胞径が小さかった。PCNA 発現は、通常食、HFD いずれでも S1pr2^{-/-}で増加していた。脂肪組織の遺伝子発現は WT に比較し、WT+HFD では Adipoq の減少、Lep、Cd11c と Nos2 の増加が認められたが、S1pr2^{-/-}と S1pr2^{-/-}+HFD ではこれらに変化はみられなかった。蛋白レベルでの adiponectin、leptin の発現も mRNA と同様の結果であった。CLSs の数は WT+HFD に比較して S1pr2^{-/-}+HFD では少数であった。

3T3-L1/3T3-F442A 脂肪前駆細胞の EdU 取り込みと WST assay で評価した細胞増殖は、S1P、JTE-013 で促進され、VPC-23019 で抑制された。脂肪細胞への分化は、S1P、JTE-013 で抑制され、VPC-23019 で促進された。siRNA による *S1pr1* の knockdown により、3T3-F442A 脂肪前駆細胞の増殖は抑制され、脂肪細胞への分化は促進された。逆に、*S1pr2* の knockdown により 3T3-F442A 脂肪前駆細胞の増殖は促進され、脂肪細胞への分化は抑制された。

JTE-013 投与により、ob/ob マウスでは体重と脂肪組織重量の減少、脂肪細胞径の縮小、GTT、ITT でのインスリン抵抗性の改善が認められたが、C57BL/6 マウスではこれらの変化は認められなかった。

HFD に対して、WT は脂肪細胞の肥大で、*S1pr2*^{-/-} は脂肪細胞の増殖で対応していた。培養脂肪細胞の検討により、*S1pr2* の阻害が脂肪前駆細胞の増殖促進と脂肪細胞への分化抑制を引き起こし、脂肪細胞の小型化とインスリン抵抗性の改善に繋がったと考えられた。*S1pr2* を阻害することで HFD 負荷による *Cd11c* と *Nos2* の増加の抑制と CLSs の減少が認められたことから、*S1pr2* を介して脂肪細胞肥大化と脂肪組織の炎症が惹起されていると考えられた。以上から、*S1pr2* の抑制が肥満によるインスリン抵抗性の治療となり得ることが示唆された。

S1pr1 は脂肪細胞分化を抑制し、脂肪前駆細胞の増殖を促進する。逆に *S1pr2* は脂肪細胞分化を促進し、脂肪前駆細胞の増殖を抑制する。*S1pr2* を阻害することにより脂肪細胞の小型化と脂肪組織の炎症抑制が起こり、その結果インスリン抵抗性が改善すると考えられた。