

氏名（本籍）	北 田 善 彦（岐阜県）
学位の種類	博 士（医学）
学位授与番号	甲第 1026 号
学位授与日付	平成 28 年 5 月 18 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Blockade of sphingosine 1-phosphate receptor 2 signaling attenuates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and systemic glucose intolerance in mice
審 査 委 員	（主査）教授 武 田 純 （副査）教授 長 岡 仁 教授 森 重 健一郎

論文内容の要旨

肥満に起因するインスリン抵抗性はメタボリックシンドロームの成因であり、その病態には脂肪組織の分化・増殖や慢性炎症の関与が指摘されている。

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) は G 蛋白を介して細胞の増殖、遊走、細胞周期を制御し、様々な生理機能を発揮することが知られている。一方、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 やその受容体の脂肪細胞における役割は明らかでない。今回、申請者は 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。

【対象と方法】

10 週齢の雄性の C57BL/6 マウスの野生型 (WT) と S1P 受容体 2 欠失マウス (S1pr2^{-/-}) を、high fat diet (HFD) を 4 週間負荷した群 (WT+HFD, S1pr2^{-/-}+HFD) と負荷しなかった対照群に分け、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組織重量、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。脂肪細胞に関連する 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 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) について、WT+HFD と S1pr2^{-/-}+HFD で比較検討した。

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 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測定した。細胞分化に対する S1P シグナル経路の関与を解析するために、インスリンで分化誘導した 3T3-F442A 細胞にこれらの阻害薬を添加し、中性脂肪含量、脂肪細胞関連遺伝子の mRNA 発現量を測定して分化度を評価した。さらに、結果を確認するために、small interfering RNA (siRNA) により S1pr1, S1pr2 発現の knockdown を行うことによって、前駆細胞の増殖および脂肪細胞への分化を評価した。

肥満 2 型糖尿病のモデル動物である ob/ob マウスと非肥満の C57BL/6 マウスに、餌 1kg 当たり 40 mg の JTE-013 を 4 週間投与した後に、体重、脂肪細胞重量、脂肪細胞径の測定、GTT, ITT を行うことによって、S1pr2 阻害の効果を解析した。

【結果】

S1pr2^{-/-}において、通常食では WT に比して体重、脂肪重量は有意に低かったが、HFD 負荷により両者に有意差は認めなくなった。しかし、WT+HFD に比べ、S1pr2^{-/-}+HFD において、GTT では耐糖能の、ITT ではインスリン感受性の改善が示唆された。脂肪細胞径は、S1pr2^{-/-}、S1pr2^{-/-}+HFD、WT、WT+HFD を比較すると、S1pr2^{-/-}で有意に低値であった。PCNA 発現は、通常食、HFD のいずれにおいても S1pr2^{-/-}で有意に増加していた。脂肪組織の mRNA 発現については、WT に比較して 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 ではこれらに有意差は認めなかった。蛋白レベルでの adiponectin、leptin の発現量の変化も mRNA と同様の結果であった。CLSs の数は、WT+HFD に比して S1pr2^{-/-}+HFD では有意に少数であった。

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。一方、siRNA による S1pr1 発現の knockdown では、3T3-F442A 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 では、3T3-F442A 細胞の増殖は促進され、脂肪細胞への分化は抑制された。

ob/ob マウスでは、JTE-013 投与により体重、脂肪重量、脂肪細胞径が減少し、GTT での耐糖能と ITT でのインスリン感受性の改善が見られたが、対照群ではこれらの変化は認められなかった。

【考察】

個体レベルでの検討では、HFD に対して、WT は個々の脂肪細胞を肥大させることで、S1pr2^{-/-}は脂肪細胞を増殖させることで対応していた。一方、培養細胞を用いた検討では、S1pr2 の障害が脂肪前駆細胞の増殖促進と脂肪細胞への分化を抑制し、その結果、脂肪細胞が小型化することでインスリン抵抗性が改善したと考えられた。さらに、S1pr2 を障害することによって、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、脂肪細胞の肥大化と脂肪組織の炎症には同受容体が関与していると考えられた。以上から、脂肪細胞の S1pr2 経路を抑制することは肥満によるインスリン抵抗性の治療となる可能性が示唆された。

【結論】

S1pr1 は脂肪細胞分化を抑制し、脂肪前駆細胞の増殖を促進したが、S1pr2 では逆に脂肪細胞分化を促進し、脂肪前駆細胞の増殖を抑制した。さらに、脂肪細胞の S1pr2 障害によって細胞の小型化と組織の炎症抑制が得られたので、その結果としてインスリン抵抗性が改善したと考えられた。

論文審査の結果の要旨

申請者 北田善彦は、sphingosine 1-phosphate (S1P) 受容体 2 と脂肪細胞の分化・増殖の関連について同受容体欠失マウスと前駆細胞を用いて検討した結果、同受容体経路を障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、インスリン抵抗性が改善することを見出した。本研究の成果は、肥満を伴うインスリン抵抗性の病態の理解を深めると共に、代謝内科学の発展に寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Yoshihiko Kitada, Kazuo Kajita, Koichiro Taguchi, Ichiro Mori, Masahiro Yamauchi, Takahide Ikeda, Mikako Kawashima, Motochika Asano, Toshiko Kajita, Tatsuo Ishizuka, Yoshiko Banno, Itaru Kojima, Jerold Chun, Shotaro Kamata, Isao Ishii, and Hiroyuki Morita: Blockade of sphingosine 1-phosphate receptor 2 signaling attenuates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and systemic glucose intolerance in mice.

Endocrinology. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26943364#>> 2016

May;157(5):1839-51. doi: 10.1210/en.2015-1768. Epub 2016 Mar 4.