



Skp2 Controls Adipocyte Proliferation during the Development of Obesity

酒井, 太門

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2007-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3797

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003797>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 9 9 】

氏 名・（本 籍） 酒井 太門 （ 大阪府 ）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学 位 記 番 号 博い第1797号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成19年3月25日

【 学位論文題目 】

Skp2 Controls Adipocyte Proliferation during the Development
of Obesity

（Skp2は肥満発症における脂肪細胞増殖を制御する）

審 査 委 員

主 査 教 授 横野 浩一

教 授 横山 光宏

教 授 饗場 篤

はじめに

肥満は生活習慣病、動脈硬化性疾患の発症基盤となるが、なかでも内臓脂肪蓄積を伴う肥満によりインスリン抵抗性やそれを基盤とした 2 型糖尿病の発症の危険性が増加することはよく知られている。つまり肥満発症のメカニズムを解明することは 2 型糖尿病の病態や新たな治療法を考える上で重要である。

肥満とは体脂肪が過剰に蓄積された状態であり、この体脂肪の量は脂肪細胞の大きさと数により規定されるが、体脂肪量の過剰状態では脂肪細胞自身の肥大化（大きさの増大）と脂肪細胞の数の増加が関与しているものと考えられる。脂肪細胞の肥大化の調節機構に関しては多くの知見が集積しているが脂肪細胞数の調節機構はいまだ十分に明らかとされていない。

脂肪細胞は脂肪前駆細胞の増殖とその成熟脂肪細胞への分化により増加するものと考えられている。近年、増殖を制御する E2F1 (E2 promoter binding factor 1)、Rb (retinoblastoma)、CDK2 (cyclin-dependent kinase 2)、CDK4 (cyclin-dependent kinase 4) といった細胞周期制御因子も脂肪前駆細胞の分化に重要な役割を果たしていることが報告されている。さらに、CDK インヒビターである p27^{Kip1} と p21^{Cip1} を欠損させたマウスでは脂肪細胞の大きさは変化がないが、脂肪細胞数の増加に伴う肥満を呈し、インスリン感受性の低下による耐糖能異常を呈することが報告されている。

Skp2 は SCF^{Skp2} 複合体を構成し、S 期/G2 期にユビキチンリガーゼとして働き p27^{Kip1} を分解し細胞周期を M 期へと進行させる。申請者は肥満形成の過程における脂肪細胞での Skp2 の役割を検討する目的で、高脂肪食を給餌した C57BL/6 マウスの白色脂肪組織における Skp2 の発現の変化を経時的に検討した。さらに Skp2 を欠損させたマウスを用いて、Skp2 の肥満誘導時の脂肪細胞数の変化や糖代謝に与える影響を検討した。

結果

長期高脂肪食給餌は脂肪細胞数を増加させる

C57BL/6 マウスに 4 週齢から高脂肪食給餌を行い、10 週間と 26 週間の高脂肪食を負荷した群に分けて、体重、副睾丸周囲脂肪組織重量を比較検討し、さらに脂肪細胞の大きさ、並びに通常食給餌の野生型マウスと比した脂肪細胞数比を両群で比較検討した。長期間 (26 週間) の高脂肪食給餌をすることにより体重、脂肪組織重量ともに増加し続けるものの、脂肪細胞の大きさは 10 週間高脂肪食給餌群以上には大きくならなかったが、脂肪細胞数は約 2 倍に増加していた。このときの白色脂肪組織において p27^{Kip1} 蛋白の発現減少および Skp2 mRNA の発現増加を認めた。

Skp2 欠損により脂肪細胞および膵 β 細胞の数は減少する

通常食給餌において Skp2 のノックアウトマウス (*Skp2*^{-/-}マウス) は野生型マウス (*Skp2*^{+/+}マウス) と比べて 20 週齢では白色脂肪組織重量と膵組織重量が有意に少なかった。また、*Skp2*^{-/-}マウスでは *Skp2*^{+/+}マウスと比べて脂肪細胞の大きさはむしろ大きく、脂肪細胞数が有意に減少していた。膵 β 細胞は *Skp2*^{-/-}マウスでは *Skp2*^{+/+}マウスと比べて有意に大きく、膵 β 細胞数は有意に減少していた。

Skp2 欠損マウスは耐糖能異常を呈する

通常食給餌において *Skp2*^{-/-}マウスは *Skp2*^{+/+}マウスと比べて経口糖負荷試験において糖負荷後の高血糖を呈した。インスリン感受性を比較検討する目的でインスリン負荷試験を行なったところ、両群に有意な差は認めなかった。そこでインスリン分泌能を比較検討したところ、*Skp2*^{-/-}マウスでは *Skp2*^{+/+}マウスと比べて糖負荷後早期のインスリン分泌が減少していた。このことは *Skp2*^{-/-}マウスでは膵 β 細胞数の減少に伴いインスリン分泌能が低下し、耐糖能異常を呈することを示唆している。

Skp2 欠損により高脂肪食給餌による肥満誘導に抵抗する

Skp2^{-/-}マウスと *Skp2*^{+/+}マウスに対して 4 週齢から高脂肪食給餌を行い肥満誘導したところ、*Skp2*^{-/-}マウスでは *Skp2*^{+/+}マウスに比べて体重増加が抑制された。特に長期に高脂肪食を給餌した 20 週から 28 週齢における体重増加の抑制が顕著であった。28 週齢において同週齢の通常食給餌したマウスと比した白色脂肪組織の増加量を両群で比較したところ *Skp2*^{-/-}マウスで有意に白色脂肪組織重量の増加が抑制されていた。このときの脂肪細胞の大きさと数を両群で比較したところ、ともに高脂肪食給餌により同様に肥大化するものの *Skp2*^{-/-}マウスでは *Skp2*^{+/+}マウスに比べて長期高脂肪食給餌による脂肪細胞数の増加が著明に抑制されていた。また *Skp2*^{-/-}マウスでは、長期高脂肪食給餌により *Skp2*^{+/+}マウスでみられた白色脂肪組織における p27^{Kip1} 蛋白の発現減少を認めなかった。以上のことから Skp2 欠損による p27^{Kip1} 蛋白発現の持続が、脂肪細胞数の増加抑制を介して、*Skp2*^{-/-}マウスの肥満抵抗性に寄与しているものと考えられた。

過食肥満糖尿病モデルマウスにおける Skp2 欠損は肥満誘導に抵抗しインスリン抵抗性を改善する

さらに Skp2 の肥満誘導時の脂肪細胞数の変化や糖代謝に与える影響を明らかにするために、過食肥満糖尿病モデルマウスである KK^{Ay} マウスとの交配により Skp2 を欠損させた *Ay;Skp2*^{-/-}マウスを作製し、長期高脂肪食給餌した *Skp2*^{-/-}マウスと同様の検討を行なった。*Ay;Skp2*^{-/-}マウスは *Ay;Skp2*^{+/+}マウスと比べて 4 週齢より有意に小

さく、4 週齢から 18 週齢までの体重増加も著明に抑制されていた。*Ay;Skp2^{-/-}*マウスは *Ay;Skp2^{+/+}*マウスと比べて 18 週齢において白色脂肪組織重量が有意に少なく、このことが体重増加抑制に大きく寄与しているものと考えられた。また、このときの脂肪細胞の大きさは両群で変わらないものの脂肪細胞の数は *Ay;Skp2^{-/-}*マウスで有意に少なかった。

*Ay;Skp2^{+/+}*マウスは加齢に伴い、膵 β 細胞の過形成と著明な血中インスリン濃度の増加を認めたが、*Ay;Skp2^{-/-}*マウスではこれらが抑制されていた。このため、経口糖負荷試験において *Ay;Skp2^{-/-}*マウスでは *Ay;Skp2^{+/+}*マウスと比べて糖負荷後の高血糖を呈した。しかしながらインスリン負荷試験を行なったところ、*Ay;Skp2^{-/-}*マウスは *Ay;Skp2^{+/+}*マウスと比べて良好なインスリン感受性を呈した。この良好なインスリン感受性は *Ay;Skp2^{-/-}*マウスが肥満抵抗性を示したことによるものと考えられた。

考察

C57BL/6 マウスにおいて、長期間の高脂肪食給餌を行なうことにより、脂肪細胞数の増加を伴う肥満が認められたが、その際、白色脂肪組織において Skp2 mRNA の発現増加、p27^{Kip1} 蛋白の発現減少を認めた。一方、*Skp2^{-/-}*マウスでは長期間の高脂肪食給餌により脂肪細胞の肥大化が *Skp2^{+/+}*マウスと同程度に認められるにもかかわらず、脂肪細胞数の増加が抑制された結果、長期間の高脂肪食給餌による肥満誘導が抑制された。さらに肥満誘導抑制に加え、良好なインスリン感受性が *Ay;Skp2^{-/-}*マウスで認められた。

以上のことから、肥満と肥満によるインスリン抵抗性には、脂肪細胞の肥大化とともに、脂肪細胞数の増加が寄与しているものと考えられた。また脂肪細胞の大きさには限界があるものと考えられ、余剰エネルギーを蓄積するために脂肪細胞数の増加が不可欠と考えられた。さらに *Skp2* 欠損マウスは脂肪細胞数の増加抑制による肥満抵抗性を呈し、良好なインスリン感受性を認めた。つまり、Skp2 が肥満形成の過程における脂肪細胞の増殖に重要な役割を果たしているものと考えられ、脂肪細胞数がインスリン抵抗性に関与することを明らかにした。

しかし現在のところ、脂肪細胞数の増加抑制が、何故インスリン感受性を良好に維持したかは明らかでない。最近、脂肪組織における低グレードの慢性炎症が全身のインスリン感受性に影響を与えるという報告が相次いでなされた。脂肪細胞数の増加が抑制された *Ay;Skp2^{-/-}*マウスでは、著明に脂肪組織におけるマクロファージの浸潤が抑制されていることを申請者らは見出しているが、脂肪細胞数と脂肪組織の慢性炎症がどのように関係するのか今後の検討課題である。

一方、マウスの膵 β 細胞において p27^{Kip1} を過剰発現すると膵 β 細胞の増殖抑制に伴い高血糖をきたす。この p27^{Kip1} のユビキチンリガーゼである Skp2 を欠損させた

*Skp2^{-/-}*マウスにおいても、*Skp2^{+/+}*マウスと比べて膵 β 細胞数は有意に減少しており、それに伴いインスリン分泌能が低下し耐糖能異常を呈した。また *in vitro* ではインスリン刺激により脂肪前駆細胞の増殖や分化が誘導されることが既に報告されている。一方で高インスリン血症がインスリン抵抗性をもたらすことも知られている。これらのことから、*Skp2^{-/-}*マウスにおけるインスリン分泌能の低下が、肥満誘導時の脂肪細胞数増加の抑制や *Ay;Skp2^{-/-}*マウスにおけるインスリン抵抗性の改善に一部寄与している可能性は否定できない。

以上の知見は、Skp2 が肥満によって発症する種々の生活習慣病、動脈硬化性疾患の治療のターゲットとなりうる可能性を示すものである。今後、脂肪細胞増殖における Skp2 の発現制御機構を明らかとし、脂肪細胞増殖機構の肥満治療に対する分子標的としての可能性をさらに検討することが必要と考えられる。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1802号	氏 名	酒井 太門
論文題目 Title of Dissertation	Skp2 Controls Adipocyte Proliferation during the Development of Obesity Skp2 は肥満発症における脂肪細胞増殖を制御する		
審査委員 Examiner	主 査 横野 浩一 Chief Examiner 副 査 横山 光宏 Vice-examiner 副 査 饗場 篤 Vice-examiner		
審査終了日	平成19年1月17日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

肥満は生活習慣病、動脈硬化性疾患の発症基盤となるが、なかでも内臓脂肪蓄積を伴う肥満によりインスリン抵抗性やそれを基盤とした2型糖尿病の発症の危険性が増加することはよく知られている。つまり肥満発症のメカニズムを解明することは2型糖尿病の病態や新たな治療法を考える上で重要である。脂肪細胞は脂肪前駆細胞の増殖とその成熟脂肪細胞への分化により増加するものと考えられている。近年、増殖を制御する E2F1 (E2 promoter binding factor 1)、Rb (retinoblastoma)、CDK2 (cyclin-dependent kinase 2)、CDK4 (cyclin-dependent kinase 4) といった細胞周期制御因子も脂肪前駆細胞の分化に重要な役割を果たしていることが報告されている。さらに、CDK インヒビターである p27 ^{Kip1} と p21 ^{Cip1} を欠損させたマウスでは脂肪細胞の大きさは変化がないが、脂肪細胞数の増加に伴う肥満を呈し、インスリン感受性の低下による耐糖能異常を呈することが報告されている。Skp2 は SCF ^{Skp2} 複合体を構成し、S 期/G2 期にユビキチンリガーゼとして働き p27 ^{Kip1} を分解し細胞周期を M 期へと進行させる。そこで申請者は肥満形成の過程における脂肪細胞での Skp2 の役割を検討する目的で、高脂肪食を給餌した C57BL/6 マウスの白色脂肪組織における Skp2 の発現の変化を経時的に検討した。さらに Skp2 を欠損させたマウスを用いて、Skp2 の肥満誘導時の脂肪細胞数の変化や糖代謝に与える影響を検討した。
C57BL/6 マウスに4週齢から高脂肪食給餌を行い、10週間と26週間の高脂肪食を負荷した群に分けて、体重、副睾丸周囲脂肪組織重量を比較検討し、さらに脂肪細胞の大きさ、並びに通常食給餌の野生型マウスと比した脂肪細胞数比を両群で比較検討した。長期間(26週間)の高脂肪食給餌をすることにより体重、脂肪組織重量ともに増加し続けるものの、脂肪細胞の大きさは10週間高脂肪食給餌群以上には大きくならなかったが、脂肪細胞数は約2倍に増加していた。このときの白色脂肪組織において p27 ^{Kip1} 蛋白の発現減少お

272

よび <i>Skp2</i> mRNA の発現増加を認めた。
通常食給餌において <i>Skp2</i> のノックアウトマウス (<i>Skp2</i> ^{-/-} マウス) は野生型マウス (<i>Skp2</i> ^{+/+} マウス) と比べて 20 週齢では白色脂肪組織重量と膵組織重量が有意に少なかった。また、 <i>Skp2</i> ^{-/-} マウスでは <i>Skp2</i> ^{+/+} マウスと比べて脂肪細胞の大きさはむしろ大きく、脂肪細胞数が有意に減少していた。膵β細胞は <i>Skp2</i> ^{-/-} マウスでは <i>Skp2</i> ^{+/+} マウスと比べて有意に大きく、膵β細胞数は有意に減少していた。
通常食給餌において <i>Skp2</i> ^{-/-} マウスは <i>Skp2</i> ^{+/+} マウスと比べて経口糖負荷試験において糖負荷後の高血糖を呈した。インスリン感受性を比較検討する目的でインスリン負荷試験を行なったところ、両群に有意な差は認めなかった。そこでインスリン分泌能を比較検討したところ、 <i>Skp2</i> ^{-/-} マウスでは <i>Skp2</i> ^{+/+} マウスと比べて糖負荷後早期のインスリン分泌が減少していた。このことは <i>Skp2</i> ^{-/-} マウスでは膵β細胞数の減少に伴いインスリン分泌能が低下し、耐糖能異常を呈することを示唆している。
<i>Skp2</i> ^{-/-} マウスと <i>Skp2</i> ^{+/+} マウスに対して 4 週齢から高脂肪食給餌を行い肥満誘導したところ、 <i>Skp2</i> ^{-/-} マウスでは <i>Skp2</i> ^{+/+} マウスに比べて体重増加が抑制された。特に長期に高脂肪食を給餌した 20 週から 28 週齢における体重増加の抑制が顕著であった。28 週齢において同週齢の通常食給餌したマウスと比した白色脂肪組織の増加量を両群で比較したところ <i>Skp2</i> ^{-/-} マウスで有意に白色脂肪組織重量の増加が抑制されていた。このときの脂肪細胞の大きさと数を両群で比較したところ、ともに高脂肪食給餌により同様に肥大化するものの <i>Skp2</i> ^{-/-} マウスでは <i>Skp2</i> ^{+/+} マウスに比べて長期高脂肪食給餌による脂肪細胞数の増加が著明に抑制されていた。また <i>Skp2</i> ^{-/-} マウスでは、長期高脂肪食給餌により <i>Skp2</i> ^{+/+} マウスでみられた白色脂肪組織における p27 ^{Kip1} 蛋白の発現減少を認めなかった。以上のことから <i>Skp2</i> 欠損による p27 ^{Kip1} 蛋白発

現の持続が、脂肪細胞数の増加抑制を介して、 <i>Skp2</i> ^{-/-} マウスの肥満抵抗性に寄与しているものと考えられた。
さらに <i>Skp2</i> の肥満誘導時の脂肪細胞数の変化や糖代謝に与える影響を明らかにするために、過食肥満糖尿病モデルマウスである KKAy マウスとの交配により <i>Skp2</i> を欠損させた <i>Ay;Skp2</i> ^{-/-} マウスを作製し、長期高脂肪食給餌した <i>Skp2</i> ^{-/-} マウスと同様の検討を行なった。 <i>Ay;Skp2</i> ^{-/-} マウスは <i>Ay;Skp2</i> ^{+/+} マウスと比べて 4 週齢より有意に小さく、4 週齢から 18 週齢までの体重増加も著明に抑制されていた。 <i>Ay;Skp2</i> ^{-/-} マウスは <i>Ay;Skp2</i> ^{+/+} マウスと比べて 18 週齢において白色脂肪組織重量が有意に少なく、このことが体重増加抑制に大きく寄与しているものと考えられた。また、このときの脂肪細胞の大きさは両群で変わらないものの脂肪細胞の数は <i>Ay;Skp2</i> ^{-/-} マウスで有意に少なかった。 <i>Ay;Skp2</i> ^{+/+} マウスは加齢に伴い、膵β細胞の過形成と著明な血中インスリン濃度の増加を認めたが、 <i>Ay;Skp2</i> ^{-/-} マウスではこれらが抑制されていた。このため、経口糖負荷試験において <i>Ay;Skp2</i> ^{-/-} マウスでは <i>Ay;Skp2</i> ^{+/+} マウスと比べて糖負荷後の高血糖を呈した。しかしながらインスリン負荷試験を行なったところ、 <i>Ay;Skp2</i> ^{-/-} マウスは <i>Ay;Skp2</i> ^{+/+} マウスと比べて良好なインスリン感受性を呈した。この良好なインスリン感受性は <i>Ay;Skp2</i> ^{-/-} マウスが肥満抵抗性を示したことによるものと考えられた。
以上のことから、肥満と肥満によるインスリン抵抗性には、脂肪細胞の肥大化とともに、脂肪細胞数の増加が寄与しているものと考えられた。また脂肪細胞の大きさには限界があるものと考えられ、余剰エネルギーを蓄積するために脂肪細胞数の増加が不可欠と考えられた。さらに <i>Skp2</i> 欠損マウスは脂肪細胞数の増加抑制による肥満抵抗性を呈し、良好なインスリン感受性を認めた。つまり、 <i>Skp2</i> が肥満形成の過程における脂肪細胞の増殖に重要な役割を果たしているものと考えられ、脂肪細胞数がインスリン抵抗性に関与す

