



# Skp2 promotes adipocyte differentiation via a p27Kip1-independent mechanism in primary mouse embryonic fibroblasts.

岡田, 潮

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2009-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4646

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004646>

※ 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。



氏 名	岡田 潮
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 4646 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 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Skp2 promotes adipocyte differentiation via a p27Kip1-independent mechanism in primary mouse embryonic fibroblasts.(初代培養マウス胎仔線維芽細胞において Skp2 は p27Kip1 非依存性の機序を介して脂肪細胞の分化を促進する)

審 査 委 員

主 査	教 授	横野 浩一
	教 授	中村 俊一
	教 授	饗場 篤

肥満は白色脂肪組織の過剰状態であり、2型糖尿病や心血管疾患の発症リスクを増加させることから、世界的に深刻な健康を脅かす問題となっている。肥満形成過程において白色脂肪組織の増大は、脂肪細胞の数の増加（過形成）とサイズの増大（肥大化）に起因する。脂肪細胞の数の増加は脂肪前駆細胞の増殖と、それに引き続きおこる成熟脂肪細胞への分化の結果と考えられるが、脂肪前駆細胞の増殖は、細胞周期の各時期においてサイクリンや、サイクリン依存性キナーゼ（CDK）、CDK 阻害因子などの蛋白の活性化・不活化により制御されている。CDK 阻害因子には Cip(Kip)ファミリーと Ink4 ファミリーがあり、細胞が細胞周期より脱け出る際に重要とされるが、Cip(Kip)ファミリーである p27<sup>Kip1</sup> と p21<sup>Cip1</sup> の遺伝子欠損マウスは、脂肪前駆細胞の増殖亢進のため脂肪細胞の過形成を呈することから、CDK 阻害因子が脂肪細胞の数の制御に重要であると考えられている。SCF<sup>Skp2</sup> ユビキチンリガーゼ複合体は p27<sup>Kip1</sup> を標的とし、26 プロテアソームによって分解し細胞周期を進行させる鍵分子であるが、最近我々はマウスの肥満形成過程において脂肪細胞の数の増加に伴い Skp2 の発現が亢進すること、さらに肥満モデルマウスにおける *Skp2* 欠損は脂肪細胞の数の増加が抑制されインスリン抵抗性が改善することを報告した。今回我々は、p27<sup>Kip1</sup> 及び Skp2 遺伝子欠損マウスにおける胎仔線維芽細胞（MEF）を用いて、脂肪細胞分化制御機構における Skp2 の役割を検討した。

脂肪細胞分化のモデルとして繁用されている 3T3-L1 脂肪前駆細胞では、脂肪細胞への分化誘導刺激により分化初期に clonal expansion（クローン増殖）と呼ばれる一過性の細胞分裂を起こし細胞数が 2〜3 倍に増加する。クローン増殖期には p27<sup>Kip1</sup> の蛋白量は減少し、Skp2 の蛋白量は逆に増加するが、脂肪細胞分化過程における p27<sup>Kip1</sup> の減少の意義を検討するため、3T3-L1 脂肪前駆細胞において p27<sup>Kip1</sup> 蛋白を過剰発現させた。脂肪細胞への分化誘導刺激に対して p27<sup>Kip1</sup> 過剰発現細胞では対照細胞よりも細胞質への脂肪滴の蓄積が低下し、PPAR $\gamma$  や 442/aP2、GLUT4 などの脂肪細胞分化の指標となる遺伝子群の発現も低下し、脂肪細胞分化が著明に低下した。また p27<sup>Kip1</sup> 過剰発現細胞ではクローン増殖期の細胞分裂は抑制され、細胞数の増加も認めなかった。フローサイトメトリー解析でも p27<sup>Kip1</sup> 過剰発現細胞では対照細胞よりも細胞周期の S 期や G2-M 期に進入している細胞の割合が減少していた。つまり 3T3-L1 脂肪前駆細胞では p27<sup>Kip1</sup> はクローン増殖期の細胞増殖を介して脂肪細胞分化を制御することが示唆された。3T3-L1 脂肪前駆細胞では Skp2 依存性の p27<sup>Kip1</sup> の分解がクローン増殖期の細胞分裂を制御するが、Skp2 自体は脂肪細胞分化に関与するのかどうかを検討するため、*Skp2* 遺伝子欠損マウス（*Skp2*<sup>-/-</sup>マウス）よりマウス胎仔線維芽細胞（MEF）を分離し実験に供した。*Skp2* 遺伝子欠損 MEF（*Skp2*<sup>-/-</sup>MEF）では野生型 MEF（*Skp2*<sup>+/+</sup>MEF）と比較して p27<sup>Kip1</sup> 蛋白が著明に増加しており、分化誘導刺激に対しては脂肪細胞への分化の低下を認めたが、*Skp2*<sup>-/-</sup>MEF では *Skp2*<sup>+/+</sup>MEF と同様、分化誘導刺激による細胞数の増加は認めなかった。つまり Skp2 は細胞分裂とは独立した経路を介して脂肪細胞の分化を制御している可能性が示唆された。一方 *p27*<sup>Kip1</sup> 遺伝子欠損マウスより MEF を分離し脂肪細胞への分化誘導を行ったところ、*p27*<sup>-/-</sup>MEF では *p27*<sup>+/+</sup>MEF と比較して脂肪細胞への分化の亢進が認められたことから、*Skp2*<sup>-/-</sup>MEF で認められた脂肪細胞への分化抑制が、p27<sup>Kip1</sup> を欠失させることで脂肪細胞分化が回復するかどうかを検討した。*Skp2*<sup>-/-</sup>MEF において RNA 干渉で p27<sup>Kip1</sup> の発現を抑制させた *Skp2*<sup>-/-</sup>MEF では p27<sup>Kip1</sup> 蛋白は著明に減少したが、Skp2 欠損による脂肪細胞分化抑制は回復しなかった。つまり脂肪細胞分化過程において、p27<sup>Kip1</sup>

とは別の Skp2 標的分子が存在することが示唆された。*Skp2*<sup>-/-</sup>MEF において PPAR $\gamma$  の高親和性リガンドであるチアゾリジン誘導体のトログリタゾンを追加して脂肪細胞への分化誘導を行ったところ、脂肪細胞分化の指標となる遺伝子群の発現増加と脂肪滴の蓄積が認められたことから、Skp2 標的分子は PPAR $\gamma$  の活性化を介して脂肪細胞の分化を制御する分子であると考えられた。

Skp2 が p27<sup>Kip1</sup> 非依存性の機序を介して脂肪細胞の分化に重要な役割を果たしていることを示した。脂肪細胞の分化過程において p27<sup>Kip1</sup> 以外に Skp2 が制御する蛋白、または蛋白群に関しては未だ同定されておらず、またその蛋白が Skp2 の介する経路でどの程度、脂肪細胞の分化に寄与するのかも不明である。しかし *Skp2*<sup>-/-</sup>MEF では PPAR $\gamma$  リガンドであるトログリタゾンが脂肪細胞の分化を回復させることから、MEF の脂肪細胞分化の制御において Skp2 の下流の分子は PPAR $\gamma$  を抑制する機能を持つ蛋白ではないかと推察される。今後 Skp2 を介する脂肪細胞分化の詳細な機序が明らかとなり、脂肪細胞の増殖がもたらす肥満や肥満に関連した疾患の病態解明や創薬、治療法の開発に結びつくことが期待される。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 1 9 8 2 号	氏 名	岡 田 潮
論 文 題 目 Title of Dissertation	Skp2 promotes adipocyte differentiation via a p27Kip1-independent mechanism in primary mouse embryonic fibroblasts.  初代培養マウス胎仔線維芽細胞においてSkp2はp27Kip1非依存性の機序を介して脂肪細胞の分化を促進する		
審 査 委 員 Examiner	主 査 横 野 浩 一 Chief Examiner 副 査 饗 場 篤 Vice-examiner 副 査 中 村 俊 一 Vice-examiner		

(要旨は1, 0 0 0字～2, 0 0 0字程度)

“肥満は白色脂肪組織の過剰状態であり，2型糖尿病や心血管疾患の発症リスクを増加させることから，世界的に深刻な健康を脅かす問題となっている。肥満形成過程において白色脂肪組織の増大は，脂肪細胞の数の増加（過形成）とサイズの増大（肥大化）に起因する。脂肪細胞の数の増加は脂肪前駆細胞の増殖と，それに引き続きおこる成熟脂肪細胞への分化の結果と考えられるが，脂肪前駆細胞の増殖は，細胞周期の各時期においてサイクリンや，サイクリン依存性キナーゼ（CDK），CDK阻害因子などの蛋白の活性化・不活化により制御されている。CDK阻害因子にはCip（Kip）ファミリーとInk4ファミリーがあり，細胞が細胞周期より脱け出る際に重要とされるが，Cip（Kip）ファミリーであるp27 <sup>Kip1</sup> とp21 <sup>Cip1</sup> の遺伝子欠損マウスは，脂肪前駆細胞の増殖亢進のため脂肪細胞の過形成を呈することから，CDK阻害因子が脂肪細胞の数の制御に重要であると考えられている。SCF <sup>Skp2</sup> ユビキチンリガーゼ複合体はp27 <sup>Kip1</sup> を標的とし，26プロテアソームによって分解し細胞周期を進行させる鍵分子であるが，最近研究者らはマウスの肥満形成過程において脂肪細胞の数の増加に伴いSkp2の発現が亢進すること，さらに肥満モデルマウスにおけるSkp2欠損は脂肪細胞の数の増加が抑制されインスリン抵抗性が改善することを報告した。今回研究者は，p27 <sup>Kip1</sup> 及びSkp2遺伝子欠損マウスにおける胎仔線維芽細胞（MEF）を用いて，脂肪細胞分化制御機構におけるSkp2の役割を検討した。
脂肪細胞分化のモデルとして繁用されている3T3-L1脂肪前駆細胞では，脂肪細胞への分化誘導刺激により分化初期にclonal expansion（クローン増殖）と呼ばれる一過性の細胞分裂を起こし細胞数が2～3倍に増加する。クローン増殖期にはp27 <sup>Kip1</sup> の蛋白量は減少し，Skp2の蛋白量は逆に増加するが，脂肪細胞分化過程におけるp27 <sup>Kip1</sup> の減少の意義を検討するため，3T3-L1脂肪前駆細胞においてp27 <sup>Kip1</sup> 蛋白を過剰発現させた。脂肪細胞への分化誘導刺激に対してp27 <sup>Kip1</sup> 過剰発現細胞では対照細胞よりも細胞質への脂肪滴の蓄積が低下し，PPAR $\gamma$ や442/aP2，GLUT4などの脂肪細胞分化の指標となる遺伝子群の発現も低下し，脂肪細胞分化が著明に低下した。またp27 <sup>Kip1</sup> 過剰発現細胞ではクローン増殖期の細胞分裂は抑制され，細胞数の増加も認めなかった。フローサイトメトリー解析でもp27 <sup>Kip1</sup> 過剰発現細胞では対照細胞よりも細胞周期のS期やG2-M期に進入している

細胞の割合が減少していた。つまり 3T3-L1 脂肪前駆細胞では p27 <sup>Kip1</sup> はクローン増殖期の細胞増殖を介して脂肪細胞分化を制御することが示唆された。3T3-L1 脂肪前駆細胞では Skp2 依存性の p27 <sup>Kip1</sup> の分解がクローン増殖期の細胞分裂を制御するが、Skp2 自体は脂肪細胞分化に関与するのかどうかを検討するため、 <i>Skp2</i> 遺伝子欠損マウス ( <i>Skp2</i> <sup>-/-</sup> マウス) よりマウス胎仔線維芽細胞 (MEF) を分離し実験に供した。 <i>Skp2</i> 遺伝子欠損 MEF ( <i>Skp2</i> <sup>-/-</sup> MEF) では野生型 MEF ( <i>Skp2</i> <sup>+/+</sup> MEF) と比較して p27 <sup>Kip1</sup> 蛋白が著明に増加しており、分化誘導刺激に対しては脂肪細胞への分化の低下を認めたが、 <i>Skp2</i> <sup>-/-</sup> MEF では <i>Skp2</i> <sup>+/+</sup> MEF と同様、分化誘導刺激による細胞数の増加は認めなかった。つまり Skp2 は細胞分裂とは独立した経路を介して脂肪細胞の分化を制御している可能性が示唆された。一方 <i>p27</i> <sup>Kip1</sup> 遺伝子欠損マウスより MEF を分離し脂肪細胞への分化誘導を行ったところ、 <i>p27</i> <sup>-/-</sup> MEF では <i>p27</i> <sup>+/+</sup> MEF と比較して脂肪細胞への分化の亢進が認められたことから、 <i>Skp2</i> <sup>-/-</sup> MEF で認められた脂肪細胞への分化抑制が、p27 <sup>Kip1</sup> を欠失させることで脂肪細胞分化が回復するかどうかを検討した。 <i>Skp2</i> <sup>-/-</sup> MEF において RNA 干渉で p27 <sup>Kip1</sup> の発現を抑制させた <i>Skp2</i> <sup>-/-</sup> MEF では p27 <sup>Kip1</sup> 蛋白は著明に減少したが、 <i>Skp2</i> 欠損による脂肪細胞分化抑制は回復しなかった。つまり脂肪細胞分化過程において、p27 <sup>Kip1</sup> とは別の Skp2 標的分子が存在することが示唆された。 <i>Skp2</i> <sup>-/-</sup> MEF において PPAR $\gamma$ の高親和性リガンドであるチアゾリジン誘導体のトログリタゾンを追加して脂肪細胞への分化誘導を行ったところ、脂肪細胞分化の指標となる遺伝子群の発現増加と脂肪滴の蓄積が認められたことから、Skp2 標的分子は PPAR $\gamma$ の活性化を介して脂肪細胞の分化を制御する分子であると考えられた。
本研究は、脂肪細胞の分化に関する機能分子について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった Skp2 の分化促進機構を明らかにし、脂肪細胞の増殖がもたらす肥満や関連疾患の病態解明について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。