



Chemerin enhances insulin signaling and potentiates insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes

高橋, 路子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2009-03-09

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙3055

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003055>

※ 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	高橋 路子
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博ろ第 3055 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位授与の 日 付	平成 21 年 3 月 9 日

【 学位論文題目 】

Chemerin enhances insulin signaling and potentiates insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes(ケマリンは、3T3-L1 脂肪細胞においてインスリンシグナルを増強しインスリン依存性糖取り込みを促進する)

審 査 委 員

主 査	教 授	清野 進
	教 授	横野 浩一
	教 授	南 康博

【背景と目的】

肥満は現代人の健康を脅かす重要な問題であり、インスリン抵抗性、高血圧、脂質異常症、2型糖尿病などいわゆるメタボリックシンドロームに関連する代謝疾患に密接に関与している。脂肪組織から分泌されるアディポカインはこれらの代謝疾患の病態において重要な働きを担っている。脂肪細胞はアディポカインとして TNF- α や IL-6、ケモカインの一員でインスリン抵抗性を惹起する MCP-1 などの炎症性サイトカインも分泌する。3T3-L1 細胞は脂肪細胞へ分化する過程で多くのアディポカインを分泌するが、糖尿病やメタボリックシンドロームなど肥満と関連する疾患のメカニズムを解明する際にこれらのアディポカインの働きを理解することが重要であると考えられている。我々はこれまでに代謝を調節する新規生理活性物質を探索する目的で、培養脂肪、肝、筋肉細胞において代謝および分化刺激によって変動する遺伝子のスクリーニングを行い、いくつかの未知の分泌蛋白を同定した。その中で脂肪分化とともに発現が上昇する未知のケモカインであるケマリンを同定した。ケマリンは tazarotene-induced gene2 (TIG2) として初めて報告されたが、未分化の樹状細胞やマクロファージに発現するオーファン G 蛋白共役型受容体 (GPCR) である ChemR23 のリガンドとして最近報告された。これまでケマリンは炎症や組織損傷の際に免疫応答をコントロールする役割があると報告されているが代謝に関する役割については報告がなかった。ごく最近ケマリンは脂肪分化を調節するアディポカインであり、血清中のケマリン濃度は BMI、中性脂肪、血圧と相関があり、3T3-L1 細胞で ERK1/2 を刺激して脂肪分解を促すと報告された。今回の我々の報告によりケマリンが新規アディポカインであり、さらに 3T3-L1 脂肪細胞においてインスリンシグナルを増強しインスリン依存性糖取り込みを促進することが明らかとなった。

【方 法】

3T3-L1 脂肪細胞は脂肪分化誘導を行い 10 日目に実験に使用した。マウスを用いた動物実験は神戸大学動物実験実施規則に従って行った。脂肪細胞の分化前後で変化する遺伝子を解析するために differential display 法を行い 300 以上の分泌蛋白をスクリーニングした結果ケマリンを同定した。実際に分泌されるかどうかを確認するために全長ケマリン cDNA を V5 タグ付で Cos7 細胞に発現し、培養上清を抗 V5 抗体を用いて免疫沈降を行った。His タグ標識ケマリンをウサギに皮内注射し特異的抗体を得たのち、Immunoblot 法と吸収試験を用いて遺伝子組み換えケマリンに対する特異性を証明した。遺伝子組み換えケマリンはバキュロウイルスの系で作製した。インスリン依存性糖取り込みの測定は 3T3-L1 脂肪細胞にケマリンを添加下において RI 標識した 2-deoxy-D-glucose (DOG) を用いて行った。

【結 果】

(1) ケマリンは成熟脂肪細胞に強く発現し、上清中に分泌される 3T3-L1 脂肪細胞の分化前後で変化する遺伝子を differential display 法で解析し、候補に上が

った 318 の遺伝子の中からアディポネクチン、3 種類の未知の遺伝子を含む 12 個の分泌蛋白を選択した。その 3 種類の未知の遺伝子のうちの 1 つは 16 のシグナルペプチドを持つ 164 のアミノ酸からなる推定蛋白 (NCBI gene accession No. AK002298) で、TIG2 やケマリンとして報告されていたものであった。Northern blot 法で確認したところ 3T3-L1 脂肪細胞だけでなく 3T3F442A 脂肪細胞においても成熟脂肪細胞で強く発現していた。次に 3T3-L1 脂肪細胞から full-length cDNA をクローニングし、発現ベクターに組み込んで Cos7 細胞に発現させた。Immunoblot 法で培養上清を分析したところケマリンが上清中に分泌されていることが明らかとなり、分泌蛋白であることが判明した。

(2) ケマリンの発現は肝臓と脂肪組織で異なった調節を受けている

マウス組織でのケマリンの発現を調べた。ケマリンは肝臓、肺、下垂体、卵巣に多く認められることがこれまでに報告されていたが、今回新たに内臓脂肪や褐色脂肪を含む脂肪組織にも強く発現していることが明らかになった。このようにケマリンが *in vivo* の脂肪組織に強く存在していることはケマリンがアディポカインのひとつであることを示している。多くのアディポカインの発現は肥満や糖尿病といった代謝の変化で調節されている。そこで、我々は肥満、糖尿病モデルマウスである *db/db* マウスの肝臓と脂肪組織でのケマリンの発現を調べたところ、*db/db* マウスの肝臓ではコントロールマウスと比較してケマリンの発現量に変化がなかったが、精巣上体脂肪での発現は顕著に低下していた。このことよりケマリンの調節は組織によって異なることが明らかとなった。生体内でのケマリンの働きを明らかにするために遺伝子組み換えケマリンを作製した。さらにこの遺伝子組み換えケマリンを抗原としてウサギ免疫ケマリン特異的抗体を作製した。ケマリン特異的抗体を用いて *db/db* マウスで血清中のケマリン濃度を調べたところ著明に低下していることが明らかになった。

(3) ケマリンは分化した 3T3-L1 脂肪細胞から分泌される

ケマリン特異的抗体を用いて 3T3-L1 脂肪細胞の培養上清中にケマリンが活性型の形で分泌されることを示した。一般的にアディポカインはホルモンとして内分泌的に作用しているだけでなくオートクライン、パラクライン的にも作用している。我々は Immunoblot 法と免疫組織化学法を用いてケマリンとその受容体である ChemR23 が分化後の 3T3-L1 脂肪細胞で発現していることを確認した。

(4) ケマリンは 3T3-L1 脂肪細胞のインスリン依存性糖取り込みを促進する

3T3-L1 脂肪細胞に遺伝子組み換えケマリンを添加してインスリン刺激の前後で 2-deoxy-D-glucose の取り込みを測定した。遺伝子組み換えケマリンを 100ng/ml 添加した場合にインスリンによる糖取り込みが 41%増加した。同様に 3T3-L1 脂肪細胞に遺伝子組み換えケマリンを添加するとインスリンによる IRS-1 のチロシンリン酸化が増強された。

〔考 察〕

近年グレリン、アディポネクチンといった新規生理活性物質が次々と同定され、摂食や代謝を調節していることが明らかになってきた。我々は新規アディポカインを探索する過程でケマリンを同定した。*In vitro*でケマリンとその受容体 ChemR23 は成熟脂肪細胞に発現しており、*in vivo*ではマウスの脂肪組織に強く発現している。*db/db* マウスではケマリンの発現調節は肝臓と脂肪組織では異なっていた。また、血清中のケマリン濃度は *db/db* マウスで著明に低下していた。さらにケマリンはインスリンシグナルを増強し 3T3-L1 脂肪細胞のインスリン依存性糖取り込みを促進した。これらのことからケマリンは肥満や糖尿病の病態や成因に密接に関連している可能性があると考えられる。またケマリンは脂肪組織においてインスリン感受性を調節する新規アディポカインであることが示唆された。

最近肥満に伴い脂肪組織には慢性炎症が誘導され、その結果生じる脂肪組織からのアディポカインの発現変化やマクロファージの集積が更なる炎症やインスリン抵抗性を誘導すると考えられている。肥満は動脈硬化と同様に炎症性疾患であるという概念が広く受け入れられつつあり、このような側面から考えるとケモカインファミリーの一員であると同時に新規アディポカインであるケマリンはまさに脂肪組織において炎症やインスリン感受性を調節する重要な因子である可能性が考えられる。ごく最近ケマリンはアディポカインで脂肪細胞の分化を調節しており、血清中のケマリンレベルは BMI、中性脂肪、血圧に関連しているという報告や、ケマリンは 3T3-L1 脂肪細胞で ERK1/2 を刺激して脂肪分解を促すという報告があった。我々の報告はこれまでのものと合わせて、ケマリンが新規アディポカインであり、脂肪細胞の分化や機能を調節し、肥満、糖尿病の病態や成因に深く関わっている可能性があることを示した。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	乙 第 2055 号	氏 名	高橋 路子
論 文 題 目 Title of Dissertation	Chemerin enhances insulin signaling and potentiates insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes ケマリンは 3T3-L1 脂肪細胞においてインスリンシグナルを増強しインスリン依存性糖取り込みを促進する		
審 査 委 員 Examiner	主 査 清 野 進 Chief Examiner 副 査 南 康 博 Vice-examiner 副 査 横 野 浩 一 Vice-examiner		
審 査 終 了 日	平成 21 年 2 月 4 日		

(要旨は1, 0 0 0 字～2, 0 0 0 字程度)

〔背景と目的〕

レプチン、アディポネクチンの発見を契機として脂肪細胞が多くの新規生理活性物質を分泌し代謝を調節していることが明らかとなった。脂肪組織から分泌されるアディポカインは肥満や糖尿病などの代謝疾患の病態において重要な働きを担っている。脂肪細胞はアディポカインとして TNF- α や IL-6、MCP-1 などの炎症性サイトカインも分泌する。3T3-L1 細胞は脂肪細胞へ分化する過程で多くのアディポカインを分泌するが、糖尿病やメタボリックシンドロームなど肥満に関連する疾患のメカニズムを解明する際にこれらのアディポカインの働きを理解することが重要であると考えられている。研究者の属するグループではこれまでに代謝を調節する新規生理活性物質を探索する目的で、培養脂肪、肝、筋肉細胞において代謝および分化刺激によって変動する遺伝子のスクリーニングを行い、いくつかの未知の分泌蛋白を同定した。本研究ではその中で新規アディポカインを同定するために 3T3L1 細胞が脂肪分化する際に発現が増強する遺伝子として chemerin を同定し、代謝調節における機能を解析した。

〔方法と結果〕

(1) Chemerin は成熟脂肪細胞に強く発現し、上清中に分泌される。

3T3-L1 細胞の脂肪分化前後で変化する遺伝子を differential display 法で解析し、全長を *in vitro* あるいは *in silico* でクローニングし、シグナルペプチドを持っていると推定される未知の分子である chemerin を同定した。Northern blot 法で確認したところ分化した 3T3-L1 脂肪細胞において強く発現していた。次に 3T3-L1 脂肪細胞から full-length cDNA をクローニングし、発現ベクターに組み込んで Cos7 細胞に発現させた。Immunoblot 法で培養上清を分析したところケマリンが上清中に分泌されていることが明らかとなり、分泌蛋白であることが判明した。

(2) Chemerin の発現は肝臓と脂肪組織で異なった調節を受けている。

chemerin はマウスでは肝臓、肺、下垂体、卵巣に多く認められることがこれまでに報告されていたが、今回新たに内臓脂肪や褐色脂肪を含む脂肪組織にも強く発現していることが明らかになった。多くのアディポカインの発現は肥満や糖尿病といった代謝の変化で調節されている。肥満、糖尿病モデルマウスである *db/db* マウスの肝臓と脂肪組織でのケマリンの発現を調べたところ、*db/db* マウスの肝臓ではコントロールマウスと比較してケマリンの発現量に変化がなかったが、精巣上体脂肪での発現は顕著に低下していた。このことよりケマリンの発現調節は組織によって異なることが明らかとなった。遺伝子組み換えケマリンとケマリン特異的抗体を作製しさらに検討を行った。*db/db* マウスで血清中のケマリン濃度を調べたところ著明に低下していることが明らかになった。

(3) Chemerin は分化した 3T3-L1 脂肪細胞から分泌される。

chemerin 特異的抗体を用いて 3T3-L1 脂肪細胞の培養上清中に chemerin が活性型の形で分泌されることを示した。ヒト preprochemerin は分泌時に signal peptide が切断され更に C 端の 6 個のアミノ酸がセリンプロテナーゼにより切断されて活性型となる。免疫組織化学法を用いて解析したところ chemerin とその受容体である ChemR23 が分化後の 3T3-L1 脂肪細胞で発現していることが明らかになりオートクライン、パラクライン的に作用する可能性が示唆された。

(4) Chemerin は 3T3-L1 脂肪細胞のインスリン依存性糖取り込みを促進する。

3T3-L1 脂肪細胞に遺伝子組み換え chemerin を添加してインスリン刺激による糖の取り込みを測定した。遺伝子組み換え chemerin を 100ng/ml 添加した場合にインスリンによる糖取り込みが 41% 増加した。同様に 3T3-L1 脂肪細胞に遺伝子組み換えケマリンを添加するとインスリンによる IRS-1 のチロシンリン酸化が増強された。

〔考 察〕

肥満は動脈硬化と同様に炎症性疾患であるという概念が広く受け入れられつつあり、ケモカインは一般的に炎症や免疫反応を調節すると同時に肥満、インスリン抵抗性に関わっていることが報告されている。このような側面から考えると chemerin がケモカインファミリーの一員であるとともに、アディポカインとして脂肪組織においてインスリン感受性を調節していることは炎症と代謝調節のリンクを考える上で興味深い。他のグループから脂肪細胞の分化を促進し代謝を調節すること、3T3L1 脂肪細胞で ERK1/2 を活性化し脂肪分解を促すこと、ヒトでの血清中の chemerin レベルは BMI、中性脂肪、血圧と正の相関があることなどが報告されている。本研究はそれらの報告と合わせて、chemerin が新規アディポカインであり、脂肪細胞の分化や機能を調節し、肥満、糖尿病の病態や成因に関わっている可能性があることを示唆した。

本研究は新規アディポカインである chemerin を同定し、chemerin が 3T3-L1 脂肪細胞においてインスリンシグナルを増強し、インスリン依存性糖取り込みを促進することを明らかにした。この chemerin のアディポカインとしての同定とその作用についての重要な知見は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。

The candidate, having completed studies on the identification of chemerin as a novel adipokine and its role in the regulation of insulin signaling, with a specialty in molecular biology, and having advanced the field of knowledge in the area of metabolism, is hereby recognized as having qualified for the degree of Ph.D.(Medicine).