

学位論文題名

3T3-L1 脂肪細胞における
ガングリオシド GM3 のインスリン抵抗性への関与

学位論文内容の要旨

肥満・2型糖尿病患者の激増は近年世界的な問題となっており、その克服のため発生機序の解明が急務である。インスリン抵抗性は、過食・運動不足に伴う肥満により誘発されインスリン標的臓器でのインスリン感受性が低下した状態であり、2型糖尿病の誘因の一つである。インスリン抵抗性を伴う肥満者やインスリン抵抗性モデル動物では、脂肪組織で tumor necrosis factor (TNF) α の発現が増強している。さらに、著明なインスリン抵抗性をきたす Zucker (fa/fa) rat に可溶性 TNF レセプター IgG キメラ蛋白質を投与し TNF α を中和すると骨格筋・脂肪細胞でのインスリンレセプター及び insulin receptor substrate (IRS) -1 のチロシンリン酸化が回復することが示されている。また、in vitro でも 3T3-L1 脂肪細胞を長時間 TNF α で処理すると糖の取り込みの低下と IRS-1 のチロシンリン酸化の抑制が認められている。しかし、TNF α がインスリン抵抗性を起こす分子機構に関しては未だ不明な点が多い。

一方、p55 TNF レセプターのノックアウトマウスの肺では、ガングリオシド GM3 が減少していることが示されている。ガングリオシドは、epidermal growth factor (EGF) レセプターや platelet derived growth factor レセプターのシグナル伝達に関与しているが、インスリンレセプターについてもリンパ様細胞において GM3 が自己リン酸化を抑制する報告がある。すなわちガングリオシドはシグナル伝達の modulator としての側面を持ち、インスリン感受性低下にも関与する可能性があるが、ガングリオシドと脂肪細胞での TNF α によるインスリン抵抗性との関連性はこれまで全く検討されていない。そこで、本研究では、培養脂肪細胞での TNF α によるインスリン抵抗性発症に GM3 が関与する可能性について検討した。

方法としては、脂肪分化の性格をもつマウス線維芽細胞である 3T3-L1 を用いた。0.1 nM TNF α で処理したときの 3T3-L1 脂肪細胞に存在する主要なガングリオシドである GM3 の経時的变化を初めに検討した。細胞表面の GM3 は抗 GM3 抗体である M2592 を用いたフローサイトメトリー、細胞内 GM3 含量は Ladish らの方法を用いて測定した。GM3 合成酵素活性は、 $[^{14}\text{C}]$ で標識したシアル酸を GM3 の前駆物質であるラクトシルセラミドに添加し合成される標識された GM3 の量を GM3 合成酵素活性として測定した。GM3 合成酵素 mRNA レベルは、RT-PCR にて検討した。また、3T3-L1 脂肪細胞のインスリンレセプターと IRS-1 のチロシンリン酸化は、それぞれの抗体で免疫沈降後抗リン酸化チロシン抗体である PY20 抗体によるウエスタンブロットング法で評価した。脂肪細胞への糖の取り込みは、 $[^3\text{H}]2\text{-deoxyglucose}$ の取り込み量を測定した。インスリン結合実験は、インスリンレセプターへの $[^{125}\text{I}]$ プタ・インスリンの結合量で測定した。

3T3-L1 脂肪細胞には、GM3 と GD1a の2種類のガングリオシドが存在するが、大部分は GM3 である。フローサイトメトリーでは、TNF α 処理後 3 時間より細胞表面の GM3 の増加を認め 96 時間でも増加していた。同様に、GM3 含量と GM3 合成酵素活性も平行して増加し 96 時間の時点においていずれも増加したままであった。また、RT-PCR で検討した GM3 合成酵素 mRNA レベルも TNF α 処理により経時的増加を認め 96 時間の時点においても増加

していた。もう一つのガングリオシドである GD1a 含量は、TNF α 処理では変化を認めなかった。

脂肪細胞では、長時間 TNF α を作用させるとインスリンレセプターと IRS-1 のチロシンリン酸化が抑制されることが示されている。そこで、TNF α により増加する GM3 のインスリンシグナルへの作用を検討するために、3T3-L1 脂肪細胞に外因性の GM3 を加え、インスリンシグナルへの影響も検討した。100 μ M GM3 を 8 時間作用させた時、インスリン刺激によるインスリンレセプターと IRS-1 のチロシンリン酸化は著明に抑制された。また、100 μ M GM3 を 96 時間作用させた時のインスリン刺激による脂肪細胞の糖の取り込みも 0.1 nM TNF α で 96 時間作用させた時と同様に低下を認めた。このことから、3T3-L1 脂肪細胞では外因性の GM3 はインスリンシグナルを抑制することが示された。

次に、グルコシルセラミド由来の内在性スフィンゴ糖脂質を枯渇させることが可能であるグルコシルセラミド合成酵素阻害剤 (D-PDMP) を用い内因性 GM3 のインスリンシグナルへの影響を検討した。3T3-L1 脂肪細胞を TNF α で 96 時間処理するとインスリンレセプターのチロシンリン酸化は軽度抑制され、IRS-1 のチロシンリン酸化は著明に抑制された。しかし、TNF α と D-PDMP で同時に処理すると IRS-1 のチロシンリン酸化の抑制は回復した。この時の GM3 含量は、TNF α 処理の有無にかかわらず D-PDMP 処理群では減少していた。以上より内因性 GM3 の量的変化がインスリンシグナルに関与していると考えられた。

さらに、D-PDMP がインスリンのレセプター結合に影響を与えるか検討した。96 時間 D-PDMP で処理した 3T3-L1 脂肪細胞は、対照の 3T3-L1 脂肪細胞と比較してインスリンのレセプター結合は同程度でありインスリンのレセプター結合には影響を与えなかった。

本研究によって、3T3-L1 脂肪細胞においては、1) TNF α 処理を行うと GM3 が膜表面、細胞内でも増加し、さらに GM3 合成酵素活性とその転写レベルも亢進すること、2) 外因性の GM3 が、3T3-L1 脂肪細胞におけるインスリンシグナルを抑制すること、3) 長時間の TNF α 処理時に内因性の GM3 合成を阻害すると、TNF α による IRS-1 のチロシンリン酸化の抑制が回避されることが示された。

以上から、マウス脂肪細胞株である 3T3-L1 において長時間 TNF α 処理によるインスリン抵抗性にガングリオシド GM3 が関与していると考えられた。この結果から、肥満におけるインスリン抵抗性に GM3 が関与していることが推測され、2 型糖尿病に対する治療の標的分子の候補として、GM3 が注目される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 正 治
副 査 教 授 石 橋 輝 雄
副 査 教 授 小 池 隆 夫

学 位 論 文 題 名

3T3-L1 脂肪細胞における

ガングリオシド GM3 のインスリン抵抗性への関与

2 型糖尿病患者の激増は近年世界的な問題となっている。インスリン抵抗性は、過食・運動不足に伴う肥満により誘発されインスリン感受性が低下した状態であり、2 型糖尿病の誘因の一つである。インスリン抵抗性を伴う肥満者やそのモデル動物では、脂肪組織で tumor necrosis factor (TNF) α の発現が増強している。3T3-L1 脂肪細胞を長時間 TNF α で処理すると糖の取り込みの低下と IRS-1 のチロシンリン酸化の抑制が認められている。しかし、TNF α がインスリン抵抗性を起こす分子機構に関しては未だ不明な点が多い。

ガングリオシドは、レセプターの自己リン酸化を抑制するとい報告がある。ガングリオシドはシグナル伝達の modulator としての側面を持ち、インスリン感受性低下にも関与する可能性があるが、ガングリオシドと脂肪細胞での TNF α によるインスリン抵抗性との関連性はこれまで全く検討されていない。本研究では、培養脂肪細胞での TNF α によるインスリン抵抗性発症に GM3 が関与する可能性について検討した。

方法は、マウス由来の 3T3-L1 脂肪細胞を用いた。0.1 nM TNF α で処理した時の 3T3-L1 脂肪細胞で GM3 の経時的変化を検討した。細胞表面の GM3 はフローサイトメトリー、細胞内 GM3 含量は Ladish 法で測定した。GM3 合成酵素活性は、 $[^{14}\text{C}]$ で標識したシアル酸を用いて測定した。GM3 合成酵素 mRNA レベルは、RT-PCR にて検討した。インスリンレセプター (IR) と IRS-1 のチロシンリン酸化は、それぞれの抗体で免疫沈降後抗リン酸化チロシン抗体である PY20 抗体によるウエスタンブロッティング法で評価した。糖の取り込みは、 $[^3\text{H}]2\text{-deoxyglucose}$ の取り込み量を測定した。インスリン結合実験は、IR への $[^{25}\text{I}]$ プタ・インスリンの結合量で測定した。

フローサイトメトリーと GM3 含量、GM3 合成酵素活性、GM3 合成酵素 mRNA レベルはすべて TNF α 処理により経時的増加を認めた。

100 μM GM3 を 12 時間作用させた時、インスリン刺激による IR と IRS-1 のチロシンリン酸化は著明に抑制された。100 μM GM3 を 96 時間作用させた時のインスリン刺激による糖の取り込みも TNF α 処理時と同様に低下を認めた。

3T3-L1 脂肪細胞を TNF α で 96 時間処理すると IR のチロシンリン酸化は軽度に抑制され、IRS-1 のチロシンリン酸化は著明に抑制された。しかし、TNF α とグルコシルセラミド合成酵素阻害剤である 1-フェニル-3 イソブチルキサンチン (D-PDMP) で同時に処理すると IRS-1 のチロシンリン酸化の抑制は回復した。この時の GM3 含量は、D-PDMP 処理群では減少していた。

96 時間 D-PDMP で処理した 3T3-L1 脂肪細胞は、対照の 3T3-L1 脂肪細胞と比較して IR 結合は同程度であり IR 結合には影響を与えなかった。

以上から、マウス脂肪細胞株である 3T3-L1 において TNF α 処理によるインスリン抵抗性に ganglioside GM3 が関与していると考えられた。この結果から、肥満におけるインスリン抵抗性に GM3 が関与していることが推測され、2 型糖尿病に対する治療の標的分子の候補として、GM3 が注目される。

審査にあたり、副査小池教授より、1) 他の脂肪細胞での ganglioside の発現について、2) D-PDMP の IRS-1 以外の IRS ファミリーへの影響について、3) GM3 の作用部位について、4) TNF α で増加する GM3 に対する治療への応用について、5) GM3 の TNF レセプターシグナルへ作用するかについて質問があり、副査石橋教授より 1) GM3 のセラミド部分の構造の違いによる効果の差があるかについて、2) 細胞内 GM3 について、3) D-PDMP の作用で起こる GM3 以外の影響について、4) GM3 添加実験が有効かについて、5) TNF α 以外の物質の作用に対する影響について質問があった。主査西村教授からは、1) 内因性と外因性の GM3 の作用の違いについて、2)細胞表面と細胞内 GM3 の役割の違いについて、3) 外因性 GM3 の細胞内動態についての質問があった。申請者はこれらの質問に対して適切な解答をおこなった。

審査員一同は本研究を、脂肪細胞における GM3 のインスリン抵抗性への関与について検討した研究として高く評価し、博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有すると判定した。