

3T3-L1脂肪細胞におけるアディポカインの遺伝子発現と 分泌に対する酸化ストレスの影響

学位論文内容の要旨

【背景】肥満は心血管疾患の独立した危険因子である。近年、脂肪細胞から様々な生理活性物質が発現・分泌されることが知られるようになり、これらはアディポカインと総称される。その中にはプラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター1 (PAI-1)、レプチン、レジスチン、アディポネクチンなどが含まれる。肥満では血中PAI-1・レプチン・レジスチンの増加とアディポネクチンの低下がみられるが、PAI-1の増加は血栓形成を介して動脈硬化を促進し、アディポネクチンの低下はインスリン感受性を悪化させると共に動脈硬化を促進する。現在では、こうしたアディポカインの発現・分泌異常が肥満症例における心血管疾患増加の重要な原因と考えられており、その調節機構に注目が集まっている。

一方、酸化ストレスは蛋白・脂質・核酸の修飾を介して、癌・糖尿病・動脈硬化などの疾病に関与することが知られている。近年、心血管疾患・糖尿病を含む様々な病態において全身性の酸化ストレスマーカーの増加が報告されるようになり、その中で、尿中8イソプロスタンが他の酸化ストレスを増加させる因子で補正してもBMIと比例して増加していることから、肥満自体が酸化ストレスを増加させることが示唆された。

最近、脂肪細胞において16時間以上の酸化ストレス暴露でアディポネクチンの発現が低下することが報告された。しかし、酸化ストレスの影響については、げっ歯類の脂肪細胞で、高濃度短時間の H_2O_2 暴露と低濃度長時間の H_2O_2 暴露で、インスリンシグナルが正反対の反応を示すことが知られており、酸化ストレスの程度・暴露時間により細胞の反応に違いがあることが推定される。また、レプチン・レジスチンに対する酸化ストレスの影響については知られていない。

【目的】脂肪細胞におけるアディポカイン発現・分泌に対する酸化ストレスの影響について、低濃度長時間と高濃度短時間の2通りの方法による酸化ストレス暴露後に比較・検討する。

【方法】実験には十分に分化させた3T3-L1脂肪細胞株を用いた。脂肪細胞を高グルコース濃度で培養した時の内因性活性酸素種 (ROS) 発生量と蛋白の酸化修飾量は、それぞれNBT法、Western blot法で検討した。脂肪細胞に対する酸化ストレス暴露は、これまでインスリン様作用の報告がある H_2O_2 の高濃度短時間暴露 (100~500 μ M, 10分間) とインスリンシグナル抑制の報告がある H_2O_2 の低濃度長時間暴露 (グルコースオキシダーゼ (GO) 10~25mU/ml, 18時間) の2通りの方法を用いた (GOによる H_2O_2 産生は、25mU/ml30分暴露の培養上清中で14.8 \pm 1.5 μ Mと報告されている。)。アディポネクチン・PAI-1・レプチン・レジスチンの遺伝子発現はRT-PCR法、分泌量はELISA法で検討した。生細胞活性はXTTアッセイにより評価した。

【結果】3T3-L1脂肪細胞を高グルコース (450mg/dl) で培養したとき、低グルコース (100mg/dl)

に比べてスーパーオキシドの産生が増加しており、カルボニル化蛋白も増加していた。高グルコース培養ではアディポネクチンmRNAの発現も低下していた。

H₂O₂低濃度持続暴露の影響の検討では、GO濃度が5~25mU/mlで、GO濃度依存性にアディポネクチン、レプチン、レジスチンのmRNA量は減少したが、PAI-1 mRNA量は増加した。培養上清中へのアディポカインの分泌もmRNAの変化とほぼ同様の变化を認めた。25mU/mlのGOによるアディポネクチン・PAI-1の発現変化は、抗酸化剤のN-アセチル-L-システイン (NAC) 20mMによる前処置で抑制された。

H₂O₂高濃度短時間暴露の影響の検討では、100~500μM H₂O₂ 10分間暴露の24時間後に、H₂O₂の濃度依存性にアディポネクチン、レプチン、レジスチンの遺伝子発現は抑制され、PAI-1の発現は亢進しており、GO 18時間暴露と同様の結果となった。アディポカインの分泌もmRNAの変化と対応した変化を認めた。500μMのH₂O₂によるPAI-1・アディポネクチンの発現変化もGOによる変化の場合と同様にNACにより抑制された。500μM H₂O₂に10分間暴露後の各アディポカイン遺伝子発現の経時的変化の検討では、アディポネクチンとレジスチンのmRNA量はH₂O₂暴露後16時間までは有意な変化が起こらなかったが、レプチンmRNA量は暴露後4時間で有意に減少した。PAI-1 mRNA量は暴露後4時間から8時間の間でもっとも増加し、その後次第に減少した。

これらのアディポカイン発現変化が細胞活性の低下の影響でないことを示すために行ったXTT assayでは、10mU/mlまでのGO18時間暴露と500μMまでのH₂O₂10分間暴露で細胞活性に影響を与えなかった。

【考案】肥満症例では全身の酸化ストレスが増大していることが示されているが、それは主に脂肪組織におけるROS産生を反映していることが動物モデルで推定されている。さらに本研究において、高グルコース濃度下の脂肪細胞では内因性の酸化ストレスが増加すると推測された。そこで、本研究では、H₂O₂の高濃度短時間暴露は食後高血糖・食後高脂血症による一過性の強い酸化ストレスの増加などを、低濃度長時間暴露は肥満の他に慢性的な高血糖による持続的な酸化ストレスの増加などを想定した。

今回の酸化ストレスによる発現変化のうちアディポネクチンの低下とPAI-1の増加はともに動脈硬化促進的に作用する。本研究によりレプチン・レジスチン発現もまた酸化ストレスにより調節されることを初めて示したが、レプチンには食欲抑制作用があるので、レプチンの低下は更に肥満を助長してインスリン抵抗性を悪化させる可能性がある。レジスチンはインスリン抵抗性と関係するとされているので、レジスチンの低下は耐糖能に好影響を及ぼす可能性があるが、インスリン抵抗性と脂肪組織におけるレジスチン発現に明らかな関係を見いだせなかったとする報告も認められることから、総合すると、酸化ストレスは動脈硬化促進性にアディポカインの遺伝子発現に影響するようである。

当研究では、酸化ストレスの高濃度短時間暴露でも低濃度長時間暴露でも、動脈硬化促進的なアディポカイン発現変化を起こすことを示したが、これは糖尿病における持続性高血糖と耐糖能異常における食後のみの高血糖のいずれにおいても心血管疾患が増加することの説明となりうるかもしれない。

酸化ストレスによる遺伝子発現変化の機序はいまだ知られていないが、本研究におけるH₂O₂暴露後の遺伝子発現変化の起こる時間経過の違いから、酸化ストレスによるアディポカイン遺伝子発現調節には様々な機序が含まれることが推察される。

本研究では、生細胞活性の変化を起こす程度以下の酸化ストレスでアディポカイン発現の変化を来しているため、細胞活性変化が結果に影響したのではないと考えた。

【結語】酸化ストレスは高濃度短時間暴露でも低濃度長時間暴露でも様々なアディポカインに動脈硬化促進性の遺伝子発現変化を起こす。脂肪細胞における酸化還元状態の調節が心血管疾患の発症を防ぐ鍵となるかもしれない。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 筒 井 裕 之

副 査 教 授 西 村 正 治

学 位 論 文 題 名

3T3-L1脂肪細胞におけるアディポカインの遺伝子発現と 分泌に対する酸化ストレスの影響

欧米諸国のみならず本邦でも動脈硬化性疾患の罹病率が増加している。近年、脂肪細胞は様々な生理活性物質を発現・分泌することが知られるようになり、これらはまとめてアディポカインと総称される。その中でアディポネクチン・レプチン・レジスチン・PAI-1などは動脈硬化性疾患の発症に強く関与する。アディポネクチンは血管壁への直接的な動脈硬化抑制とインスリン増感、レプチンは食欲抑制、レジスチンはインスリン抵抗性促進、PAI-1は血栓形成を介した動脈硬化促進作用を持つ。動脈硬化性疾患の危険因子である加齢・高脂血症などでは持続的に酸化ストレスが増加しており、食後の高血糖や高中性脂肪では一過性に酸化ストレスが増加することが知られている。更に、最近、持続性の酸化ストレスがアディポネクチン・PAI-1などの発現変化に影響していることが報告された。一方、げっ歯類の脂肪細胞で持続性の酸化ストレスは細胞のインスリン抵抗性を悪化させたが、一過性の酸化ストレスは細胞のインスリンシグナルを活性化させたという報告があり、酸化ストレスは持続性と一過性で細胞への影響が異なる可能性が示されていた。そこで、今回、研究1として外因性の酸化ストレスによる脂肪細胞のアディポネクチン・レプチン・レジスチン・PAI-1発現への影響を、持続性の酸化ストレス暴露と一過性の暴露の2通りの方法で、研究2として高濃度グルコース培養液による脂肪細胞の酸化ストレス増加の有無とアディポネクチン発現変化について検討した。研究1では、持続性の酸化ストレス(5~25mU/ml glucose oxidase 18時間)が濃度依存性にアディポネクチン・レプチン・レジスチンの遺伝子発現・分泌を減少させ、PAI-1の発現・分泌を増加させ、アディポネクチン・PAI-1の発現変化は抗酸化剤NACにより改善することを示した。次に、一過性の酸化ストレス(100~500 μ M H₂O₂ 10分)も同様のアディポカイン発現・分泌変化を起こすこと、一過性の酸化ストレス暴露後のアディポカイン発現変化は各々で経時変化が異なることを示した。更に、25mU/mlのglucose oxidase暴露の場合を除くと、今回の遺伝子発現変化が細胞活性の変化によるものでないことも示された。研究2では高濃度グルコース培養液にて、脂肪細胞内の酸化ストレスが増加することをNBT法とカルボニル化蛋白のwestern blottingの2つの方法で示した。加えて、同様の高グルコース培養液でアディポネクチンの発現が低下することも示した。以上より、本研究にて酸化ストレスはレジ

スチンへの影響を除くとアディポカインの遺伝子発現・分泌を動脈硬化促進性に変化させること、これは持続性の暴露でも、一過性の暴露でも生じることを示した。臨床的には、加齢・高脂血症など動脈硬化性疾患の各危険因子で生じる持続性の酸化ストレスも、食後の高血糖や高中性脂肪などで生じる一過性の酸化ストレスもアディポカインの発現変化を介して、動脈硬化を促進している可能性があると考えられる。

審査にあたり、副査の筒井教授から1) 高グルコース培養液での脂肪細胞の酸化ストレス増加とアディポネクチン発現低下の関係、2) アディポカイン発現変化における予測される転写因子の関わりについて、次いで、主査の小池教授から1) 別のコントロール細胞による評価の必要性、2) 別の方法での細胞活性評価の必要性、3) 他の酸化ストレスを抑制させる方法、4) 臨床的に想定される酸化ストレス産生の主要な起源、について、最後に副査の西村教授から1) 一過性暴露後の遺伝子発現の経時変化の違いの理由と仮説、2) 持続性と一過性の酸化ストレスの臨床的寄与度の違い、について質問があった。いずれの質問についても、申請者は自験データと文献を引用して概ね適切に解答した。

審査員一同は、これらの成果を世界に先駆けて報告したものとして高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。