

氏名(本籍)	田尾 ゆかり (滋賀県)
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士第 522号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成18年3月24日
学位論文題目	The transcription factor AP-2 causes cell enlargement and insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes (3T3-L1脂肪細胞において、転写因子AP-2 は細胞の肥大化および、インスリン抵抗性をひき起こす)
審査委員	主査 教授 藤山 佳秀 副査 教授 清水 猛史 副査 教授 岡村 富夫

論文内容要旨

※整理番号	527	(ふりがな) 氏名	た お ゆかり 田尾 ゆかり
学位論文題目	<p>The transcription factor AP-2β causes cell enlargement and insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes</p> <p>(3T3-L1 脂肪細胞において、転写因子 AP-2β は細胞の肥大化および、インスリン抵抗性をひきおこす)</p>		
<p>【背景と目的】 肥満、すなわち脂肪細胞の肥大化が起こると、アディポサイトカイン産生異常が生じ、これがメタボリックシンドローム発症の中心的役割を果たすことが近年報告されている。しかし、脂肪細胞肥大化および機能異常の分子機構は不明である。我々は、理化学研究所の前田士郎博士らとの共同研究で、SNP (single nucleotide polymorphisms) 解析によりその遺伝子座が肥満 2 型糖尿病において頻度の高い変異を示す転写因子 AP-2β(activating protein 2 beta) を新規に同定した。本転写因子は脂肪組織に強く発現していることを見いだしたが、その役割は全く知られていない。そこで脂肪細胞における本転写因子の役割を明らかにするため、以下の実験を行った。</p> <p>【方法】 1) アデノウイルスを用いて 3T3-L1 脂肪細胞に AP-2β を過剰発現させ、その発現量をウエスタンブロット(WB)法で測定した。また、脂肪細胞肥大化への影響をオイルレッド染色にて検討した。2) 糖取り込みへの影響を³H 標識 2-デオキシグルコースを用いて測定した。また細胞の膜分画をおこない、糖輸送担体 (GLUT4) の細胞膜への移行を検討した。3) RNA 干渉を用いて内因性の AP-2β 発現を抑制し、糖取り込みを測定した。また DNA 結合能を消失した変異型 AP-2β (R225C) 過剰発現による、糖取り込みへの影響を検討した。4) 糖取り込み促進の機序を明らかにするため、糖取り込み亢進に対する各種抑制剤の効果を検討した。次にその実験により、関与が示唆された PLC (phospholipase C) および atypical PKC (protein kinase C) の活性を測定した。5) さらに、アデノウイルスを用いて PLC を過剰発現させ、糖取り込み、および atypical PKC 活性を測定した。6) PLC 活性化の機序を検討するために AP-2β によりチロシンリン酸化される蛋白を抗ホスホチロシン抗体を用いた WB 法にて検索し、候補分子を種々の特異的抗体を用いて同定した。7) インスリン作用への影響を検討するため、インスリン刺激による糖取り込みを測定し、シグナル伝達分子(インスリン受容体(IR),インスリン受容体基質(IRS-1),Akt)の蛋白発現およびリン酸化を WB 法にて検討した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

【結果】 1) アデノウイルスを用いた検討では、核内に AP-28 の過剰発現を確認した。また、オイルレッド染色にて、脂肪細胞の中性脂肪蓄積による肥大化が認められた。2) この細胞では糖取り込みが亢進し、その原因は GLUT4 の細胞膜への translocation によるものであった。3) RNA 干渉法により AP-28 の内因性の発現を抑制すると、糖取り込みが抑制された。AP-28(R225C)の過剰発現では、糖取り込みに影響はなかった。4) AP-28 過剰発現により亢進する糖取り込みは PLC および atypical PKC の各抑制剤にて抑制された。また、PLC 活性および atypical PKC 活性共に増加を認めた。5) PLC γ の過剰発現により、atypical PKC が活性化され、糖取り込みが亢進した。その亢進は atypical PKC 阻害剤にて抑制された。6) AP-28 の過剰発現により、Gab1 (Grb2 associated binding protein 1) がリン酸化され、さらに Gab1 と PLC γ の結合も増加した。AP-28 (R225C) は Gab1 リン酸化を刺激しなかった。7) インスリン刺激による糖取り込みは AP-28 過剰発現により低下した。また IR, IRS-1, Akt すべてのリン酸化が低下した。

【考察】 転写因子 AP-28 は Gab1、PLC γ 、atypical PKC を活性化し GLUT4 の translocation を介し、糖取り込みを亢進させることにより、中性脂肪の蓄積を引き起こし、脂肪細胞を肥大化させると考えられた。この作用には、本転写因子の DNA 結合能が必要であり、何らかの分子の転写を制御して行われると考えられた。一方、AP-28 は受容体レベルでインスリンシグナルを抑制することにより、インスリン抵抗性を惹起した。

【結語】 転写因子 AP-28 は、脂肪細胞を肥大化させ、さらにインスリン抵抗性を引き起こすことが判明した。このことにより本転写因子は脂肪細胞の機能異常を引き起こすことによりメタボリックシンドロームおよび 2 型糖尿病を発症させる原因遺伝子である可能性が示唆された。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	527	氏名	田尾 ゆかり
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>糖尿病発症候補遺伝子の検索により、転写因子 AP-2β が肥満 2 型糖尿病に関連のあることが新規に報告された。本研究は 3T3-L1 脂肪細胞を用いて、糖取り込み能の検討などを行い、AP-2β 過剰発現による脂肪細胞肥大化への分子機構を検討し、さらに肥大化によるアディポサイトカイン分泌異常などへの影響を検討したものである。</p> <p>その結果、脂肪細胞において AP-2β は Gab1、PLCγ、atypical PKC を活性化し、GLUT4 の translocation を介しインスリン非依存性に糖取り込みを亢進させることにより中性脂肪の蓄積を引き起こし脂肪細胞を肥大化し、アディポサイトカインの分泌異常を誘導することが明らかになった。一方 AP-2β は受容体レベルでインスリンシグナルを抑制することにより、インスリン抵抗性を惹起した。</p> <p>このように本論文は脂肪細胞における転写因子 AP-2β による脂肪細胞肥大化、およびインスリン抵抗性の分子機構を解明したものであり、博士 (医学) の学位論文に値するものと認める。</p>			
(平成 18 年 2 月 6 日)			