

氏 名	つば い ひろ あき 坪 井 宏 朗
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 519 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 生 命 薬 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	脂肪細胞におけるプロスタグランジンの機能に関する研究

論文調査委員 (主 査)
教 授 市 川 厚 教 授 佐 藤 公 道 教 授 川 寄 敏 祐

論 文 内 容 の 要 旨

近年、肥満や糖尿病など代謝異常疾患の発症に脂肪組織の重要性が注目され、脂肪組織中には油滴を蓄える脂肪細胞が存在する。脂肪細胞は、刺激に応じてレプチンや腫瘍壊死因子などの数多くのサイトカインやホルモンを発現・分泌する内分泌臓器として機能しており、このような脂肪細胞がインスリン抵抗性を示したり分化異常により細胞数が減少すると代謝異常疾患の発症に繋がる。脂肪細胞は、前駆脂肪細胞からインスリン刺激により分化して、脂質や糖の代謝酵素や脂肪細胞特異因子の発現が亢進する。プロスタグランジン (PG) は、このような脂肪細胞分化を阻害しうる因子の一つとして知られる。また、最近、アディポネクチンによる前駆細胞から脂肪細胞への分化抑制作用が非ステロイド性抗炎症薬によって阻害されることが示された。これらの事実は、PG が脂肪細胞の分化に重要な作用をしていることを示唆するが、機能する PG 受容体の種類の同定や細胞分化に伴い PG で影響を受ける遺伝子発現については十分に検討されていない。そこで、脂肪細胞の分化における PG の機能を分子レベルで明らかにすることを目的に、マウス線維芽細胞由来 3T3-L1 細胞から脂肪細胞を分化させる実験系を用いて、以下の研究を行った。

第一章 前駆脂肪細胞ならびに脂肪細胞におけるプロスタグランジン受容体の発現解析

マウス線維芽細胞由来 3T3-L1 細胞を、インスリンとデキサメタゾン、ホスホジエステラーゼ阻害剤の 1-メチル-3-ブチルキサンチン (IBMX) で 2 日間処理し、その後 5 日間インスリンを加えた培地で培養すると、オイルレッド O により染色される脂肪滴が存在し、成熟脂肪細胞様の細胞に分化した。まず、この脂肪細胞分化系を用いて、RT-PCR 法により分化誘導処理、非処理細胞における PG 受容体と合成酵素の mRNA 発現を調べた結果、PGE 受容体サブタイプである EP4 とシクロオキシゲナーゼ (COX-1, COX-2)、PGE 合成酵素の mRNA 発現が細胞分化に伴い変動することを確認した。中でも、分化前後において細胞は EP4 を発現し、PGE₂ 添加は細胞内 cAMP 量を上昇させることから、脂肪細胞への分化において EP4 受容体の重要な役割が示唆された。

前駆脂肪細胞から脂肪細胞様細胞への分化について、細胞内トリグリセリド含量を指標に検索すると、1 μ M PGE₂ あるいは cAMP の安定誘導体 dibutyryl cAMP の添加はトリグリセリド含量を有意に減少させた。一方、EP4 アンタゴニストである ONO-AE3-208 の処理はトリグリセリド含量を有意に増加させたことから、EP4 が脂肪細胞の分化に対して抑制的に働くことを明らかにした。

3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化前後における EP4 受容体 mRNA 発現量の変化を、GeneChip マイクロアレイを用いて検討したところ、脂肪細胞の EP4 発現量は、前駆細胞の 6.0 倍に上昇していた。一方、COX-1 は、分化に伴い 2-3 倍の発現低下を示したが、COX-2 は有意な発現変化を示さなかった。分化前の 3T3-L1 細胞に PGE₂ あるいは dibutyryl cAMP を処理すると、処理後 3 時間には EP4 mRNA の発現亢進が認められたことから、脂肪細胞の分化に伴う EP4 受容体 mRNA の発現亢進は、PGE₂ の EP4/cAMP 系を介した positive feedback 調節による可能性が示唆された。

第二章 脂肪細胞分化過程における EP4 受容体作用の解析

脂肪細胞分化過程において遺伝子発現パターンが大きく変化する。3T3-L1 細胞をはじめとして、脂肪細胞分化に伴い、アディポネクチンやペルオキシソーム増殖性活性化受容体 (PPAR)- γ など多くの遺伝子が発現亢進することが知られている。PGE₂ が EP4 を介してこれらのどの遺伝子発現に影響するのかを同定するために、3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化系を用いて、GeneChip マイクロアレイにより解析した。PGE₂ 処理によりその多くが発現低下を示すことが判明した。例えば、上述のアディポネクチンと PPAR- γ はいずれも数分の 1 に減少した。PPAR- γ は、それ自身が脂肪細胞分化に重要な役割を果たすことが知られることから、PGE₂ による分化抑制は、PPAR 発現抑制による可能性も考えられる。糖・脂肪酸代謝酵素群の中では、脂肪酸合成酵素、カルニチンアシル転移酵素などではほぼ分化前の発現レベルにまで抑制していた。さらにインスリン耐性に関与するレジスチンでは、PGE₂ により数十分の 1 以下のレベルにまで mRNA 発現が抑えられた。逆に、チトクロム P450、アポリポプロテイン D、インターロイキン -6 などにおいては PGE₂ 処理により数倍の発現上昇が認められた。これらの結果は、PGE₂ が EP4 を介して脂肪細胞のおそらく最終分化を抑制している可能性を示すものである。

以上の成果は前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化に際して、抑制因子として働く PGE₂ の機能を受容体および遺伝子発現から解析したものであり、PG による脂肪細胞の機能制御を考える際に重要な基礎知見となるものである。

論文審査の結果の要旨

脂肪細胞の代謝および増殖に関する研究は肥満や糖尿病などの代謝異常疾患の発症の解明に必須な基礎知見であり、重要な課題である。脂肪細胞は前駆脂肪細胞と考えられている線維芽細胞からインスリンやグルココルチコイドなどのホルモン刺激により分化すると考えられているが、近年、この脂肪細胞の分化にプロスタグランジン (PG) の関与が示唆されている。しかし、これまでの研究では PGE₂ がどのタイプの PG 受容体を介して作用するのか、また、PGE₂ の作用はどのような遺伝子の発現を伴うのかなどに関しては明らかではなかった。そこで著者はこれらの点について検討し、以下の成果を挙げた。

著者は、まず前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化を調べる *in vitro* 実験系を確立した。これは前駆脂肪細胞として 3T3-L1 を用い、細胞をインスリン、デキサメサゾン、cAMP ホスホジエステラーゼの阻害剤とともに 2 日間分化誘導刺激し、次いでインスリンのみで 6 日間培養することにより脂肪細胞様細胞へと分化させ、その分化程度を細胞内脂肪滴の出現とトリグリセライド量の増加で判定するという簡便かつ再現性の良いアッセイ系である。著者はこの系を用いて、①脂肪細胞の分化は PGE₂ で阻害され PG 合成酵素阻害剤で促進されること、② PGE₂ の阻害作用は cAMP の産生増加を介して発現すること、③脂肪細胞への分化は培地中の未知因子で活性化する COX-1 を介して産生される PGE₂ により抑制されることを発見した。これらの成果は PGE₂ が EP4 の活性化を介して脂肪細胞の分化を負に制御することを初めて示唆したものであり、関連する領域の発展に貢献する貴重な発見である。

次いで、著者は EP4 の機能を網羅的に解析するためにマイクロアレイによる解析を行った。その結果、①脂肪細胞マーカー遺伝子と糖脂質代謝酵素遺伝子に代表される多くの遺伝子の発現は脂肪細胞分化に伴い亢進するが、それらは PGE₂ 存在下での分化誘導の阻害により減少すること、逆に、②線維芽細胞や前駆脂肪細胞に特徴的な遺伝子の発現は PGE₂ 処理により増加すること、③インスリンにより増加した酵素遺伝子は PGE₂ 添加によりその発現が抑制されることなどの成果を得た。これらの成果は、PGE₂ がインスリンによる脂肪細胞への分化において遺伝子発現のレベルで拮抗的に働いている可能性を示唆するものであり、新規性の高いものである。著者はさらに PG に関連した遺伝子を調べ、COX-1 と EP4 の発現が大きく変化していることを発見した。COX-1 は脂肪細胞への分化に伴い発現低下し、PGE₂ 処理により分化が抑制されるとその発現低下は抑えられるが、EP4 は PGE₂ 処理に関わらず分化とともに増大することを明らかにした。さらに、この EP4 の発現亢進は cAMP の産生を介してインスリンによる遺伝子発現を抑制することを見出した。これらの業績は、これまで不明であった PGE₂ 脂肪細胞分化抑制作用を遺伝子発現の側面から解析したものとして評価できる。

以上の成果は、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化に際して抑制因子として働く PGE₂ の作用を、関与する受容体の同定および発現亢進する遺伝子プロファイルから解析したものであり、PGE₂ 関連医薬品を用いて脂肪細胞の代謝や増殖の制御を考える際に重要な基礎知見となるものである。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成15年2月25日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。