

学位論文の内容の要旨

学位論文題目 脂肪蓄積における脂肪細胞内ペルオキシソーム酵素カタラーゼの役割に関する研究

指導教員 桜井 光一

学位申請者 新田 侑生



肥満は肥大化した脂肪細胞が過剰に増加した状態を指す。肥満および過体重の患者は、2015年に世界で約22億人と推定され、全人口の30%を占めている。肥満は、脂質異常症、糖尿病、心血管疾患などの中心的なリスクファクターであり、2015年における肥満および過体重に関連する疾患で死亡した人数は、世界で約400万人と推定されている。肥満の蔓延は重要な問題であるにも拘らず、十分な安全性と効果を兼ね備えた肥満症治療薬はまだ得られていない。

脂質代謝に関わるオルガネラの一つであるペルオキシソームは、極長鎖脂肪酸の β 酸化およびエーテルリン脂質や胆汁酸の合成に参与する。ペルオキシソーム生合成の障害は、Zellweger症候群のような脂質代謝障害を引き起こし、血漿中の極長鎖脂肪酸レベルが著しく増加する。このことは、ペルオキシソーム機能の維持が生体内の脂質レベルおよび脂質代謝機能の恒常性にとって重要であることを示唆している。しかしながら、脂肪細胞の脂肪蓄積におけるペルオキシソームの役割についての詳細は不明である。

ペルオキシソームには種々のオキシダーゼが含まれ、多量の過酸化水素(H_2O_2)が産生されることが知られている。一方、 H_2O_2 を分解するカタラーゼは、特異的にペルオキシソームに存在し、酸化ストレスを防御している。ペルオキシソーム内の過剰な活性酸素種(ROS)レベルは、酸化ストレスによるペルオキシソーム分解を引き起こすため、カタラーゼ活性はペルオキシソームの数と機能の維持に重要である可能性が推察される。しかしながら、脂肪細胞の脂肪蓄積反応におけるペルオキシソーム酵素カタラーゼの役割は明らかでない。本研究では、マウス由来3T3-L1前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化に伴う抗酸化能の変化および脂肪の蓄積におけるカタラーゼおよびその局在オルガネラであるペルオキシソームの役割について検討した。

1. 脂肪細胞への分化に伴う抗酸化能の増加

初めに、3T3-L1 前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化に伴う抗酸化能の変化を検討した。3T3-L1 前駆脂肪細胞は鋭角な形態を示すが、分化誘導に伴い脂肪細胞の形態的特徴である円形へと変化し、それに伴い細胞内に多くの脂肪滴が観察され、分化に伴って著しく増加した。前駆脂肪細胞を H_2O_2 で 21 時間処理すると、細胞生存率は H_2O_2 濃度依存的に減少し、50%致死濃度(LD50)は 0.35 mM であった。分化 2 日目および 6 日目の脂肪細胞では、LD50 はそれぞれ 0.75 mM および >2.0 mM H_2O_2 に増加した(図 1)。これらの結果は、脂肪細胞への分化の進行に伴って酸化ストレスに対する耐性が著しく増加することを示している。

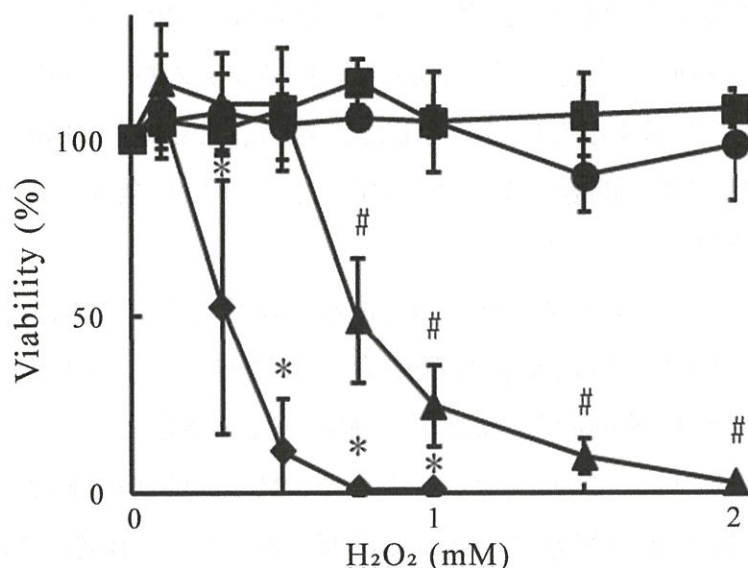


図 1 3T3-L1 細胞の分化による H_2O_2 に対する生存率の変化

3T3-L1 前駆脂肪細胞と脂肪細胞を 0-2 mM の H_2O_2 で 21 時間処理した。細胞生存率は、MTT 法を用いて求めた。3T3-L1 細胞の分化をそれぞれ◆0、▲2、●6 および■9 日目で示し、実験は 3-4 回行い、結果を平均値±標準偏差で示した。*: $P < 0.05$; 分化 0 日目の H_2O_2 未処理と比較。#: $P < 0.05$; 分化 2 日目の H_2O_2 未処理と比較

細胞内抗酸化酵素であるカタラーゼ量とその活性および細胞内抗酸化物質である GSH の GSH/GSSG 比は、分化に伴いいずれも有意に増加した(図 2)。さらに、カタラーゼ活性阻害剤 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) 処理または GSH 合成阻害剤 L-buthionine sulfoximine (BSO)の前処理は、 H_2O_2 に対する細胞感受性を増強させた(図 3)。これらの結果から、脂肪細胞への分化に伴って細胞内カタラーゼ活性および GSH 含有量が増加することが明らかとなり、細胞内の抗酸化能の上昇が示唆された。

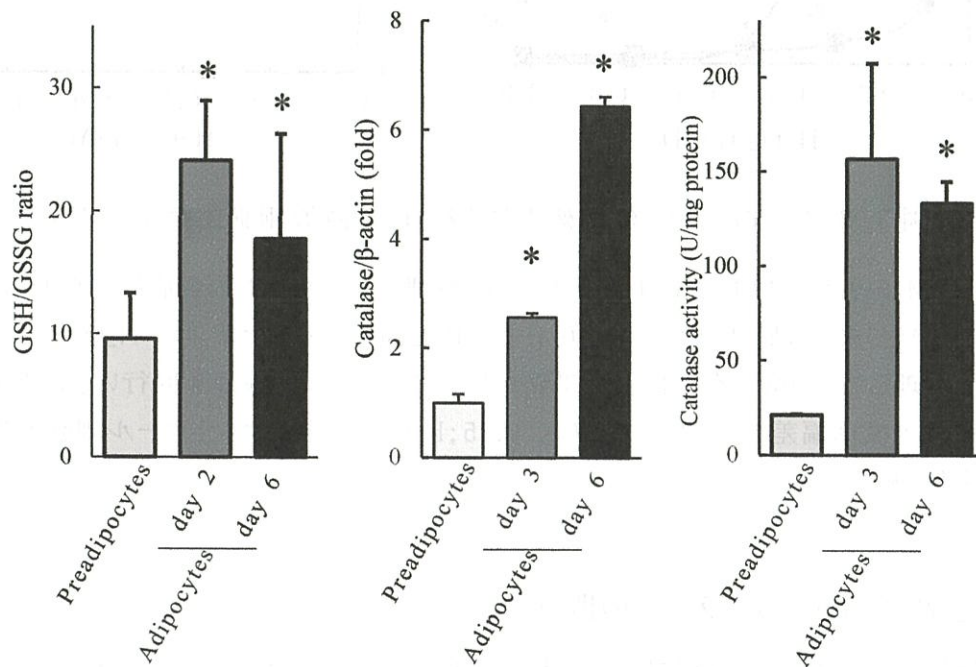


図 2 3T3-L1 細胞の分化に伴う細胞内 GSH/GSSG 比、カタラーゼ量および活性の変化

3T3-L1 前駆脂肪細胞と分化脂肪細胞における細胞内 GSH/GSSG 比およびカタラーゼ量と活性を測定した。実験は 3-7 回行い、結果を平均値±標準偏差で示した。*: $P < 0.05$; 前駆脂肪細胞と比較

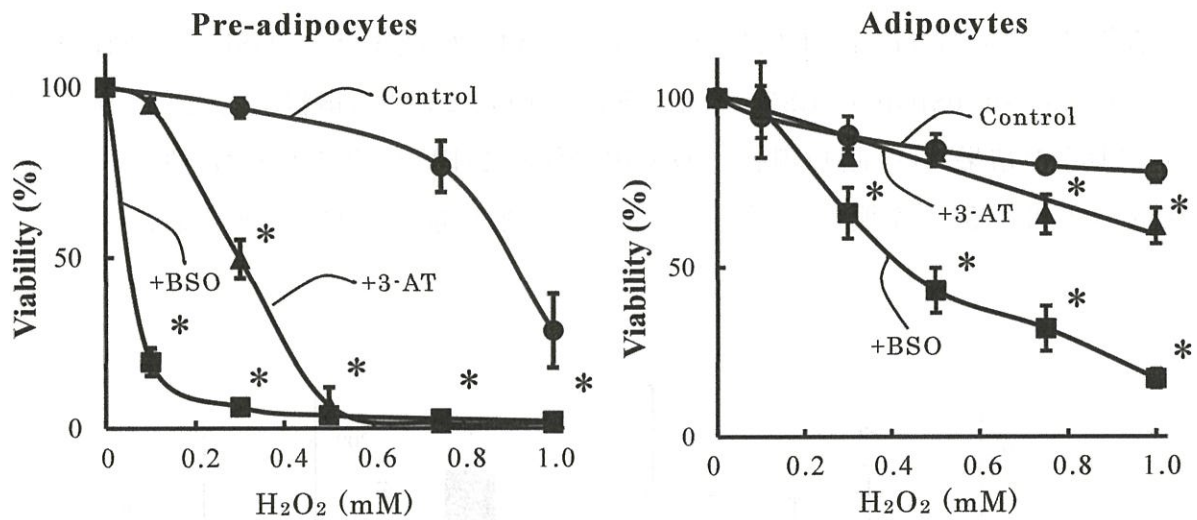


図3 3-AT または BSO 前処理による H₂O₂ 誘導細胞生存率への影響

5 mM 3-AT 添加または 10 μM BSO 前処理した 3T3-L1 前駆脂肪細胞(分化 0 日目)(A)または脂肪細胞(分化 6 日目)(B)を図中に示した濃度の H₂O₂ で 21 時間処理した。細胞生存率は、MTT 法を用いて求めた。実験は 4 回行い、結果を平均値±標準偏差で示した。*: $P < 0.05$; H₂O₂ 未処理のコントロール細胞の生存率と比較

2. 脂肪蓄積におけるカタラーゼの関与

脂肪細胞への分化に伴う脂肪の蓄積へのカタラーゼの関与について検討した。前駆脂肪細胞に対するカタラーゼ siRNA 処理は、分化に伴うカタラーゼ量の増加を有意に抑制し、脂肪滴の数とサイズを減少させ(図 4A)、脂肪の蓄積量を 36%抑制した(図 4B)。分化 6 日目の脂肪細胞におけるカタラーゼのノックダウン効率は 47%であった。カタラーゼ活性阻害剤 3-AT 処理細胞において、脂肪滴の数とサイズの減少が観察された(図 5A)。また、3-AT 処理は、濃度依存的に脂肪の蓄積を抑制し、10 mM 3-AT は脂肪の蓄積を 45%低下させたが(図 5B)、細胞数の変化は認められなかった。これらの結果から、カタラーゼ活性は、3T3-L1 前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化に伴う脂肪の蓄積に影響を及ぼすことが示唆された。

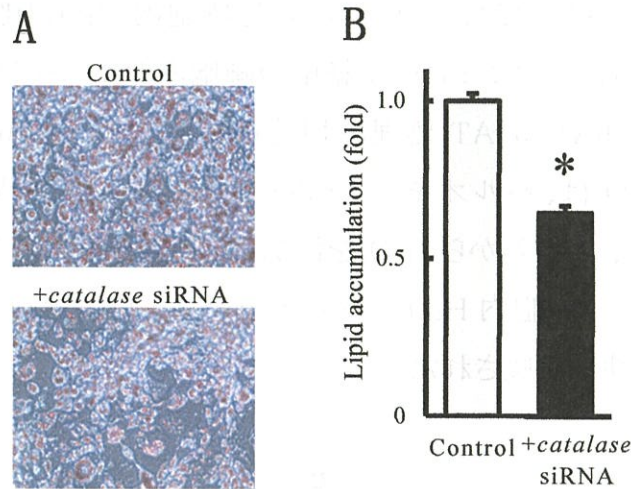


図 4 脂肪蓄積に対する *catalase* siRNA 処理の影響

3T3-L1 前駆脂肪細胞を分化誘導 2 日前に *catalase* siRNA 処理した。分化 6 日目の脂肪細胞内の脂肪滴は、Oil Red O で染色し、デジタル倒立顕微鏡像 (倍率: $\times 418$) で観察し(A)、染色液を抽出し、定量した(B)。実験は 3 回行い、結果を平均値 \pm 標準偏差で示した。*: $P < 0.05$; コントロール細胞と比較

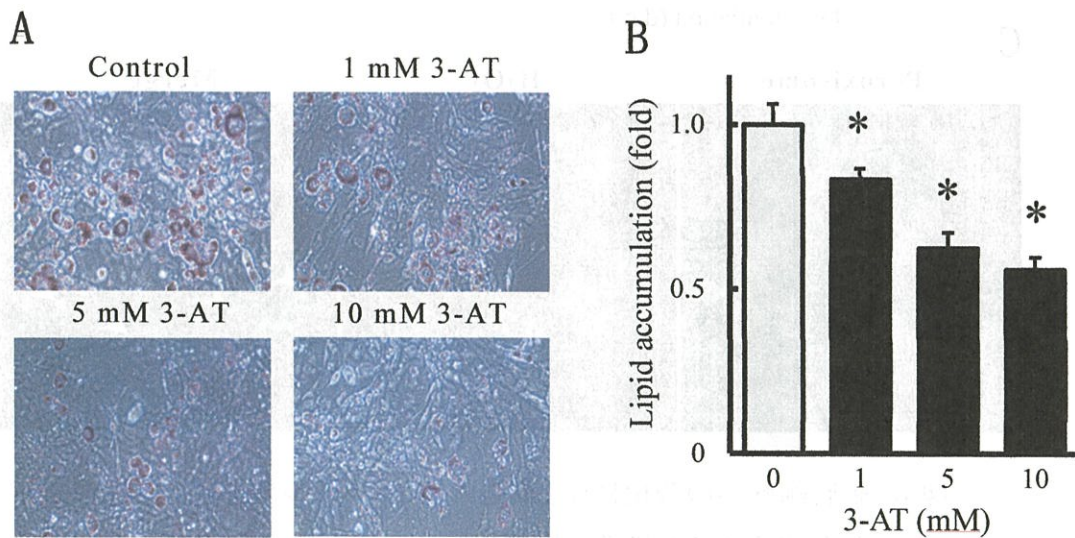


図 5 脂肪蓄積に対する 3-AT 処理の影響

前駆脂肪細胞に種々濃度 3-AT を添加して、分化 6 日目まで培養した。(A) Oil Red O で染色後、脂肪滴をデジタル倒立顕微鏡にて撮影した (倍率: $\times 418$)。 (B) 脂質含量は染色液を抽出して定量した。実験は 3 回行い、結果を平均値 \pm 標準偏差で示した。*: $P < 0.05$; 3-AT 未処理細胞と比較

ペルオキシソームは、ミトコンドリアと同様に多量の H_2O_2 を産生するが、脂肪の蓄積に対する H_2O_2 の影響は明らかでない。したがって、細胞内 H_2O_2 の脂肪の蓄積に対する影響とその局在性を検討した。コントロール細胞の細胞内 H_2O_2 レベルは、脂肪細胞への分化に伴って増加し(図 6A)、3-AT 処理によりさらに増加した(図 6B)。3-AT 処理によって増加した細胞内 H_2O_2 は、ペルオキシソームと共局在することを顕微鏡画像において確認した(図 6C)。一方、細胞外から H_2O_2 を添加した場合、脂肪の蓄積に影響を与えなかった。これらの結果から、細胞内 H_2O_2 レベルの上昇は、脂肪細胞への分化に伴う脂肪の蓄積に影響する可能性が示唆された。

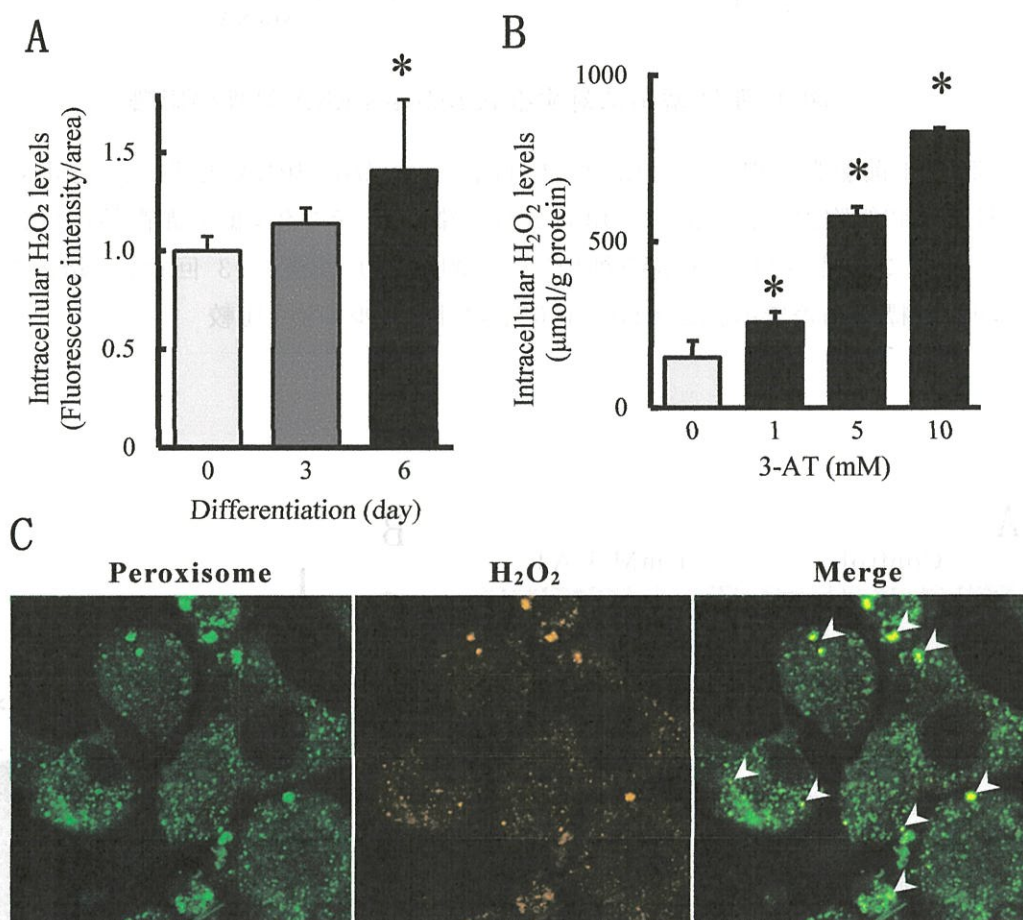


図 6 脂肪細胞への分化に伴う細胞内 H_2O_2 レベルおよびその局在に対する 3-AT 処理の影響

分化 0 日、3 日、6 日目のコントロール細胞(A)および 3-AT 処理された分化 6 日目の細胞(B)における細胞内 H_2O_2 の蛍光強度と量を測定した。(C)スプリット画像は、左にペルオキシソームの染色像、中央に細胞内 H_2O_2 の染色像、右にそのマージ画像を示した。矢印は、ペルオキシソームに共局在した細胞内 H_2O_2 を示している。データは 3-4 回の実験結果を平均±標準偏差で示した。*: $P < 0.05$; 分化 0 日目(A)または 3-AT 未処理細胞(B)と比較

3. 脂肪蓄積におけるペルオキシソームの関与

カタラーゼ活性の阻害はペルオキシソーム内 H_2O_2 レベルを増加させ、脂肪の蓄積を抑制したことから、ペルオキシソームが脂肪細胞における脂肪の蓄積に関与するかを検討した。ペルオキシソーム増殖に関わる *PEX26* のノックダウンは、3T3-L1 細胞のペルオキシソーム量の指標である PMP70 を 52% 減少させ(図 7A)、脂肪滴の数とサイズ(図 7B)、および脂肪蓄積量も有意に抑制した(図 7C)。PPAR γ アゴニスト rosiglitazone は、ペルオキシソーム量を増加させ(図 8A)、脂肪の蓄積も増加させた(図 8B)。また、3-AT 処理はペルオキシソーム量と脂肪の蓄積を減少させたが、rosiglitazone の共存はこれらの減少を回復させた(図 8A、B)。以上の結果から、ペルオキシソームは、脂肪細胞における脂肪の蓄積に関与することが示唆された。

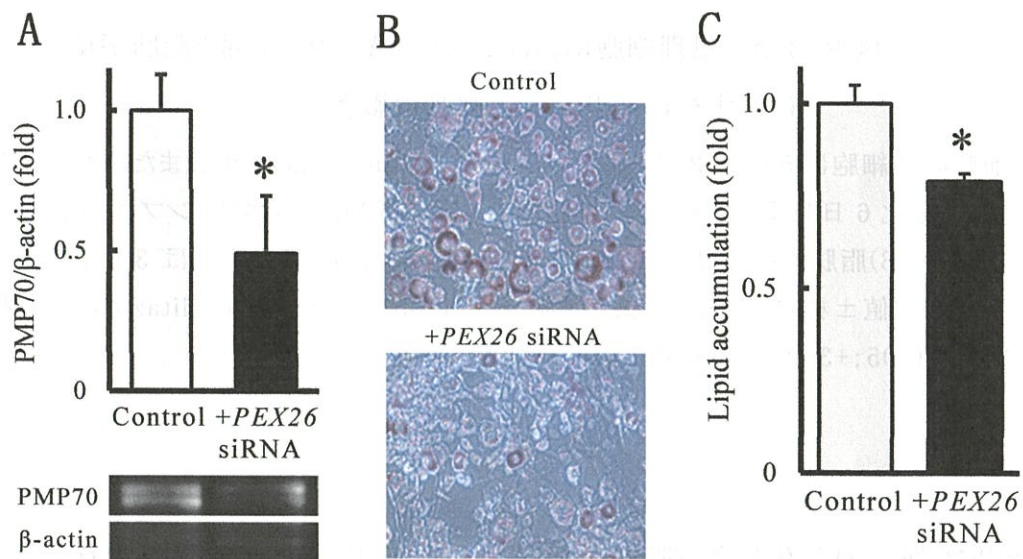


図 7 脂肪細胞のペルオキシソーム量と脂肪蓄積に対する
PEX26 ノックダウンの影響

分化誘導 2 日前に *PEX26* siRNA 処理した 3T3-L1 細胞を分化 6 日目まで培養した。PMP70(A)の定量は、ウエスタンブロット法を用いて検出し、 β -actin 量で標準化した。(B)脂肪滴は、Oil Red O で染色し、デジタル倒立顕微鏡で撮影した後(倍率: $\times 418$)、(C)染色液を抽出し、脂質含量を測定した。実験は 3 回行い、結果を平均値 \pm 標準偏差で示した。*: $P < 0.05$; コントロール細胞と比較

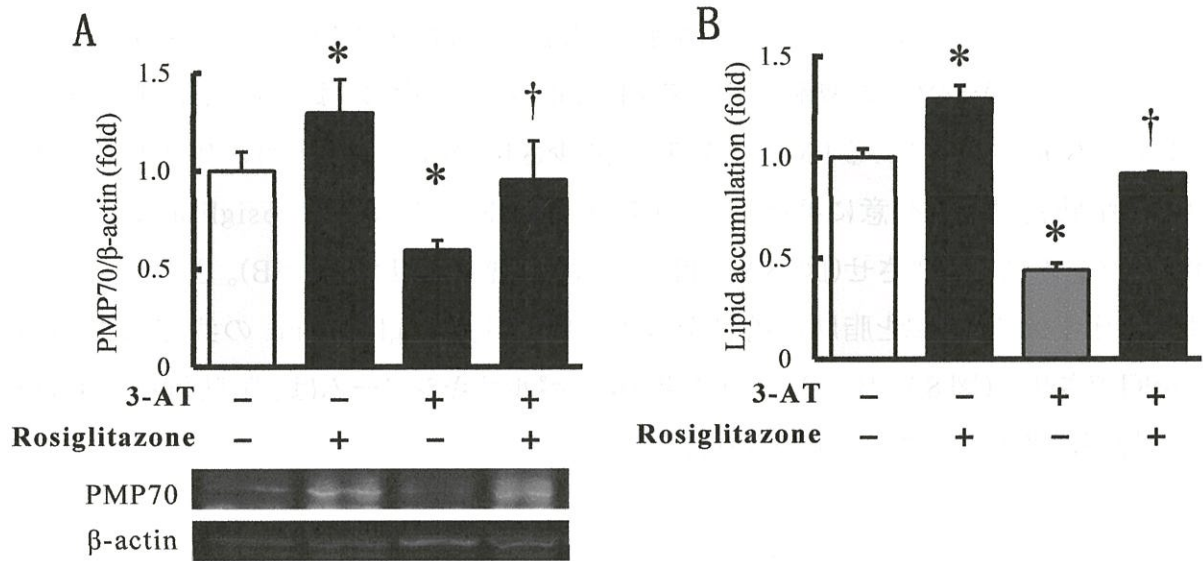


図 8 3-AT 処理細胞におけるペルオキシソーム量と脂肪蓄積
に対する rosiglitazone 処理の影響

前駆脂肪細胞に 5 mM 3-AT および 5 μM rosiglitazone を単独または共に添加して、分化 6 日目まで培養した。細胞内の PMP70(A)は、ウエスタンブロット法で定量した。(B)脂肪の蓄積は、Oil Red O で染色し、定量した。実験は 3 回行い、結果を平均値±標準偏差で示した。*: $P < 0.05$; -3-AT/-rosiglitazone と比較 †: $P < 0.05$; +3-AT/-rosiglitazone と比較

4. 脂肪細胞への分化に伴う脂肪の蓄積に対するオートファジーの関与

オートファジーは、飢餓やオルガネラの損傷に応答してタンパク質や細胞内小器官を分解するシステムである。カタラーゼ活性阻害による脂肪蓄積およびペルオキシソーム量の減少にオートファジーが関与するか検討した。オートファゴソームの発現は、コントロール細胞と比較して、3-AT 処理細胞において増加する傾向が観察された(図 9A)。オートファジー発現の指標である LC3 II / I 比は、3-AT 処理によって 1.4 倍まで増加した(図 9B)。また、オートファジー阻害剤 spautin-1 は、3-AT による脂肪蓄積の抑制を 18%回復させた(図 10)。これらの結果から、カタラーゼ活性阻害によって誘導される酸化ストレスがオートファジーを誘導し、ペルオキシソーム量の減少および脂肪蓄積の抑制を引き起こすことが示唆された。

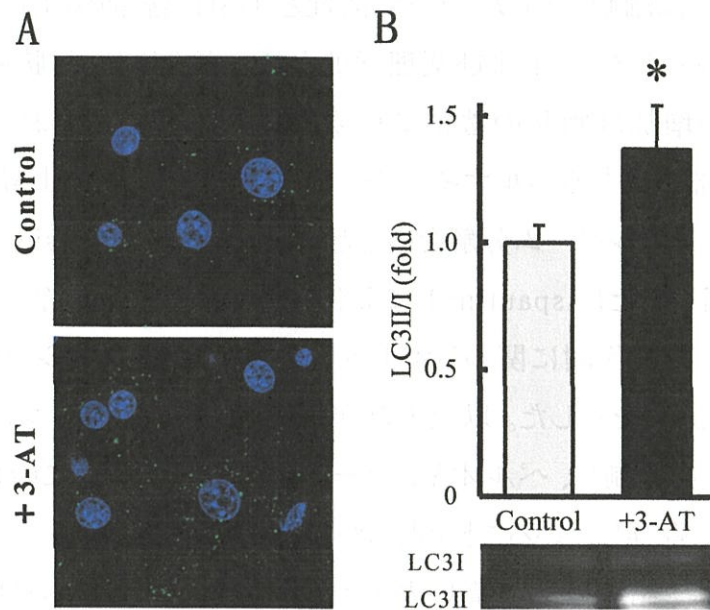


図9 オートファジー発現に対する3-ATの影響

前駆脂肪細胞を5 mM 3-ATで処理して、分化6日目まで培養した。(A) オートファゴソームはLC3Bへの免疫蛍光染色(緑色)、核はHoechst 33258染色(青色)により検出した。(B) LC3IおよびLC3IIは、ウェスタンブロット法にて検出した。実験は4回行い、結果を平均値±標準偏差で示した。*: $P < 0.05$; 3-AT未処理細胞と比較

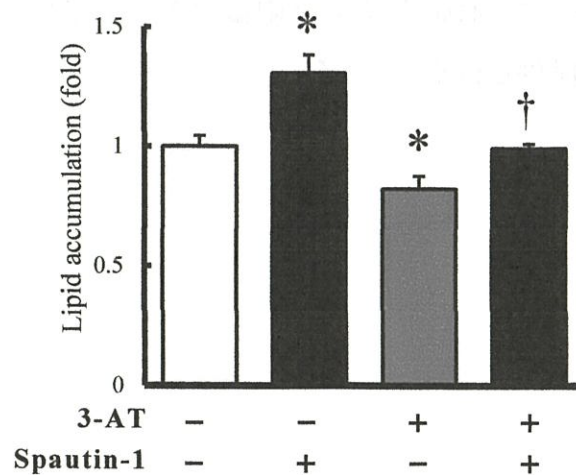


図10 脂肪蓄積に対する3-ATおよびspautin-1の影響

前駆脂肪細胞に5 mM 3-ATおよび5 μ M spautin-1を添加して、分化6日目まで培養した。脂肪の蓄積は、Oil Red Oで染色して定量した。実験は3回行い、結果を平均値±標準偏差で示した。*: $P < 0.05$; -3-AT/-spautin-1と比較 †: $P < 0.05$; +3-AT/-spautin-1と比較

結語

本研究において、3T3-L1 前駆脂肪細胞は脂肪細胞への分化に伴い抗酸化能が増加すること、これには細胞内のカタラーゼ活性と GSH 含量の増加が関与することを示した。カタラーゼのノックダウンおよび薬理的な活性抑制剤は脂肪蓄積を抑制したため、カタラーゼ活性の増加は脂肪の蓄積に重要であることが示唆された。カタラーゼ活性の抑制はその局在部位であるペルオキシソーム内 H_2O_2 レベルを上昇させ、オートファジーの発現によるペルオキシソーム分解を引き起こした。一方で、rosiglitazone によるペルオキシソーム量の回復または spautin-1 によるオートファジーの阻害は、脂肪蓄積を回復させた。このことは、脂質代謝に関わるオルガネラであるペルオキシソーム量の維持が脂肪蓄積に必要であることを示した。以上の結果は、カタラーゼはペルオキシソームで産生される H_2O_2 の蓄積を抑制し、ペルオキシソーム分解を防ぐこと、この作用は脂肪細胞における脂肪の蓄積に寄与していることを明らかにした。

本研究において、脂肪細胞は高いカタラーゼ活性と細胞内 GSH 含量を有することで抗酸化能が上昇していることが明らかとなった。このことから、上昇した抗酸化能は細胞内レドックスバランスを調節し、脂肪の蓄積機構の障害を防御している可能性が示唆された。したがって、脂肪細胞は高いカタラーゼ活性および低い細胞内 H_2O_2 レベルを有することが推察される。近年、肥満パラドックスという概念が示され、生活習慣病患者や高齢者において、標準体型や痩せ型と比較して肥満や過体重の人の寿命が長いことが疫学的調査で報告され、生体内における脂質および脂肪細胞の生理的役割が注目されている。これらの知見を統合して、本研究結果は肥満に対する予防または治療法の開発に貢献する基礎的な情報を提供し得ると考える。