

称号及び氏名 博士(理学) 陳 敏彪

学位授与の日付 2024年3月31日

論文名 The regulatory mechanisms for adipocyte hypertrophy and its impacts on  
insulin signaling in skeletal muscle  
(脂肪細胞の肥大化の制御機構と骨格筋のインスリンシグナル伝達への  
影響)

論文審査委員 主査 佐藤 孝哉  
副査 原 正之  
副査 加藤 裕教

# The regulatory mechanisms for adipocyte hypertrophy and its impacts on insulin signaling in skeletal muscle

## (脂肪細胞の肥大化の制御機構と骨格筋のインスリンシグナル伝達への影響)

陳 敏彪 (細胞生物学)

### 【緒言】

2型糖尿病は、近年増加している慢性的な代謝性疾患であり、世界中で健康問題の一つとなっている。2型糖尿病に罹患すると、インスリンの効果が低下し、高血糖状態が持続することにより、合併症のリスクが増加する。2型糖尿病の病態は複雑で、インスリンの分泌不足と組織でのインスリン感受性の低下がみられる。

生体内では、様々な臓器間の相互作用が知られているが、脂肪組織と骨格筋も、相互に調節されている。肥満に伴う脂肪細胞の増大や炎症が、炎症性サイトカインやアディポカインのバランスの崩れなどを介して、骨格筋のインスリン感受性を抑制し、全身のインスリン抵抗性の進行に寄与する。したがって、2型糖尿病の発症メカニズムの全容を解明するには、脂肪細胞と骨格筋それぞれにおけるシグナル伝達機構と相互のクロストークを解析することが重要である。

脂肪細胞におけるインスリン刺激による糖取り込みは、糖輸送担体 GLUT4 によって媒介される。3T3-L1 脂肪細胞および脂肪細胞特異的 *rac1* ノックアウト (KO) マウスを用いた所属研究室の先行研究から、インスリン応答性の GLUT4 の細胞膜移行を介する糖取り込みが、ホスホイノシチド3キナーゼ (PI3K) -タンパク質キナーゼ Akt2 経路の下流で、低分子量 GTP アーゼ Rac1 により制御されていることが明らかとなった。

また、脂肪細胞特異的 *rac1* KO マウスでは、脂肪萎縮症が見られた (図1)。そのメカニズムの解明を進めたところ、インスリン依存性の糖取り込みの減少のほか、脂質合成系酵素の発現低下が認められた。さらに、中性脂肪合成の基質である脂肪酸の取り込みが減少している可能性も考えられたので、本研究において、脂肪酸輸送担体 CD36 を介する脂肪酸取り込みにおける Rac1 の役割を解析した。

一方、骨格筋特異的 *rac1* KO マウスを作出し、骨格筋でのインスリン応答性糖取り込みの制御系においても、Rac1 を介する経路の重要性が示された。しかし、Rac1 依存性シグナル伝達が、2型糖尿病を発症した際に阻害されているかどうかは明らかにされていないので、本研究において解析を進めた。



図1 野生型 (WT) と脂肪細胞特異的 *rac1* KO マウスの脂肪組織の比較。

## 第1章 3T3-L1 脂肪細胞でのインスリン応答性糖取り込みにおける Rac1 のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) の同定

### 【目的】

白色脂肪細胞におけるインスリン応答性の GLUT4 細胞膜移行の制御系では、PI3K-Akt2 経路が重要な役割を果たしているが、そのシグナル伝達系には不明の点が多い。3T3-L1 脂肪細胞を用いた所属研究室の先行研究で、Rac1 が PI3K-Akt2 経路を介して活性化され、GLUT4 の細胞膜移行を誘導することが明らかにされた。一方、骨格筋細胞における同様のインスリン応答性の糖取り込み系においては、Rac1 の GEF として FLJ00068 が機能している。そこで、本研究では、3T3-L1 脂肪細胞を用いて、FLJ00068 が Rac1 の GEF として機能しているかを検討した。

### 【結果・考察】

3T3-L1 脂肪細胞において、siRNA を用いて FLJ00068 をノックダウンすると、インスリン刺激や恒常的活性型 Akt2 の発現による Rac1 の活性化が阻害された。また、恒常的活性型 FLJ00068 の発現によって、Rac1 が活性化された。次に、Rac1 の特異的阻害剤を用いて、FLJ00068 が Rac1 を制御するか検討した。その結果、細胞を Rac1 阻害剤で処理すると、インスリン刺激や恒常的活性型 FLJ00068 の発現による GLUT4 の細胞膜移行が阻害されることが明らかとなった。以上の結果より、Rac1 が FLJ00068 の下流に存在し、制御されていることが明らかとなった。

## 第2章 3T3-L1 脂肪細胞での CD36 を介するインスリン応答性脂肪酸取り込みにおける Rac1 の役割の検討

### 【目的】

第1章の結果より、3T3-L1 脂肪細胞においては、Rac1 がインスリン応答性糖取り込みを制御

し、GEFであるFLJ00068がRac1の活性化に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。一方、脂肪細胞においては、インスリンに応答して脂肪酸も細胞内へ取り込まれ、脂質合成の基質となることが知られている。また、マウス成熟白色脂肪細胞において、Rac1がインスリン応答性の脂肪酸取り込みに関与することが明らかとなっている。しかし、Rac1による脂肪酸取り込みの制御メカニズムには不明の点が多い。第2章では、3T3-L1脂肪細胞を用いて、CD36を介するインスリン応答性脂肪酸取り込みにおけるRac1の役割を検討することを目的とした。

#### 【結果・考察】

当研究室で開発した脂肪酸輸送担体CD36の動態解析法を図2に示す。CD36は、細胞内小胞と細胞膜に存在し、細胞膜において、長鎖脂肪酸などの受容体として機能する。CD36のN末端付近とC末端付近には膜貫通ドメインが存在し、細胞膜に局在したとき、中央のドメインが細胞外に露出する。細胞外ドメインの表面に位置する親水性ループにV5タグを挿入し、C末端に緑色蛍光タンパク質(GFP)を結合したCD36レポーターを作成した。このレポーターを発現させ、蛍光免疫染色を行うことにより、細胞内でのCD36の動態を観察できる。レポーターの発現量はGFPの蛍光強度で定量可能で、細胞膜を可溶化しない条件下では、細胞膜に局在しているレポーターのみが抗V5抗体で認識される。

恒常的活性型PI3K、恒常的活性型Akt2、恒常的活性型Rac1の発現により、CD36の細胞膜移行が誘導された。次に、Rac1の活性阻害の影響について、検討を行った。Rac1特異的阻害剤により、Rac1の活性を阻害すると、インスリン刺激、恒常的活性型PI3K、恒常的活性型Akt2によるCD36の細胞膜移行は抑制された。また、第1章で脂肪細胞でのインスリン応答性糖取り込みのシグナル伝達系において、Rac1を制御することを明らかにしたGEFであるFLJ00068の恒常的活性型もCD36の細胞膜移行を誘導したが、この作用もRac1特異的阻害剤により抑制された。一方、siRNAにより、Rac1をノックダウンすると、上記の刺激によるCD36の細胞膜移行が抑制されることが明らかとなった(図3)。以上の結果より、3T3-L1脂肪細胞において、Rac1は、PI3K-Akt2経路の下流でCD36のインスリン応答性細胞膜移行を制御することが明らかとなった。さらに、糖取り込みの場合と同様に、FLJ00068がRac1の制御に関与していることが明らかとなった。

インスリン応答性糖取り込み制御系においては、Rasファミリー低分子量GTPアーゼRafAがRac1の下流で制御されている。そこで、Rac1の下流であるRafAの役割を検討した。ドミナントネガティブ型RafAを用いた活性阻害の影響について検討を行ったところ、インスリン刺激によるCD36の細胞膜移行が抑制された。同様に、PI3K、Akt2、FLJ00068、Rac1それぞれの恒常的活性型によるCD36の細胞膜移行も抑制された。一方、siRNAにより、RafAをノックダウンすると、上記の刺激によるCD36の細胞膜移行が抑制されることが明らかとなった(図4)。以上の結果より、3T3-L1脂肪細胞において、RafAは、Rac1の下流でCD36のインスリン応答性CD36細胞膜移行の制御に関与することが明らかとなった。

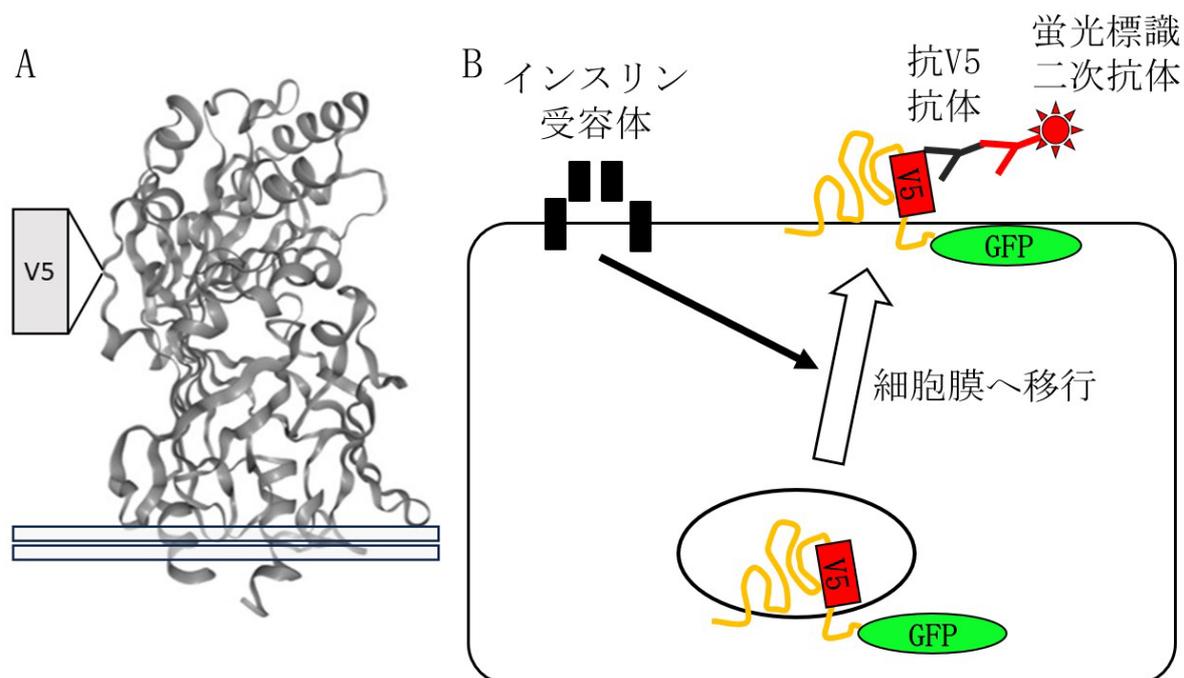


図2 脂肪酸輸送担体CD36の動態解析法。(A) CD36レポーターの細胞外ドメイン。(B) CD36の動態解析法の原理。

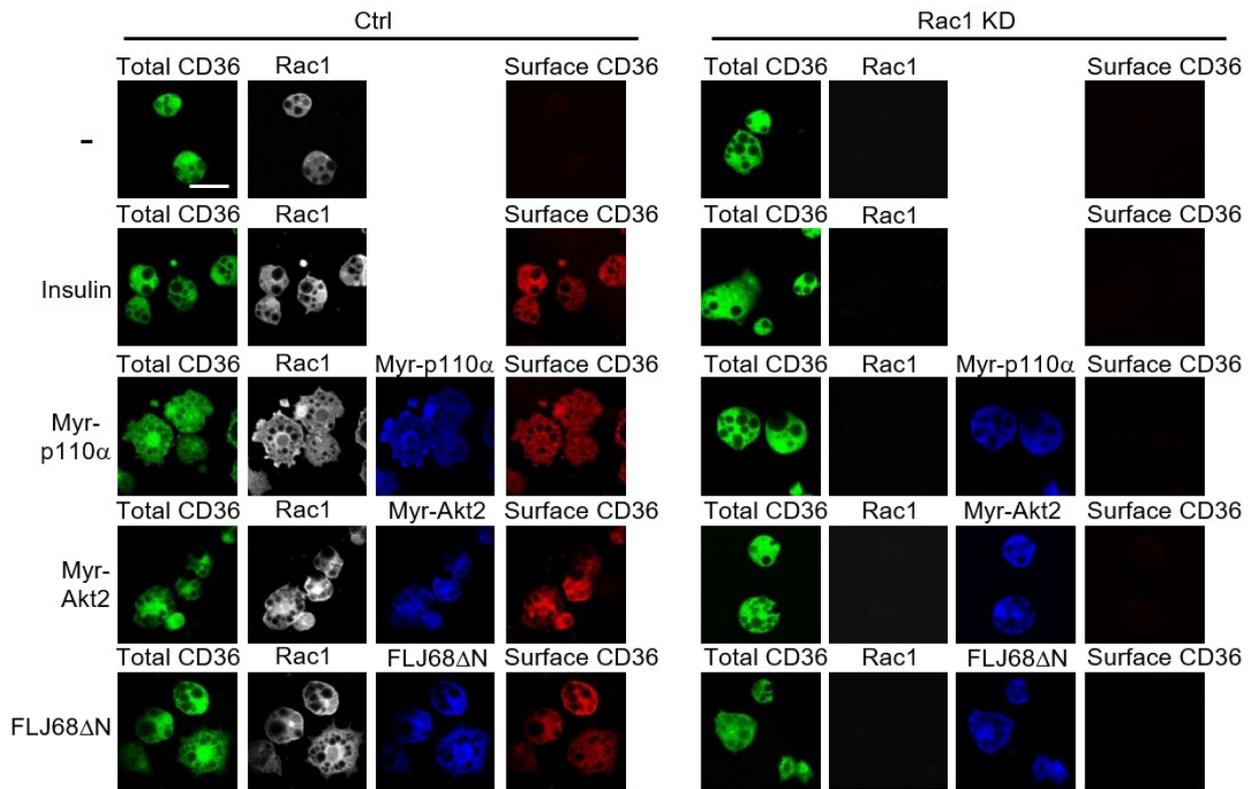


図3 恒常的活性型 PI3K (Myr-p110 $\alpha$ )、恒常的活性型 Akt2 (Myr-Akt2)、恒常的活性型 FLJ00068 (FLJ68 $\Delta$ N) により誘導される CD36 の細胞膜移行の Rac1 ノックダウンによる阻害。KD：ノックダウン。スケールバー：50  $\mu$ m。

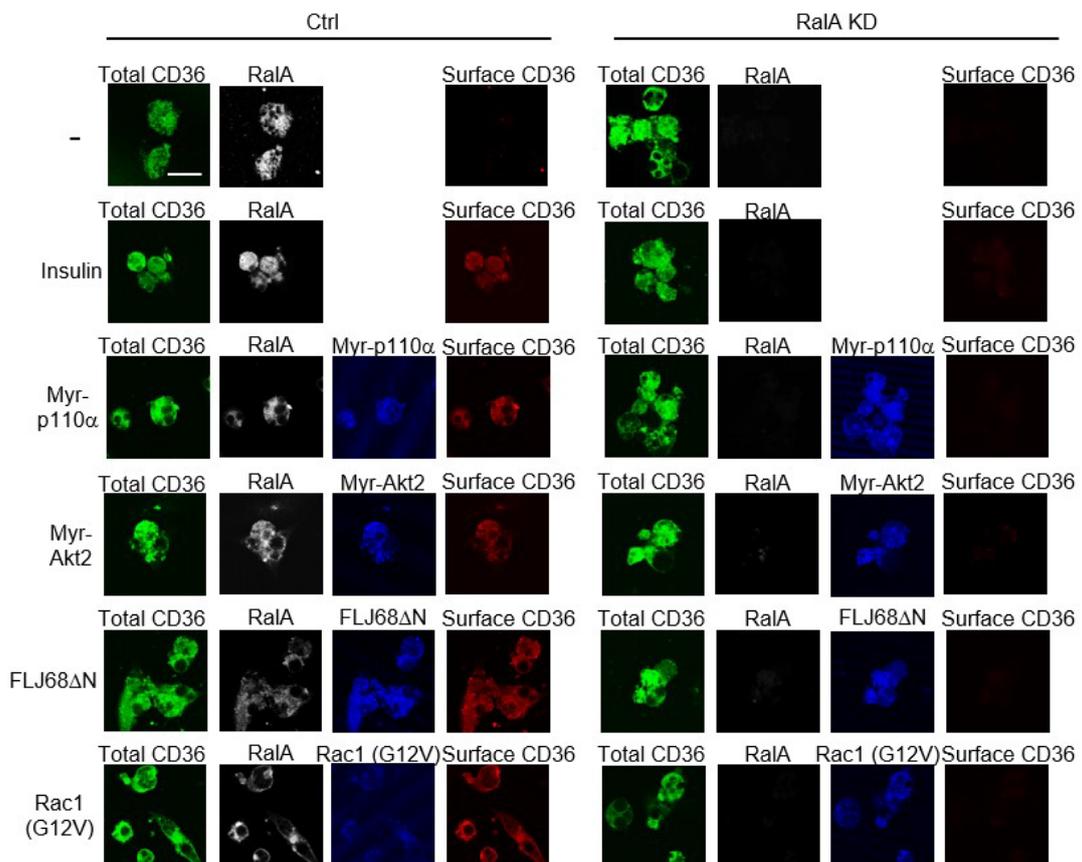


図4 恒常的活性型 PI3K (Myr-p110 $\alpha$ )、恒常的活性型 Akt2 (Myr-Akt2)、恒常的活性型 FLJ00068 (FLJ68 $\Delta$ N) により誘導される CD36 の細胞膜移行の RaiA ノックダウンによる阻害。KD：ノックダウン。スケールバー：50  $\mu$ m。

### 第3章 肥満モデルマウスの骨格筋における Rac1 を介するインスリンシグナル伝達系の障害

#### 【目的】

肥満になると、インスリン応答性が低下し、高血糖が誘導されて2型糖尿病となる。しかし、肥満により、2型糖尿病が発症するのに伴い、Rac1 を介するインスリン応答性糖取り込みシグナル伝達系が阻害されているかは明らかにされていない。そこで、肥満モデルマウスであるレプチン欠損 (*Lep<sup>ob/ob</sup>*) マウスを用いて、骨格筋における Rac1 の上流と下流のシグナル伝達が、肥満によりどのような影響を受けるかを解析した。

#### 【結果・考察】

まず、インスリン応答性の Rac1 活性化を検討したところ、*Lep<sup>ob/ob</sup>* マウスの骨格筋では完全に阻害されていることが明らかとなった。次に、*Lep<sup>ob/ob</sup>* マウスにおける Rac1 シグナル伝達の上流と下流をさらに詳細に解析した。まず、Rac1 の上流に位置する Akt2 と FLJ00068 への影響を検討した。解析の結果、*Lep<sup>ob/ob</sup>* マウスにおいては、インスリン応答性の Akt2 リン酸化が阻害され、FLJ00068 の細胞膜移行も阻害されていた。また、恒常的活性型 Akt2、恒常的活性型 FLJ00068 を発現させた場合には、Rac1 の活性化が回復した。以上の結果より、*Lep<sup>ob/ob</sup>* マウスの骨格筋においては、インスリン刺激による Akt2 の活性化は完全に阻害されるが、Akt2 の下流での Rac1 の制御系は阻害されないことが明らかとなった。

次に、Rac1 の下流に位置する RalA の活性化を解析した。その結果、*Lep<sup>ob/ob</sup>* マウスにおいては、インスリン応答性の RalA 活性化は完全に阻害されていた。しかし、恒常的活性型 Rac1 による RalA の活性化は、*Lep<sup>ob/ob</sup>* マウスにおいては、部分的に阻害されていた (図5)。さらに、恒常的活性型 Akt2、恒常的活性型 FLJ00068 による RalA の活性化は、*Lep<sup>ob/ob</sup>* マウスにおいては、部分的に阻害されていた。したがって、*Lep<sup>ob/ob</sup>* マウスの骨格筋においては、Rac1 の下流のシグナル伝達が部分的に阻害されることが明らかとなった。

以上の結果より、肥満になると、Rac1 の上流と下流における2つのメカニズムによって、骨格筋におけるインスリン応答性の糖取り込みが阻害されると考えられる。

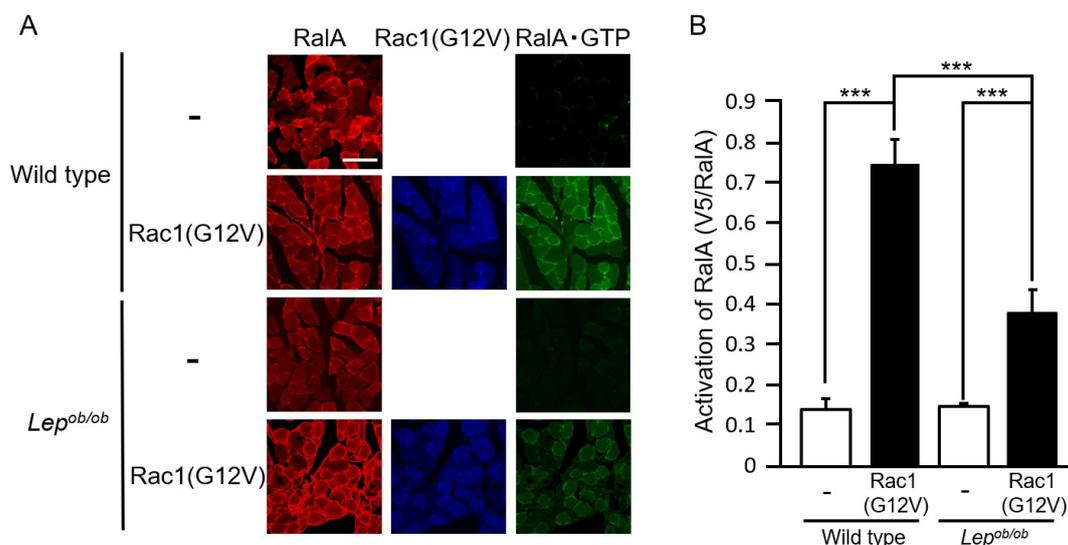


図5 *Lep<sup>ob/ob</sup>* マウスの骨格筋における恒常的活性型 Rac1 (Rac1(G12V)) による RalA の活性化。(A) 蛍光免疫染色法による RalA の活性化の検出。(B) 蛍光強度の比 (V5/RalA) を定量化したグラフ。\*\*\* $p < 0.001$ 。スケールバー: 100  $\mu$ m。

#### 【論文】

- (1) N. Takenaka, M. Nakao, K. Hasegawa, **M. P. Chan**, T. Satoh. The guanine nucleotide exchange factor FLJ00068 activates Rac1 in adipocyte insulin signaling. *FEBS Lett.* 594(24), 4370-4380, 2020.
- (2) K. Hasegawa, N. Takenaka, K. Tanida, **M. P. Chan**, M. Sakata, A. Aiba, T. Satoh. Atrophy of white adipose tissue accompanied with decreased insulin-stimulated glucose uptake in mice lacking the small GTPase Rac1 specifically in adipocytes, *Int. J. Mol. Sci.* 22(19), 10753, 2021.
- (3) **M. P. Chan**, N. Takenaka, T. Satoh. Impaired insulin signaling mediated by the small GTPase Rac1 in skeletal muscle of the leptin-deficient obese mouse. *Int. J. Mol. Sci.* 24(14), 11531, 2023.
- (4) **M. P. Chan**, N. Takenaka, Y. Abe, T. Satoh. Insulin-stimulated translocation of the fatty acid transporter CD36 to the plasma membrane is mediated by the small GTPase Rac1 in adipocytes. *Cell. Signal.* 117, 111102, 2024.

## (別紙) 学位論文審査結果の要旨

当該学位論文は、肥満による糖尿病並びに肥満を伴わない糖尿病の発症機構の解明を目指して行われた以下の研究から構成されている。

第1章では、3T3-L1脂肪細胞でのインスリン応答性糖取込みシグナル伝達系において機能する、低分子量GTPアーゼRac1を調節するグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) が同定された。インスリンが白色脂肪細胞に作用すると、糖輸送担体GLUT4が細胞膜へ移行、露出し、糖が取込まれる。所属研究室の先行研究により、このシグナル伝達系の制御因子としてRac1が同定されたが、Rac1に対するGEFは同定されていなかった。そこで、本研究では、骨格筋での同様のシグナル伝達系で機能しているGEFであるFLJ00068の関与を検討した。その結果、白色脂肪細胞においても、FLJ00068が機能していることが示された。

第2章では、脂肪酸輸送担体CD36の新規レポーターアッセイを開発し、これを用いて、3T3-L1脂肪細胞でのインスリン応答性脂肪酸取込みシグナル伝達系におけるRac1の機能を解析した。その結果、GLUT4を介する糖取込みと同様に、Rac1が重要な役割を果たし、その下流では低分子量GTPアーゼRalAが機能していることが示された。以上の結果より、インスリン応答性脂肪酸取込みの低下が、脂肪細胞特異的*rac1*ノックアウトマウスの肥満を伴わない糖尿病の発症原因の一つである可能性が示唆された。

第3章では、肥満モデルマウスであるレプチン欠損 (*Lep<sup>ob/ob</sup>*) マウスを用いて、骨格筋におけるインスリン応答性糖取込みシグナル伝達のRac1の上流と下流が、肥満によりどのような影響を受けるかを解析した。その結果、Rac1の上流のシグナル伝達系は完全に阻害される一方、Rac1の下流では、Rac1によるRalAの活性化が部分的に抑制されていた。したがって、肥満になると、Rac1の上流と下流での2つのメカニズムによって、骨格筋でのインスリン応答性の糖取込みが阻害され、糖尿病が誘発されると考えられる。

以上の研究成果は、学位論文において、詳細な実験結果に基づいて論理的に記述されており、学位論文としての申請に相応しい内容であると判断した。なお、第1章の研究は申請者が共著者である学術誌論文、第2章と第3章の研究はそれぞれ申請者が筆頭著者である学術誌論文において、既に発表されている。