

Foxo1 による摂食行動調節機構の解明

(研究課題番号 15390318)

平成 15 年度～平成 16 年度科学研究費補助金 (基盤研究 (B) (2))
研究成果報告書

平成 17 年 5 月

研究代表者 吉田 真

(旭川医科大学医学部 助手)

はしがき

肥満は、近年、我が国においても、高カロリー摂取などの食事内容の欧米化に伴い、増加しつつあり、2型糖尿病、高血圧、高脂血漿、動脈硬化症の原因として重要視されている。肥満は、生体内でのエネルギー摂取と消費の総和として、摂取エネルギー量が消費エネルギー量を上回った結果として現れる。従って、摂食調節および脂肪組織の分化、発達の分子レベルでの解明は、肥満の病態生理の解明、さらにはその治療薬開発に役立つものと考えられる。

研究組織

研究代表者：吉田 真 (旭川医科大学 医学部 助手)
平成15年12月1日より平成17年3月31日
中江 淳 (旭川医科大学 医学部 講師)
平成15年4月1日より平成15年11月30日

研究分担者：藤枝 憲二 (旭川医科大学 医学部 教授) 平成15～16年度
研究分担者：本間 研一 (北海道大学大学院 医学研究科 教授)
平成15～16年度

研究分担者：吉田 真 (旭川医科大学 医学部 助手)
平成15年6月2日より平成15年11月30日

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 15年度	6,300	0	6,300
平成 16年度	7,000	0	7,000
総計	13,300	0	13,300

研究発表

(1)学会誌発表

1. Altomonte J, Richter A, Harbaran S, Suriawinata J, **Nakae J**, Thung SN, Maseck M, Accili D, Dong H : Inhibition of Foxo1 function is associated with improved fasting glycemia in diabetic mice. Am J Physiol Endocrinol Metab 285:E718-E728, 2003
2. Hribal ML, **Nakae J**, Kitamura T, Shutter JR, Accili D : Regulation of insulin-like growth factor-dependent myoblast differentiation by Foxo forkhead transcription factors. J Cell Biol 162(4):535-541, 2003
3. 中江 淳 : 摂食と肥満の分子制御機構-脂肪組織および視床下部におけるフォークヘッド転写因子Foxo1の役割-、バイオクリニカ、19(1) : 41-46, 2004

(2)学会発表

1. **Nakae J**, **Fujieda K** : Foxo1 regulates leptin sensitivity by regulating neuropeptides gene expression in hypothalamus, 63rd Scientific Sessions The American Diabetes Association, New Orleans, U.S.A. June 13-17, 2003
2. **Nakae J**, **Fujieda K** : LXXLL motif is indispensable for function of forkhead transcription factor Foxo1, The Endocrine Society's 85th Annual Meeting, Philadelphia Pennsylvania, U.S.A., June 19-22, 2003
3. 中江淳、北村忠弘、北村ゆかり、**藤枝憲二**、Accili D : 脂肪細胞分化における forkhead transcription factor Foxo1 の役割、第 76 回日本内分泌学会学術総会、横浜、2003 年 5 月 9-11 日

4.中江淳、Accili D、Biggs W III、Arden K、藤枝憲二：Foxo1による視床下部におけるレプチン感受性の調節機構、第46回日本糖尿病学会学術総会、富山、2003年5月22-24日

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

特になし

目 次

はじめに	1
------	---

I. Foxo1 による摂食行動調節機構の解明

1. 研究目的	1
2. 緒言	1
3. 研究成果	3
4. 考察	11

II. 脂肪組織における Foxo1 の役割

1. 研究目的	12
2. 緒言	12
3. 研究成果	13
4. 考察	21

参考文献	23
------	----

研究発表	24
------	----

はじめに

肥満は、近年、我が国においても、高カロリー摂取などの食事内容の欧米化に伴い、増加しつつあり、2型糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化症の原因として重要視されている。肥満は、生体内でのエネルギー摂取と消費の総和として、摂取エネルギー量が消費エネルギー量を上回った結果として現れる。従って、摂食調節および脂肪組織の分化、発達の分子レベルでの解明は、肥満の病態生理の解明、さらにはその治療薬開発に役立つものと考えられる。

本研究では、Foxo1 の視床下部、脂肪組織での役割を明らかにすることを目的とした。

I. Foxo1 による摂食行動調節機構の解明

1. 研究目的

Foxo1 は、マウスでは主に肝臓、膵β細胞、白色および褐色脂肪組織、骨格筋に発現していることが既に報告されており、肝臓、膵β細胞において、Foxo1 がインスリン作用を抑制していることがノックアウトマウス、トランスジェニックマウスを用いて明らかにされている。さらに、中枢神経系におけるインスリン作用の抑制により、多食、肥満、肝臓での糖産生の亢進を引き起こし、視床下部におけるインスリン作用の役割が示唆されている。

本研究の目的は、視床下部におけるインスリン作用の働きを、インスリンシグナルの負の調節因子である Foxo1 の作用を中心に解析し、さらに同部位における Foxo1 の標的遺伝子を明らかにし、新たなメカニズムを解明し、肥満の治療薬の開発につなげることである。

2. 緒言

インスリンが、摂食行動の調節に何らかの役割を担っていることは 1979 年に Woods らにより報告されていた¹⁾。インスリン受容体が脳内に発現しており、インスリンの脳室内投与により摂食量、体重の減少が認められることも Woods らの仮説を支持してきた²⁾。さらに、インスリン受容体が視床下部弓状核に発現しており^{3),4)}、インスリンの脳室内投与により絶食による視床下部弓状核の Agouti 関連タンパク(Agrp)/ニューロペプチド Y(Npy)の発現量の増加が抑制されることが示された⁵⁾。さらに近年になり、神経特異的インスリン受容体ノックアウトマウスが体重増加をもたらした⁶⁾、また脳室内へのインスリン受容体のアンチセンスオリゴヌクレオチド投与により視床下部弓状核でのイン

スリン受容体発現が低下するとともに *Agrp/Npy* の発現量が増加することが示された⁷⁾。以上の知見が示すようにインスリンは、レプチンと同様に *Agrp/Npy* 発現ニューロンに抑制性のシグナルを伝達していると考えられる。

インスリンは、細胞表面のインスリン受容体に結合した後、その β サブユニットのリン酸化を引き起こし、その後、細胞内のインスリン受容体基質(Insulin Receptor Substrates, IRSs)をリン酸化する。その後、主に Phosphatidyl Inositol-3-Kinase (PI3K) をリン酸化させ、シグナルを伝達し、様々な生物学的作用を惹起していく。PI3K 抑制作用のある wortmannin や LY294002 の脳室内投与がインスリンによる摂食量や体重の減少作用を抑制することが報告されており⁸⁾、また、インスリン受容体基質の一つである *Irs-2* ノックアウトマウスが過食を呈することから⁹⁾、インスリンの摂食抑制作用には視床下部においても IRS-2 - PI3K 経路が重要な役割を果たしていることが考えられる。しかし、視床下部の IRS-2 - PI3K 経路の下流にあり、摂食を調節している分子メカニズムについては明らかになっていない。

フォークヘッド転写因子 Foxo1 は、DAF-16 の哺乳動物における相同遺伝子として注目された。Foxo1 は、インスリン、IGF-1 刺激後、PI3K 依存性に主に AKT によりリン酸化され、核内より細胞質へ移行し、その転写活性を失うインスリンシグナルの負の調節因子である^{10,11)}。Foxo1 はマウスでは主に肝臓、膵 β 細胞、白色および褐色脂肪組織、骨格筋などのインスリン反応性臓器に発現している。

3. 研究成果

a, *Foxo1* ヘテロノックアウトマウスにおけるレプチン感受性

我々は、*Foxo1*がマウス視床下部弓状核において発現していることを確認するため *in situ hybridization* を行った (図1)。その結果は、*Foxo1*が視床下部弓状核及び室傍核において発現していることを示した。

視床下部弓状核において発現している *Foxo1* の生理的意義を解析するために、コロンビア大学 Domenico Accili 博士より供与された *Foxo1*ヘテロノックアウトマウス¹²⁾の雄を用い、いくつかのパラメーターを同胞の野生型マウスと比較した。

まず、視床下部における *Foxo1*の発現量を Real time RT-PCRにより確認したところ、*Foxo1*+/-マウスでは野生型の30%に有意に減少していた (図2)。体重、一日摂食量に関しては、*Foxo1*+/-マウスは野生型マウスに対して有意差は認められなかった (図3A, 3B)。しかし、摂食時の血中レプチン濃度は *Foxo1*+/-マウスは、野生型マウスの57.4%と有意に低かった (図4)。レプチンは、脂肪組織由来の摂食抑制ペプチドであるが、その血中濃度が *Foxo1*+/-マウスで野生型マウスに対して有意に低いにもかかわらず、摂食量に違いが認められなかったことより、*Foxo1*+/-マウスではレプチン感受性が亢進していると考え、*Foxo1*+/-マウスが野生型マウスに対してレプチン投与に対する感受性が亢進しているかどうかを確認した。

レプチンを体重(g)当たり、0.005mg 腹腔内投与したところ、*Foxo1*+/-マウスでは野生型マウスと比べ有意に一日摂食量および体重が低下し、*Foxo1*+/-マウスにおいて、レプチン感受性が亢進していることが認められた (図5A, 5B)。

Foxo1 の発現が視床下部において有意に減少している *Foxo1*+/-マウスでレプチン感受性の亢進が確認されたことより、*Foxo1* は、視床下部において、レプチン感受性を低下させていると示唆された。



図1 マウス視床下部における Foxo1 に対する in situ hybridization

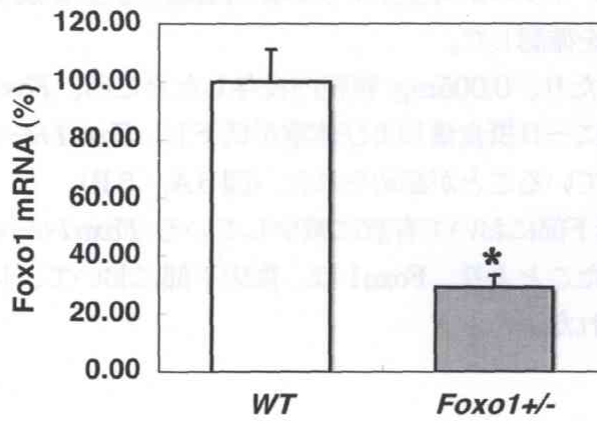


図2 視床下部における Foxo1 の発現量の比較 (* $p < 0.001$)

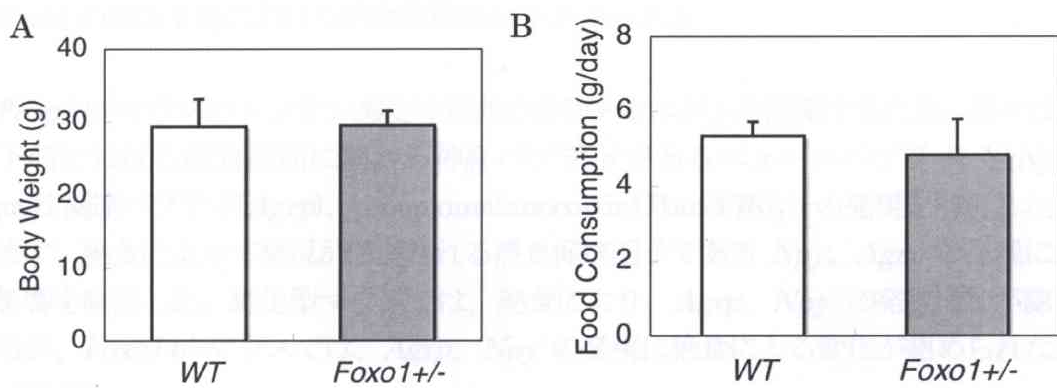


図3 *Foxo1*+/-マウス、野生型マウスの体重(A)および摂食量(B)の比較

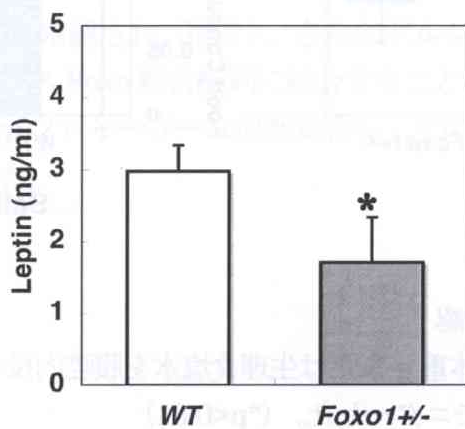


図4 血中レプチン濃度の比較
(* $p < 0.005$)

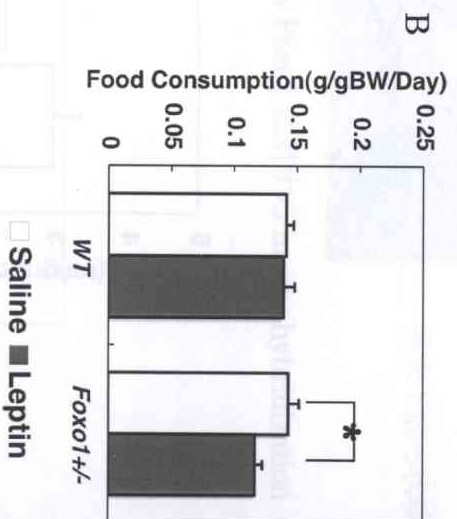
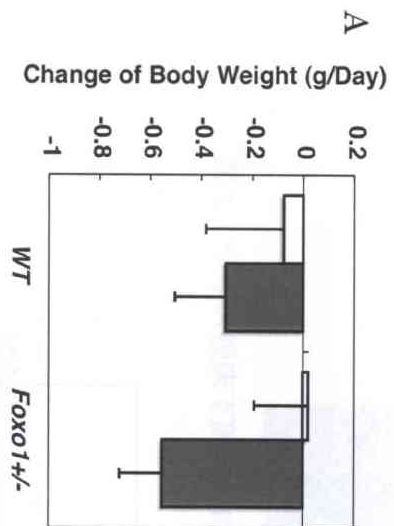


図5 レプチン感受性の確認
 レプチン 0.005mg/体重 g または生理食塩水を腹腔内投与し体重の変化(A)と一日
 摂食量(B)の変化をモニターした。(* $p < 0.01$)

b. Foxo1 の視床下部における摂食調節の分子メカニズム

Foxo1^{+/-}マウスのレプチン感受性亢進の分子メカニズムを解明するため、我々は、視床下部における摂食調節に関わる神経ペプチドであるニューロペプチド Y(*Npy*)、*Agouti* 関連ペプチド(*Agrp*)、*proopiomelanocortin*(*Pomc*)遺伝子の発現を解析した。

まず、絶食によって発現が促進される摂食促進因子である *Npy*、*Agrp* の発現に対する影響を確認した。野生型マウスでは、絶食により、*Agrp*、*Npy* の発現増加が認められるが、*Foxo1*^{+/-}マウスでは、*Agrp*、*Npy* の発現に絶食による変化が認められなかった (図6)。

次に、摂食時の *Pomc*、*Agrp*、*Npy* の発現を比較したところ、摂食抑制に働く *Pomc* の発現は、*Foxo1*^{+/-}マウスでは、野生型マウスに比べ有意に増加していたが *Agrp*、*Npy* の発現には変化が認められなかった (図7)。これらの結果は、*Foxo1* が *Agrp*、*Npy* の発現を亢進し、*Pomc* の発現を抑制している可能性を示唆した。

興味深いことにマウス *Agrp* プロモーター領域にはいくつかのコンセンサス Foxo 結合配列 (AAAC/TA) が散見された。プロモーターアッセイでは、*Foxo1* によりその活性が有意に上昇する領域が確認され (図8)、さらにゲルシフトアッセイでは、*Foxo1* が、その領域のコンセンサス Foxo 結合配列に結合することが示された (図9)。これらの結果は、*Foxo1* が *Agrp* プロモーターに直接結合し、その転写を亢進していることを示唆していると考えられた。

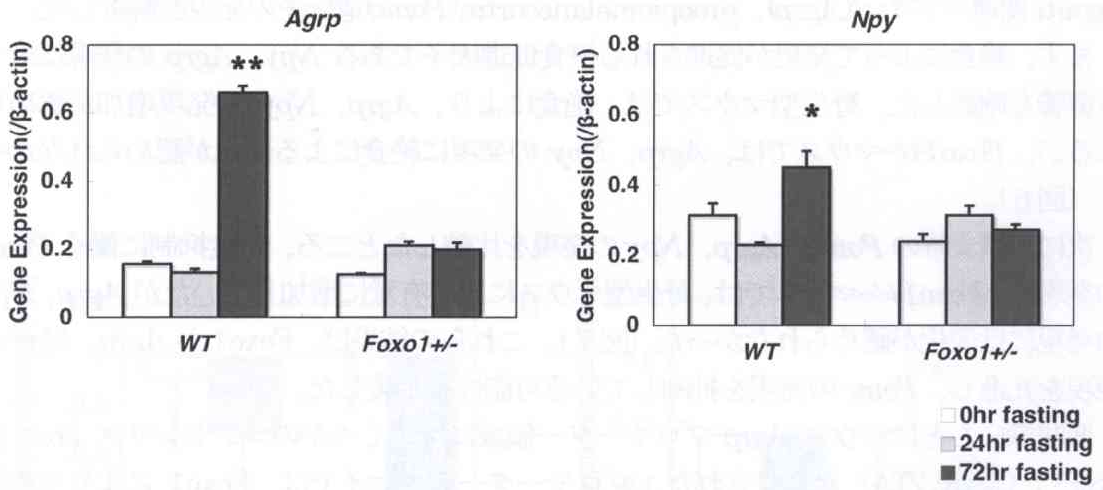


図6 絶食による *Agrp* と *Npy* の発現量の比較 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$)

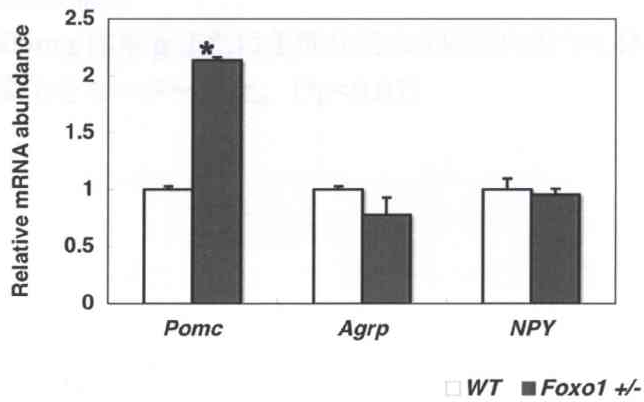
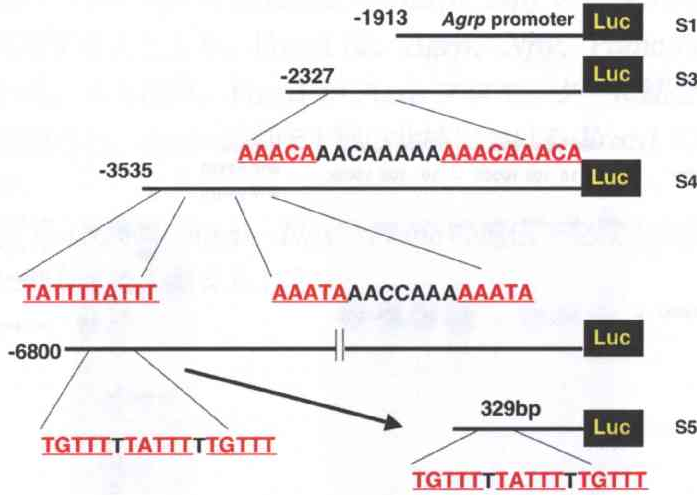


図7 摂食時における *Pomc*、*Agrp*、*Npy* の発現量の比較 (* $p < 0.001$)

A



B

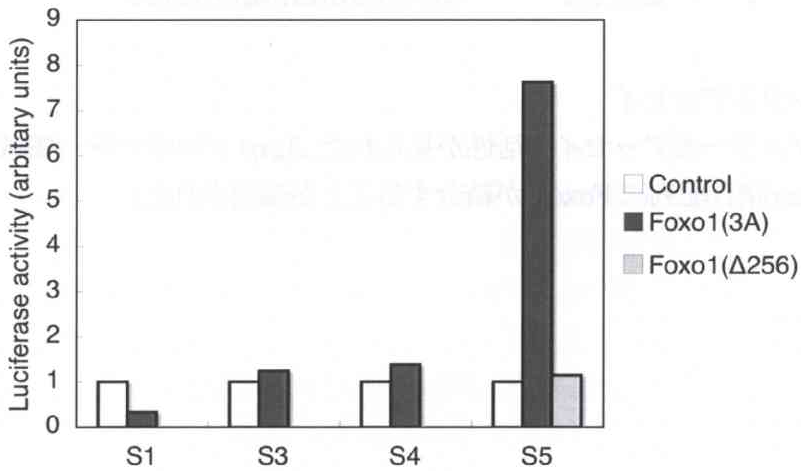


図8 プロモーターアッセイ

- A) *AgRP* プロモーターのコンセンサス Foxo 結合配列(AAAC/TA)を含む各領域とルシフェラーゼ遺伝子を結合し、レポーターアッセイ用プラスミド(S1, S3, S4, S5)を構築した。
- B) それぞれのレポーターアッセイ用プラスミドと Foxo1 の構成的活性型変異体(Foxo1(3A))、または、優性抑制型変異体(Foxo1(Δ256))を SV40 形質転換肝細胞にトランスフェクションし、プロモーターアッセイを行った。

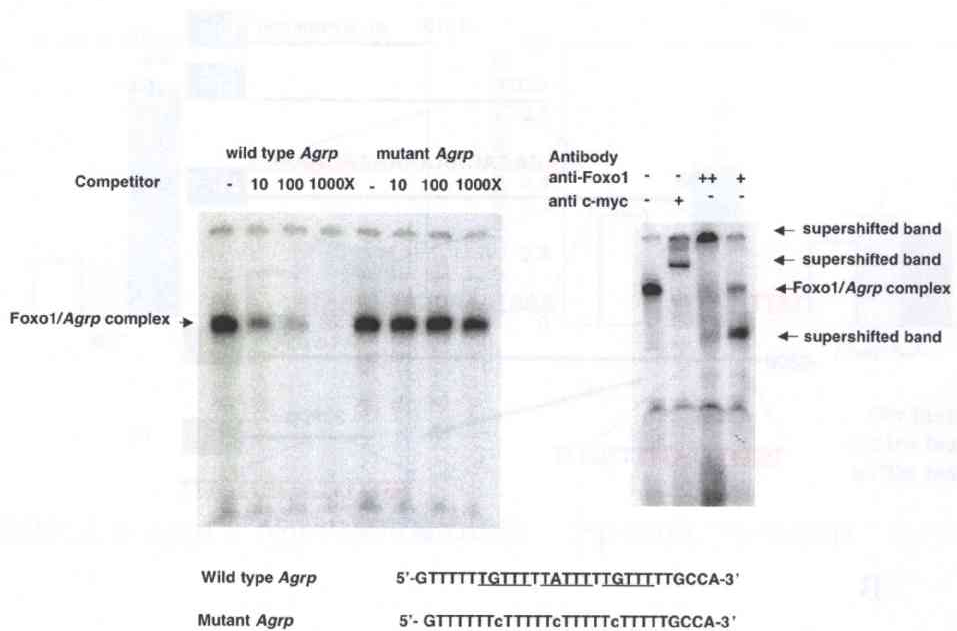


図9 ゲルシフトアッセイ
 ルシフェラーゼアッセイで活性が見られた *Agrp* プロモーター領域のコンセンサス Foxo 結合配列に Foxo1 が結合することが確認された。

4. 考察

今回の研究により、*Foxo1* がマウス視床下部弓状核で発現していること、*Foxo1*ヘテロ欠損マウスにおいてレプチン感受性が亢進していることが明らかとなった。また、*Foxo1*ヘテロ欠損マウスにおいて絶食による *Agrp*、*Npy* の発現が抑制され、摂食時の *Pomc* の発現が亢進することより、*Foxo1* は、*Agrp*、*Npy*、*Pomc* の発現を制御している可能性が示された。さらには、*Foxo1* が *Agrp* プロモーターに結合し、その転写を促進しうることが確認され、*Agrp* が視床下部弓状核における *Foxo1* の標的遺伝子であることが示唆された。

以上のことより *Foxo1* は、*Agrp*、*Npy*、*Pomc* の遺伝子発現を制御することにより、レプチン感受性に関与すると考えられた。

II. 脂肪組織における Foxo1 の役割

1. 研究目的

Foxo1 が、脂肪前駆細胞株である 3T3-F442A 細胞において P21, retinoblastoma protein (pRb) 遺伝子の発現を誘導し、clonal expansion を抑制することにより、成熟脂肪細胞への分化を阻害することは報告されている¹³⁾。Foxo1 は、マウス白色および褐色脂肪組織において、他のアイソフォームと比較し、有意に多く発現しており¹³⁾、脂肪細胞への分化の過程のみならず、成熟細胞において何らかの作用を有することが推測された。

本研究の目的は、成熟脂肪細胞、すなわちマウス白色脂肪組織、褐色脂肪組織における Foxo1 の生体内でのインスリン感受性に対する作用を明らかにし、インスリン抵抗性に関する新たなメカニズムを同定し、肥満、2型糖尿病の治療に役立てることである。

2. 緒言

Foxo1 は、フォークヘッド転写因子ファミリーに属し、約 100 個のアミノ酸からなるフォークヘッド DNA 結合部位と、その C 末端の transactivation domain を有する。Foxo1 には、3 つの protein kinase B (PKB/AKT) リン酸化部位 (threonine24, serine253, serine316) が存在し、インスリン、IGF-1 刺激により、主に phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-PKB/AKT 依存的にリン酸化を受け、核内より細胞質内へ移行し、その転写活性が失われる^{10),11)}。

Foxo1 は、マウス生体内では、肝臓、膵β細胞、白色および褐色脂肪組織、骨格筋などのインスリン反応性臓器に発現が認められ、インスリン作用に関与することが報告されている。肝臓においては、糖産生に関わる glucose-6-phosphatase (G6pase) 遺伝子発現を誘導し、肝臓におけるグルコース産生を亢進させ、膵β細胞においては、pancreatic and duodenal homeobox factor-1 (Pdx-1) 遺伝子発現を抑制することにより、末梢組織におけるインスリン抵抗性に対する代償性肥大を抑制し、インスリン抵抗性における病態生理の一端を担っていると考えられる¹²⁾。

また、脂肪細胞においては、脂肪前駆細胞株である 3T3-F442A 細胞においてサイクリン依存性キナーゼインヒビター (P21)、retinoblastoma protein (pRb) 遺伝子の発現を誘導し、clonal expansion を抑制することにより、成熟脂肪細胞の分化に関与することが報告されている¹³⁾。Foxo1 は、マウス白色および褐色脂肪組織において、他のアイソフォームと比較し、有意に多く発現しており¹³⁾、脂肪細胞への分化の過程のみならず、成熟細胞において何らかの作用を有することが考えられる。

3. 研究成果

a. 脂肪組織特異的優性抑制型 Foxo1 過剰発現トランスジェニックマウスの作製

まず我々は、脂肪組織特異的に Foxo1 の機能が抑制されたマウスを作製するため、aP2(adipocyte fatty acid binding protein)プロモーター¹⁴⁾の支配下に脂肪組織特異的に優性抑制型 Foxo1 を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製した (図10A)。得られたトランスジェニックマウスとその同腹仔の野生型マウスより精巢上体白色脂肪組織、肩胛骨間褐色脂肪組織、肝臓、筋肉のタンパク質を抽出し、ウエスタンブロッティングを行ったところ、トランスジェニックマウスの脂肪組織にのみ優性抑制型 Foxo1 が発現していることが確認できた (図10B)。優性抑制型 Foxo1 は、Foxo1 の transactivation domain を欠いた dominant negative タイプの変異体であり、アデノウイルスを用いてマウス肝臓において発現させたところ、G6pase、Pepck とも容量依存的に抑制され、内在性 Foxo1 の機能を抑制しうることが明らかになっている¹⁵⁾。また、優性抑制型 Foxo1 のアミノ酸配列が本来の Foxo1 の N 末端から 256 アミノ酸であることから、この変異型 Foxo1 を Delta256 (以下、D256 と表記する) と呼んでいる。

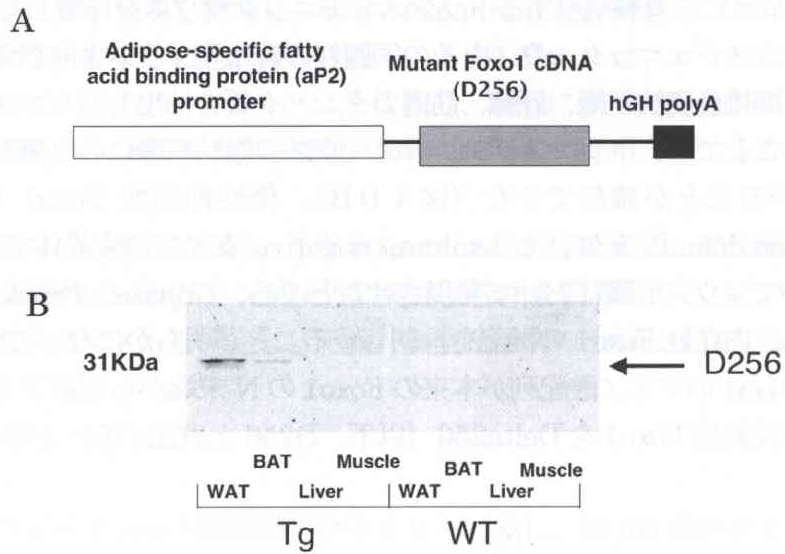


図10 導入遺伝子の構造とウエスタンブロッティングによる優性抑制型 Foxo1 の脂肪組織特異的な発現の確認。

A)導入遺伝子の構造

B)トランスジェニックマウス(Tg)及びその同腹仔の野生型マウス(WT)より精巣上体白色脂肪組織(WAT)、肩胛骨間褐色脂肪組織(BAT)、肝臓、筋肉のタンパク質を抽出し、ウエスタンブロッティングを行い、トランスジェニックマウスの脂肪組織にのみ優性抑制型 Foxo1(D256)が発現していることを確認した。

b.糖代謝の解析

離乳後 14 週間、高脂肪食を負荷したトランスジェニックマウス及び野生型マウスに普通食を負荷した野生型マウスを対照にして比較検討した。

体重、脂肪重量は、高脂肪食を負荷したトランスジェニックマウス及び野生型マウスともに対照と比べて有意に増加したが両マウス間では違いが見られなかった (図 1 1)。

摂食時の血糖値は、違いが見られなかったが、血漿インスリン濃度において、野生型のマウスが対照に対して有意に増加し、高インスリン血漿を呈しているにもかかわらずトランスジェニックマウスでは、若干の増加を認めるのみであった (図 1 2)。また、絶食時の血糖値もトランスジェニックマウスでは、正常値を保っていた (図 1 3)。

さらに、腹腔内糖負荷試験 (IPGTT)、インスリン負荷試験 (ITT) の結果、野生型マウスでは、対照に対して有意な耐糖能及びインスリン感受性の低下がみられたが、トランスジェニックマウスでは、有意差がみられず、耐糖能及びインスリン感受性の低下が抑制されていた (図 1 4)。

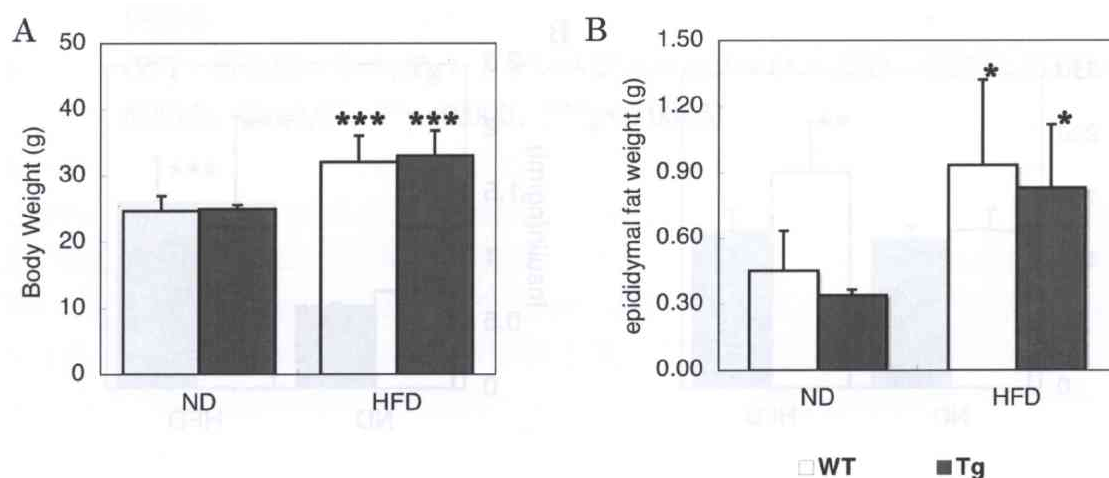


図 1 1 体重(A)と脂肪重量(B)

(WT: 野生型マウス、Tg: トランスジェニックマウス、ND: 普通食、HFD: 高脂肪食、* $p<0.005$ 、*** $p<0.0005$)

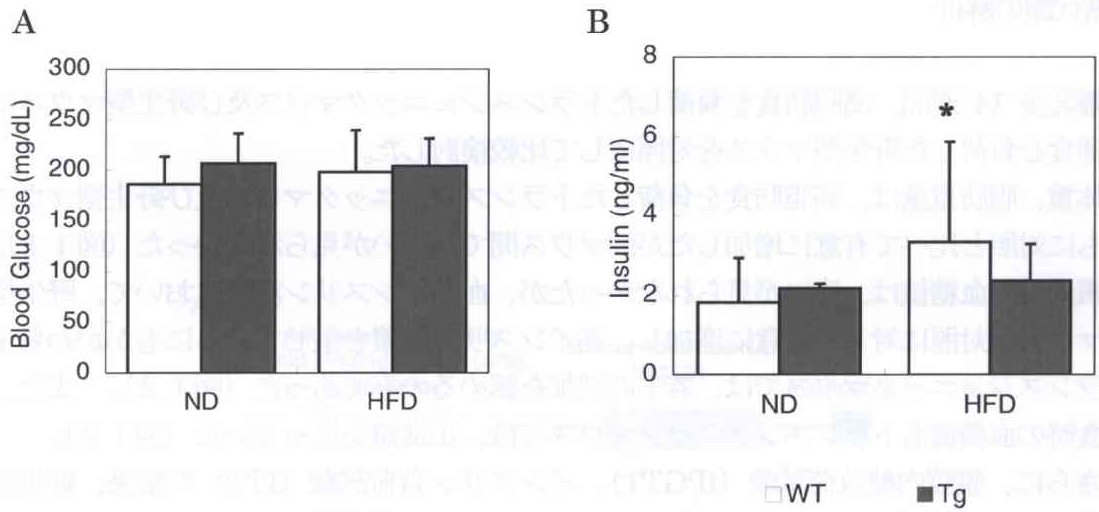


図 1.2 摂食時の血糖値(A)と血漿インスリン濃度(B)
(WT: 野生型マウス、Tg: トランスジェニックマウス、ND: 普通食、HFD: 高脂肪食、* $p < 0.05$)

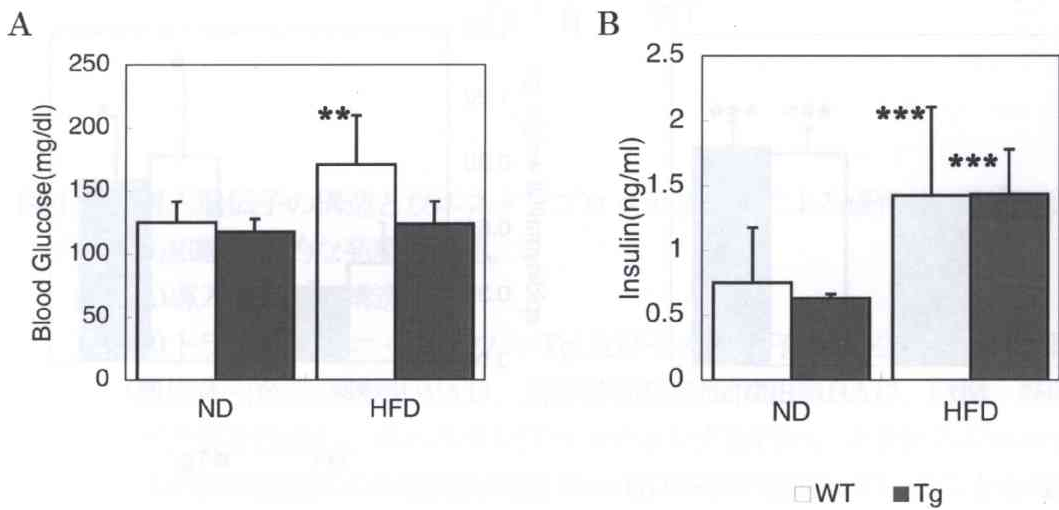


図 1.3 絶食時の血糖値(A)と血漿インスリン濃度(B)
(WT: 野生型マウス、Tg: トランスジェニックマウス、ND: 普通食、HFD: 高脂肪食、** $p < 0.005$ 、*** $p < 0.0005$)

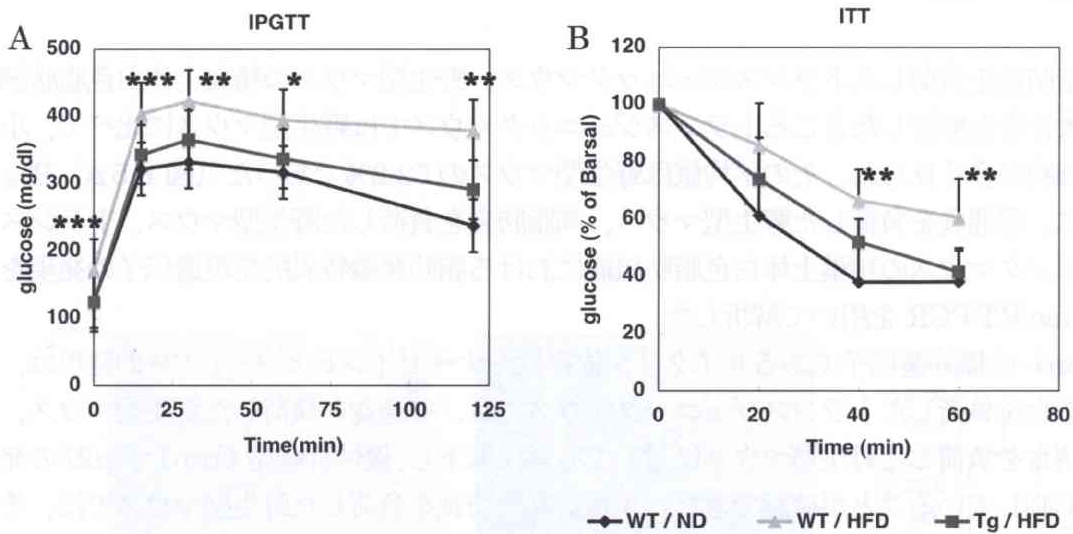


図14 トランスジェニックマウスにおける耐糖能とインスリン感受性。

A) 腹腔内糖負荷試験 (IPGTT) : 16 時間絶食後、グルコース 1.2g/kg を腹腔内投与

B) インスリン負荷試験 (ITT) : 6 時間絶食後、インスリン 0.75U/kg を腹腔内投与

(WT: 野生型マウス、Tg: トランスジェニックマウス、ND: 普通食、HFD: 高脂肪食、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.005$ 、*** $p < 0.0005$)

c.脂肪組織の解析

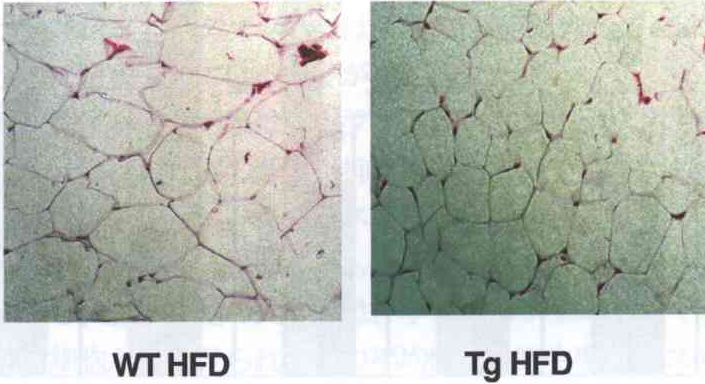
高脂肪食を負荷したトランスジェニックマウス、野生型マウスの精巣上体白色脂肪細胞の大きさを解析したところトランスジェニックマウスでは野生型マウスに比べて、小型の細胞が多く見られ、その平均値は野生型マウスの52.2%であった(図15A, B)。

次に、普通食を負荷した野生型マウス、高脂肪食を負荷した野生型マウス、トランスジェニックマウスの精巣上体白色脂肪組織における脂肪組織特異的発現遺伝子の発現をrealtime RT-PCRを用いて解析した。

*Foxo1*の標的遺伝子であるサイクリン依存性キナーゼインヒビター*p21*¹³⁾の発現は、高脂肪食を負荷したトランスジェニックマウスでは、普通食を負荷した野生型マウス、高脂肪食を負荷した野生型マウスに対して有意に低下し、優性抑制型*Foxo1*が*p21*の発現を抑制していることが確認できた。また、高脂肪食を負荷した野生型マウスでは、その発現が有意に上昇していた。これらの結果は、脂肪組織において優性抑制型*Foxo1*が、*Foxo1*の標的遺伝子の発現を抑制しうることを示していると考えられた。

Ppar γ の発現は、高脂肪食を負荷した野生型マウスは、普通食を負荷した野生型マウスに対して有意に低下していたが、高脂肪食を負荷したトランスジェニックマウスでは普通食、高脂肪食を負荷した野生型マウスに対して有意差がみられなかった。インスリン感受性ホルモンであるアディポネクチン(*Acrp30*)の発現は、高脂肪食を負荷したトランスジェニックマウスでは、有意に増加し、高脂肪食を負荷した野生型マウスの2倍の発現量であった。インスリン感受性糖輸送担体*Glut4*の発現は、高脂肪食を負荷した野生型マウスでは、普通食を負荷したマウスの50%程度に有意に低下したが、高脂肪食を負荷したトランスジェニックマウスでは、普通食を負荷した野生型マウスの発現量と有意差が見られなかった。*Leptin*の発現は、高脂肪食を負荷した野生型マウスでは、普通食を負荷したマウスの2倍程度に有意に増加したが、高脂肪食を負荷したトランスジェニックマウスでは、普通食を負荷した野生型マウスの発現量と有意差が見られなかった。インスリン抵抗性惹起因子*TNF α* の発現は、高脂肪食を負荷した野生型マウスでは、普通食を負荷したマウスに対して有意に増加したが、高脂肪食を負荷したトランスジェニックマウスでは、普通食を負荷した野生型マウスの発現量と有意差が見られなかった。

A



B

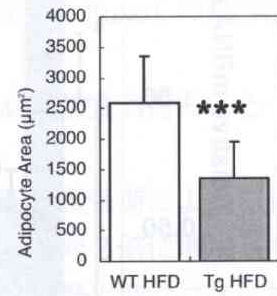


図15 脂肪組織像の解析

A) 精巣上体白色脂肪組織の HE 染色像

B) 脂肪細胞の大きさ

(WT: 野生型マウス、Tg: トランスジェニックマウス、HFD: 高脂肪食、
*** $p < 0.0005$)

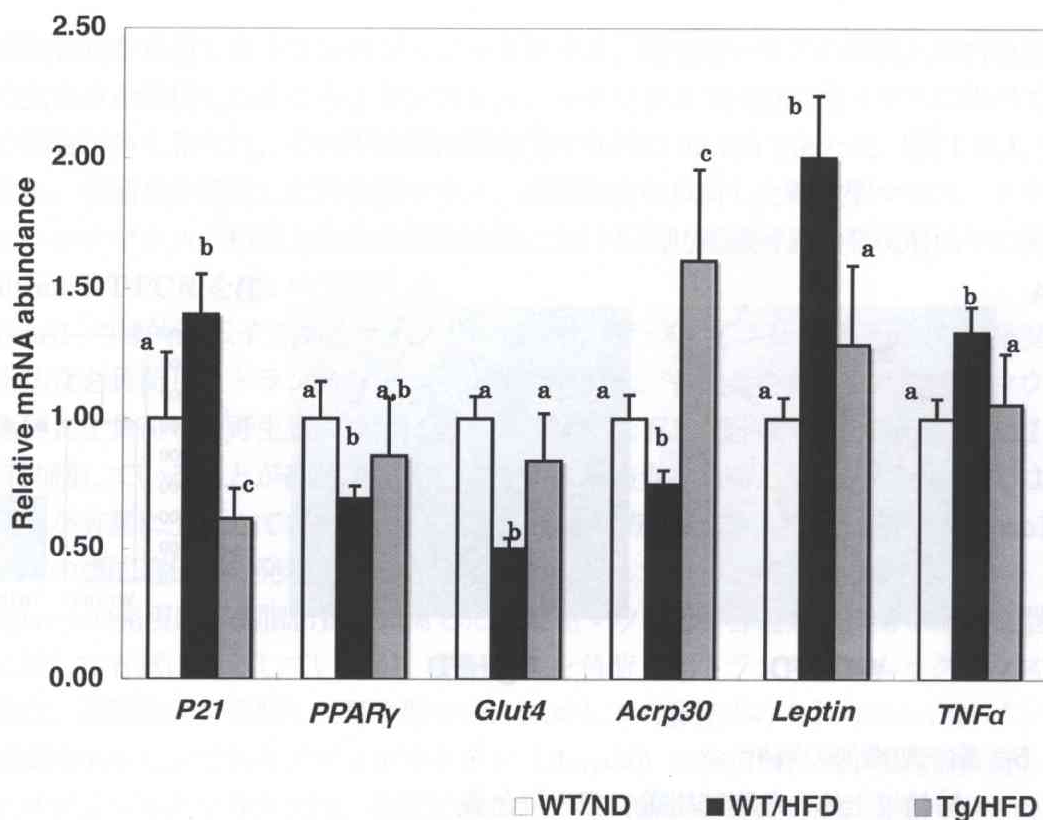


図 16 精巣上体白色脂肪組織における各種遺伝子の発現量の比較

精巣上体白色脂肪組織における各種遺伝子の発現量をリアルタイム RT-PCR により解析した。普通食を負荷した野生型マウスの各遺伝子の発現量の平均を 1.00 とし、他の条件のマウスにおける各遺伝子の発現量を、その比として示した。(WT: 野生型マウス、Tg: トランスジェニックマウス、ND: 普通食、HFD: 高脂肪食、a, b, c:異なる記号は、その間に $p < 0.05$ の有意差があることを示す)

5. 考察

今回、我々は、成熟脂肪細胞、すなわちマウス白色脂肪組織、褐色脂肪組織における Foxo1 の生体内でのインスリン感受性に対する作用を明らかにする目的で脂肪組織特異的に Foxo1 の機能が抑制されている、脂肪組織特異的優性抑制型 Foxo1 過剰発現トランスジェニックマウスを作製し、解析した。高脂肪食を負荷したトランスジェニックマウスでは、普通食、高脂肪食を負荷したマウスに対して、Foxo1 の標的遺伝子であるサイクリン依存性キナーゼインヒビター *p21* の発現が白色脂肪組織において有意に低下し、トランスジェニックマウスでは、優性抑制型 Foxo1 により内在性 Foxo1 の転写活性が競合的に阻害されていることが確認された。

糖代謝に関する解析結果は、トランスジェニックマウスでは、高脂肪食負荷によるインスリン感受性、耐糖能の低下が抑制されることを示した。

また、トランスジェニックマウスは、野生型マウスと同様に高脂肪食負荷によって肥満し、精巣上皮白色脂肪組織重量も普通食を負荷したマウスに対して約 2 倍に増加していた。しかし、脂肪細胞の大きさは、トランスジェニックマウスは、野生型マウスに対して小型の細胞が多く見られ、その平均値は、野生型マウスの 52.2% であった。肥大した脂肪細胞では、インスリン感受性ホルモンであるアディポネクチンの産生が低下し、インスリン抵抗性を惹起する (TNF α など) の因子が多量に産生され、骨格筋や肝臓でインスリンの情報伝達を障害し、インスリン抵抗性を惹起すると考えられている¹⁶⁾。今回の結果も脂肪細胞が肥大している高脂肪食を負荷した野生型マウスではインスリン感受性と耐糖能の有意な低下が見られたが、脂肪細胞の大きさがより小型であるトランスジェニックマウスでは、耐糖能とインスリン感受性の低下が抑制されていた。

また、精巣上皮白色脂肪組織の遺伝子発現の解析において、高脂肪食を負荷したトランスジェニックマウスでは、*Ppar γ* の発現には変化が認められなかったが、インスリン感受性ホルモンであるアディポネクチン遺伝子 (*Acrp30*) の発現が増加し、インスリン感受性糖輸送担体 *Glut4* の発現が正常化し、インスリン抵抗性惹起分子 *Tnf α* の発現が抑制され、さらに *Leptin* の発現も抑制されていることが確認できた。脂肪組織におけるインスリン感受性糖輸送担体 GLUT4 は、その脂肪組織特異的ノックアウトマウスが耐糖能異常、インスリン抵抗性を示すことより、その発現量の低下が個体の耐糖能異常、インスリン抵抗性を惹起すると考えられている¹⁷⁾。これらの結果より、高脂肪食を負荷したトランスジェニックマウスにおける耐糖能とインスリン感受性の低下の抑制は、白色脂肪組織におけるアディポネクチンの発現増加とインスリン感受性糖輸送担体 *Glut4* の発現の正常化およびインスリン抵抗性惹起分子 *Tnf α* の発現抑制によるものと考えられた。

また、*Acrp30* 及び *Glut4* は、PPAR γ の活性化により発現が増強されること、*Leptin* の発現は、PPAR γ の活性化により抑制されることが報告されている^{16),18)}。今回の研究では、*Ppar γ* の発現には、変化が認められなかったが *Acrp30* 及び *Glut4* の発現が増加

し、*Leptin* の発現が抑制されていたことより、トランスジェニックマウスの脂肪組織においては *Ppar γ* が活性化されていると考えられた。しかし、詳細なメカニズムに関してはさらなる研究が必要であると考えられる。

今回の結果を要約すると、脂肪組織特異的に *Foxo1* の機能が抑制されたマウスで脂肪細胞の肥大化の抑制と白色脂肪組織におけるインスリン感受性ホルモンであるアディポネクチンの発現増加、インスリン依存性糖輸送担体 *Glut4* の発現の正常化、*Tnf α* の発現の抑制により高脂肪食誘導性のインスリン感受性と耐糖能の低下が抑制されたことより、脂肪組織においても *Foxo1* は、糖尿病病態形成に寄与しているものと推定された。

参考文献

- 1) Woods SC, et al : Nature (1979) 282 : 503-505
- 2) Woods SC, et al : Science (1998) 280 : 1378-1383
- 3) Marks JL, et al : Endocrinology (1990) 127 : 3234-3236
- 4) Wilcox BJ, et al : Peptides (1989) 10 : 1159-1164
- 5) Schwartz MW, et al : Endocrinology (1992) 130 : 3608-3616
- 6) Bruning JC, et al : Science (2000) 289 : 2122-2125
- 7) Obici S, et al : Nat Neurosci (2002) 5 : 566-572
- 8) Niswender KD, et al : Diabetes (2003) 52 : 227-231
- 9) Masaki T, et al : Obesity Research (2004) 12 : 878-885
- 10) Nakae J, et al : J Biol Chem (1999) 274 : 15982-15985
- 11) Nakae J, et al : EMBO J (2000) 19 : 989-996
- 12) Nakae J, et al : Nat Genet (2002) 32 : 245-253
- 13) Nakae J, et al : Dev Cell (2003) 4 : 119-129
- 14) Ross SR, et al : Proc Nat Acad Sci (1990) 87 : 9590-9594
- 15) Altomonte J, et al : Am J Physiol Endocrinol Metab (2003) 285 : E718-728
- 16) Yamauchi T, et al : J Biol Chem (2001) 276 : 41245-41254
- 17) Abel ED, et al : Nature (2001) 409 : 729-733
- 18) Wu Z., et al : J Clin Invest (1998) 101 : 22-32