

脂肪細胞のライフサイクルを調節する生理活性脂質の生合成調節と作用に関する分子細胞生物学的解析

横田一成, 橋本道男, 小川哲郎

目 的

肥満は、動脈硬化や糖尿病のような生活習慣病の危険因子であることはよく知られている。肥満の脂肪組織では、脂肪細胞の数の増加もしくは肥大化により、過剰の脂肪蓄積が起こるのみならず、インスリン抵抗性の発生のような脂肪細胞の質的変化が伴う。従って、肥満に関連する生活習慣病の制御のための基盤研究として、このような脂肪細胞のライフステージでの機能変化に注目することは重要である。

脂肪細胞は、局所ホルモンとして機能する生理活性脂質の複数のプロタノイド類を生成する。これらの生合成には、アラキドン酸シクロオキシゲナーゼ (COX) 経路の生合成酵素が関与しており、さらに、それぞれの酵素には、複数のアイソフォームが存在する。脂肪細胞は、内因性及び外因性のプロスタグランジン (PG) 類にも応答して多様な作用を示す。その場合の作用機構は複雑であり、例えば、 PGD_2 由来の PGJ_2 関連物質は、核内受容体を介して作用する。一方で、例えば、 PGE_2 や $\text{PGF}_{2\alpha}$ は、細胞膜表面の受容体を介して作用する。このような作用様式の違いに加えて、 PGE_2 受容体のように、異なる細胞情報伝達系に共役する複数の受容体サブタイプがある。このような背景のもとに、異なるライフステージでの脂肪細胞の PG 生合成と作用について検討した。

今回の研究目的として、第一に、異なるライフステージの脂肪細胞を、活性化ホルボールジエステルとカルシウムイオノフォアで処理し、そのときの COX 経路の生合成酵素アイソフォームの遺伝子発現の様式を解析した。第二に、同様の処理をした後の細胞応答による遅延性の PG 生成を測定した。今回、 PGE_2 と $\text{PGF}_{2\alpha}$ の生合成調節に焦点を当てている。そして、第三に、脂肪細胞の各ライフステージにおいて、細胞応答で生成される内因性 PG と共に、外因性 PG 類の特異的な作用も探求した。

実験方法

脂肪細胞のライフステージは、大きく3つの段階に分類される。すなわち、前駆脂肪細胞が増殖する生育期、特定の試薬で分化誘導刺激を与える分化誘導期、そして、脂肪蓄積が進行する成熟期である。今回の実験では、脂肪細胞への分化能を有するマウスの前駆脂肪細胞株の 3T3-L1 培養細胞を用いた (Lu et al. 2004; Xu et al. 2006)。そ

の培養過程で、各ライフステージの脂肪細胞を、活性化ホルボールジエステルのホルボール-12-ミリステート-13-酢酸 (PMA) とカルシウムイオノフォアの A23187 で刺激した。そして、その3時間と24時間後に全 RNA を抽出して、逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応法により目的の標的遺伝子の発現を検出した。また、細胞応答の24時間後に、COX アイソフォームのタンパク質レベルでの発現を Western blot 法で解析し、そして、 PGE_2 と $\text{PGF}_{2\alpha}$ の生成量を、それぞれの特異抗体を用いた酵素免疫測定法で測定した。脂肪細胞内の脂肪蓄積量の測定は、本研究室の既報の方法に従って行った (Lu et al. 2004; Xu et al. 2006)。

結果と考察

最初に、各ステージで、PMA と A23187 による脂肪細胞の特異的マーカーの遺伝子発現の調節作用を観察した。このように、脂肪細胞の分化誘導のマスターレギュレーターである核内受容体のペルオキシソーム増殖剤応答性因子 γ や、インスリン感受性の維持に関わるアディポネクチンの発現を、PMA は阻害した。

同様の条件で、COX 経路の生合成酵素アイソフォームの遺伝子発現の変化を検出した。まず、細胞質性ホスホリパーゼ $\text{A}_{2\alpha}$ (cPLA $_{2\alpha}$) は、成熟期よりも生育期や分化誘導期において高いレベルで発現していた。この cPLA $_{2\alpha}$ の遺伝子発現を、PMA は促進した。しかし、成熟期の脂肪細胞では、PMA に対する発現応答が、顕著に低下していた。さらに、COX アイソフォームのうち、COX-2 は、PMA により一過的に誘導されていたが、これは、いずれのステージでも構成的に発現している COX-1 の発現とは対照的であった。

そして、COX アイソフォームのタンパク質レベルでの発現を Western blot 法で検討した。先程の転写レベルの解析結果に一致して、COX-1 の発現レベルは構成的であったが、糖鎖の修飾によると思われる発現タンパク質の二重のバンドが特徴的に検出された。一方、COX-2 の発現量は、PMA による処理で明らかに促進された。特に、生育期と分化誘導期の細胞で顕著であったが、成熟期では、そのような応答性は低下した。

COX 経路の生合成酵素のうち、 PGH_2 を基質とする PGE 合成酵素 (PGES) と PGF 合成酵素 (PGFS) の遺伝子発現レベルを解析した。そのうち、PGE 合成酵素の3種類

のアイソフォーム, すなわち, 細胞質性の cPGES に加えて, 膜結合性の mPGES-1 と mPGES-2 の発現が検出された. いずれも, ほぼ, 構成的に発現していた. 対照的に, PGFS の遺伝子発現レベルは, PMA により誘導されることができ, 特に, 分化誘導期の細胞でその促進効果が著しくなっていた.

次に, 細胞応答による PGE₂ の生成量を酵素免疫測定法で測定した. PMA は, 処理 24 時間後の PGE₂ 生成促進に有効であったが, それに, カルシウムイオノフォアの A23187 を作用させると, さらに PGE₂ 生成量が増加した. しかし, 成熟期の脂肪細胞は, そのような応答性を失っていた. 同様に, PGF_{2α} の生成量を測定した場合も, PGE₂ の生成と同様の傾向が観察された.

このようにして生成される内因性 PG 類の作用を見るための実験を次に行った. 生育期の 2 日間, 分化誘導期の 45 時間, あるいは, 成熟期の 6 日間のいずれかを, PMA と A23187 で処理し, そのときの細胞応答で生成される内因性の PG 類が, どのように成熟脂肪細胞の脂肪蓄積に影響するのかを検討した.

その結果, 生育期の前駆脂肪細胞を PMA で前処理した場合, 成熟脂肪細胞の脂肪蓄積は, ほとんど影響されなかった. 対照的に, 分化誘導期と成熟期の脂肪細胞を PMA で処理すると, 成熟脂肪細胞の脂肪蓄積の低下が認められました. さらに, 分化誘導期の細胞を, PMA と A23187 を添加して処理したときには, PMA のみの条件よりも, さらに, 脂肪蓄積が有意に低下しました. このことは, PMA と A23187 により, 分化誘導期の細胞で, 分化誘導プログラムを抑制する内因性の PG 類の生成促進が起こり, それらの作用が関連していることを示す.

次に, 外因性 PG 類の作用について検討した. そのために, 生育期の前駆脂肪細胞がコンフルエントになる前の 2 日間, PMA あるいはアスピリンの存在下に, 外因性の PGE₂ もしくは PGF_{2α} で処理した. PMA 自身には, 脂肪蓄積の抑制作用が認められたが, 外因性 PG 類の効果は有意なものではなかった. 一方, 分化誘導期の 45 時間, 脂肪細胞を, 同様の前処理をした場合は, アスピリンとの共存の実験で顕著なように, PGE₂ は, 成熟脂肪細胞の脂肪蓄積を著しく低下した. 一方, PGF_{2α} には, そのような低下作用は, ほとんど, 認められなかった. これらの結果を確認するため, PG 類で分化誘導期の細胞を前処理した

後, 成熟期 6 日目の脂肪細胞を位相差顕微鏡で観察したところ, 明らかに PGE₂ の前処理による脂肪合成の抑制効果が確認できた.

さらに, 成熟期の 6 日間, 2 日ごとに培地交換をしながら, PMA あるいはアスピリンの存在下に, 同様の PG 類で処理した. この場合, 分化誘導期の細胞を処理した実験結果と全く対照的に, PGE₂ には, 顕著な効果が認められなかったが, PGF_{2α} には, 脂肪蓄積の著しい低下作用が観察された. この PGF_{2α} による脂肪蓄積低下作用は, 位相差顕微鏡による観察でも確認できた.

最近, 3T3-L1 脂肪細胞の分化誘導と成熟過程に関して, PGE₂ と PGF_{2α} の受容体の遺伝子発現様式が報告されている (Tsuboi et al. 2004). それによると, PGE₂ の主要な受容体サブタイプとして, 脂肪合成の抑制に関与する EP4 受容体が, 分化誘導期から成熟期に優先的に発現しているという. ところが, PGF_{2α} に対する FP 受容体の遺伝子発現では, 分化誘導期に発現が弱く, 成熟期に発現の促進が観察される. これらの知見は, 脂肪蓄積の低下作用に関して, 分化誘導期の脂肪細胞で, PGE₂ に対する細胞応答性が高く, 成熟期の脂肪細胞では, PGF_{2α} の応答性が高いという我々の今回の結果を説明する.

引用文献

- Lu S., Nishimura K., Hossain M. A., Jisaka M., Nagaya T., and Yokota K. (2004) Regulation and role of arachidonate cascade during the changes in the life cycle of adipocytes. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 118: 133-153.
- Xu, L. Nishimura, K., Jisaka, M., Nagaya, T., and Yokota, K. (2006) Gene expression of arachidonate cyclooxygenase pathway leading to the delayed synthesis of prostaglandins E₂ and F_{2α} in response to phorbol 12-myristate 13-acetate and action of these prostanoids during life cycle of adipocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1761: 434-444.
- Tsuboi H., Sugimoto Y., Kainoh T., and Ichikawa A. (2004) Prostanoid EP4 receptor is involved in suppression of 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 322: 1066-1072.