
メタボリックシンドローム病態形成における
プロテインホスファターゼ 2A の役割

17590927

平成17年度～平成18年度科学研究費補助金
(基盤研究(C)) 研究成果報告書

平成19年6月

研究代表者 卯木 智
滋賀医科大学医学部助手

滋賀医科大学附属図書館



2006014467

研究組織

研究代表者 : 卯木 智 (滋賀医科大学医学部助手)

研究分担者 : 前川 聡 (滋賀医科大学医学部助教授)

交付決定額 (配分額)

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	2,200,000	0	2,200,000
平成 19 年度	1,300,000	0	1,300,000
総計	3,500,000	0	3,500,000

研究発表

(1) 学術誌等

Ikeda K, Maegawa H, Ugi S, Tao Y, Nishio Y, Tsukada S, Maeda S, Kashiwagi A. Transcription factor activating enhancer-binding protein-2 β . A negative regulator of adiponectin gene expression. *J Biol Chem*, 281: 31245-31253, 2006

Tsuchihashi H, Yamamoto H, Maeda K, Ugi S, Mori T, Shimizu T, Endo Y, Hanasawa K, Tani T. Circulating concentrations of adiponectin, an endogenous lipopolysaccharide neutralizing protein, decrease in rats with polymicrobial sepsis. *J Surg Res*. 134: 348-353, 2006

Tao Y, Maegawa H, Ugi S, Ikeda K, Nagai Y, Egawa K, Nakamura T, Tsukada S, Nishio Y, Maeda S and Kashiwagi A. The transcription factor AP-2 α causes cell enlargement and insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* 147: 1685-1696, 2006.

Hupfeld CJ, resnik JL, Ugi S, Olefsky JM. Insulin-induced beta-arrestin1 Ser-412 phosphorylation is a mechanism for desensitization of ERK activation by Galphai-coupled receptors. *J Biol Chem*, 280: 1016-1023, 2005

Sharma PM, Sin HS, Ugi S, Ricketts W, Olefsky JM. Mechanism of SHIP-mediated inhibition of insulin- and platelet-derived growth factor-stimulated mitogen-activated protein kinase activity in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol.* 19: 421-430, 2005

卯木 智、柏木厚典 【インスリンシグナルと調節機構】 FFA による新しい臓器特異性インスリン抵抗性発現機構 内分泌・糖尿病科 科学評論社 p123-130, 2007

卯木 智、前川 聡 【インスリン抵抗性の分子機構 update】 糖毒性・脂肪毒性とインスリン抵抗性 糖尿病 日本糖尿病学会 p853-855, 2006

(2) 口頭発表

Shi K, Ugi S, Maegawa H, Guo B, Yoshizaki T, Egawa K, Nishio N, Koya D, Nakamura T, Kashiwagi A. Anchoring of PTP1B on Endoplasmic Reticulum is essential for its Activation of SREBP-1 Gene Expression. 65rd Annual meeting of American Diabetes Association 2005

Ugi S, Maegawa H, Nishio Y, Egawa K, Kashiwagi A.. PP2A Activation and TRB3 Induction are the Two Independent Mechanisms of FFA-induced Insulin Resistance. 65rd Annual meeting of American Diabetes Association 2005

Ikeda K, Maegawa H, Ugi S, Tao Y, Tsukada AS, Yoshizaki T, Matsumura K, Egawa K, Nishio Y, Maeda S, Kashiwagi A. Transcription factor AP-2 β , a novel candidate gene for obese type 2 diabetes, negatively regulates adiponectin gene expression. Insulin Action symposium 2005

Ugi S, Maegawa H, Nishio Y, Kashiwagi A. FFA induces insulin resistance through the different mechanisms in adipocytes and hepatocytes. Insulin Action symposium 2005

Tao Y, Maegawa H, Ugi S, Ikeda K, Nishio Y, Maeda S, Kashiwagi A. Transcription factor AP-2 β causes hypertrophy and dysfunction of adipocytes. Insulin Action symposium 2005

Ikeuchi T, Nishio Y, Sekine O, Nagai Y, Ugi S, Takemoto T, Maegawa H, Kimura H, Kashiwagi A. A Newly Identified RNA Binding Motif Protein Controls Transcription of SREBP-1c Gene in the Liver of High-Fructose Fed Mice. 66rd Annual meeting of American Diabetes Association 2006

Sekine O, Nishio Y, Sato Y, Nagai Y, Ikeuchi C, Ugi S, Maegawa H, Kashiwagi A. Increased Expression of CCAAT/Enhancer Binding Protein-B and - Δ and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Genes in Aortas from Hyperinsulinemic Rats 66rd Annual meeting of American Diabetes Association 2006

Ikeda K, Maegawa H, Ugi S, Tao Y, Tsukada S, Nishio Y, Maeda S, Kashiwagi A. Transcription factor AP-2 β : A novel candidate gene for obese type 2 diabetes and a negative regulator of adiponectin gene expression Insulin Action symposium 2006

Ugi S, Maegawa H, Ikeda K, Tao Y, Nishio Y, Kashiwagi A. The transcription factor AP-2 causes cell enlargement and abnormal adipocytokine expression in 3T3-L1 adipocytes. Insulin Action symposium 2006

Sekine O, Nishio Y, Sato Y, Nagai Y, Ikeuchi C, Ugi S, Maegawa H, Kashiwagi A. Increased expression of CCAAT/enhancer binding protein- β and - δ and monocyte chemoattractant protein-1 genes in aortas from hyperinsulinemic rats. Insulin Action symposium 2006

卯木智、前川聡、西尾善彦、柏木厚典 インスリンシグナルと調節機構 病態の解明と治療への展望 FFA による新しい臓器特異性インスリン抵抗性発現機構 PP2A, TRB-3 の関与 日本糖尿病学会 2006

卯木智、前川聡、田尾ゆかり、池田和弘、前田士郎、西尾善彦、柏木厚典 脂肪細胞肥大化関連転写因子によるアディポサイトカイン発現調節 日本内分泌学会 2006

卯木智、前川聡、柏木厚典 メタボリックシンドロームの発症メカニズムの解明 — 脂肪細胞肥大化因子の同定 — 日本肥満学会 2006

研究の概要

脂肪細胞のモデル細胞である 3T3-L1 細胞において、パルミチン酸(PAL)および C 2 セラマイド(CER)孵置によりインスリン抵抗性が惹起されたが、その作用点とは、Akt レベルであると考えられた。CER 合成阻害剤であるミリオシン孵置は PAL の効果を消失させた。さらに、CER の合成基質とならないミリスチン酸(MYR)やオレイン酸はインスリン抵抗性を惹起しなかった。以上の結果より FFA を基質として細胞内で de novo 合成されるスフィンゴ脂質の一つである CER がインスリン抵抗性の原因であることが示唆された。さらに、PAL および CER により PP2A 活性が刺激され、PP2A 抑制剤であるオカダ酸前孵置により、PAL、CER による Akt 抑制が解除された。CER は以前より PP2A を活性化すること、PP2A は Akt を不活性化することが知られており、以上より、Akt 活性の抑制機序として、細胞内 CER 合成亢進を介して PP2A 活性を直接刺激し、Akt を脱リン酸化することを見出した。

一方、肝臓のモデル細胞である Fao 細胞においても PAL と CER は Akt リン酸化を抑制したが、MYR でも抑制された。しかし、PP2A 活性化は伴わず、オカダ酸、ミリオシンの抑制効果も認めなかった。

さらに、筋肉細胞のモデル細胞である L6 細胞においては、PAL と CER により Akt リン酸化を抑制したが、これは、オカダ酸により部分的に解除された。PAL の効果はミリオシンにより部分的に解除された。MYR の効果は認めなかった。このことより、L6 細胞における Akt 抑制作用は、一部は PP2A の活性化を介するが、その他の機序も関与していると考えられた。

以上の結果より、FFA によるインスリン抵抗性惹起機構は、単一ではなく、各臓器において異なることが示唆された。

はじめに

脂肪毒性(lipotoxicity) は、Unger らが、脂肪酸による膵β細胞のインスリン分泌減弱作用について提唱した概念であるが、脂肪酸は膵β細胞のみならず、インスリン標的臓器においても、糖、脂質代謝異常を引き起こすことが知られ、現在はそれらを含めた病態を表すようになった。内臓脂肪分解により生じた Free fatty acid (FFA) は門脈を通過して、直接、肝臓へ取り込まれ、Very low density lipoprotein (VLDL) 合成亢進を起し、脂肪肝やインスリン抵抗性をひき起こす。骨格筋においてインスリン抵抗性を惹起することは、これまでに数多く報告されている (1, 2)。しかし、その分子機構についてはいくつかの異なる機序が提唱されており不明な点も多い。

一方、もうひとつのインスリン感受性臓器である脂肪組織に対する FFA の効果についての報告は少なく、結果も一定していない (3-5)。しかし、もし FFA が脂肪組織でインスリン抵抗性を増強させるなら、脂肪組織での中性脂肪分解は亢進し、vicious cycle を形成することが考えられる。このことから、脂肪組織における FFA の作用を検討することは脂肪毒性の病態を理解する上で重要と考えられる。そこで、FFA による脂肪細胞におけるインスリン抵抗性の機序につき検討し、さらに、筋細胞や肝細胞におけるインスリン抵抗性機序と比較を行った。

方法

細胞培養

3T3-L1 細胞 (カリフォルニア大学サンディエゴ校、JM. olefsky 博士より供与)、L6 細胞 (シックチルドレン病院、A. Klip 博士より供与) は、それぞれ既報の方法により脂肪細胞と筋肉細胞へ分化させた(6, 7)。Fao 細胞はジョスリン糖尿病センター、CR. Kahn 博士より供与された(7)。

FFA 溶液の作成

パルミチン酸、ミリスチン酸は、既報の方法(8)により、FFA free BSA と混合した。

アデノウイルスの作成

Small t antigen をコードする発現ベクター (pCMV5-small t antigen、テキサス大学、MC. Munby 博士より供与) より、Adeno-X expression system (CLONTECH) を用いて、アデノウイルスを作成した (6)。

Protein phosphatase 2A (PP2A) 活性測定

細胞を 1mM バナジン酸を含有する溶液で可溶化後、抗 PP2A 抗体にて免疫沈降し、*para*-nitrophenyl phosphate (*p*-NPP) を基質として 450mM の吸光度を測定することにより測定した (9)。

2 deoxyglucose (2DOG) 取り込みの測定

細胞を 100ng/ml インスリンで 30 分間刺激後、0.01mmol/L 2- [³H] deoxyglucose を添加し、5 分間に細胞内に取り込まれる放射活性を測定した (6)。

結果

1. 3T3-L1 脂肪細胞においてセラマイドおよびパルミチン酸は Akt を抑制することによりインスリン抵抗性を惹起する

セラマイドの cell permeable analogue である C2 セラマイド(100 μ M) を 30 分間 3T3-L1 脂肪細胞に前処置することにより、インスリン刺激による糖取り込みが約 70% 抑制された(図 1 A)。同様に、脂肪酸の一種であるパルミチン酸(1mM)は糖取り込みを約 50%抑制したが、24 時間の前処置が必要であった(図 1 B)。

次にこの糖取り込み抑制の機序を明らかにするため、インスリンシグナルを検討した。その結果、糖取り込み抑制と同様の time course、すなわち、セラマイドは 30 分、パルミチン酸は 12 時間で Akt、mitogen activated protein (MAP) キナーゼのリン酸化が抑制された(図 1B)。しかし、インスリン受容体、Insulin receptor substrate-1(IRS-1) のチロシンリン酸化、p85 との結合、shc のチロシンリン酸化は影響なかった(図 1C)。以上の結果より、セラマイドとパルミチン酸は Akt レベルで、インスリンシグナルを抑制していると考えられた。

2. 3T3-L1 脂肪細胞においてセラマイドおよびパルミチン酸は PP2A 活性を刺激することによりインスリン抵抗性を惹起する

PP2A はセリンスレオニンフォスファターゼのひとつで、これまで、MAP キナーゼ経路など、増殖シグナルの抑制に関与することなどが知られているが、我々は新たに、PP2A が Akt に直接結合し、脱リン酸化することにより、インスリン作用を抑制することを報告した(6)。さらにセラマイドは *in vitro* において PP2A を活性化することが報告されている(10)。このことから、我々は、FFA により細胞内で合成されたセラマイドが、PP2A を活性化し、Akt を抑制することによりインスリン抵抗性を惹起するのではないか、という仮説を立て検討した。その結果、C2 セラマイドにより、30 分で PP2A 活性は 2 倍に上昇し、パルミチン酸は 24 時間で PP2A 活性を刺激した(図 2A)。しかし、パルミチン酸は数時間の孵置では、PP2A 活性には影響を与えなかった(データ示さず)。次に、なぜセラマイドとパルミチン酸で、PP2A 活性化の time course に隔たりがあるのかを検討した。Cell lysate を抗 PP2A 抗体にて免疫沈降し、沈降物に C2 セラマイドまたはパルミチン酸を直接添加して活性を測定した。その結果、セラマイドは PP2A を活性化させたが、パルミチン酸は活性化させなかった(図 2B)。すなわち、セラマイドは直接 PP2A 活性を刺激するのに対し、パルミチン酸は細胞内でなんらかの作用を介して間接的に活性を刺激すると考えられた。この結果は、パルミチン酸により細胞内セラマイド合成が亢進し、PP2A を刺激するという仮説に一致する。

次に、本当に、PP2A 活性化が Akt を抑制し、インスリン抵抗性を惹起しているの

かを確かめるため、PP2A 活性の阻害がセラマイドとパルミチン酸によるインスリン抵抗性を解除するか検討した。セラマイドは、インスリン刺激による Akt リン酸化を 90% 抑制したが、PP2A の強力な特異的阻害剤であるオカダ酸の前処置により、Akt の抑制は完全に解除された(図 3A)。同様に、パルミチン酸による Akt の抑制も解除された。さらに、PP2A の特異的阻害物質である small t antigen をアデノウイルスにより過剰発現させることによっても Akt の抑制は部分的に解除できた。この Akt 抑制が解除される度合いの違いは、オカダ酸と small t antigen による PP2A 抑制の強さの違いによるものと考えられた(9)。さらに、small t antigen の過剰発現は、単独ではインスリン刺激後の糖取り込み作用を増強しないが、セラマイドによる糖取り込み抑制を 50%、パルミチン酸により糖取り込み抑制作用を 60% 解除した(図 3B)。以上の結果より、セラマイドとパルミチン酸は、PP2A 活性化を介して、抵抗性を惹起していると考えられた。

3. 3T3-L1 脂肪細胞においてパルミチン酸はセラマイド合成を介してインスリン抵抗性を惹起する

PP2A 活性化やインスリン抵抗性発現までの時間がセラマイドとパルミチン酸で異なること、セラマイドが直接 PP2A を刺激するがパルミチン酸は直接活性化しないこと、さらに、パルミチン酸により細胞内セラマイド合成が亢進するという報告(11) があること、これらのことは、前述のごとく、パルミチン酸により細胞内セラマイド合成が亢進し、PP2A を刺激するという仮説を支持する。この仮説をさらに検証するため、セラマイド合成阻害剤を用いて、パルミチン酸の作用が本当にセラマイド合成を介しているかどうか検討した。ミリオシンは、細胞内セラマイド合成の最初の反応、パルミトイル Co-A とセリンとの縮合反応を触媒するセリンパルミトイルトランスフェラーゼの抑制剤である(11)。ミリオシンを前処置しておくこと、パルミチン酸による PP2A の活性化が抑制された(図 4A)。この結果に一致して、ミリオシンは、パルミチン酸による Akt の抑制、糖取り込みの抑制を完全に解除した(図 4B、C)。

さらに、もう 1 つのアプローチを行った。細胞内セラマイド合成経路の途中、スフィンガニンとアシル CoA からジヒドロセラマイドが形成されるステップにおいて、このセラマイド合成に使われうるアシル CoA は、C16,18,22,24 の飽和脂肪酸のみであることが知られている(12)。したがって、この経路に入れない脂肪酸は、細胞内セラマイド合成基質にはならず、インスリン抵抗性を起こさないはずである。そこで、C14 の飽和脂肪酸であるミリスチン酸と、C16 の 1 価不飽和脂肪酸であるオレイン酸の効果を検討した。その結果、パルミチン酸は、PP2A を活性化するが、同濃度のミリスチン酸とオレイン酸は活性化しなかった(図 5A)。同様に、パルミチン酸はインスリン刺激による Akt と糖取り込みを抑制したが、ミリスチン酸とオレイン酸は抑制しなかった(図 5B、C)。以上より、3T3-L1 細胞において、パルミチン酸によるインスリン抵抗性の原因は、

細胞内セラミド合成亢進により、PP2Aが活性化されることにより、Akt以下のシグナルを抑制することによることが示唆された。

4. L6 筋肉細胞におけるパルミチン酸によるインスリン抵抗性機序の検討

3T3-L1 細胞で見出した新しい機序が他の細胞でも見られるかは興味深い。そこで、筋肉のモデル細胞である L6 細胞において検討した。その結果、パルミチン酸はインスリン刺激による糖取り込みを抑制したが、ミリスチン酸は抑制しなかった(図 6A)。この結果と同様、パルミチン酸は Akt を抑制したが、ミリスチン酸は抑制しなかった(図 6B)。パルミチン酸における Akt の抑制は、Akt の上流の抑制は伴っていないこと作用点は、Akt レベルと考えられた(結果示さず)。これらの結果は、3T3-L1 細胞における結果と類似するものであり、これを支持するように、セラミドおよびパルミチン酸による Akt の抑制はオカダ酸により完全に解除された(図 7)。しかし、3T3-L1 細胞における結果とは異なり、ミリオシンは、パルミチン酸による Akt の抑制を部分的に解除するみであった(図 7)。この結果は、L6 細胞においては、細胞内セラミド合成亢進と PP2A 活性化は、インスリン抵抗性惹起機序に一部関与しているが、それ以外の機序が存在していることを示唆している。

5. Fao 細胞においてパルミチン酸はセラミドや PP2A 活性を介さずインスリン抵抗性を惹起する

最後に、ラット肝細胞癌の cell line である Fao 細胞においても同様の検討を行った。Fao 細胞においても、セラミドとパルミチン酸は、インスリン刺激による Akt のリン酸化を抑制したが(図 8A)、Akt の上流は影響がなかったことからこれらの作用点は、やはり Akt レベルと考えられた(結果示さず)。しかし、3T3-L1 や L6 細胞では効果を認めなかったミリスチン酸も Akt リン酸化を抑制した(図 8A)。さらに、セラミド、パルミチン酸およびミリスチン酸は、いずれも PP2A 活性を刺激しなかった(図 8B)。この結果に一致して、オカダ酸前処置は Akt の抑制を解除しなかった(図 8C)。さらに、ミリオシン前処置もパルミチン酸およびミリスチン酸による Akt の抑制を解除しなかった(図 8C)。以上の結果より、Fao 細胞においては、FFA によるインスリン抵抗性機序は、セラミド合成や PP2A 活性化を介さないと考えられた。

考察

今回の研究により、FFA は各臓器において、異なる機序によりインスリン抵抗性を惹起することが明らかとなった(図 9)。脂肪細胞においては、細胞内セラマイド合成亢進により、PP2Aが活性化され、Akt を脱リン酸化してインスリン抵抗性を惹起する。筋細胞においても、セラマイド-PP2A が一部、関与しているが、セラマイド合成阻害剤の効果は 3T3-L1 細胞における効果より弱く部分的であり、同時に他の機序も存在している可能性がある。一方、肝臓においては、FFA は Akt レベルを抑制することは同様であるが、セラマイド合成亢進や、PP2A の活性化は介さず、全く異なる機序を介していると考えられた。

骨格筋特異的にリポ蛋白リパーゼ (LPL)を過剰発現する TG マウスでは、血清中性脂肪値、FFA 値は不変であるが、骨格筋内の遊離脂肪酸 (FFA)由来の代謝産物 (ジアシルグリセロール(DAG)、長鎖アシル-CoA、セラマイド)が増加し、骨格筋での糖取り込みが低下し、インスリン抵抗性を示すことが報告されている(13)。FFA 由来の代謝産物のうち、どれかがインスリン抵抗性の原因になっていると考えられるが、結論は得られていない。

セラマイドは、スフィンゴ脂質の1つで、スフィンゴミエリンシグナルの重要なセカンドメッセンジャーである。セラマイドは遊離脂肪酸の1つであるパルミチン酸から細胞内で生成される。このことから、高 FFA 血症によるインスリン抵抗性の原因が細胞内セラマイドの蓄積によるものであるという説が提唱されている(14)。インスリン抵抗性肥満者において、骨格筋セラマイド含量は非肥満者の2倍に増加しており、しかも血中 FFA 濃度と正相関する(15)。さらに、インスリン感受性と逆相関し、脂肪製剤 (イントラリピッド) を静脈内投与すると、セラマイド含量が増加し、インスリン抵抗性が惹起された(16)。また、ラットを長時間運動させると、筋肉内のセラマイド含量は低下し、その程度は筋肉における糖取り込みの改善の程度と相関した(17)。

セラマイドによるインスリン抵抗性の分子機構について、Schmitz-Peiffer らは、筋肉のモデル細胞である C2C12 細胞を用いた実験で、インスリン刺激による Akt の活性化抑制が原因であると報告した(18)。さらに、Summers らは、Akt の抑制はプロテインホスファターゼ 2A(PP2A)の活性化によると報告した(19)。これまでに報告されていた PP2A の主な作用は、MAP キナーゼカスケードの脱感作により増殖シグナルを抑制することであったが、PP2A の阻害剤であるオカダ酸で糖取り込みが刺激されることや、糖尿病モデルである GK ラットの脂肪組織では、インスリンによる PP2A 活性抑制作用が見られないこと(20)、インスリン抵抗性を示す肥満 2 型糖尿病患者の骨格筋において、PP2A 発現量が増加していること(21)などが報告されており、PP2A とインスリンシグナルとの関連について興味を持たれていた。我々は、PP2A が直接 Akt に結合して脱リン酸化し、インスリンシグナルを負に制御することを明らかにした(6)。さらに、*in vitro* に

においてセラマイドはPP2Aを活性化することが報告されており(10)、これらのことより、FFAは細胞内セラマイド蓄積をきたし、PP2Aを活性化させることでAktを不活性化してインスリン抵抗性を惹起するのではないかという仮説が成り立つが、3T3-L1脂肪細胞における今回の結果により、脂肪細胞においてこの仮説が正しいことが示された。

一方、L6筋細胞では、3T3-L1脂肪細胞と同様に、パルミチン酸によりPP2A活性の上昇とともに、インスリン抵抗性が惹起されたが、その効果は、PP2Aの阻害剤やセラマイド合成の阻害剤で部分的に打ち消すことができたのみであった。この結果は、筋細胞においては、セラマイド-PP2A経路は一部関与しているものの、他の機序も同時に関与して可能性を示唆する。Protein kinase C(PKC) (1, 22, 23)、Ikk(24, 25)などのセリンキナーゼカスケードが筋肉組織における脂肪毒性に関与していることが報告されており、今後、検討する必要がある。また、ひとつの臓器に異なるインスリン抵抗性機序が存在しているという今回の結果は、これまでに報告されているFFAによる骨格筋における種々のインスリン抵抗性機序を考える上で興味深い。すなわち、脂肪製剤の静脈内投与では、筋肉内セラマイド含量は増加させずにインスリン抵抗性を惹起するという報告(26, 27)は、セラマイド仮説を否定する根拠になっているが、FFA投与後短時間で惹起されるインスリン抵抗性はアシルCoAやDAG量増加による、IRS-1レベルでのインスリンシグナル抑制が原因であり、長時間では、細胞内セラマイド蓄積によりPP2A活性化を介するAktレベルでのインスリンシグナル抑制が起こる。すなわち、時間により、同じ臓器で異なる機序が働いていると考えれば説明がつく。

一方、Fao肝細胞では、パルミチン酸は、PP2A活性に影響を与えずに、インスリン抵抗性を惹起した。また、PP2A阻害剤やセラマイド合成阻害剤もインスリン抵抗性を改善しなかった。このことは、肝臓においては、FFAはセラマイド-PP2Aを介さない機序でインスリン抵抗性を惹起していることを示唆している。FFAの肝臓におけるインスリン抵抗性惹起の分子機序についての検討は少ない。肝臓においてもPKCやIKK β /I κ B/NF- κ B経路の活性化がインスリン抵抗性に関与しているという報告があるが(28)、実際に我々の実験系で、どのような機序を介しているかについては今後の検討が必要である。

高FFA血症は、種々の臓器において様々な機序によりインスリン抵抗性を惹起し、全身のインスリン抵抗性を引き起こす。全身のインスリン抵抗性はさらに、脂肪組織での脂肪分解を増加させ、高FFA血症を増悪させる。ここに介入して悪循環を断ち切ることができれば、病態の改善に役立つはずである。各臓器をターゲットにした介入法を開発するためには、この臓器特異性のあるFFAによるインスリン抵抗性の機序についてさらに解明していくことが重要である。

文献

- 1) Shulman GI. Cellular mechanism of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106: 171
- 2) Hagardy BD, Furler SM, Ye J, et, al. The role of intramuscular lipid in insulin resistance. *Acta Physiol Scand* 2003; 178: 373
- 3) Fung MV, Williford J, Wells A, et, al. Fatty acid-induced insulin resistance in adipocytes. *Endocrinology* 1997; 138: 4338
- 4) Usui I, Haruta T, Iwata M, et, al. Differential effects of palmitate on glucose uptake in rat-1 fibroblasts and 3T3-L1 adipocytes. *Horm Metab Res* 1999; 31: 546
- 5) Gao Z, Zhang X, Zuberi A, et, al. Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 2024
- 6) Ugi S, Imamura T, Maegawa H, et, al. Protein Phosphatase 2A Negatively Regulates Insulin's Metabolic Signaling Pathway by Inhibiting Akt (Protein Kinase B) Activity in 3T3-L1 Adipocytes. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 8778
- 7) Egawa K, Maegawa H, Shimizu S et, al. Protein-tyrosine Phosphatase-1B Negatively Regulates Insulin Signaling in L6 Myocytes and Fao Hepatoma Cells. *J Biol Chem* 2004; 276: 10207
- 8) Briaud I, Harmon JS, Kelpe CY, et al. Lipotoxicity of the Pancreatic β -Cell Is Associated With Glucose-Dependent Esterification of Fatty Acids Into Neutral Lipids. *Diabetes* 2001; 50: 315
- 9) Ugi S, Imamura T, Ricketts W, et al. Protein Phosphatase 2A Forms a Molecular Complex with Shc and Regulates Shc Tyrosine Phosphorylation and Downstream Mitogenic Signaling. *Mol Cell Biol* 2001; 22: 2375
- 10) Chlfant CE, Kishikawa K, Munby MC, et, al. Long chain ceramides activate protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A. Activation is stereospecific and regulated by phosphatidic acid. *J Biol Chem* 1999; 274: 20313
- 11) Chavez JA, Knotts TA, Wang LP, et al. A Role for Ceramide, but Not Diacylglycerol, in the Antagonism of Insulin Signal Transduction by Saturated Fatty Acids. *J Biol Chem* 1999; 278: 10297
- 12) Alfred H. Merrill, Jr. *De Novo* Sphingolipid Biosynthesis: A Necessary, but Dangerous, Pathway. *J Biol Chem* 2002; 277: 25843
- 13) Kim JK, Fillmore JJ, Chen Y, et, al. Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 7522
- 14) Scott A. Summers and Don H. Nelson. A Role for Sphingolipids in Producing the

Common Features of Type 2 Diabetes, Metabolic Syndrome X, and Cushing's Syndrome. *Diabetes* 2005; 54: 591

- 15) Adams JM, Pratipanawatr T, Berria R, et, al. Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes* 2004; 53: 25-31
- 16) Strackowski M, Kowalska I, Nikolajuk A, et, al. Relationship between insulin sensitivity and sphingomyelin signaling pathway in human skeletal muscle *Diabetes* 2004; 53: 1215
- 17) Dobrzyń A, Ceramides J. Ceramide and sphingomyelins in skeletal muscles of the rat: content and composition. Effect of prolonged exercise *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282: E277
- 18) Cazzolli R, Carpenter L, Biden TJ, et, al. A Role for Protein Phosphatase 2A-Like Activity, but Not Atypical Protein Kinase ζ , in the Inhibition of Protein Kinase B/Akt and Glycogen Synthesis by Palmitate. *Diabetes* 2001; 50:2210
- 19) Stratford S, Hoehn KL, Liu F, et, al. Regulation of insulin action by ceramide: dual mechanisms linking ceramide accumulation to the inhibition of Akt/protein kinase B. *J Biol Chem* 2004; 279: 36608
- 20) Begum N, Rangolia L. Altered regulation of insulin signaling components in adipocytes of insulin-resistant type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Metabolism* 1998; 47: 54
- 21) Levin K, Schroeder HD, Alford FP, et, al. Morphometric documentation of abnormal intramyocellular fat storage and reduced glycogen in obese patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* 2001; 44: 824
- 22) Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, et, al. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C θ and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 1999; 48: 1270
- 23) Kim JK, Filmore JJ, Sunshine MJ, et, at. PKC- θ knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2004; 114: 823
- 24) Kim JK, Kim YJ, Filmore JJ, et, al. Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest* 2001; 108: 437
- 25) Yuan, M, Konstantopoulos N, Lee J, et, al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* 2001; 293: 1673
- 26) Yu C, Chen Y, Cline GW, et, at. Mechanism by Which Fatty Acids Inhibit Insulin Activation of Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1)-associated Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity in Muscle. *J Biol Chem* 2002; 277: 50230
- 27) Itani, SI, Ruderman, NB, Schmieder F, et, al. Lipid-Induced Insulin Resistance in Human Muscle Is Associated With Changes in Diacylglycerol, Protein Kinase C, and I κ B- α . *Diabetes* 2002; 51: 2005
- 28) Boden G, She P, Mozzoli M, et, al. Free fatty acids produce insulin resistance and activate

the proinflammatory nuclear factor- κ B pathway in rat liver. *Diabetes* 2005; 54: 3458

Figure Legend

図 1

3T3-L1 脂肪細胞において C2 セラマイドとパルミチン酸は Akt レベルでインスリンシグナルを抑制する (A) 100 μ M C2 セラマイドは 30 分間または 6 時間前孵置、0.5mM または 1mM パルミチン酸は 24 時間孵置した後、100ng/ml インスリンを 30 分間刺激し、糖取り込みを測定した。* $p < 0.01$ vs control cell without insulin, ** $p < 0.01$ vs control cell with insulin、(B)(C) 100 μ M C2 セラマイドまたは 1mM パルミチン酸を前孵置した後、100ng/ml インスリンを 5 分間刺激し、インスリンシグナルをウエスタンブロット法にて検討した。C2: C2 セラマイド、pal: パルミチン酸

図 2

3T3-L1 脂肪細胞において C2 セラマイドとパルミチン酸は PP2A を活性化する 100 μ M C2 セラマイドを様々な時間(A)、または、様々な濃度のパルミチン酸を 24 時間前孵置した後、抗 PP2A 抗体にて免疫沈降し、PP2A 活性を測定した。* $p < 0.01$ vs control cell (B) 細胞を抗 PP2A 抗体にて免疫沈降し、沈降物に直接 C2 セラマイドまたはパルミチン酸を添加した後、PP2A 活性を測定した。* $p < 0.01$ vs DMSO treated cells、C2: C2 セラマイド、pal: パルミチン酸

図 3

3T3-L1 脂肪細胞において PP2A 活性の抑制は C2 セラマイドとパルミチン酸によるインスリン抵抗性を解除する

(A) 100 μ M C2 セラマイドは 30 分間、1 μ M オカダ酸は 40 分間、1mM パルミチン酸は 24 時間孵置した。small t antigen はアデノウイルス感染により、過剰発現させた。100ng/ml インスリンを 5 分間刺激し、Akt リン酸化をウエスタンブロット法にて検討した。* $p < 0.01$ vs control cell, ** $p < 0.01$ vs C2 ceramide or palmitate treated cells (B) small t antigen を過剰発現させた細胞に、100 μ M C2 セラマイドを 30 分間または 1mM パルミチン酸を 24 時間孵置した後、100ng/ml インスリンを 30 分間刺激し、糖取り込みを測定した * $p < 0.01$ vs control cell without insulin, ** $p < 0.05$ vs C2 ceramide or palmitate treated cells stimulated with insulin、C2: C2 セラマイド、p: パルミチン酸、OA: オカダ酸、sT: small t antigen

図 4

3T3-L1 脂肪細胞においてセラマイド合成阻害はパルミチン酸によるインスリン抵抗性を解除する

10 μ M ミリオシンは 16 時間、1 μ M オカダ酸は 40 分間、1mM パルミチン酸は 24 時間孵置した後、PP2A 活性(A)、Akt のリン酸化(B)、糖取り込み(C) を測定した。(A) *p < 0.01 vs control cell (B) *p < 0.01 vs control cell stimulated with insulin (C) *p < 0.05 vs control cell stimulated with insulin、OA: オカダ酸

図 5

3T3-L1 脂肪細胞においてミリスチン酸やオレイン酸はインスリン抵抗性を惹起しない
1mM パルミチン酸、ミリスチン酸またはオレイン酸を 24 時間孵置した後、PP2A 活性(A)、Akt のリン酸化(B)、糖取り込み(C) を測定した。(A) *p < 0.01 vs control cell (C) *p < 0.01 vs control cell stimulated with insulin、P: パルミチン酸、M: ミリスチン酸、O: オレイン酸

図 6

L6 筋細胞においてパルミチン酸は Akt レベルでインスリンシグナルを抑制する
様々な濃度のパルミチン酸、ミリスチン酸またはオレイン酸を 24 時間孵置した後、糖取り込み(A)、Akt のリン酸化(B)を測定した。*p < 0.05, **p < 0.01 vs control cell stimulated with insulin

図 7

L6 筋細胞においてパルミチン酸によるインスリン抵抗性は、PP2A 活性の抑制により完全に、セラマイド合成阻害により部分的に解除される
1 μ M オカダ酸は 40 分間、10 μ M ミリオシンは 16 時間前処置し、100 μ M C2 セラマイドを 30 分間または 1mM パルミチン酸を 24 時間孵置した後、Akt のリン酸化を測定した。*p < 0.01 vs cell stimulated with insulin C2: C2 セラマイド、OA: オカダ酸、P: パルミチン酸

図 8

Fao 肝細胞において、PP2A やセラマイドは FFA によるインスリン抵抗性に関与しない
様々な濃度のパルミチン酸、ミリスチン酸を 24 時間、または、C2 セラマイドを 30 分間孵置した後、Akt のリン酸化(A) および PP2A 活性(B) を測定した。*p < 0.05, **p < 0.01 vs control cell stimulated with insulin、(C) 1 μ M オカダ酸は 40 分間、10 μ M ミリオシンを 16 時間前処置し、100 μ M C2 セラマイドを 30 分間、0.25mM パルミチン酸または 0.25mM ミリスチン酸を 24 時間孵置した後、Akt のリン酸化を測定した。*p < 0.01 vs cell stimulated with insulin C2: C2 セラマイド、OA: オカダ酸、P: パルミチン酸、M: ミリスチン酸

図 9

高 FFA 血症によるインスリン抵抗性惹起機序の臓器特異性

A

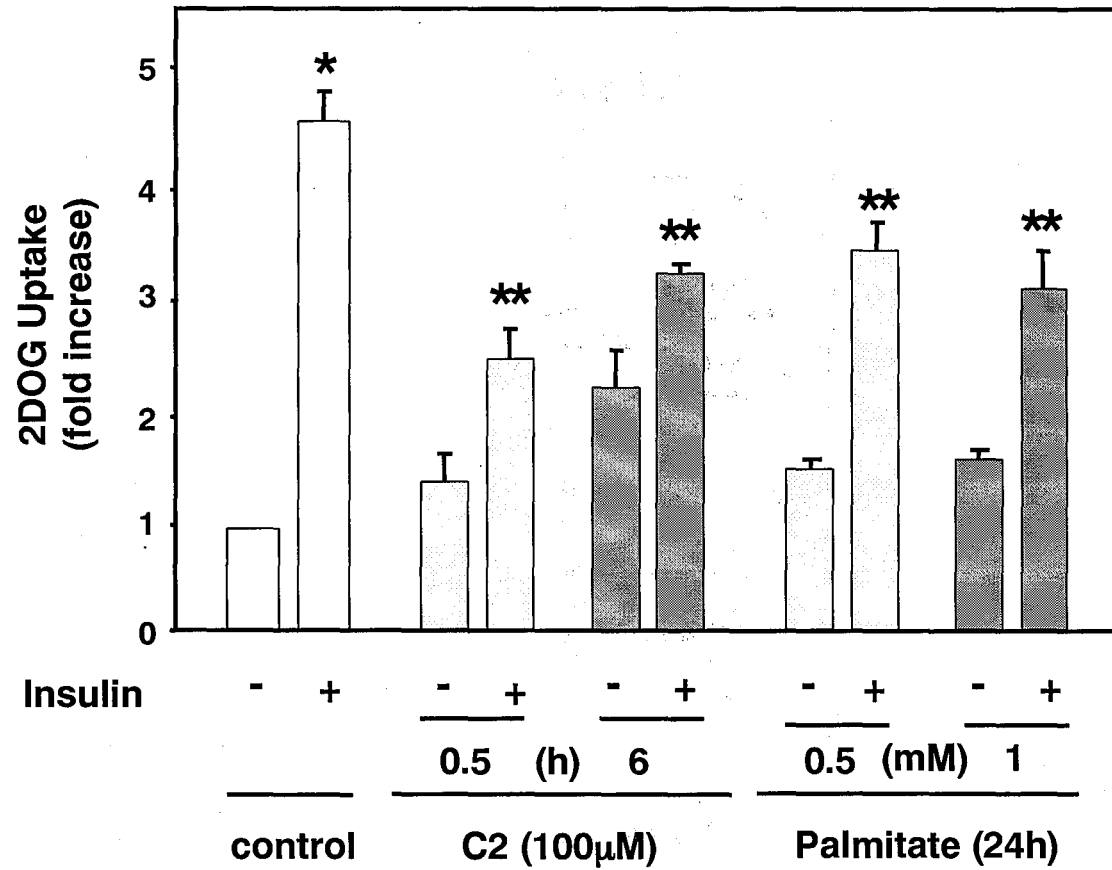


Fig. 1

B

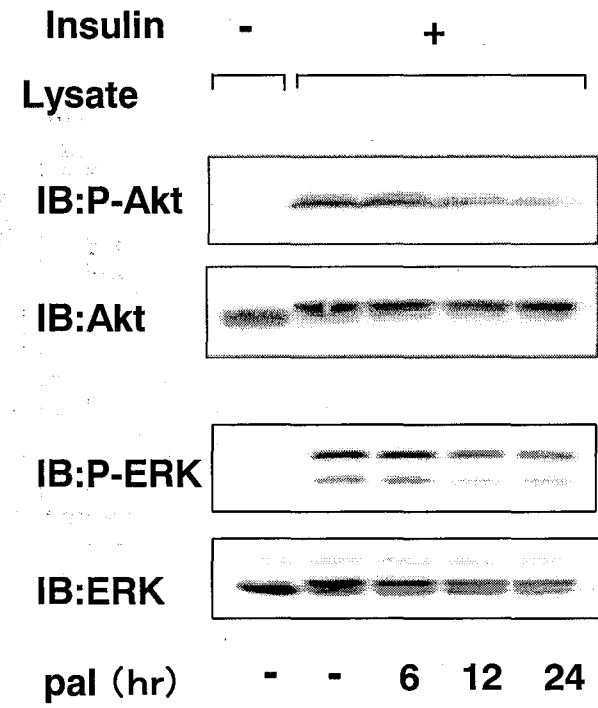
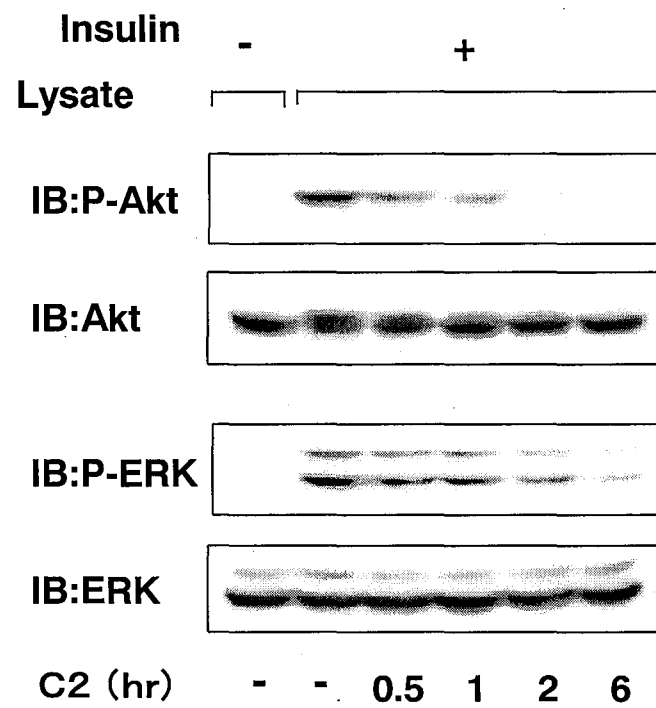


Fig. 1

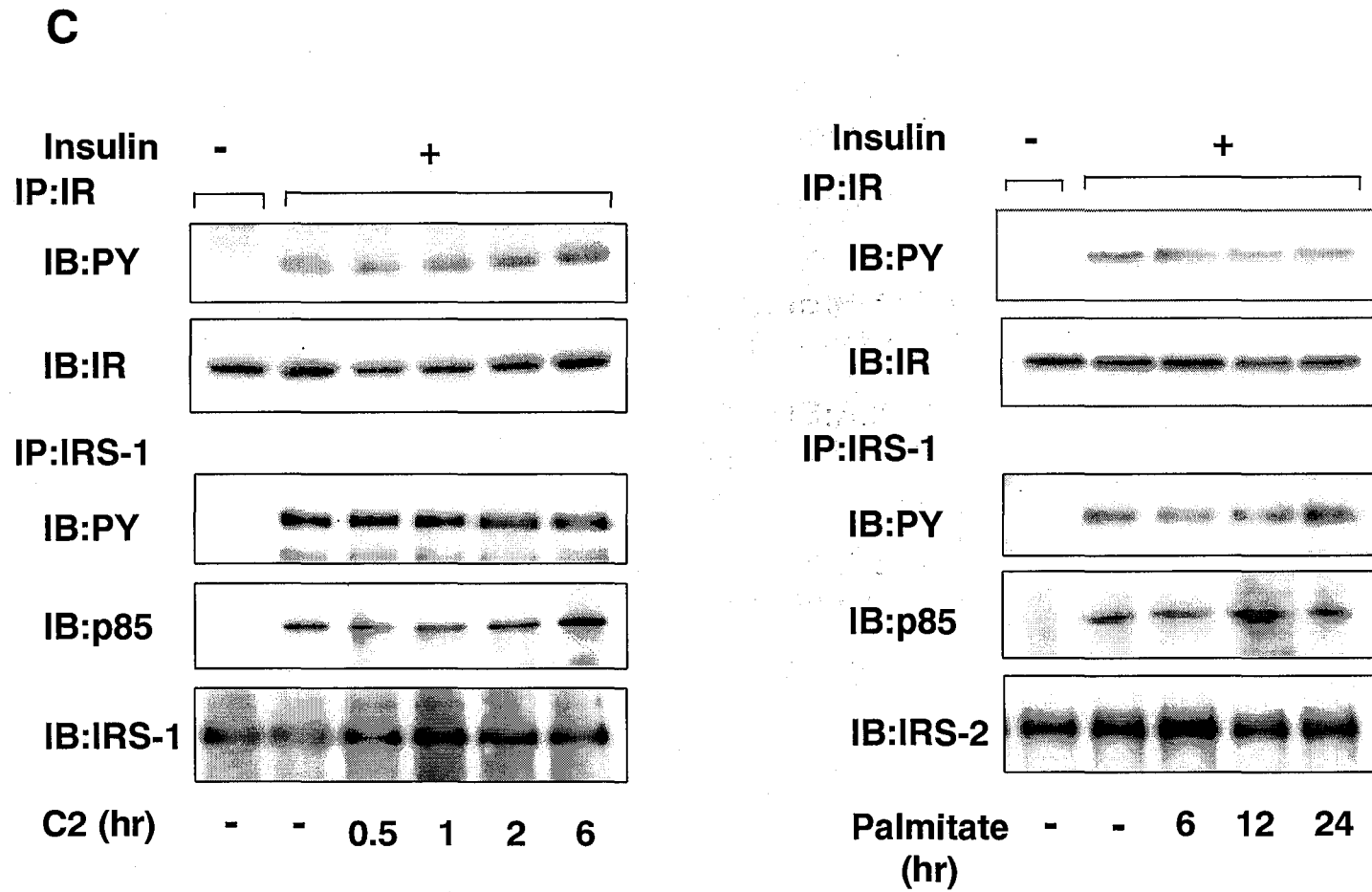


Fig. 2

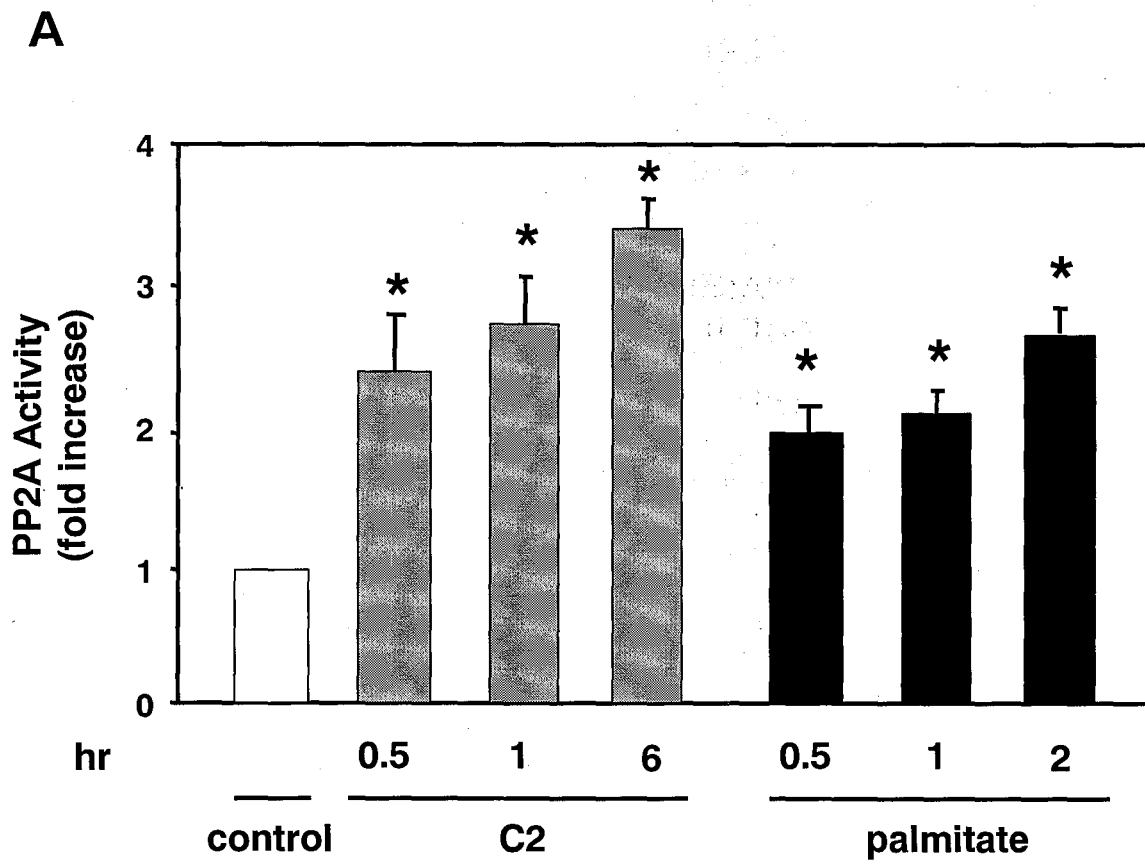


Fig. 2

B

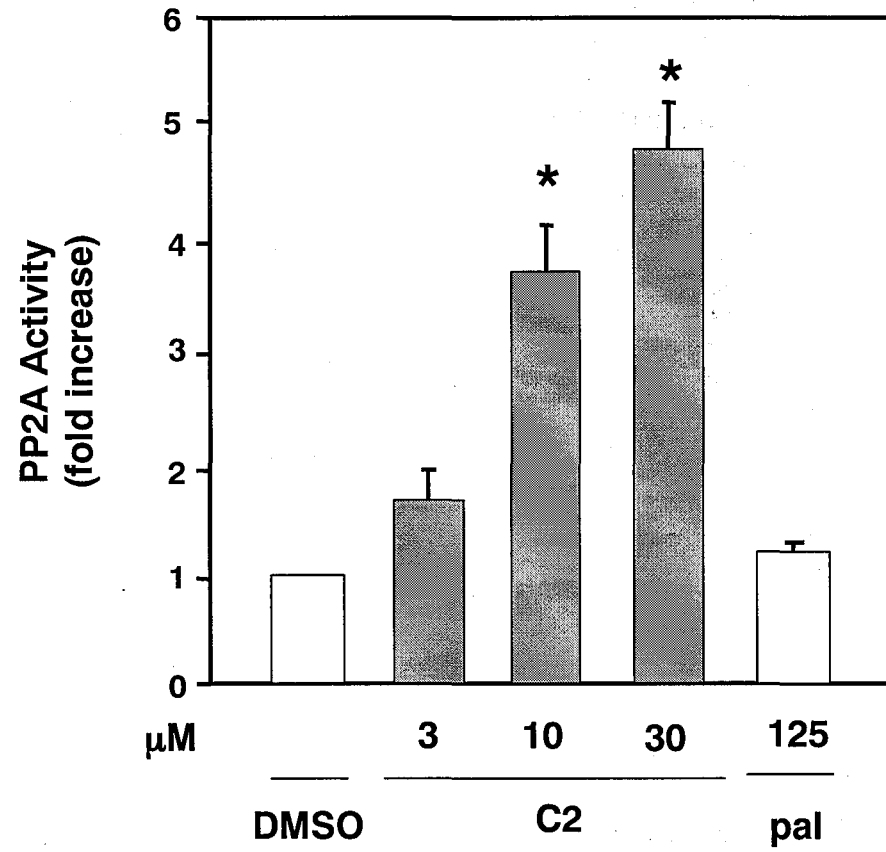


Fig. 3

A

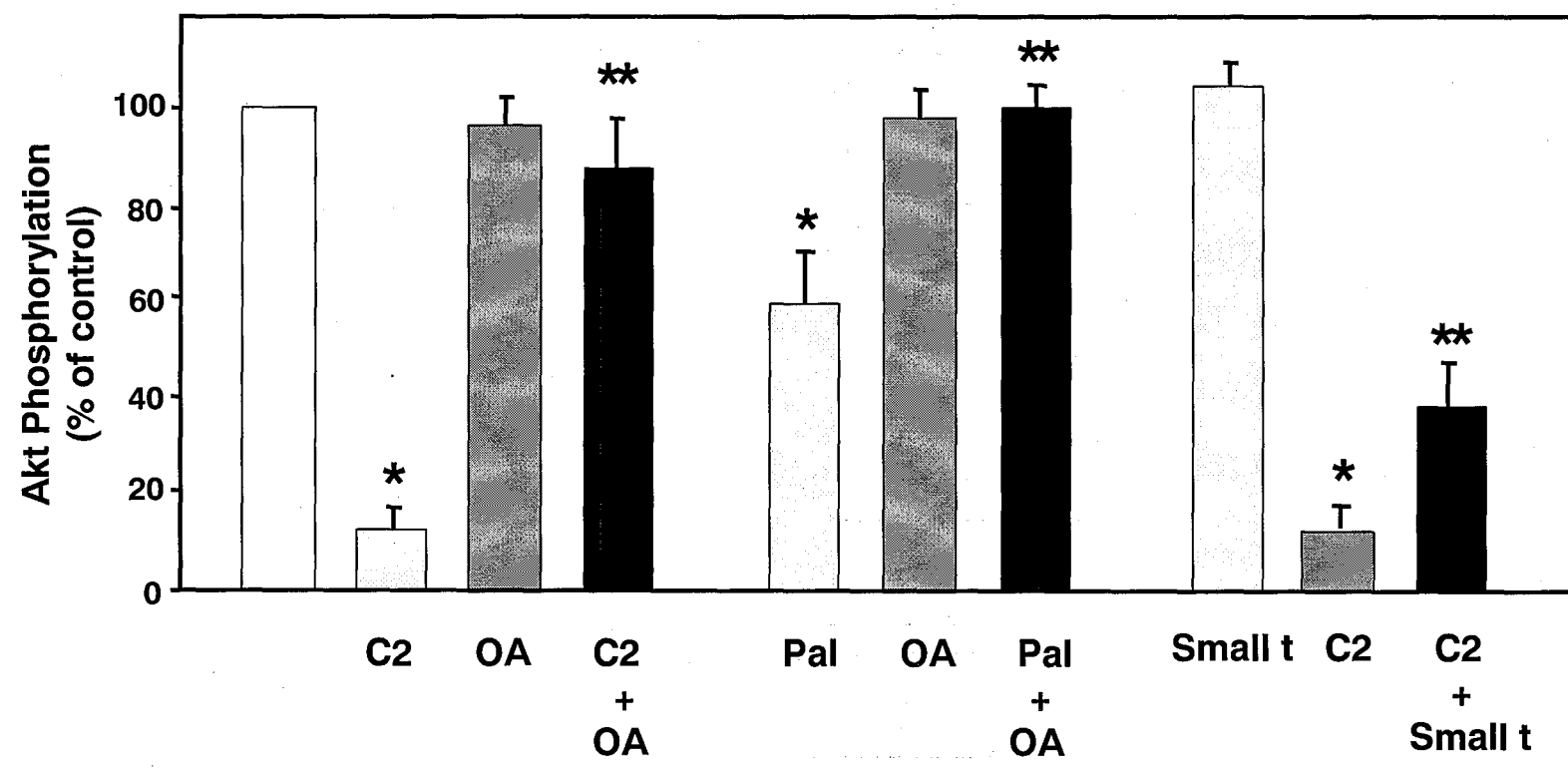
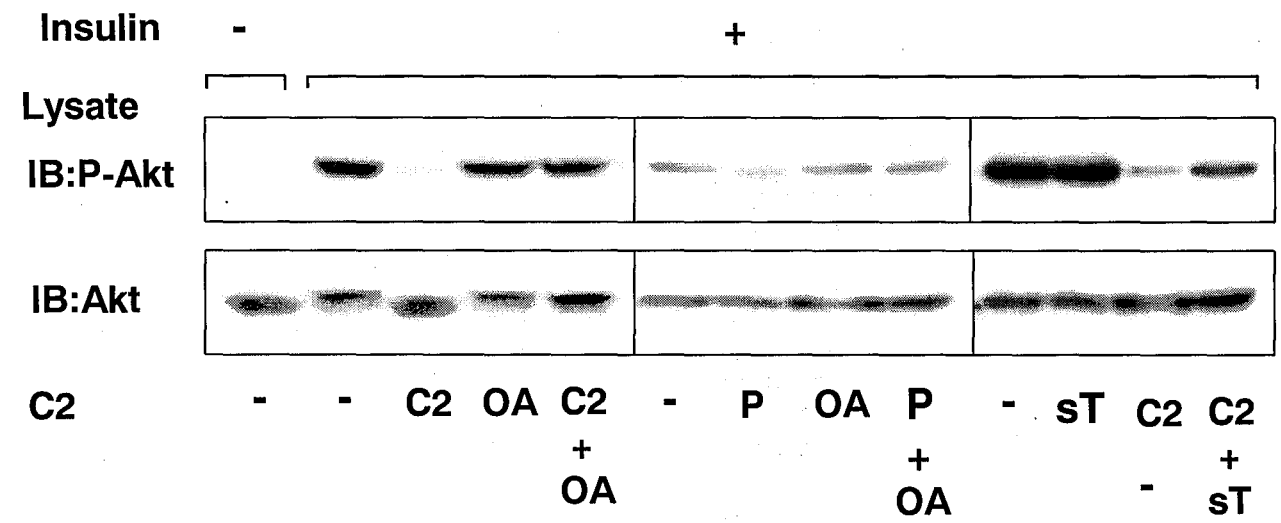
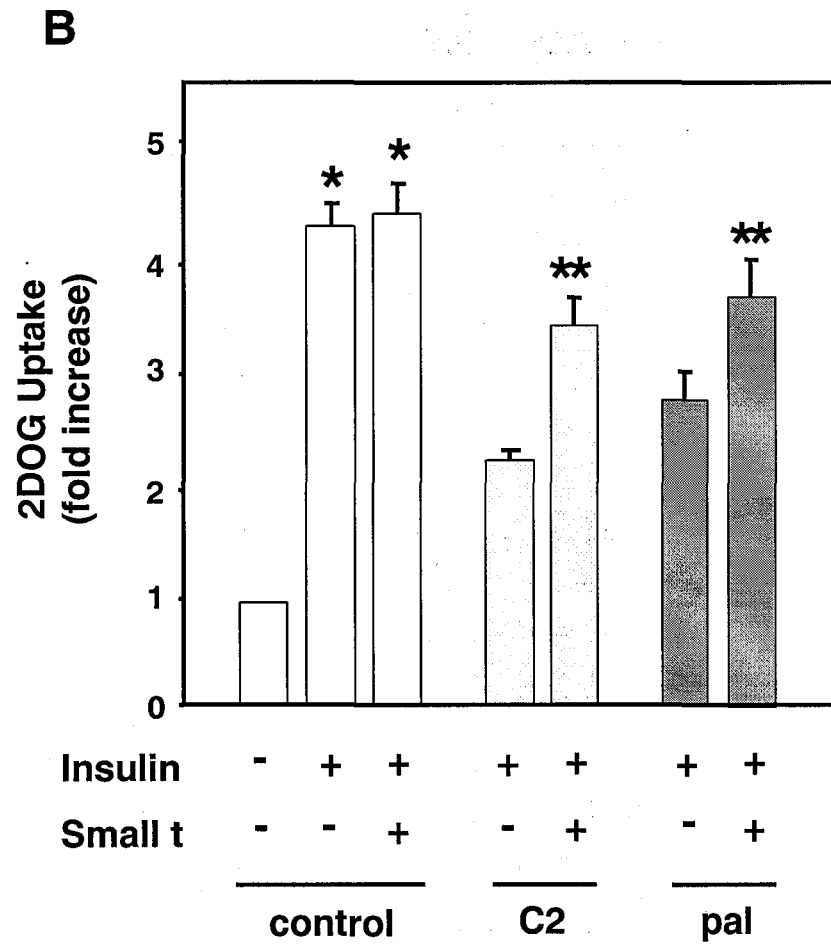


Fig. 3



A

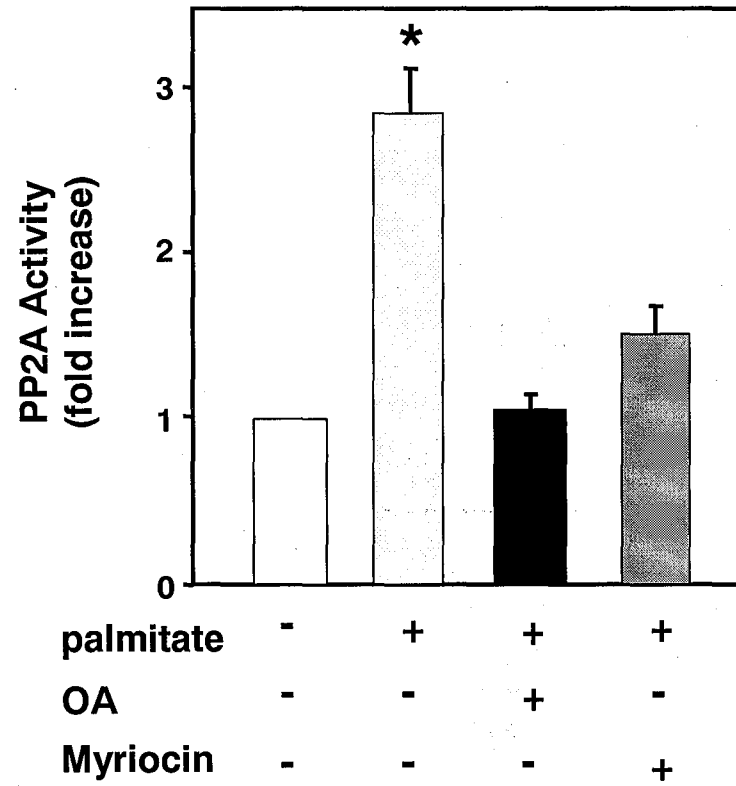
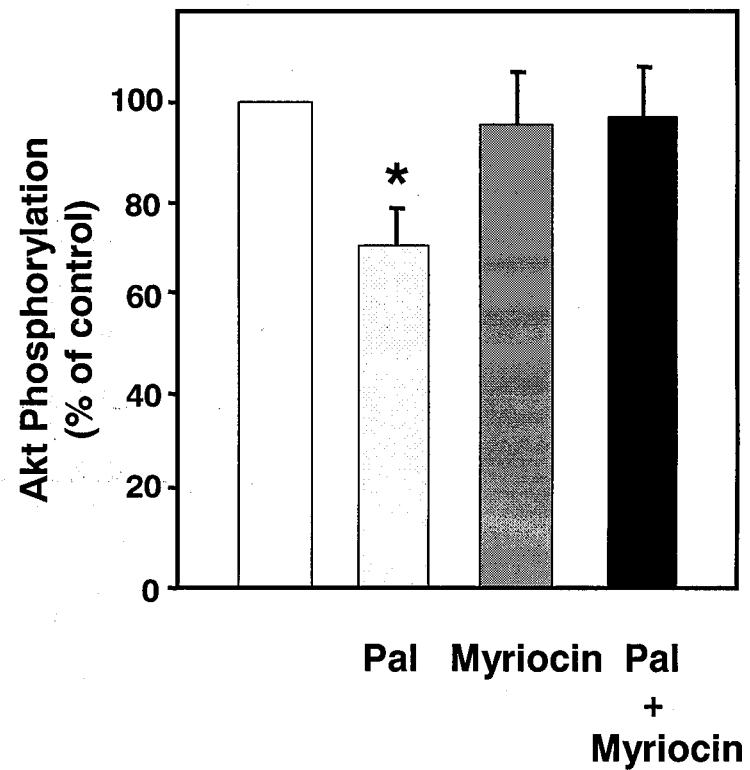
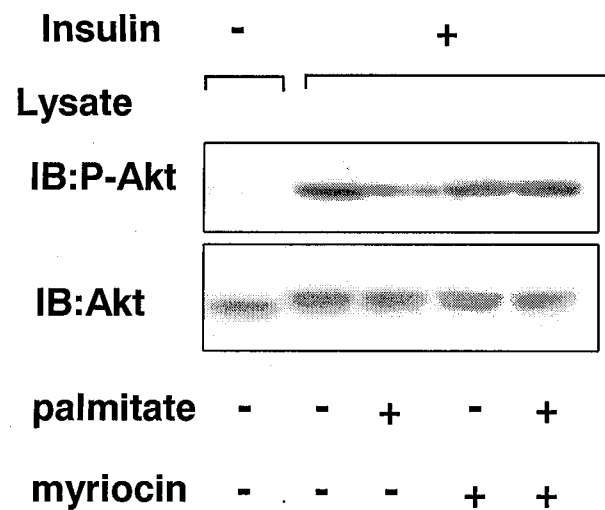


Fig. 4

B



C

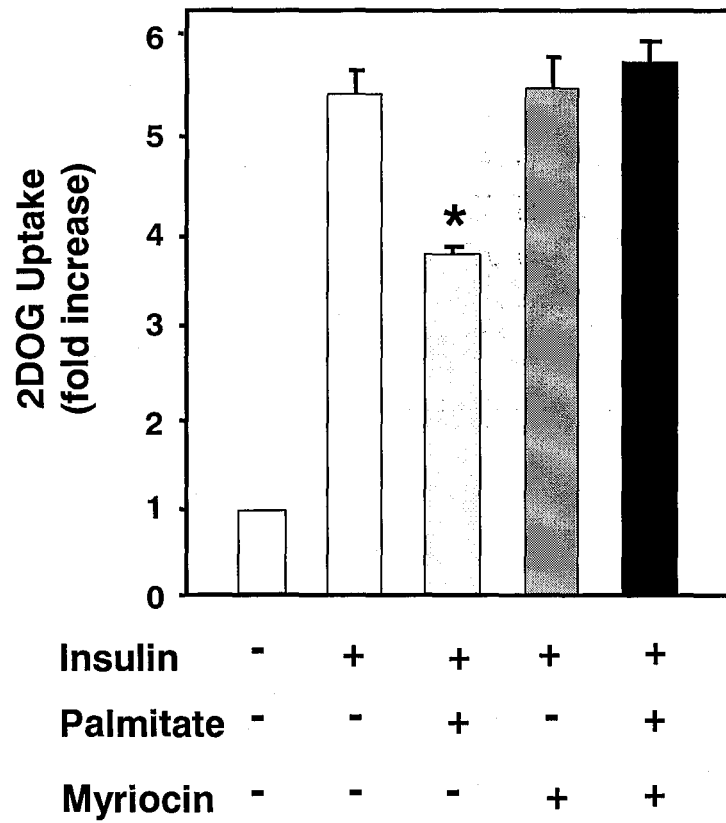


Fig. 5

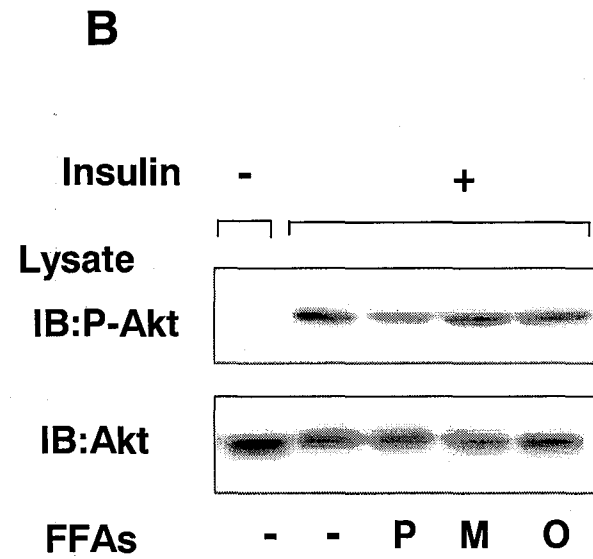
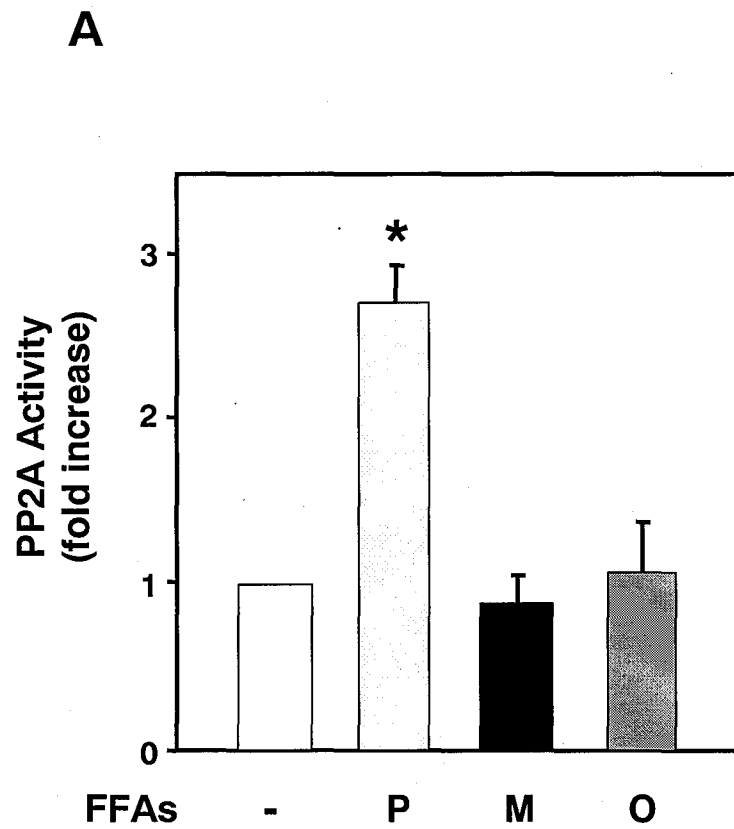


Fig. 5

C

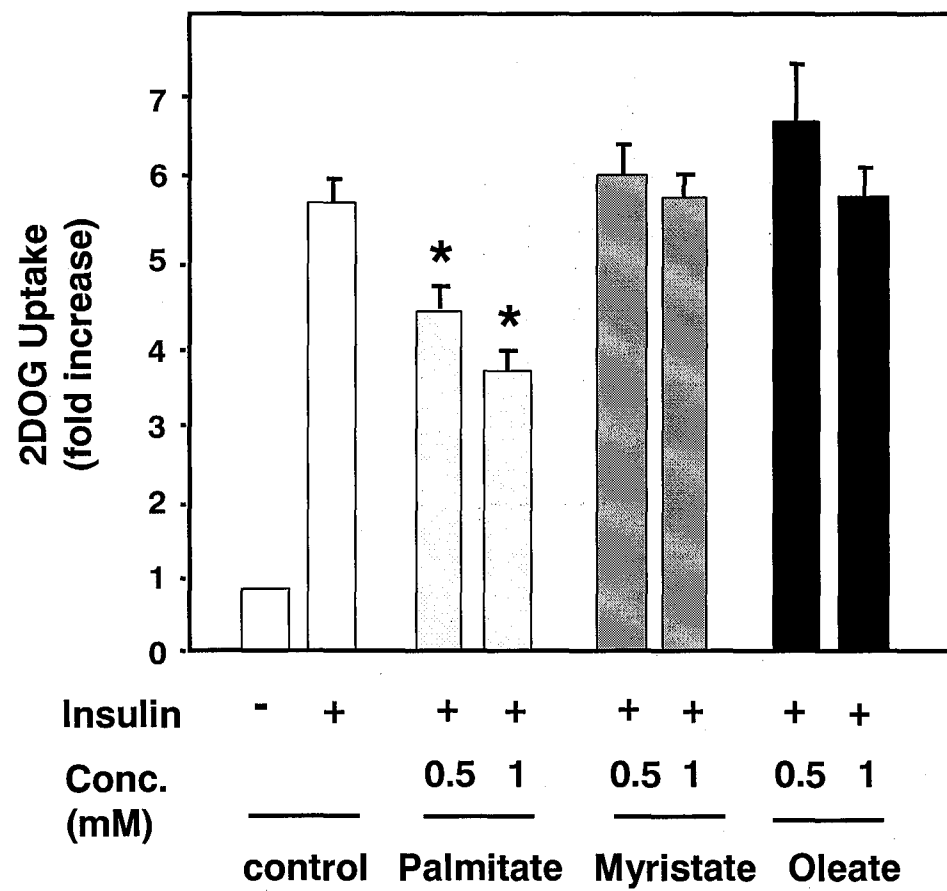
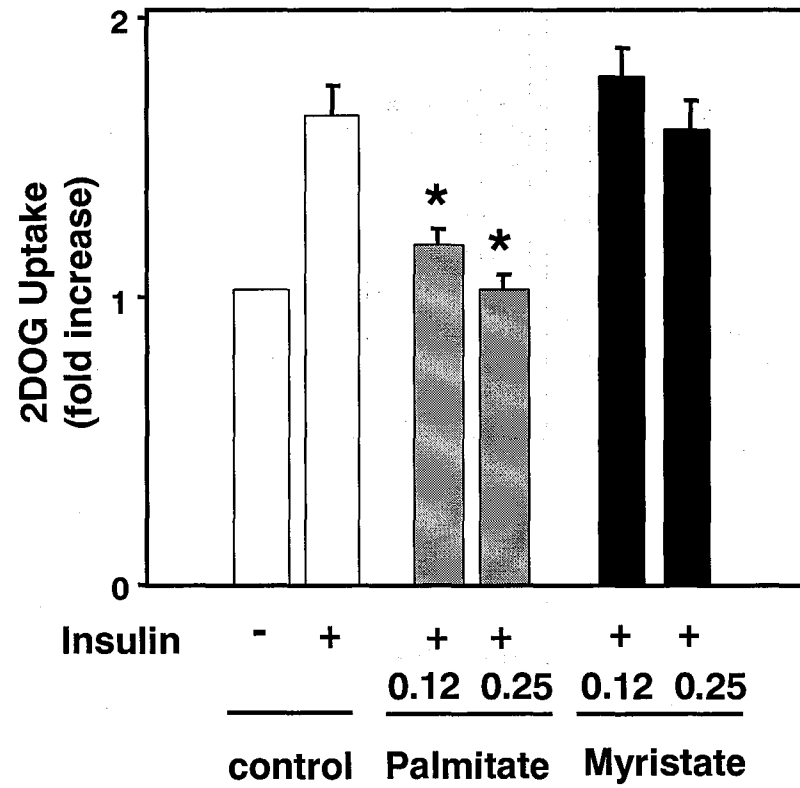


Fig. 6

A



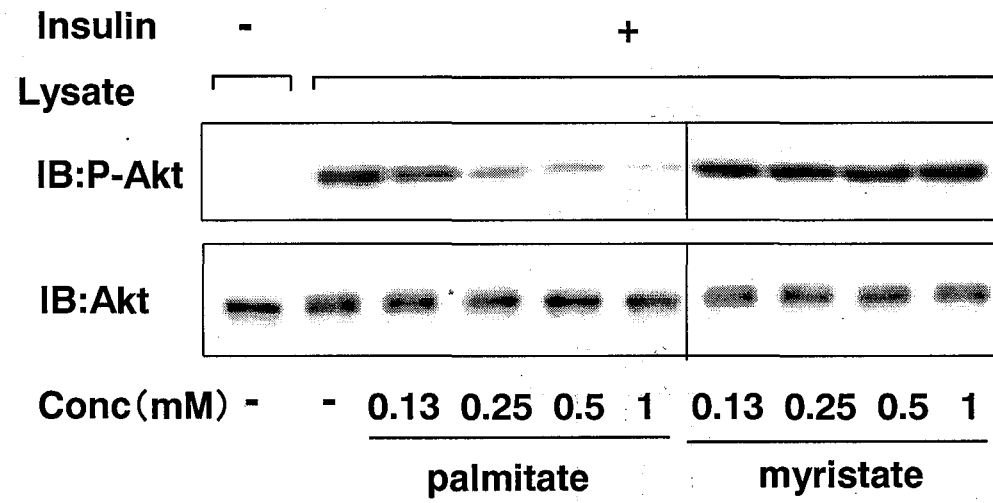
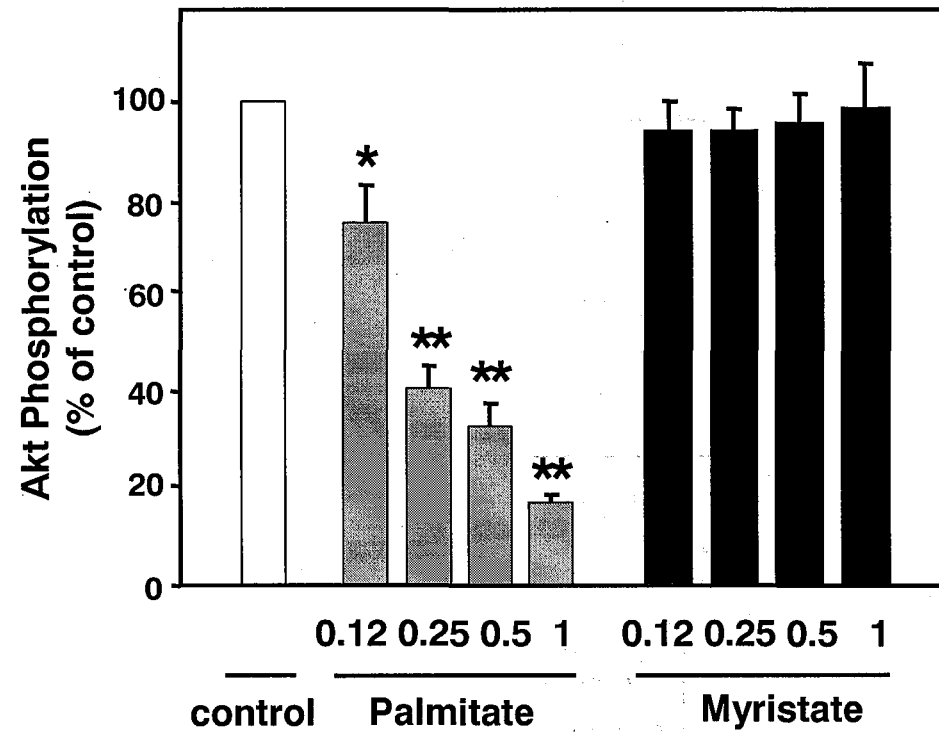
B**Fig. 6**

Fig. 7

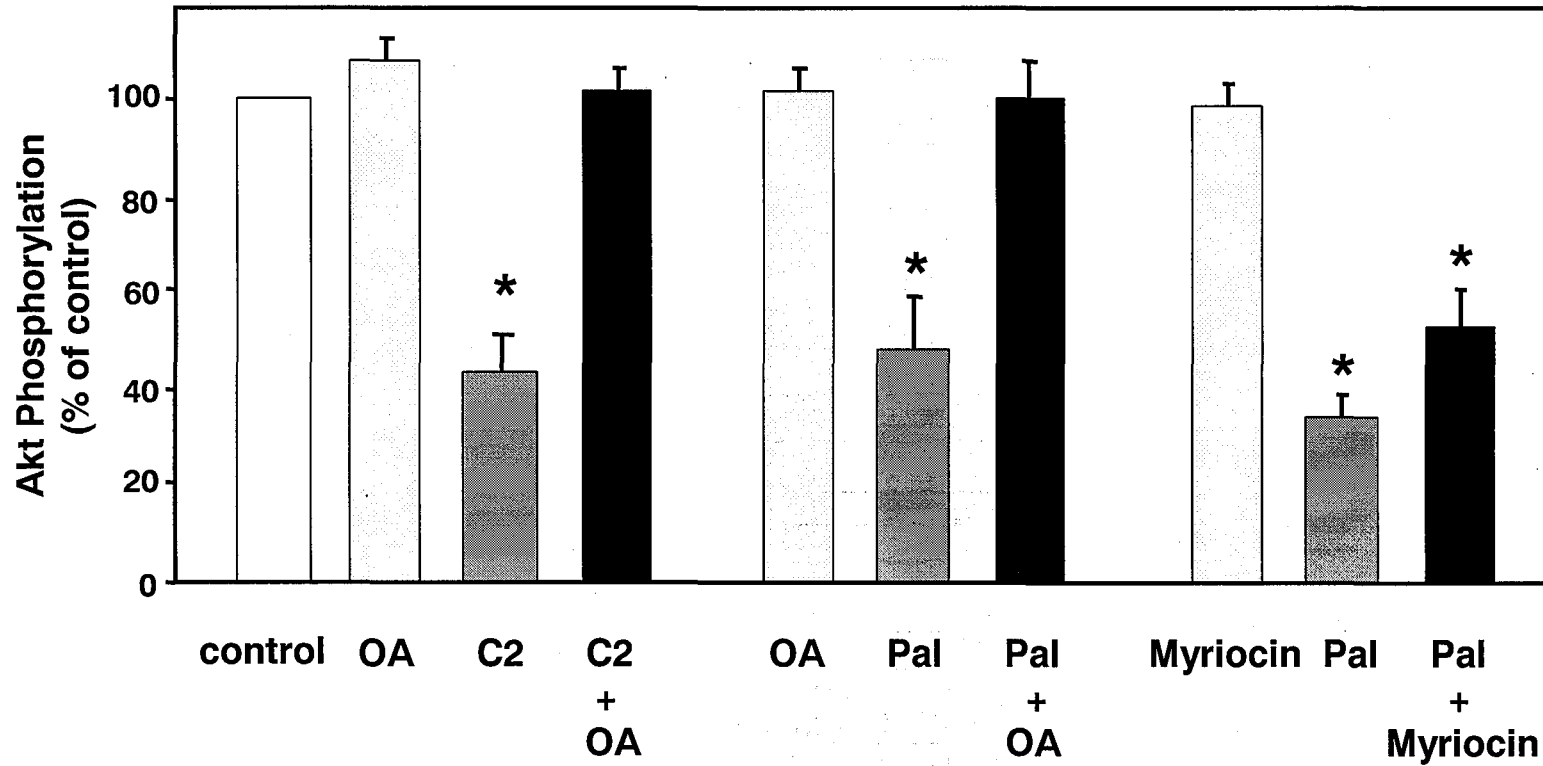
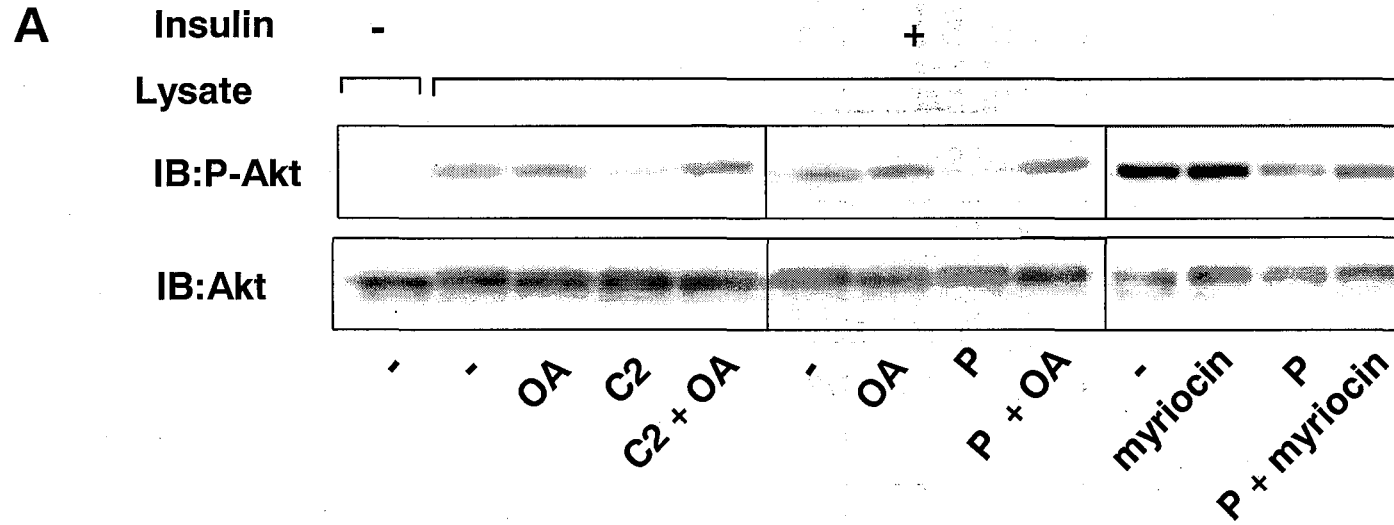


Fig. 8

B

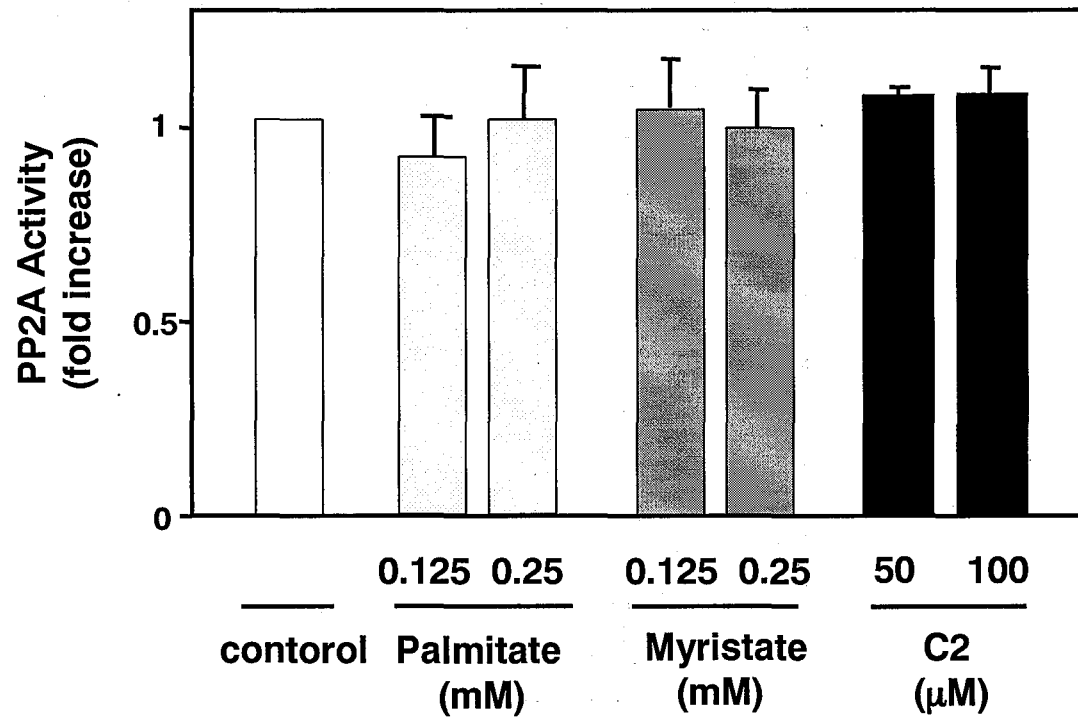


Fig. 8

C

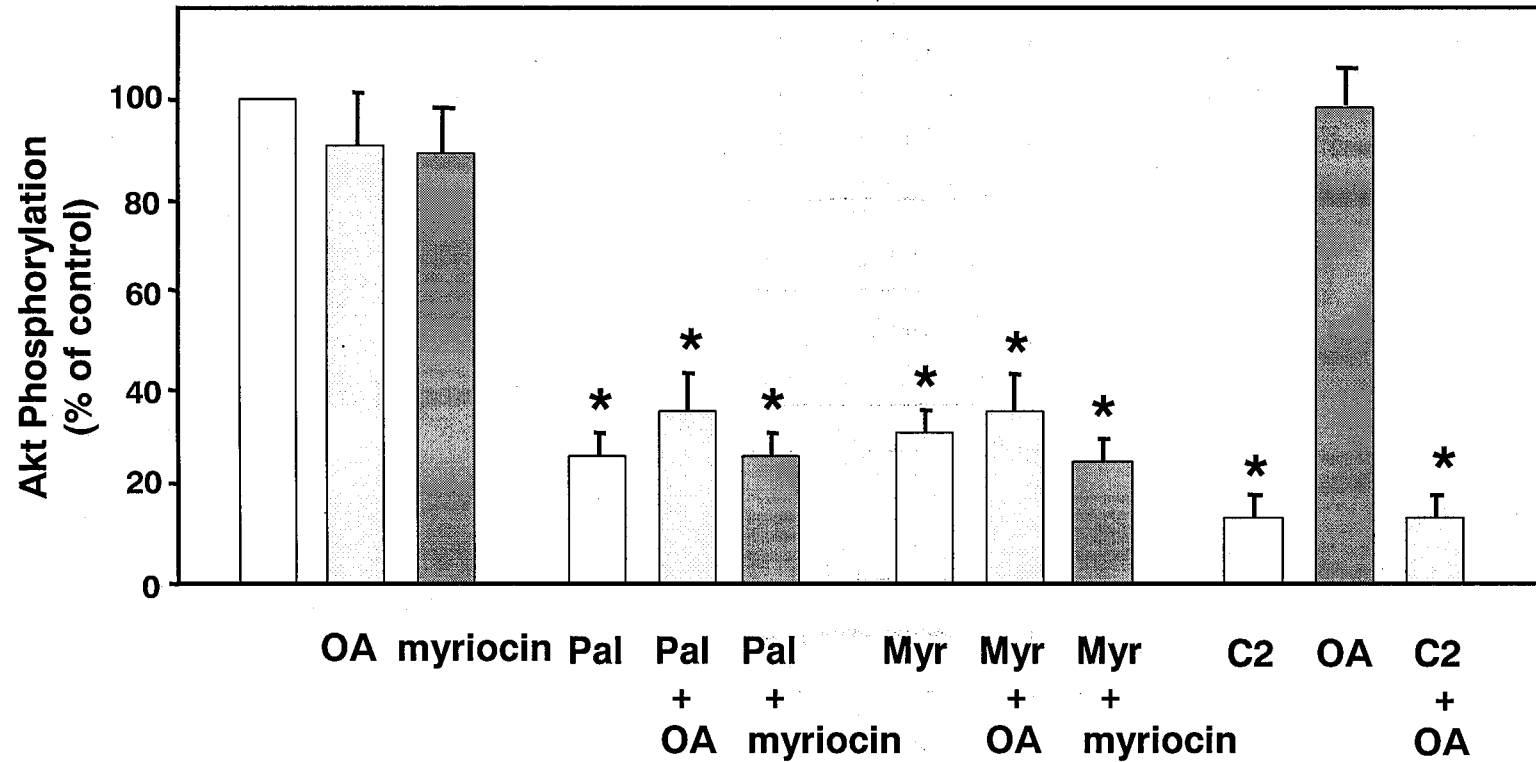
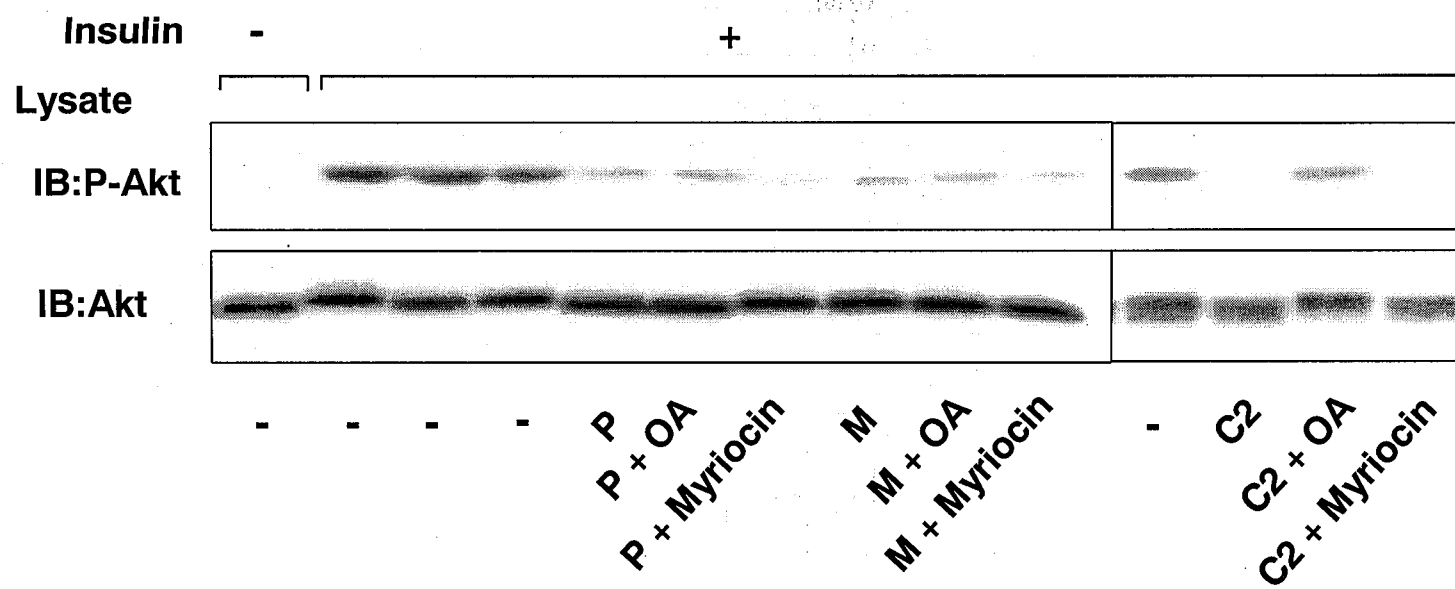


Fig. 9

