

学 位 論 文  
Doctor's Thesis

論 文 名 : 3T3-L1 脂肪細胞におけるインスリンによる  
レジスチン mRNA 発現抑制機構の解析  
(Study on the mechanism of insulin-induced  
downregulation of resistin mRNA in 3T3-L1 adipocytes)

著 者 名 : 河島 淳司 (Junji Kawashima)

指導教官名 : 代謝内科学教授

荒木 栄一

七里 元亮(前教授)

審査委員名 : 分子遺伝学担当教授 森 正敬

循環器内科学担当教授 小川 久雄

生化学第二担当教授 堀内 正公

神経発生分野担当教授 大久保 博晶

2 0 0 3 年 3 月

## - 目 次 -

1. 要旨.....	1
2. 発表論文リスト.....	5
3. 謝辞.....	7
4. 略語一覧.....	8
5. 研究の背景と目的.....	11
5-(1) 2型糖尿病の成因と病態.....	11
5-(2) 肥満に伴うインスリン抵抗性の発症機序.....	14
5-(3) レジスチンの構造、発現、機能及び インスリン抵抗性との関係.....	18
(A) レジスチンの構造	
(B) レジスチンの発現	
(C) レジスチンの機能	
(D) ヒトにおけるレジスチンとインスリン抵抗性との関係	
5-(4) インスリン作用の伝達機構.....	22
(A) インスリン受容体	
(B) インスリン受容体の基質	
(C) PI 3-キナーゼ及びそれ以降のシグナル	
(D) MAP-キナーゼ及びそれ以降のシグナル	
(E) CAP-Cbl シグナル経路	
(F) その他のシグナル経路	
5-(5) 本研究の目的.....	29
6. 実験方法.....	30
6-(1) 細胞培養.....	30
6-(2) ノーザンブロット法.....	30
(A) 細胞刺激	
(B) RNA の抽出	
(C) ハイブリダイゼーション	
6-(3) ウェスタンブロット法.....	32
(A) 蛋白精製	
(B) ウェスタンブロット法	
6-(4) p38 MAP-キナーゼ活性の測定.....	34

6-(5) アデノウィルスを用いた遺伝子導入.....	35
6-(6) PI 3-キナーゼ活性測定.....	35
6-(7) 統計処理.....	36
7. 実験結果.....	37
7-(1) 3T3-L1 細胞における分化に伴うレジスチン mRNA の 発現についての検討.....	37
7-(2) 3T3-L1 脂肪細胞におけるインスリンによる レジスチン mRNA の変化.....	38
7-(3) インスリンによるレジスチン mRNA の発現低下に対する ブドウ糖の影響.....	40
7-(4) インスリンシグナル伝達経路の検討.....	41
7-(5) 蛋白合成阻害剤サイクロヘキサマイドについての検討.....	45
7-(6) RNA 合成阻害剤アクチノマイシン D の効果.....	46
8. 考察.....	48
8-(1) インスリンによるレジスチンの発現調節.....	48
8-(2) インスリンシグナル伝達機構の解析.....	49
8-(3) サイクロヘキサマイド及びアクチノマイシン D の効果.....	50
9. 結語.....	53
10. 参考文献.....	54

## 1. 要旨

脂肪細胞から分泌されるレジスチンは、肥満とインスリン抵抗性を結び付ける分子として同定された。3T3-L1 脂肪細胞において、インスリンがレジスチン mRNA の発現を抑制することが報告されているが、その機序については明らかになっていない。今回、3T3-L1 細胞におけるインスリンによるレジスチン mRNA の発現調節機序について各種阻害剤を用いて解析した。3T3-L1 線維芽細胞をインスリン、デキサメサゾン及びイソブチルメチルキサンチンを用いて脂肪細胞に分化誘導すると、誘導開始後 4 日目よりレジスチン mRNA の発現を認め、8 日目に最大となった。以後の解析は分化 8 日目の 3T3-L1 脂肪細胞を用いた。3T3-L1 脂肪細胞において、インスリンは濃度、時間依存性にレジスチン mRNA の発現を抑制した。このインスリンの効果はブドウ糖を含まない培養液中でも認められた。インスリンによるレジスチン mRNA 発現抑制は、extracellular signal-regulated kinase (ERK) 経路阻害剤 PD98059 や p38 mitogen-activated protein (MAP)-キナーゼ阻害剤 SB203580 によって影響を受けなかった。phosphatidylinositol (PI) 3-キナーゼ阻害剤 LY294002 存在下では、インスリンによるレジスチン mRNA の抑制は軽度増強したが、PI 3-キナーゼ調節サブユニット p85 のドミナントネガティブフォーム  $\Delta$ p85 を過剰発現させた細胞においては、インスリンによるレジスチン mRNA の発現抑制に変化は見られなかった。蛋白合成阻害剤であるサイクロヘキサマイドで細胞を前処理した場合、インスリンによるレジスチン mRNA の低下が完全に抑制された。mRNA 減少の経時的観察において、インスリン刺激によるレジスチン mRNA の減少速度は、RNA 合成阻害剤であるアクチノマイシン D 処理による減少速度よりも速く、またアクチノマイシン D 存在下でインスリン刺激した場合の減少速度は、インスリン単独刺激時よりもレジスチン mRNA の減少が緩やかで、アクチノマイシン D 単独刺激による減少速度と同程度であった。

以上、3T3-L1 脂肪細胞において、インスリンはレジスチン mRNA の発現を濃度、時間

依存性に抑制し、このレジスチン mRNA の抑制は ERK、p38 MAP-キナーゼ及び PI 3-キナーゼ非依存的な経路によって制御されていた。インスリンによるレジスチン mRNA の発現抑制は、ある蛋白の新たな合成を介して行われており、その mRNA の低下の少なくとも一部はレジスチン mRNA の分解を促進することによると推測された。

## Summary

Resistin is a peptide secreted by adipocytes and recognized as a hormone that could link obesity to insulin resistance. This study was designed to examine the effect and mechanism(s) of insulin on resistin expression in 3T3-L1 adipocytes.

Differentiated 3T3-L1 adipocytes were stimulated with insulin and resistin mRNA expression was examined by Northern blot analysis. In some experiments, the insulin signal was blocked by several chemical inhibitors or overexpression of a dominant negative form ( $\Delta p85$ ) of the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase).

3T3-L1 fibroblasts differentiated into adipocytes by using insulin, dexamethasone and 3-isobutyl-1-methylxanthine. Resistin mRNA expression in pre-adipocytes (differentiation at days 0 and 2) was below the detection limit but was detected from day 4. Resistin mRNA expression reached a maximum at day 8. Insulin treatment caused a reduction of resistin mRNA in time-dependent and dose-dependent manners in 3T3-L1 adipocytes. Insulin-induced decrease of resistin mRNA still occurred under glucose-free conditions. Pre-treatment with PD98059, an inhibitor of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) pathway, or SB203580, an inhibitor of p38 mitogen-activated protein-kinase (p38 MAP-kinase) pathway, did not influence insulin-induced reduction of resistin mRNA. Inhibition of PI 3-kinase by LY294002 or  $\Delta p85$  also failed to block insulin-induced reduction of resistin mRNA. Cycloheximide, a protein synthesis inhibitor, completely blocked insulin-induced reduction of resistin mRNA. Actinomycin D, a RNA synthesis inhibitor, also blocked insulin-induced reduction of resistin mRNA, and the decreasing rate of resistin mRNA in cells treated with insulin alone was faster than that with actinomycin D.

In conclusion, insulin downregulates resistin mRNA via PI 3-kinase, ERK or p38 MAP-kinase independent pathways in 3T3-L1 adipocytes. The downregulation mechanism of resistin

mRNA by insulin would be an indirect event through the synthesis of novel protein(s) that could accelerate the degradation of resistin mRNA.

## 2. 発表論文リスト

1. Kawashima J, Tsuruzoe K, Motoshima H, Shirakami A, Sakai K, Hirashima Y, Toyonaga T, and Araki E  
Insulin downregulates resistin mRNA through the synthesis of protein(s) that may accelerate the degradation of resistin mRNA in 3T3-L1 adipocytes  
Diabetologia 2003. (in press)
2. Shirakami A, Toyonaga T, Tsuruzoe K, Shirotani T, Matsumoto K, Yoshizato K, Kawashima J, Hirashima Y, Miyamura N, Kahn CR, and Araki E  
Heterozygous knockout of the IRS-1 gene in mice: 309-319, 2002.
3. Yoshizato K, Shirotani T, Furukawa N, Taguchi T, Motoshima H, Toyonaga T, Hirashima Y, Kawashima J, Ebina Y, Shichiri M, Araki E.  
Identification of a *cis*-Acting Element and a Novel *trans*-Acting Factor of the Human Insulin Receptor Gene in HepG2 and Rat Liver Cells  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 280: 428-434, 2001
4. Motoshima H, Araki E, Nishiyama T, Taguchi T, Kaneko K, Hirashima Y, Yoshizato K, Shirakami A, Sakai K, Kawashima J, Shirotani T, Kishikawa H, and Shichiri M  
Bradykinin enhances insulin receptor tyrosine kinase in 32D cells reconstituted with bradykinin and insulin signaling pathways  
Diab. Res. Clin. Pract. 48: 155-70, 2000.
5. 荒木栄一, 河島淳司, 白神敦久, 平島義彰, 七里元亮.  
2 型糖尿病の分子病態とその発生工学的アプローチ  
組織培養工学 25:567-571, 1999.



6. 荒木栄一, 河島淳司, 水流添寛.  
インスリン抵抗性改善薬の作用とその機序  
-チアゾリジン誘導体とビグアナイド薬-  
最新医学 57:1834-1841, 2002.

### 3. 謝辞

本研究は熊本大学大学院医学研究科代謝内科学講座で、荒木栄一教授、七里元亮前教授による御指導の下に行いました。研究について多面にわたり御指導を頂き、深く感謝致します。

熊本大学大学院医学研究科代謝内科学講座元講師城谷哲也博士、同助手 豊永哲至博士、同助手 松本和也博士には、論文作成及び日頃の研究の中で貴重な御指導、御助言を頂きました。

本研究の施行にあたり、熊本大学大学院医学研究科代謝内科学講座医員 水流添覚博士、吉里和晃博士、白神敦久博士に実験の細部に至るまでの御指導、御助言を頂きました。

さらに熊本大学大学院医学研究科代謝内科学講座技官 一ノ瀬賢司氏にも、御助言を頂きました。

最後に、熊本大学大学院医学研究科代謝内科学講座研究室の皆様には日頃から御助言、御協力を頂きました。

皆様に心より感謝致します。

#### 4. 略語一覧

ACRP30; adipocyte complement-related protein of 30 kDa

ADSF; adipose tissue-specific secretory factor

AMP; adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase

AMPK; AMP-activated protein kinase

apM1; adipose most abundant gene transcript 1

APS; adapter protein with a PH domain and an SH2 domain

Bcl-2; B cell lymphoma/leukaemia-2

BMI; body mass index

BSA; bovine serum albumin

CAP; c-Cbl-associating protein

CBB; Coomassie brilliant blue

Cbl; casitas B-lineage lymphoma

C/EBP; CCAAT/enhancer-binding protein

CrkII; CT-10 regulated kinase II

DMEM; Dulbecco's modified Eagle's medium

EGF; epidermal growth factor

ERK; extracellular signal-regulated kinase

FBS; fetal bovine serum

FFA; free fatty acid

Fizz3; found in inflammatory zone 3

Gab-1; Grb2-associated binder-1

GLUT4; glucose transporter type 4

Grb2; growth factor receptor-bound protein 2

GRE; glucocorticoid response element

GSK; glycogen synthase kinase

HB-EGF; heparin-binding epidermal growth factor (EGF)-like growth factor

IGF-I; insulin like growth factor-I

IRS; insulin receptor substrate

JAK; Janus kinase

JNK; c-Jun N-terminal kinase

LAR; leukocyte common antigen-related protein-tyrosine phosphatase

MAP; mitogen-activated protein

MEK; MAPK/ERK kinase

mTOR; mammalian target of rapamycin

PAGE; (SDS-)polyacrylamide gel electrophoresis

PAI-1; plasminogen activator inhibitor-1

PBS; phosphate-buffered saline

PCR; polymerase chain reaction

PDE3B; phosphodiesterase 3B

PEPCK; phosphoenolpyruvate carboxykinase

PF2K; 6-phosphofructo-2-kinase

PH; plekstrin homology

PHAS-1; pH and acid stable-1

PI; phosphatidylinositol

PKA; protein kinase A

PKB; protein kinase B

PKC; protein kinase C

PMSF; phenylmethylsulfonyl fluoride

PPAR; peroxisome proliferator-activated receptor

PTB; phosphotyrosine binding

PTP; protein-tyrosine phosphatase

RELM; resistin-like molecule

RT; reverse transcriptase

SAPK; stress-activated protein kinase

SDS; sodium dodecyl sulfate

SH2; src homology 2

Shc; src homology and collagen

SHP-2; src homology phosphotyrosine phosphatase-2

SNP; single nucleotide polymorphism

SOS; son of sevenless

STAT; signal transducers and activators of transcription

STZ; streptozotocin

TNF- $\alpha$ ; tumor necrosis factor- $\alpha$

TLC; thin-layer chromatography

## 5. 研究の背景と目的

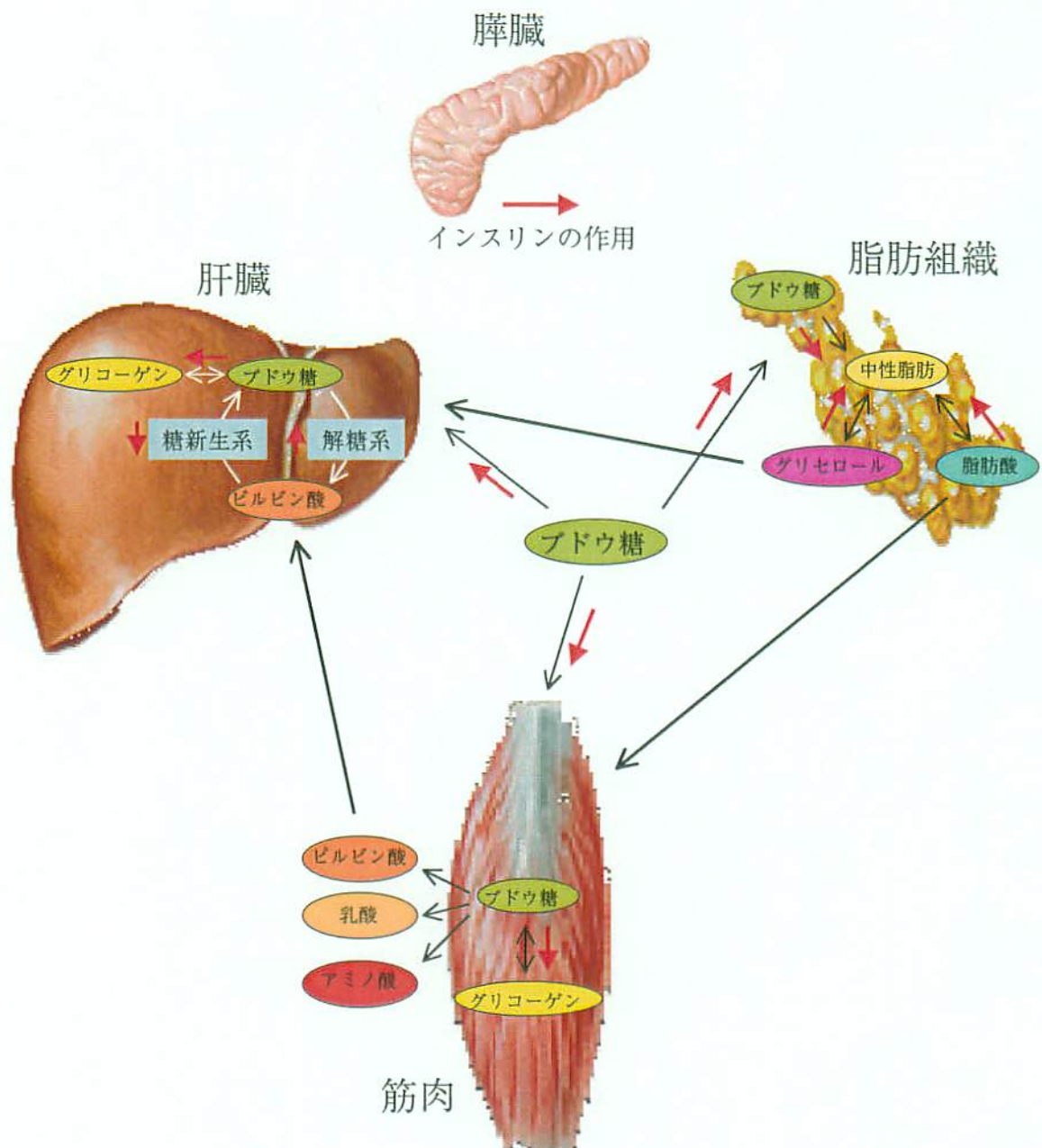
本章では本研究の背景と目的について述べる。まず、5-(1)では2型糖尿病の成因と病態を、5-(2)では肥満に伴うインスリン抵抗性の発症機序を、5-(3)ではレジスチンの構造、機能、発現およびインスリン抵抗性との関連について述べる。続いて、5-(4)ではインスリン作用伝達機構について、当研究室においてこれまで明らかにしてきた事項と共に述べる。最後に、5-(5)で本研究の目的について述べる。

### 5-(1) 2型糖尿病の成因と病態

近年、2型糖尿病患者は世界的に増加しており、中でも日本を含めた東アジア地域での増加は著明である。平成9年に行われた厚生省の「糖尿病実態調査」によると、日本人において糖尿病が強く疑われる人は690万人、糖尿病の可能性が否定できない人が680万人と推定されており、このまま増加傾向が持続すると、10年後には糖尿病患者は一千万人を超えると推定されている。

2型糖尿病は、相対的なインスリン作用の不足による慢性高血糖を主徴とし、種々の特徴的な代謝異常を伴う疾患群である。血糖値は主として①肝臓での糖産生、②骨格筋、脂肪組織への糖取り込み、③肝臓への糖取り込み、によって通常は4~7 mmol/lと非常に厳格に制御されている。食物摂取後、腸管より門脈に吸収されたブドウ糖は膵β細胞からのインスリン分泌を促し、血中に分泌されたインスリンは、肝臓ではグリコーゲン合成の促進と糖新生の抑制を、筋肉ではブドウ糖取り込み及びグリコーゲン合成の亢進を、脂肪組織ではブドウ糖取り込みの亢進、中性脂肪の合成及び脂肪分解の抑制を起こす。このように、消化管より吸収された過剰なブドウ糖は肝臓、筋肉、脂肪組織に取り込まれ、血糖値が一定に保たれる。一方、絶食時には膵β細胞からのインスリン分泌は基礎値に戻り、肝臓に

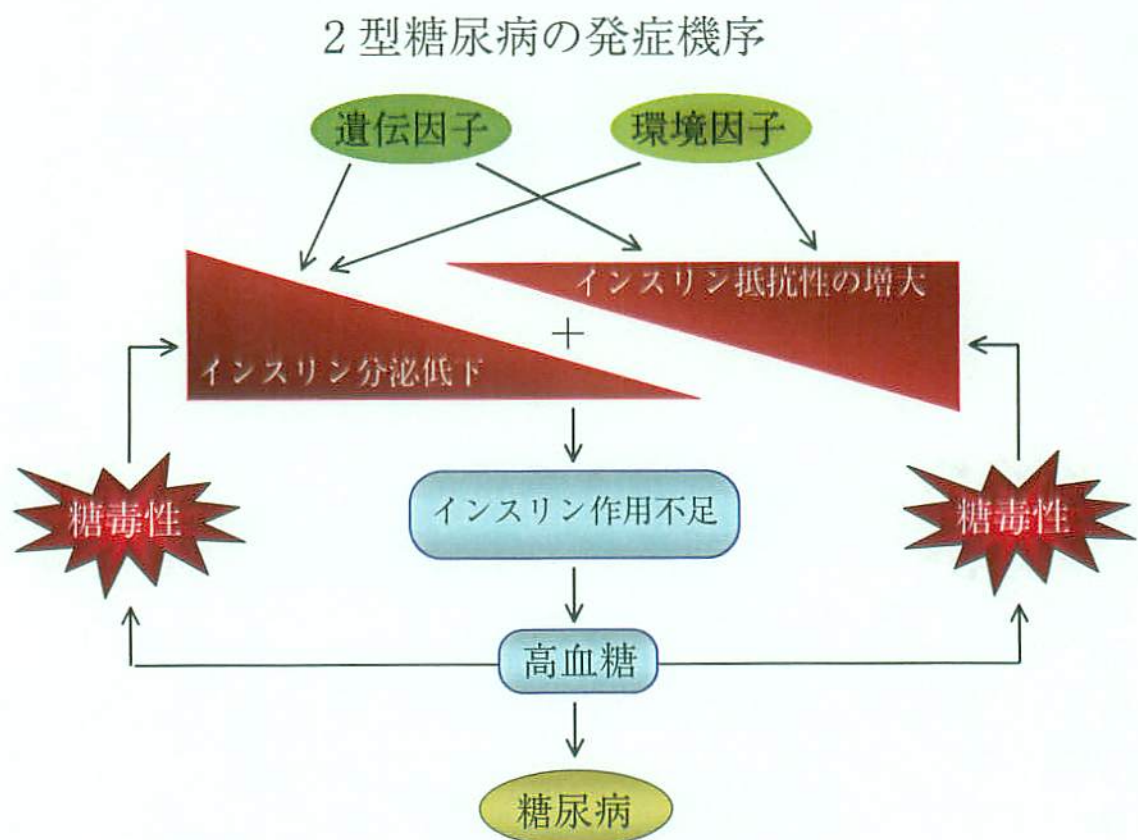
おけるグリコーゲンの分解と、乳酸、アミノ酸、グリセロールなどからの糖新生が亢進し、ブドウ糖が血中に放出されることにより、全身へのブドウ糖供給を維持している（図1）。



[図1] インスリン作用の模式図

インスリンの主要標的臓器への作用を模式的に示す。インスリンは筋肉、脂肪組織への糖取込みを促進し、肝臓でのグリコーゲン分解や糖新生を抑制する。また脂肪組織において中性脂肪の合成を促進する。

このような血糖値の制御は神経系や内分泌系によって厳格に制御されているが、その中心的な役割を果たしているがインスリンである。環境因子や遺伝因子によってインスリン分泌の低下やインスリン作用の障害、すなわちインスリン抵抗性が起こると、個体におけるインスリン作用の不足が生じ血糖値の一過性上昇を示す。血糖を正常範囲内に維持するためには、より過剰なインスリンの分泌が必要となり、高インスリン血症を呈するようになる。この代償性のインスリン分泌が膵β細胞の機能を越えた場合に高血糖が引き起こされる。高血糖はそれ自体がインスリンの分泌低下や、インスリン抵抗性の増悪を引き起こし(糖毒性)、高血糖が増悪する。このような悪循環の結果、持続的な高血糖が顕著になり糖尿病が発症すると考えられている(図2)。



[図2] 2型糖尿病の発症機序モデル



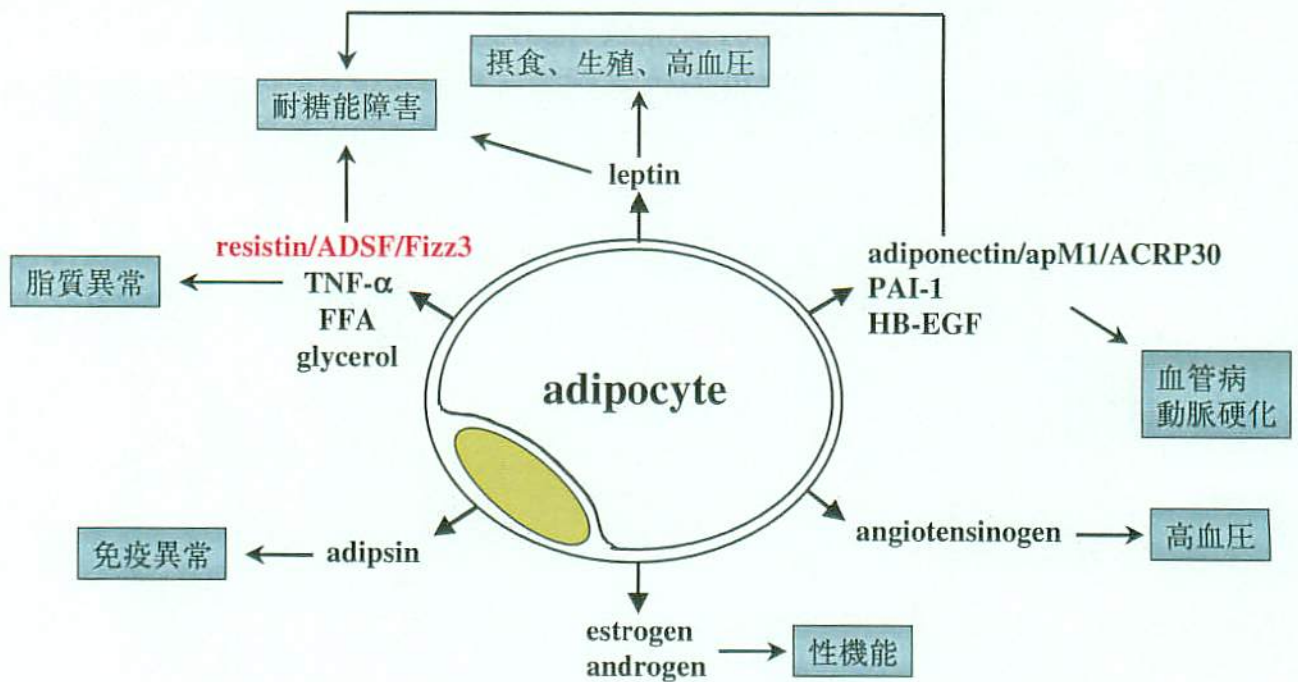
このようにインスリン抵抗性はインスリン分泌障害と並んで糖尿病発症に重要な因子であり、遺伝的素因と後天的な環境因子の両者が関与すると考えられている。近年の2型糖尿病患者数の増加は、遺伝的背景が急速に変化したのではなく、環境因子によるインスリン抵抗性の増大によって導かれたものである。

環境因子の変化、すなわち文明の発達に伴う運動量の減少や食生活の欧米化などといった変化が原因となり、日本人に肥満患者が急激に増加している。肥満は脂肪組織が過剰に蓄積した状態と定義されるが、肥満は糖尿病、高血圧、高脂血症などに代表される生活習慣病の主要な危険因子として注目されている。肥満と生活習慣病の発症を結び付ける重要な因子が「インスリン抵抗性」であり、生活習慣病の発症を予防するためにも、肥満に伴うインスリン抵抗性の発症機序の解明が重要な意味を持つ。

#### 5-(2) 肥満に伴うインスリン抵抗性の発症機序

肥満がいかにしてインスリン抵抗性を増強し、糖尿病、高脂血症、高血圧といった生活習慣病を惹起するのかについてはさまざまな研究がなされてきたが、その機序は長年不明であった。

脂肪組織はエネルギー貯蔵臓器として働いているが、最近の分子生物学的手法により様々な液性因子が脂肪組織より分泌されることが明らかになり、脂肪組織は内分泌臓器の一つとして考えられるようになった。これらの脂肪細胞由来液性因子は現在“アディポサイトカイン”とも称され、これらの一部には脂肪蓄積の増減と共にその発現が変化し、糖・脂質代謝、動脈硬化発症に積極的に関与することが明らかとなり（図3）、これが肥満に伴うインスリン抵抗性発症因子の一つとして考えられるようになった。以下に脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインのうち、インスリン抵抗性へ関与している因子について概説する。



[図 3] 脂肪細胞由来の生理活性物質

脂肪細胞は糖代謝、脂質代謝、摂食、動脈硬化、生殖、性機能、免疫機能などに様々な影響を及ぼす物質を分泌する。apM1; adipose most abundant gene transcript 1、ACRP30; adipocyte complement-related protein of 30 kDa、PAI-1; plasminogen activator inhibitor-1、HB-EGF; heparin-binding epidermal growth factor (EGF)-like growth factor、TNF- $\alpha$ ; tumor necrosis factor- $\alpha$ 、FFA; free fatty acid、ADSF; adipose tissue-specific secretory factor、Fizz3; found in inflammatory zone 3

### ①遊離脂肪酸 (FFA)

肥満者、特に内臓脂肪型肥満者は血中 FFA が高い傾向にある。高 FFA 血症はインスリン抵抗性を増悪させると考えられる。ラットを用いた実験によって、急激な FFA の上昇は、insulin receptor substrate-1 (IRS-1) 蛋白のリン酸化及び PI 3-キナーゼ活性の低下を介して、骨格筋における糖取込みの低下、結果としてグリコーゲン合成能の低下及び糖の酸化的利用の低下を引き起こし、インスリン抵抗性を増強することが明らかとなっている (Griffin ME, *et al.* 1999)。また、高濃度の FFA は、抗アポトーシス因子である Bcl-2 を減少させることにより膵ラ氏島のアポトーシスを誘導すること (Shimabukuro M, *et al.* 1998)、膵 $\beta$ 細胞におけるプロインスリンからインスリンへのプロセシングの過程を遅延させるこ

と(Furukawa H, *et al.* 1999)が明らかとなっている。

## ②TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$ は炎症性サイトカインの一つとして知られているが、肥満モデル動物の脂肪細胞において TNF- $\alpha$  mRNA の発現が 5~10 倍に増加し、TNF- $\alpha$ 中和抗体の投与でインスリン抵抗性が改善すること(Hotamisligil GS, *et al.* 1993)、TNF- $\alpha$ をノックアウトしたマウスでは肥満によるインスリン抵抗性が見られないことから(Uysal KT, *et al.* 1997)、TNF- $\alpha$ がインスリン抵抗性増強因子であることが示唆された。脂肪組織と骨格筋において、TNF- $\alpha$  はセラミドの合成を介して、IRS-1 のセリン残基をリン酸化し、インスリン受容体のチロシンリン酸化を抑制することがわかっていたが(Hotamisligil GS, *et al.* 1994)、この IRS-1 のセリンリン酸化はPI 3-キナーゼ/Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR)経路を介していることが最近明らかとなった(Ozes ON, *et al.* 2001)。その他、脂肪細胞において、TNF- $\alpha$ はCCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)を介して glucose transporter type4 (GLUT4)の発現を減少させることが明らかとなった(Jain R, *et al.* 1999)。

## ③レプチン

レプチンは遺伝性肥満動物 ob/ob マウスの原因遺伝子産物として同定された脂肪組織特異的な分泌蛋白で、脂肪蓄積に比例して分泌が増加する(Zhang Y, *et al.* 1994)。その作用は主に視床下部食欲中枢に作用して、食欲の抑制作用、エネルギー消費増強作用を介して、体重を減少させる。体脂肪量に比例して脂肪組織におけるレプチン産生が増加し、血中レプチン濃度が上昇するため、肥満者にはレプチン抵抗性が存在すると考えられている。脂肪萎縮性糖尿病モデルマウス（レプチン発現が著明に低下）や脂肪萎縮性糖尿病の患者にレプチンを投与するとインスリン抵抗性が減少し、糖、脂質代謝も改善すること(Shimomura I, *et al.* 1999、Oral EA, *et al.* 2002)から、レプチンはインスリン抵抗性改善作用を有すると考えられる。また、骨格筋において、レプチンは視床下部-交感神経系を介して、あるい

は骨格筋に直接作用することによって、細胞内の AMP(adenosine 5'-monophosphate)-activated protein kinase (AMPK)を活性化し、脂肪酸酸化を促進することが明らかとなった(Minokoshi Y, *et al.* 2002)。その他、レプチンは造血(Gainsford T, *et al.* 1996)や生殖機能系(Brann DW, *et al.* 2002)に関与していることが明らかとなっている。

④アディポネクチン/apM1 (adipose most abundant gene transcript 1) /ACRP30 (adipocyte complement-related protein of 30 kDa)

Maeda らは、脂肪組織に高発現しており、かつ脂肪組織特異的な分泌蛋白遺伝子アディポネクチンを同定した(Maeda K, *et al.* 1996)。ヒトのアディポネクチンは、血中で 2~20 $\mu$ g/ml と高濃度で存在し、肥満度が高くなるほど血中濃度は低下し、体重減量によってその濃度は増加する(Arita Y, *et al.* 1999)。またサル、ヒトの血中アディポネクチン濃度はインスリンクランプ試験で算出された全身のインスリン感受性に強い正の相関があること(Hotta, K., *et al.* 2001、Weyer C, *et al.* 2001)、肥満糖尿病モデルマウスや脂肪萎縮性糖尿病のモデルマウス（血中のアディポネクチン濃度は著しく低下している）にアディポネクチンを投与するとインスリン感受性が改善すること(Yamauchi T, *et al.* 2001)、アディポネクチンをノックアウトしたマウスではインスリン抵抗性が増強すること(Kubota N, *et al.* 2002、Maeda N, *et al.* 2002)から、アディポネクチンの作用の一部はインスリン抵抗性改善作用を有すると考えられている。アディポネクチンは骨格筋、肝臓において peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ )および AMPK を活性化し、脂肪酸の燃焼を亢進することによりインスリン抵抗性を改善するところが明らかとなった(Yamauchi, T., *et al.* 2002)。その他、アディポネクチンは血管内皮細胞、マクロファージ、血管平滑筋細胞に作用し、動脈硬化を抑制することがわかっている(Ouchi N, *et al.* 2000、Ouchi N, *et al.* 2001、Arita Y, *et al.* 2002)。

⑤レジスチン/ADSF(adipose tissue-specific secretory factor)/Fizz3(found in inflammatory zone 3)

2001 年、脂肪細胞から分泌され、インスリン抵抗性に関与すると考えられる新しい分子が2つのグループより同定され(Steppan CM, *et al.* 2001、Kim KH, *et al.* 2001)、レジスチン/ADSF/Fizz3 と命名された。また、レジスチンと相同性の高い構造を有する蛋白 resistin-like molecule (RELM)も2種類単離され、それぞれ RELM $\alpha$ 、RELM $\beta$ と命名され、そのうち RELM $\alpha$ は脂肪細胞に多く発現していることが明らかとなった(Steppan CM, *et al.* 2001)。レジスチンの構造、作用、発現調節に関しては、次項で詳しく説明する。

### 5-(3) レジスチンの構造、発現、機能及びインスリン抵抗性との関係

#### (A) レジスチンの構造

マウスのレジスチンは 12.5kDa のシステイン残基に富む蛋白で、RELM 蛋白にも共通している特徴的なシステイン残基の繰り返し配列[C-X(11)-C-X(8)-C-X-C-X(3)-C-X(10)-C-X-C-X-C-X(9)-CC-X(3~6)]を有する(Steppan CM, *et al.* 2001) (図4)。レジスチンの mRNA は 20 アミノ酸のシグナル配列を含む 114 アミノ酸 (ヒトでは 108 アミノ酸) をコードしている。レジスチンは S-S 結合によりホモダイマーを形成することがわかっており、ホモダイマーの形成には 26 番アミノ酸のシステインが重要であることが知られている(Banerjee RR, *et al.* 2001)。

#### (B) レジスチンの発現

レジスチンは脂肪細胞に局限して発現し、マウスにおいては褐色脂肪細胞よりも白色脂肪細胞により強く発現している。その発現レベルは性や脂肪組織の存在部位によって異なり、女性の性腺の脂肪においてもっとも発現が強い。また、分泌蛋白であることから予想されるように同蛋白は細胞質に局在していることも確認された。一方、RELM $\alpha$ は白色脂肪組織に大量に発現しており、そのほか乳腺、舌、肺、心に発現していたが、レジスチンと異なり培養脂肪細胞である 3T3-L1 脂肪細胞には発現していなかった。RELM $\beta$ は大腸に



のみ発現しており、脂肪組織には発現していなかった(Steppan CM, *et al.* 2001)。

mResistin	MK-NLSFPLLLFLFFLV--PELLGSSMPLCPIDEAIDKKIKQD
hResistin	MK-ALCLLLL----PV--LGLLVSSKTLCSMEEAINERIQEV
mRELM $\beta$	MKPTLCFLFI----LVSLFPLIVPGNAQCSFESLVDQRIKEA
hRELM $\beta$	MGPSSCLLLI----LIPLQLINPGSTQCSLDSVMDKKIKDV
mRELM $\alpha$	MKTTTCSLLI----CISLLQLMVPVNTDGTLDIIGKKKVKEI
mResistin	FNSLF-----PNAIKNIGLN CWTVSSRGKLAS CPEGTAVLS
hResistin	AGSLI-----FRAISSIGLE CQSVTSRGDLAT CPRGFAVIG
mRELM $\beta$	LSRQE-----PKTIS-----CTSVTSSGRLAS CPAGMVTIG
hRELM $\beta$	LNSLEYSPSPISKLS-----CASVKSQGRPSS CPAGMAVIG
mRELM $\alpha$	LANPANYPSTVTKTLS-----CTSVKTMNRWAS CPAGMITATG
mResistin	CS CGSA CGSWDIREEKV CHCQCARIDWTAAR CCKLQVAS
hResistin	CT CGSA CGSWDVRAETT CHCQAGMDWTGAR CCRVQ--P
mRELM $\beta$	CACGYG CGSWDIRNGNT CHCQCSVMDWASAR CCRM---A
hRELM $\beta$	CACGYG CGSWDVQLETT CHCQCSVVDWTTAR CCHL---T
mRELM $\alpha$	CACGFA CGSWEIQSGDT CNCLCLLVDWTTAR CCQL---S

[図4] レジスチン、RELM のアミノ酸配列 (m; マウス、h; ヒト)

レジスチンの発現調節に関してはさまざまな研究が行われてきた(表1)。マウスを用いた実験では、絶食後では血中レジスチン蛋白量、脂肪組織中の蛋白量及び mRNA 発現量が共に低下し、摂食再開でいずれも増加した(Steppan CM, *et al.* 2001)。ob/ob マウスなどの肥満モデルマウスや高脂肪食負荷肥満マウスではレジスチン発現量が増加しており、また興味深いことに、インスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン誘導体を投与するとレジスチンの発現が低下することが明らかとなった(Steppan CM, *et al.* 2001、Moore GB, *et al.* 2001)。しかしながら、以後の報告によると、ob/ob マウスなどの肥満モデルマウスや高脂肪食負荷肥満マウスのレジスチンの発現はむしろ低下しており、インスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン誘導体やビッグアニド剤を投与すると、その発現が増強するという相反する報告が相次いでいる(Way JM, *et al.* 2001、Le Lay S, *et al.* 2001、Rajala MW, *et al.* 2002、Fujita H, *et al.* 2002)。

*in vitro* の検討では、3T3-L1 脂肪細胞を用いた実験より、脂肪細胞への分化に伴いレジスチン mRNA の発現が誘導されることが明らかとなった。チアゾリジン誘導体で処理するとレジスチンの発現が減少した(Steppan CM, *et al.* 2001)。そのほか、イソプロテレノール、エピネフリン(Fasshauer M, *et al.* 2001)、TNF- $\alpha$ (Fasshauer M, *et al.* 2001)、成長ホルモン(Shojima N, *et al.* 2001)、インスリン(Haugen F, *et al.* 2001)などの生理活性物質がレジスチンの発現を低下させることが明らかとなった。

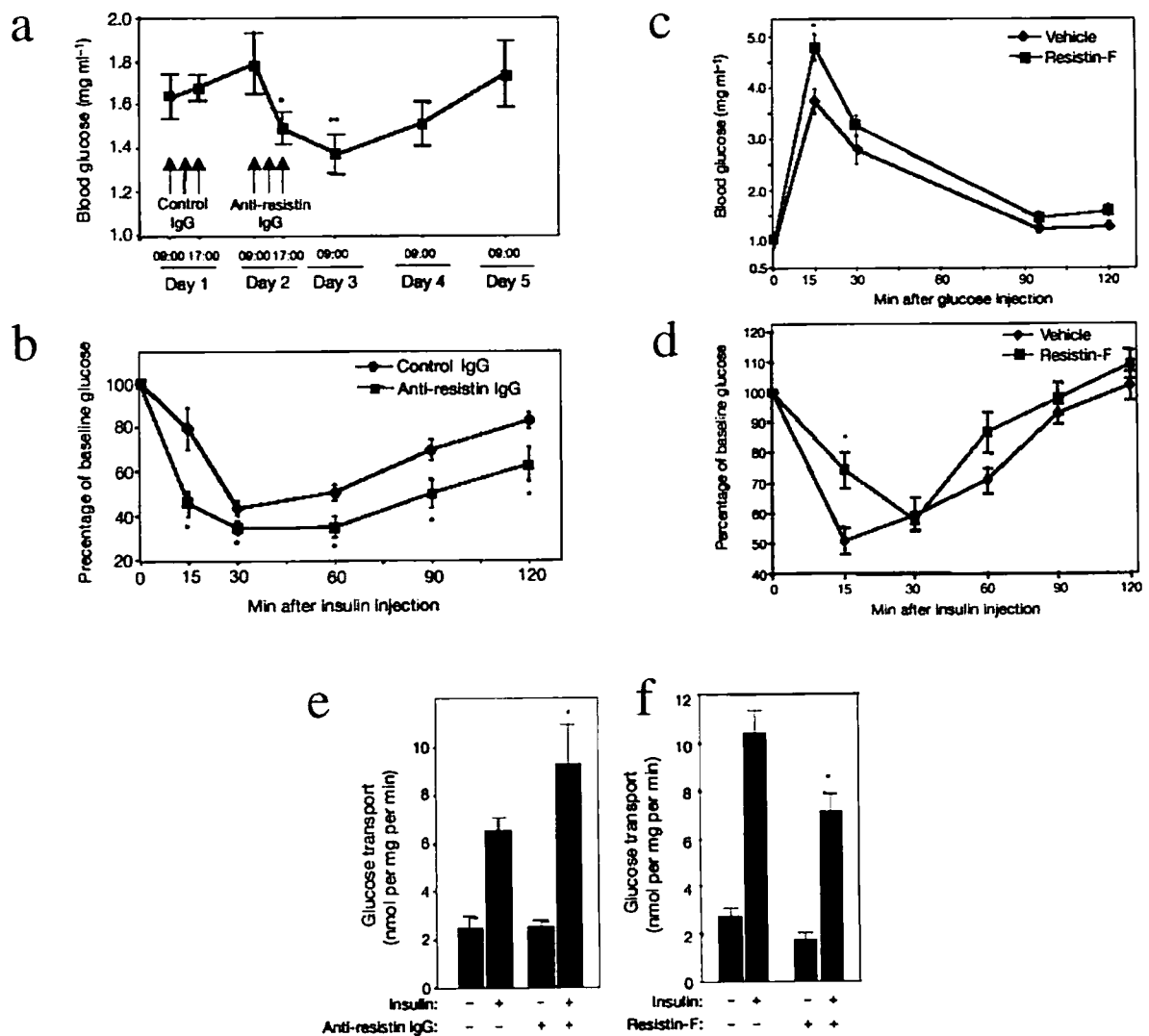
		mRNA	蛋白	血中濃度
<i>in vivo</i>	正常マウス (空腹時)	↓	↓	↓
	正常マウス (再摂食時)	↑	↑	↑
	ob/ob, db/dbマウス			↑または↓?
	高脂肪食負荷肥満マウス	↑または↓?		↑
	STZマウス			↓
	STZマウス+インスリン			↑
	チアゾリジン誘導体	↑または↓?	↓	
<i>in vitro</i>	イソプロテレノール	↓		
	エピネフリン	↓	↓	
	成長ホルモン	↓	↓	
	TNF- $\alpha$	↓	↓	
	デキサメサゾン	↑	↑	
	インスリン	↓	↓	
	チアゾリジン誘導体	↓	↓	

[表 1] 各種因子によるレジスチンの発現調節

### (C) レジスチンの機能

Steppan らは、レジスチンの機能を検討するために、マウス腹腔内に精製したレジスチンを投与し、インスリン感受性を調査した(Steppan CM, *et al.* 2001)。高脂肪食負荷肥満マウスの腹腔内にレジスチンの中和抗体を投与したところ、血糖値の低下とインスリン負荷テストにおける血糖低下作用の増強、すなわちインスリン抵抗性の改善が認められた (図 5 a, b)。逆に抽出したレジスチンを正常マウスの腹腔内に投与すると、耐糖能が悪化し、インスリン抵抗性が増強した (図 5 c, d)。

Steppan らは、レジスチンの作用をより詳しく解析するために、3T3-L1 脂肪細胞の糖取込みに対するレジスチンの効果について検討したところ(Steppan CM, *et al.* 2001)、レジスチンの中和抗体を加えて培養した脂肪細胞ではインスリンによる糖取込みが減弱し、レジスチンを加えて培養された脂肪細胞では逆にインスリンによる糖取込みが増強したと報告している (図 5 e, f)。またレジスチンには脂肪細胞の分化を抑制する能力があることも示された(Kim KH, *et al.* 2001)。



[図 5] レジスチンの作用 (Steppan CM, *et al.* 2001)

(D) ヒトにおけるレジスチンとインスリン抵抗性との関係



病的肥満患者の脂肪組織においてレジスチン mRNA レベルが正常対照と比較して上昇していたという報告(Savage DB, *et al.* 2001)がある一方で、ヒトの脂肪組織にはレジスチンの発現がほとんど同定できず(Nagaev I, *et al.* 2001)、分離したヒト脂肪細胞におけるレジスチン mRNA の発現レベルは著しく少なく、body mass index (BMI)やインスリン感受性との関連性も見出せなかったという報告(Savage DB, *et al.* 2001、Nagaev I, *et al.* 2001)もある。

レジスチン遺伝子を含む染色体領域の遺伝子変異については多数の報告があるが、そのほとんどがプロモーター領域、イントロンもしくはエクソン 4 の非翻訳領域の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP)であった。いずれの SNP も糖尿病との関連性は認められなかったものの、BMI と関連性がある SNP(Engert JC, *et al.* 2002、Wang H, *et al.* 2002)、肥満を伴うと糖尿病の発症リスクが高くなる SNP(Ma X, *et al.* 2002)、インスリン感受性と関連がある遺伝子変異(Pizzuti A, *et al.* 2002)などの報告もあり、レジスチンとインスリン抵抗性の関連性についてはまだはっきりしない部分も多い。

#### 5-(4) インスリン作用の伝達機構

##### (A) インスリン受容体

インスリンは糖、脂質、蛋白質の代謝調節作用のほか、細胞増殖、筋肉や脂肪の分化、転写調節、アポトーシスの抑制等、非常に多岐にわたる生理作用を有するホルモンである。このような多彩なインスリン作用は、インスリンが細胞膜上に存在するインスリン受容体に結合し、受容体チロシンキナーゼが活性化されることにより発現される(Ebina Y, *et al.* 1985、White MF, *et al.* 1994)。インスリン受容体はインスリン様成長因子(insulin like growth factor; IGF)-I 受容体や epidermal growth factor (EGF)受容体と同じく、受容体型チロシンキナーゼファミリーに属する。インスリン受容体は、肝・筋・脂肪といったインスリンの主な標的組織だけでなく、循環血液細胞・脳・生殖細胞などの細胞表面にも存在することが

知られている。インスリン受容体は、分子量 135 kDa の 2 つの $\alpha$ サブユニットと、95 kDa の 2 つの $\beta$ サブユニットが S-S 結合で結ばれた $\alpha_2\beta_2$ の四量体を形成している。 $\alpha$ サブユニットにはインスリン結合部位が存在し、一方、 $\beta$ サブユニットは膜貫通蛋白で、細胞内に存在する C 端側にインスリンにより調節を受けるチロシンキナーゼ活性部位を持つ。インスリンが $\alpha$ サブユニットに結合すると、それまで $\alpha$ サブユニットにより抑制されていた $\beta$ サブユニットのチロシンキナーゼが活性化される。この活性化されたチロシンキナーゼによりインスリン受容体の自己リン酸化が起こり、更に細胞内のインスリン受容体の基質をチロシンリン酸化し、インスリンの情報を下流に伝達している。

#### (B) インスリン受容体の基質

現在のところ少なくとも 9 つのインスリン、IGF-I 受容体の細胞内基質が同定されている。このうちの 4 つは insulin receptor substrate (IRS)ファミリーに属するものである。IRS 蛋白には、最初にクローニングされた分子量約 180 kDa の IRS-1 (Sun XJ, *et al.* 1991)のほか、分子量約 190 kDa の IRS-2 (Araki E, *et al.* 1994, Sun XJ, *et al.* 1995)、約 60 kDa の IRS-3 (Lavan BE, *et al.* 1997)、さらに約 160 kDa の IRS-4 (Lavan BE, *et al.* 1997)の 4 種のアイソフォームが現在同定されている。その他、Grb2-associated binder-1 (Gab-1)、Casitas B-lineage lymphoma (Cbl)、adapter protein with a PH domain and an SH2 domain (APS)、src homology and collagen (Shc)などの他に、Janus kinase (JAK)/signal transducers and activators of transcription (STAT)などもインスリン受容体の基質として働き、インスリンの作用を細胞内へ伝達すると考えられている。

インスリン受容体によりリン酸化を受けたこれら基質のチロシン残基は、Src-homology-2 (SH2)部位をもつ蛋白の認識部位となる。この SH2 蛋白には phosphatidylinositol (PI) 3-キナーゼの調節領域である p85 や growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2)、CT-10 regulated kinase II (CrkII)の様にアダプター蛋白として働くものと、src homology phosphotyrosine

phosphatase-2 (SHP-2)や Fyn などのようにそれ自体が酵素として作用を発現するものがある。このような SH2 蛋白を介してインスリンのシグナルは下流に伝達されていく(Goldstein BJ, 1998、Takada T, *et al.* 1998)。

IRS 蛋白のうち IRS-1 はチロシンリン酸化だけでなくセリンリン酸化も受けることが知られている。IRS-1 にはリン酸化可能なセリン残基が多数存在するが、このうち phosphotyrosine binding (PTB)領域の近くに存在する 307 番目のセリン(Ser<sup>307</sup>)のリン酸化はインスリンシグナル伝達の抑制に関与すると考えられている。Aguirre らは yeast tri-hybrid assay で Ser<sup>307</sup> のリン酸化によりインスリン受容体と IRS-1 の PTB 領域の結合が阻害されることを示し、また培養細胞を用いた実験で Ser<sup>307</sup> のリン酸化により PI 3-キナーゼや mitogen-activated protein (MAP)-キナーゼの活性が低下することを示した(Aguirre V, *et al.* 2001)。Ser<sup>307</sup> は、インスリン刺激により活性化されるキナーゼや、c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK)などのストレスにより活性化されるキナーゼなどによりリン酸化を受け、インスリン作用伝達に対するネガティブフィードバックや、他のインスリン抵抗性因子によるシグナルの標的部位として働いていると考えられる。

また、インスリン受容体や IRS 蛋白は protein tyrosine phosphatases (PTPase)により脱リン酸化を受け、このことによりインスリン作用は減弱をされる。PTPase は 70 数種類のアイソザイムが報告されているが、インスリンのシグナル伝達機構との関連があると思われるのは leukocyte common antigen-related protein-tyrosine phosphatase (LAR)、protein-tyrosine phosphatase (PTP)  $\alpha$ 、PTP1B、SHP-2 等である。特に PTP1B と LAR は直接インスリン受容体に結合することが見出され、この 2 つがインスリンシグナル制御に特異的に働く可能性がある。PTP1B のノックアウトマウスではインスリン感受性が増強し、高脂肪食にしても肥満にならない肥満抵抗性となると報告されている(Elchebly M, *et al.* 1999)。また LAR ノックアウトマウスでは空腹時血糖値やインスリン値の低下、肝臓での糖新生の低下が見ら

れるなど、インスリン感受性の亢進を示唆する所見が認められる(Ren JM, *et al.* 1998)。

### (C) PI 3-キナーゼ及びそれ以降のシグナル

ワートマニンなどの PI 3-キナーゼの特異的阻害剤や(Hayashi, H, *et al.* 1992)、ドミナントネガティブ型 PI 3-キナーゼを用いた研究の結果(Hara, K, *et al.* 1995)、インスリンによる代謝調節作用は主に PI 3-キナーゼを介していることが明らかとなっている。PI 3-キナーゼは phosphatidylinositol (PI)のイノシトール環の D3 位をリン酸化することにより、細胞内で PI 3, 4 P<sub>2</sub> や PI 3, 4, 5P<sub>3</sub> を生成する脂質リン酸化酵素である。PI 3, 4, 5P<sub>3</sub> は様々なシグナル伝達蛋白が持つ pleckstrin homology (PH)領域に結合し、その活性や細胞内分布を変化させることによりシグナル伝達を調節していると考えられている(Lietzke SE, *et al.* 2000)。PI 3-キナーゼは分子量 110 kDa の触媒サブユニット(p110)と、より小さな分子量の調節サブユニットとの 2 量体からなる。調節サブユニットには p85 $\alpha$ 、p85 $\beta$ 、P55<sup>PIK</sup> の 3 種類のアイソフォームがあり(Pons S, *et al.* 1995)、更に p85 $\alpha$ の alternative splicing form AS53/p55 $\alpha$  (Antonetti DA, *et al.* 1996)と p50 $\alpha$  (Fruman DA, *et al.* 1996)が存在することも知られている。この中で p85 $\alpha$ は主要な蛋白であり、インスリンシグナル伝達も p85 $\alpha$ が中心的な役割を果たしていると考えられている。p110 には p110 $\alpha$ 、p110 $\beta$ 、p110 $\delta$ の 3 種のアイソフォームが存在し、いずれもその N 末端部分で調節サブユニットと結合する(Funaki M, *et al.* 1999)。

インスリンの代謝調節作用の多くは PI 3-キナーゼを介していることが明らかとなったが、その下流については十分な検討はされていなかった。近年、PI 3-キナーゼの下流のエフェクター分子として、2 つのタイプのセリン/スレオニンキナーゼが同定された。その一つは、Akt とよばれる N 末端側に PH ドメインを有する蛋白リン酸化酵素であり(Staal SP, 1987)、もう 1 つは、protein kinase C (PKC)ファミリーのなかの atypical PKC とよばれるタイプの PKC である(Akimoto K, *et al.* 1998)。Akt はそのキナーゼドメインが protein kinase A(PKA)や PKC と相同性を呈することから、protein kinase B (PKB)ともよばれる。Akt はイ

ンスリン刺激により活性化され、その活性化は PI 3-キナーゼの阻害剤やドミナントネガティブ型 PI 3-キナーゼにより抑制されるが、一方、恒常的活性型 PI 3-キナーゼにより Akt は活性化される(Klippel A, *et al.* 1996)。Akt には Akt1 と Akt2 の 2 つのアイソフォームが存在するが、Akt2 のノックアウトマウスでは肝臓でのインスリン抵抗性を有することが示された(Cho H, *et al.* 2001)。

現在までに、Akt を介するインスリン作用として、p70S6 キナーゼや pH and acid stable-1 (PHAS-1)の活性化、蛋白合成の促進、glycogen synthase kinase (GSK3)の活性抑制による glycogen synthase の活性化などが報告されている(Cross DA, *et al.* 1995)。また、3B 型 cAMP phosphodiesterase (PDE3B)のリン酸化を介して脂肪分解抑制にも関与する(Kitamura T, *et al.* 1999)。さらに、B cell lymphoma/leukaemia-2 (Bcl-2)ファミリーの蛋白の一つである BAD を介したアポトーシス抑制作用にも関与していると考えられている(Datta SR, *et al.* 1997)。PI 3-キナーゼ下流のもう 1 つのエフェクター分子である atypical PKC は、インスリン作用のうち、蛋白合成や糖の取り込み、アポトーシス抑制に関与していることが報告されている(Standaert ML, *et al.* 1997)。

#### (D) MAP-キナーゼ及びそれ以降のシグナル

インスリン刺激によって、IRS ファミリーや Shc がリン酸化されると、アダプター分子である Grb2 がこれらの蛋白に結合する(Tobe K, *et al.* 1993, Pronk GJ, *et al.* 1993 JBC)。Grb2 はグアニンヌクレオチド交換因子 son of sevenless (SOS)とも結合しており、Grb2 はこの SOS を介して非活性型 Ras を活性型 Ras へと変換する。活性化された Ras は MAPK/ERK kinase (MEK) kinase の一つである Raf を活性化し、その下流に存在する MEK をリン酸化する。活性化された MEK は extracellular signal-regulated kinase (ERK)をリン酸化することで、細胞増殖や DNA 合成といったインスリンの重要な作用を核内へと伝達する。その他、インスリンは MAP-キナーゼファミリーに属する p38 MAP-キナーゼや JNK を活性化すること

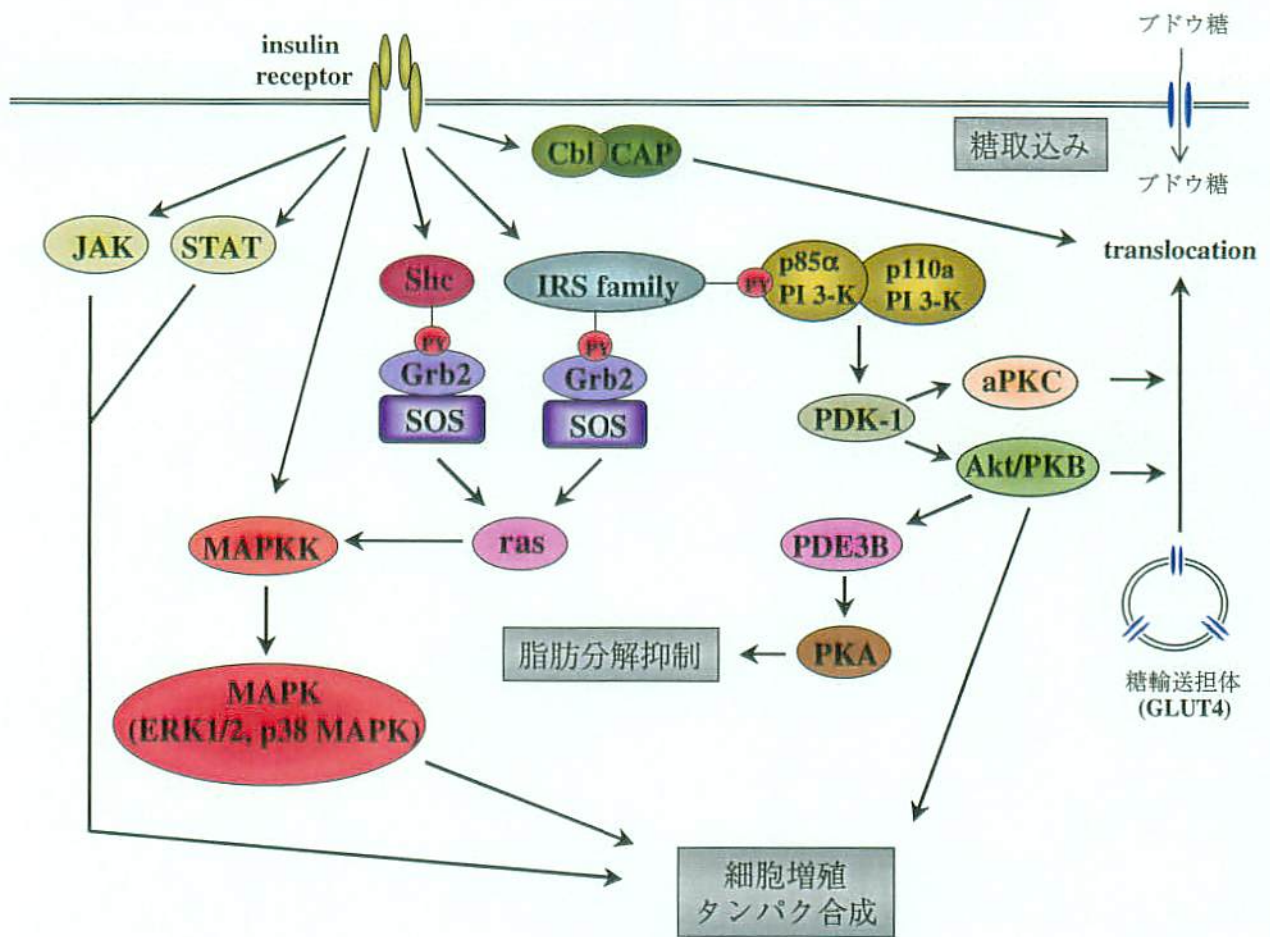
も知られている。

#### (E) CAP-Cbl シグナル経路

最近 PI 3-キナーゼと独立して糖取込を調節する経路の存在が明らかとなった。これは Casitas B-lineage lymphoma (Cbl) のチロシンリン酸化を介した経路と考えられる(Ribon V, *et al.* 1998)。Cbl は SH3 蛋白である c-Cbl-associating protein (CAP) と結合しており、インスリン刺激にて Cbl がリン酸化を受けると Cbl-CAP 結合体が細胞膜近辺に移行する。この結合体が CT-10 regulated kinase (Crk)-C3G-TC10 の結合体と膜近辺で結合すると、G 蛋白である TC10 の GDP から GTP への変換が起こり、糖輸送担体 GLUT4 の細胞膜上への移行が起こる(Chiang SH, *et al.* 2001)。このシグナル経路と PI 3-キナーゼの経路との連関は現在のところ明らかではない。

#### (F) その他のシグナル経路

成長因子やサイトカインは、細胞膜上に存在する受容体を介してそれぞれの作用を細胞内へと伝達していくが、それらの受容体に成長因子やサイトカインが結合すると、JAK や STAT といった蛋白が活性化される。JAK や STAT といった蛋白は肝臓や脂肪組織といったインスリン標的組織にも発現しており、JAK/STAT の一部はインスリン受容体の基質として作用し、インスリン作用の細胞内伝達に関与していることが明らかとなった(Sawka-Verhelle D, *et al.* 2000)。3T3-L1 細胞に関しては、STAT ファミリーが脂肪細胞への分化の過程において重要な役割を担っていることが示唆されたが(Deng J, *et al.* 2000)、成熟した 3T3-L1 脂肪細胞においてはインスリンによって STAT1, 3, 5a, 5b 及び 6 は核内に移行しないという報告(Balhoff JP, *et al.* 1998)があり、JAK/STAT がインスリン作用の伝達にどの程度関与しているかについてははっきりしていない。



[図6] 脂肪細胞におけるインスリン伝達機構のモデル

インスリンのシグナルは、①インスリン結合により生じるインスリン受容体の自己リン酸化とチロシンキナーゼ活性化、②活性化されたインスリン受容体チロシンキナーゼにより直接チロシンリン酸化を受ける IRS ファミリー、Shc などのインスリン受容体の基質のリン酸化、③チロシンリン酸化を受けたこれらの基質 SH 基を有する蛋白の結合、④SH2 蛋白によるシグナルの分岐・伝達、⑤さらにその下流のシグナル伝達系の活性化、など多段階の反応により下流へと伝達される。

IRS; insulin receptor substrate, Shc; src homology and collagen, PI 3-K; phosphatidylinositol-3 kinase, PDK-1; phosphoinositide-dependent kinase-1, aPKC; atypical protein kinase C, PKB; protein kinase B, PDE3B; phosphodiesterase 3B, PKA; protein kinase A, Grb2; growth factor receptor-bound protein 2, SOS; Son of sevenless, MAPKK; mitogen-activated protein kinase kinase, MAPK; mitogen-activated protein kinase, JAK; janus kinase, STAT; signal transducers and activators of transcription, CAP; c-Cbl-associated protein

## 5-(5)本研究の目的

糖尿病の発症には、インスリン標的組織におけるインスリン抵抗性の増大とその抵抗性に対する膵β細胞の代償性インスリン分泌の破綻が重要であると考えられている。肥満はインスリン抵抗性を増大させるもっとも重要な因子と考えられるが、肥満に伴うインスリン抵抗性の発症機序については不明な点が多かった。

近年の分子生物学的研究によって、脂肪細胞からさまざまな因子が分泌されることが明らかとなり、これらの因子が糖代謝や脂質代謝に積極的に関与していることがわかってきた。

前述のごとく、レジスチンは脂肪細胞から分泌される蛋白で、インスリン抵抗性増強因子の一つと考えられており、その発現は種々の因子によって調節を受けている。血糖調節ホルモンであるインスリンは種々の遺伝子発現制御に関与しているが、培養脂肪細胞においては、レジスチンの発現を負に調節すると考えられている。しかしながら、インスリンによるレジスチンの発現調節に関する詳細な機序については明らかとされていなかった。

そこで本研究では、培養脂肪細胞系である 3T3-L1 細胞における、インスリンによるレジスチン遺伝子の発現調節に関する機序の解明を目的とし、インスリン作用伝達経路の種々の阻害剤を用いて、レジスチン mRNA の発現をノーザンブロット法により解析した。



## 6. 実験方法

### 6-(1) 細胞培養

3T3-L1 線維芽細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco BRL 社) に最終濃度が 10%となるような仔ウシ血清 (calf serum, Invitrogen 社) と 25 mmol/l となるようなブドウ糖を加えた培地にて、37°C、10% CO<sub>2</sub>を含む培養器 (CO<sub>2</sub>培養器) で培養を行った。3T3-L1 線維芽細胞はコンフルエントに達した後、分化用培養液 [DMEM に最終濃度が 10%となるようなウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS, Invitrogen 社)、25 mmol/l となるようなブドウ糖、0.5 mmol/l となるような イソプチルメチルキサンチン(Sigma 社)、5 µg/ml となるようなインスリン及び 0.4 µg/ml となるようなデキサメサゾンを加えたもの] の中で培養した。48 時間培養後、培養液を脂肪細胞成長用培養液 (DMEM に最終濃度が 10%となるような FBS、25 mmol/l となるようなブドウ糖及び 5 µg/ml となるようなインスリンを加えたもの)に交換し、さらに 48 時間培養した。その後、培養液を維持培養液 (DMEM に最終濃度が 10%となるような FBS 及び 25 mmol/l となるようなブドウ糖を加えたもの) に交換し、培養を続けた。維持培養液は 2 日置きに交換した。

### 6-(2) ノーザンプロット法

#### (A) 細胞刺激

3T3-L1 細胞における分化に伴うレジスチン mRNA の発現を調べるため、上記 6-(1)に記載した方法で分化させた、分化誘導 0、2、4、8、12 日目の細胞の RNA について検討した。インスリン刺激は、分化誘導 8 日目の 3T3-L1 脂肪細胞を、血清を含まない培地 [DMEM に最終濃度が 25 mmol/l となるようなブドウ糖とウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA, Sigma 社) を加えたもの] (以下 SS 培養液) で 6 時間培養した後に、100 nmol/l のインスリンで 0~24 時間刺激を行った。濃度に関する実験では 0~1000 nmol/l の濃度のイ

ンスリンを用いて 16 時間刺激を行った。ERK 経路の特異的阻害剤である PD98059 (Calbiochem 社)、p38 MAP-キナーゼの特異的阻害剤である SB203580 (Calbiochem 社)、PI 3-キナーゼの特異的阻害剤である LY294002 (Sigma 社)、蛋白合成阻害剤であるサイクロヘキサマイド (Sigma 社) 及び RNA 合成阻害剤であるアクチノマイシン D (Sigma 社) を用いた実験においては、インスリン刺激を行う 30 分前にそれらの阻害剤を培養液に加え、100 nmol/l のインスリンを加え、さらに 16 時間培養した。

#### (B) RNA の抽出

RNA は TRIzol 試薬 (Invitrogen 社) を用いて抽出した。60 mm シャーレ (IWAKI 社) で培養された 3T3-L1 細胞を 4°C に冷やした PBS (phosphate-buffered saline) で洗浄した後、1 ml の TRIzol 試薬を加え、細胞をスクレイパーにてプレートより剥離し、1.5 ml チューブに移した。室温にて 5 分間静置後、クロロホルムを 200 $\mu$ l 加え、30 秒間よく攪拌し、さらに 2 分間室温に静置。次に、12,000 $\times$ g、4°C で 15 分間遠心し、上清を 400 $\mu$ l 新しい 1.5 ml チューブに移した。400 $\mu$ l のイソプロパノールを加え、室温にて 10 分間静置後、12,000 $\times$ g、4°C で 10 分間遠心。上清を取り除き、1 ml の 75 %エタノールを加え、軽く攪拌した後、7,500 $\times$ g、4°C で 5 分間遠心。上清を取り除き、ペレットを軽く空乾した後、ペレットを、RNA 分解酵素を含まない水に溶解し、濃度を測定した。

#### (C) ハイブリダイゼーション

10  $\mu$ g の RNA とエチジウムブロマイド含有試料 (Sigma 社) を混合した後、ホルムアルデヒドを含む 1.0%アガロースゲル上で電気泳動を行った。電気泳動を行ったゲルに含まれる RNA をニトロセルロース膜 (Amersham Pharmacia Biotech 社) に転写し、NaOH を用いて固定を行った。Megaprime DNA Labelling System キット (Amersham Pharmacia Biotech 社) を用いて[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP で標識したプローブを ExpressHyb Hybridization Solution (Clontech Laboratories 社) の中でハイブリダイゼーションを行った。プローブの遺伝子配列は以下

の通りで、3T3-L1 脂肪細胞から抽出した RNA を鋳型として用い reverse transcript (RT)-polymerase chain reaction (PCR)を行った。

mouse resistin cDNA [from up 138 to 421 (Steppan CM, *et al* 2001)]

mouse aP2 cDNA [from up 1 to 399 (Hunt CR, *et al* 1986)]

mouse 36B4 cDNA [from up 336 to 628 (Simpson DA, *et al* 2000)]

68°C で2時間ハイブリダイゼーションを行った後、ニトロセルロース膜を室温で10分間、1次洗浄液 [2×SSC 溶液 (300 mmol/l NaCl + 30 mmol/l クエン酸ナトリウム)に最終濃度が0.05%となるような SDS (sodium dodecyl sulfate)を加えたもの] で2回洗浄し、続いて50°C で10分間、2次洗浄液 (0.1×SSC 溶液に最終濃度が0.1%となるように SDS を加えたもの) で洗浄した。ニトロセルロース膜を X 線フィルムに感光した。定量はフィルムをスキャナーで画像として取り込み NIH Image analyser にて解析を行った。

### 6-(3) ウェスタンブロット法

#### (A) 蛋白精製

血清を含まない培養液 (SS 培養液) で6時間培養した分化誘導8日目の3T3-L1 脂肪細胞に最終濃度が50 μmol/l の PD98059 もしくは50 μmol/l の LY294002 を加え、30分間培養した。その後、最終濃度が100 nmol/l になるようにインスリンを加え、さらに10分間培養した。60 mm シャーレで培養された3T3-L1 脂肪細胞を4°C に冷やした PBS で洗浄した後、1 ml の蛋白抽出用溶液を加え、細胞をスクレイパーにてプレートより剥離し、1.5 ml チューブに移した。4°C にて30分間緩徐に回転後、4°C 下12,000 rpm、30分間の遠心分離を施行し、上清を試料として使用した。蛋白抽出液は Coomassie brilliant blue (CBB) G250 を用いた Bradford 色素結合法 (Bio-Rad 社) にて、吸光度計で蛋白濃度を測定した。蛋白抽出用溶液の組成を下記に示す。

30 mmol/l Tris (pH 7.4)

150 mmol/l NaCl

10 mmol/l EDTA

1 mmol/l  $\text{Na}_3\text{VO}_4$

20 mmol/l  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$

50 mmol/l NaF

1% NP-40

1 mmol/l phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)

10  $\mu\text{g/ml}$  aprotinin

1  $\mu\text{mol/l}$  leupeptin

## (B) ウェスタンブロット法

精製した各蛋白を 50  $\mu\text{g}$  ずつ分注し、試料溶解用溶液を加え 95°C 5 分間煮沸し sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)を行った。SDS-PAGE 終了後、セミドライ転写器を用いてニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell 社) に電氣的に転写した。目的とする蛋白の検出方法は Chemiluminescence Western Blotting キット (BOEHRINGER MANNHEIM 社) に付属の使用法に従い行った。まず、ブロッキング液中で膜をブロッキング。次に一次抗体反応 (室温 2 時間)、二次抗体反応 (ペルオキシダーゼ標識抗マウス、ウサギ IgG 抗体、室温 30 分) を行ったあと、発光基質を加え、発光を X 線フィルムに感光した。定量はフィルムをスキャナーで画像として取り込み NIH Image analyser にて解析を行った。以下に一次抗体反応で用いた抗体を示す。

抗 ERK1/2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社)

抗 phospho-ERK1/2 抗体 (Cell Signaling 社)

抗 Akt 抗体 (Cell Signaling 社)

抗 phospho-Akt 抗体 (Cell Signaling 社)

#### 6-(4) p38 MAP キナーゼ活性の測定

血清を含まない培養液 (SS 培養液) で 6 時間培養した分化誘導 8 日目の 3T3-L1 脂肪細胞に最終濃度が 10  $\mu\text{mol/l}$  の SB203580 を加え、30 分間培養した。その後、最終濃度が 100 nmol/l になるようにインスリンを加え、さらに 10 分間培養した。p38 MAP キナーゼ活性の測定は、p38 MAP キナーゼ活性測定キット (Cell Signaling 社) に付属の使用法に従って行った。まず、4°C に冷やした PBS で細胞を洗浄した後、1 ml の蛋白抽出用溶液を加え、細胞をスクレイパーにてプレートより剥離し、1.5 ml チューブに移した。破碎処理後、4°C 下 12,000 rpm、30 分間の遠心分離を施行し、上清を試料として使用した。蛋白抽出液は Coomassie brilliant blue (CBB) G250 を用いた Bradford 色素結合法 (Bio-Rad 社) にて、吸光度計で蛋白濃度を測定した。蛋白抽出用溶液の組成を下記に示す。

20 mmol/l Tris (pH 7.4)

150 mmol/l NaCl

1 mmol/l EDTA

1 mmol/l EGTA

1% Triton

2.5 mmol/l sodium pyrophosphate

1 mmol/l  $\beta$ -glycerolphosphate

1 mmol/l  $\text{Na}_3\text{VO}_4$

1  $\mu\text{g/ml}$  leupeptin

精製した各蛋白を 200  $\mu\text{g}$  ずつ分注し、phospho-p38 MAP-キナーゼモノクローナル抗体を加え、4°C にて 12 時間以上緩徐に回転後、4°C 下 15,000 rpm、30 秒間の遠心分離を施

行し、上清を取り除いた。500  $\mu$ l の蛋白抽出用溶液で2回洗浄した後、500  $\mu$ l のキナーゼ活性用溶液 [25 mmol/l Tris (pH 7.5), 5 mmol/l  $\beta$ -glycerol-phosphate, 2 mmol/l DTT, 0.1 mmol/l  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  及び 10 mmol/l  $\text{MgCl}_2$ ] でさらに2回洗浄した。50  $\mu$ l のキナーゼ活性用溶液とともに 200  $\mu$ mol/l ATP と 2  $\mu$ g の ATF-2 を加え、30°C で 30 分間反応させた。これらの試料に試料溶解用溶液を加え 95 °C 5 分間煮沸し SDS-PAGE を行った。抗 phospho-ATF-2 抗体を用い、ウェスタンブロットを行った。

#### 6-(5) アデノウィルスを用いた遺伝子導入

$\Delta$ p85 (PI 3-キナーゼの 110-kDa 触媒サブユニットとの結合領域を欠く p85 ; AdexCA $\Delta$ p85) をコードしているアデノウィルスは神戸大学の春日雅人博士から供与していただいたものであり (Sakaue H, *et al.* 1997)、LacZ をコードしているアデノウィルス (AdexCALacZ) はアメリカジョスリン糖尿病センターの植木浩二郎博士から供与していただいたものである。維持培養液で培養された分化誘導 8 日目の 3T3-L1 脂肪細胞に AdexCALacZ もしくは AdexCA $\Delta$ を加え 24 時間培養した。ノーザンブロット法の場合、血清を含まない培養液 (SS 培養液) で 6 時間培養した後に、最終濃度が 100 nmol/l になるようにインスリンを加え、さらに 16 時間培養した。PI 3-キナーゼ活性測定の場合、血清を含まない培養液 (SS 培養液) で 6 時間培養した後に、最終濃度が 100 nmol/l になるようにインスリンを加え、さらに 10 分間培養した。

#### 6-(6) PI 3-キナーゼ活性測定

蛋白濃度測定の後、500  $\mu$ g の蛋白を抗リン酸化チロシン抗体 (Upstate biotechnology 社) にて免疫沈降させ (4 °C 12 時間)、ウェスタンブロット用蛋白抽出用溶液で予め洗浄した 50% 濃度の Protein A-Sepharose CL-4B を 70  $\mu$ l 添加し、90 分間の反応後に回収し、生じた

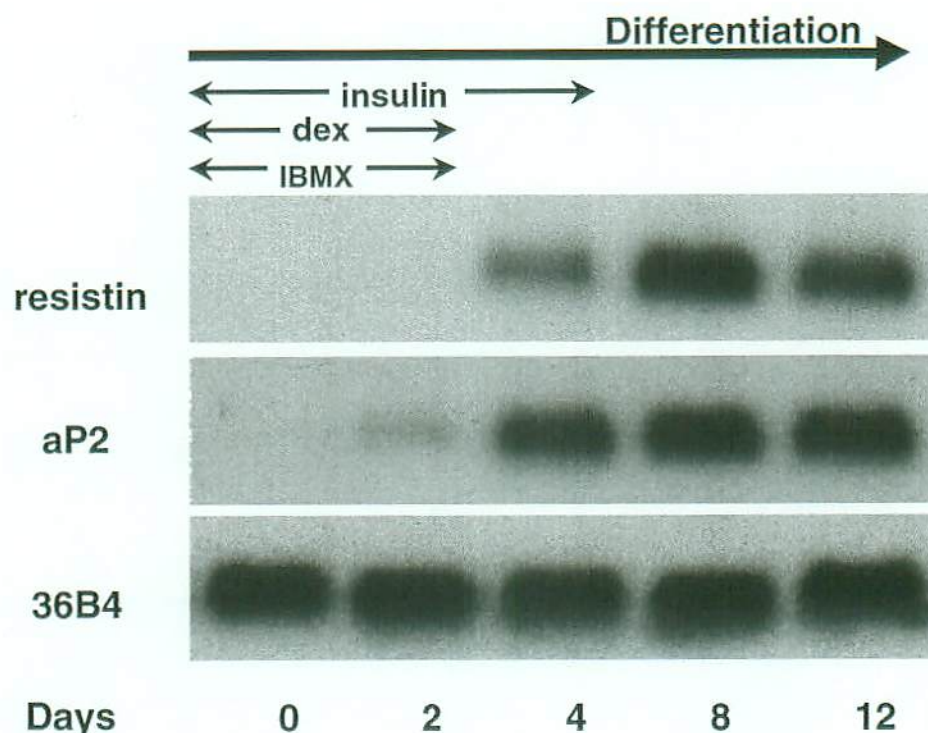
免疫複合体を洗浄溶液①（最終濃度 1 % Nonidet P-40, 100  $\mu\text{mol/l}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$  を含む PBS）にて 2 回、洗浄溶液②（100 mmol/l Tris, pH 7.5, 500 mmol/l  $\text{LiCl}_2$ , 100  $\mu\text{mol/l}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ）にて 2 回、洗浄溶液③（10 mmol/l Tris, pH 7.5, 100 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA, 100  $\mu\text{mol/l}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ）にて 2 回洗浄した。その後、免疫複合物に 50  $\mu\text{l}$  の洗浄溶液③と、50 mmol/l  $\text{MgCl}_2$  を 50  $\mu\text{l}$ 、2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  の濃度の破碎処理した phosphatidylinositol を 10  $\mu\text{l}$  添加した。リン酸化反応は、1.1MBq [ $^{32}\text{P}$ ]ATP を含む 440  $\mu\text{mol/l}$  ATP を 10  $\mu\text{l}$  添加後室温で 10 分間反応させた後、1N HCl 250  $\mu\text{l}$  により停止し、80  $\mu\text{l}$  のクロロホルム：メタノール（2：1）により抽出した。続いて 3,000 rpm、5 分の遠心分離後、分離した 3 層の最下層にある有機層を採取し、thin-layer chromatography (TLC) プレート（Merck 社）上にスポットした。プレートを展開液（クロロホルム：メタノール： $\text{H}_2\text{O}$ ：アンモニア水 = 60：47：11.3：2）を入れた展開層内に設置して展開、乾燥後、オートラジオグラフィーにて検出した。PI 3-キナーゼ活性は生成した PI 3-P(phosphatidylinositol 3-phosphate)の放射活性を NIH Image Analyzer で定量した。

#### 6-(7) 統計処理

数値は平均値 $\pm$ 標準偏差（SEM）で表記した。2 群間の検定に関しては student' s t-test にて有意差を検定した。 $p<0.05$  の際に、統計学的に有意と判断した。

## 7. 実験結果

### 7-(1) 3T3-L1 細胞における分化に伴うレジスチン mRNA の発現についての検討



【図 7】 3T3-L1 細胞における分化に伴うレジスチン mRNA の発現

3T3-L1 細胞をイソブチルメチルキサンチン (IBMX)、デキサメサゾン (dex) 及びインスリンを用いて分化誘導を行い、レジスチン mRNA の発現についてノーザンブロット法を用いて検討した。脂肪細胞分化の指標として aP2 の mRNA についても検討した。細胞内対照として 36B4 の mRNA についても検討した。

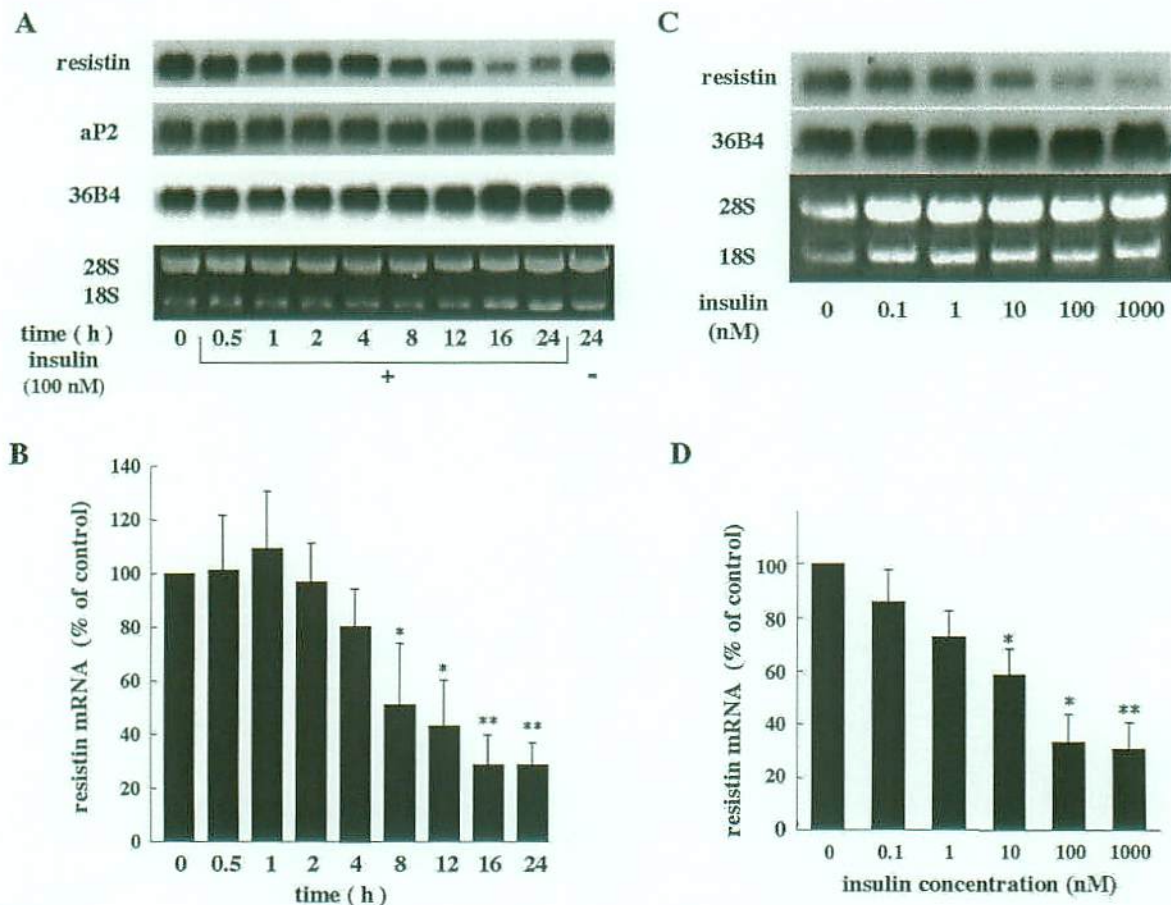
まず、3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化に伴うレジスチン mRNA の発現について、ノーザンブロット法を用いて検討した。脂肪滴の発現が認められない前脂肪細胞（分化誘導 0～2 日目）にはレジスチン mRNA の発現は認められなかった（図 7）。レジスチン mRNA の発現は分化誘導 4 日目から認められるようになった。その発現は分化誘導 8 日目に最大となり、分化誘導 12 日目には減少傾向にあった。一方、分化脂肪細胞に特異的に発現する遺伝子である aP2 の mRNA は、分化誘導 2 日目から認められるようになり、その発現は分化誘導 12 日目まで持続していた。36B4 は細胞内に恒常的に発現しているリボソーム



RNA であり、この発現は脂肪細胞分化前後で変化がなかった。この結果を元に、以後の実験に対しては分化誘導 8 日目の 3T3-L1 脂肪細胞を用いることとした。

#### 7-(2) 3T3-L1 脂肪細胞におけるインスリンによるレジスチン mRNA の変化

3T3-L1 脂肪細胞におけるレジスチン mRNA に対するインスリンの効果を検討した。インスリン刺激 8 時間後より有意なレジスチン mRNA の発現低下が認められ ( $p<0.05$ )、インスリン刺激 24 時間後には対照 (インスリン非刺激細胞) の約 30% まで低下していた (図 8 A, B)。一方、aP2 の mRNA の発現には変化が見られなかった。また、インスリンによるレジスチン mRNA の発現低下は濃度依存的であり、10 nmol/l のインスリン濃度で有意なレジスチン mRNA の発現低下を認め ( $p<0.05$ )、100 nmol/l のインスリンでは対照 (インスリン非刺激細胞) の 33% まで減少していた (図 8 C, D)。



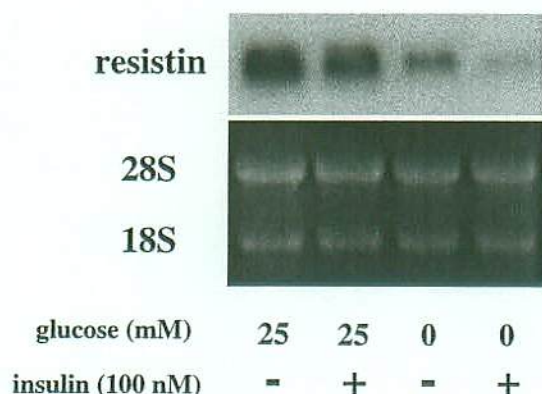
[図 8] 3T3-L1 脂肪細胞におけるレジスチン mRNA に対するインスリンの効果

(A) 血清を含まない培養液 (SS 培養液) で 6 時間培養した分化誘導 8 日目の 3T3-L1 脂肪細胞に最終濃度が 100 nmol/l になるようにインスリンを加え、刺激を行った。(B) レジスチン mRNA 量を 36B4 の mRNA 量で補正した後、インスリン刺激(-)の細胞のレジスチン mRNA 量 (対照) に対する割合を表したもの。\* $p < 0.05$  対 対照、\*\* $p < 0.01$  対 対照。(C) 血清を含まない培養液 (SS 培養液) で 6 時間培養した分化誘導 8 日目の 3T3-L1 脂肪細胞に各濃度のインスリンを加え、16 時間刺激を行った。(D) レジスチン mRNA 量を 36B4 の mRNA 量で補正した後、インスリン刺激(-)の細胞のレジスチン mRNA 量 (対照) に対する割合を表したもの。\* $p < 0.05$  対 対照、\*\* $p < 0.01$  対 対照。

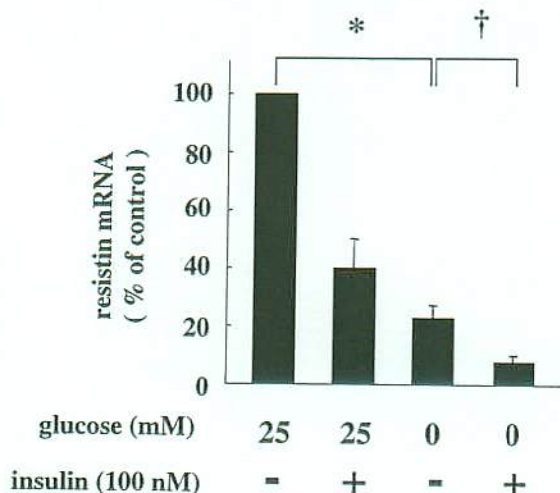
### 7-(3) インスリンによるレジスチン mRNA の発現低下に対するブドウ糖の影響

インスリンによるレジスチン mRNA の発現低下が細胞外ブドウ糖により影響を受けるかどうかについて、ブドウ糖を含まない培養液で培養した細胞を用いて検討した。インスリン非刺激の状態では、ブドウ糖を除いた培養液で培養した細胞のレジスチン mRNA は、通常のブドウ糖含有培養液で培養した細胞の約 25% まで低下していた (図 9 A, B)。しかしながら、ブドウ糖を含む培養液で培養した細胞と同様、ブドウ糖を除去した培養液で培養した細胞においてもインスリンによるレジスチン mRNA の発現低下を認めることができた。

**A**



**B**



[図 9] インスリンによるレジスチン mRNA の発現低下に対するブドウ糖の影響

(A) 25 mmol/l のブドウ糖、もしくはブドウ糖を含まない培養液で 6 時間培養した細胞に最終濃度が 100 nmol/l になるようにインスリンを加え、16 時間刺激を行った。RNA 量は 28S/18S リボソーム RNA で等量であることを確認した。(B) 25 mmol/l のブドウ糖濃度で培養された、インスリン刺激を行っていない細胞のレジスチン mRNA を対照とし、レジスチン mRNA の量を対照に対する割合で表した。\* $p < 0.05$ 、† $p < 0.05$

#### 7-(4) インスリンシグナル伝達経路の検討

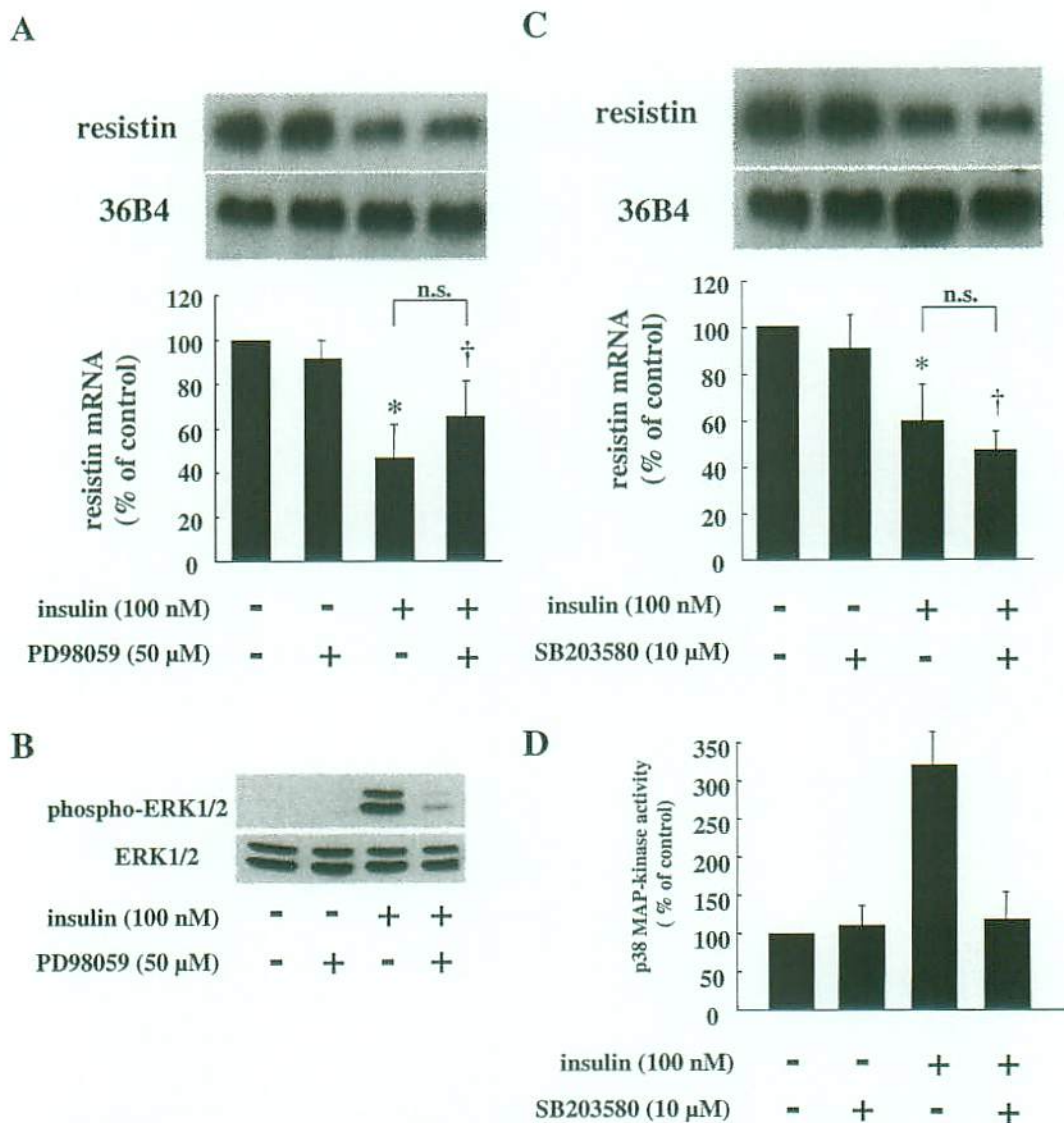
次に、レジスチン mRNA の発現に対するインスリンの効果をより詳細に検討するために、インスリンシグナル伝達経路について実験を行った。まず MAP-キナーゼ経路について検討し、次に PI 3-キナーゼ経路について検討した。

##### ① MAP-キナーゼ経路

MAP-キナーゼ経路の一つである ERK1/2 経路の特異的阻害剤である PD98059 を用いて検討した。50  $\mu\text{mol/l}$  の PD98059 で 30 分間前処理した細胞に 100 nmol/l のインスリンで 16 時間刺激を行ったところ、インスリンによるレジスチン mRNA の発現低下は全く阻害されなかった (図 10A)。PD98059 の効果を確認するために、50  $\mu\text{mol/l}$  の PD98059 で 30 分間前処理した後に 100 nmol/l のインスリンで 10 分間刺激を行った細胞の ERK1/2 のリン酸化を調べたところ、インスリンによる ERK1/2 のリン酸化は PD98059 によって完全に阻害された (図 10B)。このことは 50  $\mu\text{mol/l}$  の PD98059 でインスリンによる ERK1/2 経路の活性化を十分に阻害していることを意味している。

3T3-L1 脂肪細胞において、インスリンによって活性化される ERK1/2 経路以外の MAP-キナーゼ経路として p38 MAP-キナーゼが知られている (Sweeney G, *et al.* 1999, Kayali AG, *et al.* 2000)。そこで、p38 MAP-キナーゼ経路の特異的阻害剤である SB203580 を用いて検討した。10  $\mu\text{mol/l}$  の SB203580 で 30 分間前処理した細胞に 100 nmol/l のインスリンで 16 時間刺激を行ったところ、インスリンによるレジスチン mRNA の発現低下は全く阻害されなかった (図 10C)。SB203580 の効果を確認するために、10  $\mu\text{mol/l}$  の SB203580 で 30 分間前処理した後に 100 nmol/l のインスリンで 10 分間刺激を行った細胞の p38 MAP-キナーゼの酵素活性を調べたところ、インスリンによる p38 MAP-キナーゼの酵素活性は SB203580 によって完全に阻害された (図 10D)。このことは 10  $\mu\text{mol/l}$  の SB203580 でインスリンによる p38 MAP-キナーゼ経路の活性化を十分に阻害していることを意味している。





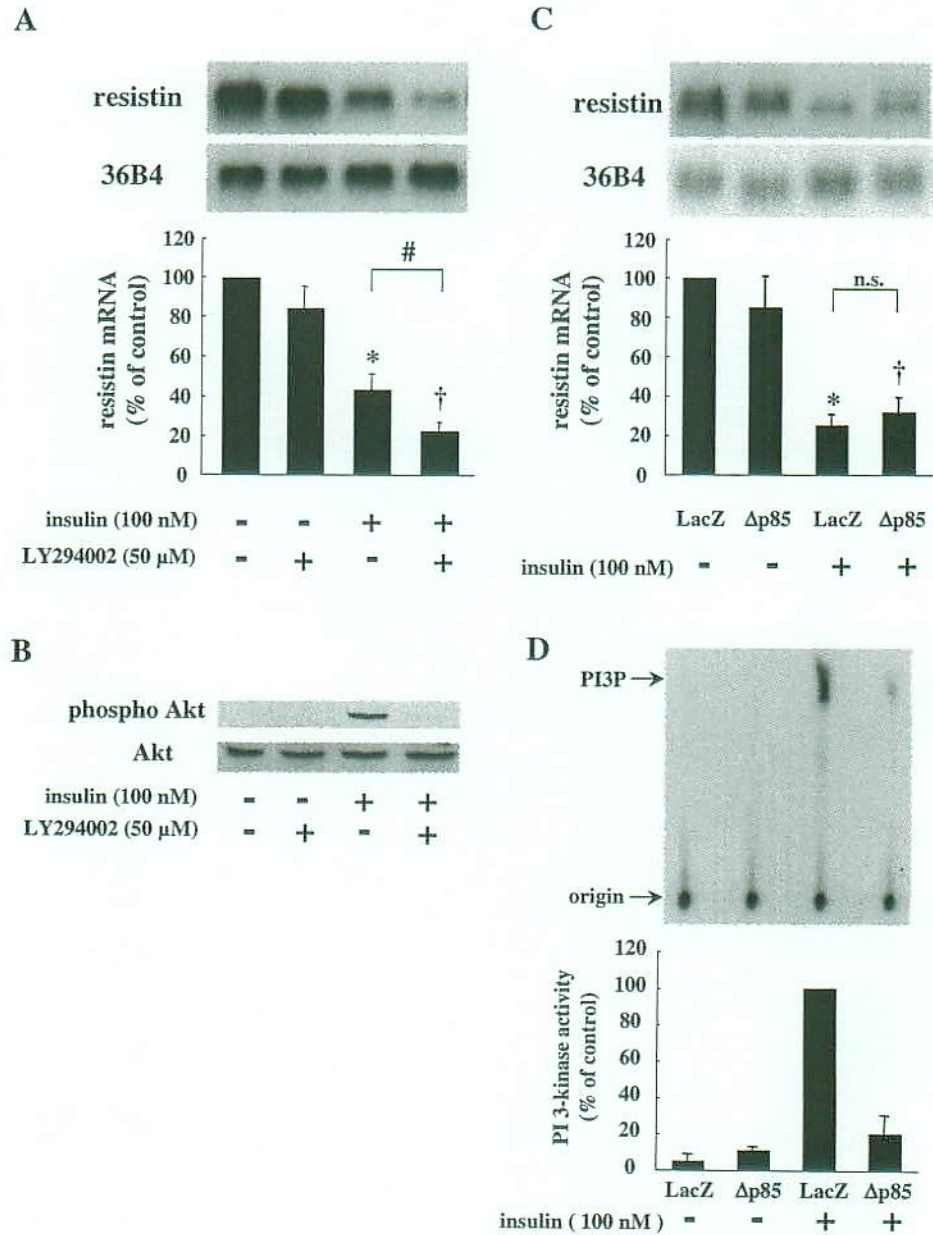
[図 10] インスリンによるレジスチン mRNA 発現抑制に対する ERK1/2 経路及び p38 MAP-キナーゼ経路の検討

(A), (C) 3T3-L1 脂肪細胞を PD98059 (A) もしくは SB203580 (C) で 30 分間前処理した後に 100 nmol/l のインスリンで 16 時間刺激を行った。レジスチン mRNA 量を 36B4 の mRNA 量で補正した後、インスリン刺激(-)・阻害剤(-)の細胞のレジスチン mRNA 量(対照)に対する割合をレジスチン mRNA の量として表した。 $*p < 0.05$  対 対照,  $\dagger p < 0.05$  阻害剤のみの細胞 対 阻害剤+インスリンの細胞, n.s.: 有意差なし。(B) PD98059 で 30 分間前処理した後に 100 nmol/l のインスリンで 10 分間刺激を行った細胞の蛋白を抗 phospho-ERK1/2 抗体もしくは抗 ERK1/2 抗体を用いてウェスタンブロット解析。(D) p38 MAP-キナーゼ酵素活性の測定。インスリン(-)・SB203580(-)の細胞の p38 MAP-キナーゼの酵素活性を対照とした。

## ② PI 3-キナーゼ経路

次に、PI 3-キナーゼの特異的阻害剤である LY294002 を用いて検討した。50  $\mu\text{mol/l}$  の LY294002 で 30 分間前処理した細胞に 100 nmol/l のインスリンで 16 時間刺激を行ったところ、インスリン単独によるレジスチン mRNA の発現低下よりもさらに 50%ほどレジスチンの mRNA は低下していた (図 11A)。LY294002 の効果を確認するために、50  $\mu\text{mol/l}$  の LY294002 で 30 分間前処理した後に 100 nmol/l のインスリンで 10 分間刺激を行った細胞の Akt のリン酸化を調べたところ、インスリンによる Akt のリン酸化は LY294002 によって完全に抑制された (図 11B)。このことは 50  $\mu\text{mol/l}$  の LY294002 でインスリンによる PI 3-キナーゼ経路の活性化を十分に抑制していることを意味している。

$\Delta p85$  (PI 3-キナーゼの 110-kDa 触媒サブユニットとの結合領域を欠く PI 3-キナーゼ調節サブユニット p85 ; AdexCA $\Delta p85$ ) をコードしているアデノウィルスを用いて、PI 3-キナーゼ経路をより詳細に検討した。 $\Delta p85$  を過剰発現した細胞では、PI 3-キナーゼの酵素活性は十分に抑制される (図 11D) が、インスリンによるレジスチン mRNA の抑制は阻害されなかった (図 11C)。



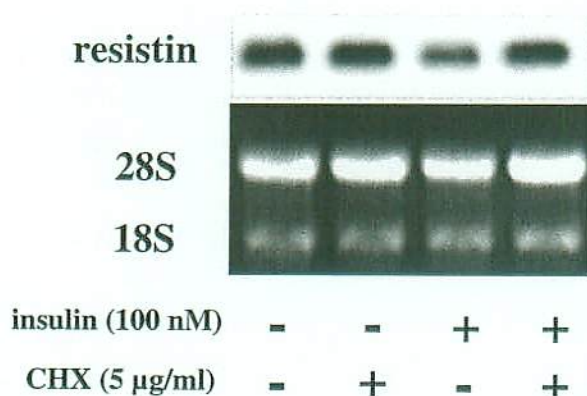
[図 11] インスリンによるレジスチン mRNA 発現抑制に対する PI 3-キナーゼ経路の検討

(A) 3T3-L1 脂肪細胞を LY294002 で 30 分間前処理した後に 100 nmol/l のインスリンで 16 時間刺激を行った。レジスチン mRNA 量を 36B4 の mRNA 量で補正した後、インスリン刺激(-)・阻害剤(-)の細胞のレジスチン mRNA 量(対照)に対する割合をレジスチン mRNA の量として表した。 $*p < 0.05$  対 対照、 $†p < 0.05$  LY294002 のみの細胞 対 LY294002+インスリンの細胞、n.s.: 有意差なし。(B) PD98059 で 30 分間前処理した後に 100 nmol/l のインスリンで 10 分間刺激を行った細胞の蛋白を抗 phospho-Akt 抗体もしくは抗 Akt 抗体を用いてウェスタンブロット解析。(C)  $\Delta p85$  を過剰発現させた細胞におけるレジスチン mRNA の変化。LacZ を過剰発現したインスリン非刺激の細胞のレジスチン mRNA 量(対照)に対する割合をレジスチン mRNA の量として表した。 $*p < 0.05$  対 対照、 $†p < 0.05$  対  $\Delta p85$  を過剰発現させたインスリン非刺激の細胞、n.s.: 有意差なし。(D) PI 3-キナーゼ酵素活性の測定。 $\Delta p85$  を過剰発現させたインスリン刺激(+)の細胞の PI を対照とした。

# 7-(5) 蛋白合成阻害剤サイクロヘキサマイドについての検討

インスリンによるレジスチン mRNA の発現抑制が他の蛋白の合成を介して行われているのかどうか検討するため、5  $\mu\text{g/ml}$  の蛋白合成阻害剤サイクロヘキサマイドを 30 分間前処理した後、インスリン刺激を 16 時間行ったところ、サイクロヘキサマイド前処理によってインスリンによるレジスチン mRNA の発現抑制が完全に阻害された (図 12A, B)。

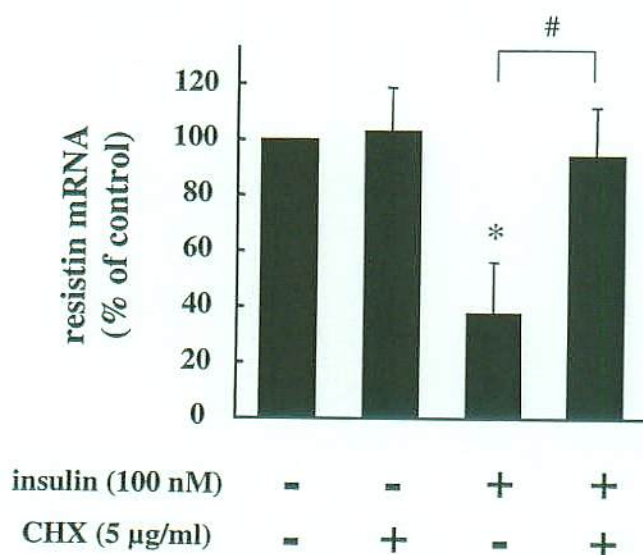
**A**



[図 12] インスリンによるレジスチン mRNA 発現抑制に対するサイクロヘキサマイドの効果

(A) 5  $\mu\text{g/ml}$  のサイクロヘキサマイドで 30 分間前処理した後に、100 nmol/l のインスリンで 16 時間刺激を行った。(B) インスリン刺激(-)・サイクロヘキサマイド(-)の細胞のレジスチン mRNA 量 (対照) に対する割合をレジスチン mRNA の量として表した。\* $p < 0.05$  対 対照、# $p < 0.05$  インスリンのみの細胞 対 インスリン+サイクロヘキサマイドの細胞

**B**

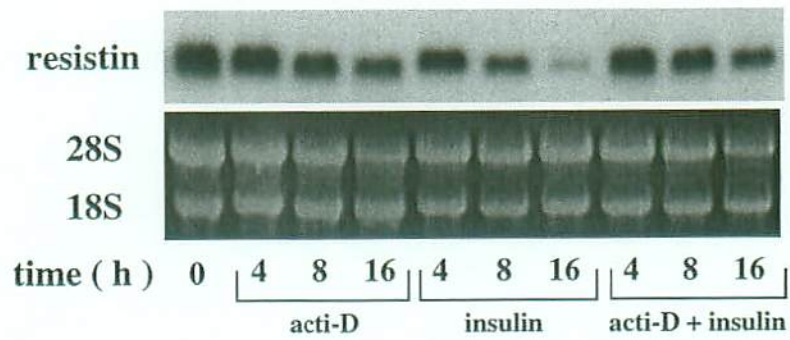




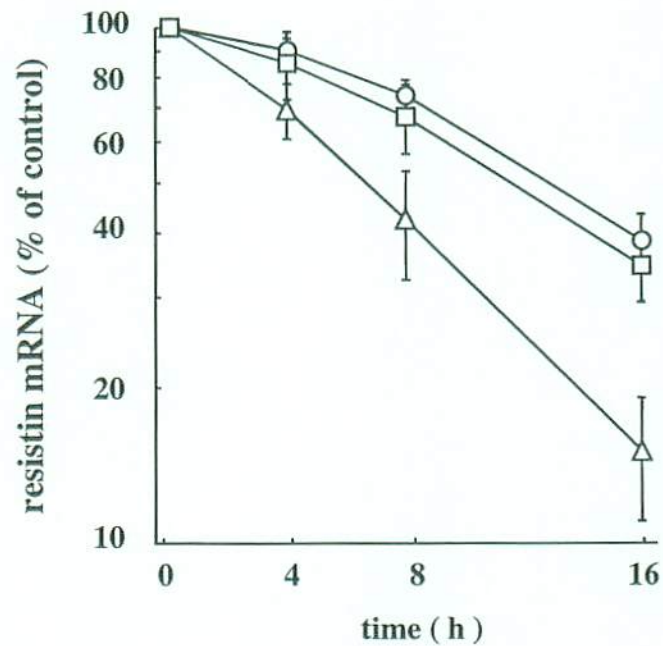
#### 7-(6) RNA 合成阻害剤アクチノマイシン D の効果

最後に、レジスチン mRNA の半減期を求めるために、RNA 合成阻害剤アクチノマイシン D を用いた実験を行った。アクチノマイシン D 処理にて RNA 合成を抑制した場合、レジスチン mRNA の半減期は 12.7 時間であった (図 13A, B ; open circles)。一方、インスリン存在下でのレジスチン mRNA の減少速度 (図 13A, B ; open triangles) は、アクチノマイシン D によるレジスチン mRNA の減少速度よりも明らかに速かった。また、アクチノマイシン D で前処理した後にインスリン刺激を行った細胞におけるレジスチン mRNA の減少速度は、インスリン存在下でのレジスチン mRNA の減少速度よりも緩やかで (図 13B ; open squares)、アクチノマイシン D 単独刺激の細胞におけるレジスチン mRNA の減少速度と同程度であった。

A



B



[図 13] インスリンによるレジスチン mRNA 発現抑制に対するアクチノマイシン D の効果

(A) 5  $\mu$ g/ml のアクチノマイシン D で 30 分間前処理した後に、100 nmol/l のインスリンで 4、8、16 時間刺激を行った (acti-D ; アクチノマイシン D)。 (B) インスリン刺激(-)・アクチノマイシン D(-)の細胞のレジスチン mRNA 量 (対照) に対する割合をレジスチン mRNA の量として表した。(open circles ; アクチノマイシン D のみ、open triangles ; インスリンのみ、open squares ; アクチノマイシン D+インスリン)。

## 8. 考察

### 8-(1) インスリンによるレジスチンの発現調節

インスリンは糖代謝やその他さまざまな栄養素の代謝に関与する遺伝子の発現を調節する重要な役割を担っている。空腹時では、血清レジスチン濃度とともに脂肪組織でのレジスチンの発現が低下しており、逆に食事摂取により血清レジスチン濃度の上昇とともに脂肪組織のレジスチン発現が上昇することから、インスリンはレジスチンの発現を上昇させると考えられてきた(Steppan CM, *et al.* 2001)。事実、内因性のインスリンが枯渇した糖尿病マウスである STZ マウスの白色脂肪組織でのレジスチン mRNA の発現は低下しており、streptozotocin (STZ)マウスにインスリンを投与するとレジスチン mRNA の発現が上昇している(Kim KH, *et al.* 2001)。一方、その後の実験では ob/ob マウスなどの肥満モデルマウスや高脂肪食負荷肥満マウスのレジスチンの発現は低下しており、インスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン誘導体やピグアナイド剤を投与すると、その発現が増強するという報告が相次いでいる(Way JM, *et al.* 2001、Le Lay S, *et al.* 2001、Rajala MW, *et al.* 2002、Fujita H, *et al.* 2002)。さらに最近の報告では、3T3-L1 脂肪細胞でもインスリンによってレジスチンの mRNA が低下することが明らかとなっている(Haugen F, *et al.* 2001)。以上のようにインスリンはレジスチンの発現を抑制する可能性が示唆されたが、その詳細な機序については全く不明であった。そこで我々は、3T3-L1 脂肪細胞におけるインスリンによるレジスチンの発現調節を種々の阻害剤を用いることでより詳細に解析することを試みた。

Haugen らの報告と同様に、我々の実験においてもインスリンはレジスチン mRNA の発現を低下させた。我々の実験では、インスリンによるレジスチン mRNA の発現低下は、8 時間以上のインスリン刺激を必要とし、その発現抑制は濃度依存的であった。今回我々は、蛋白発現については解析していないが、最近の報告ではインスリンがレジスチンの蛋白発現を低下させることも明らかとなっている(Shojima N, *et al.* 2002)。

## 8-(2) インスリンシグナル伝達機構の解析

次に、レジスチンの発現を負に調節するインスリンシグナル経路について解析した。インスリンによって活性化される主なシグナル経路は PI 3-キナーゼ経路と MAP-キナーゼ経路である(O'Brien RH, *et al.* 1996)。レジスチンの発現調節に対するこれらの経路の役割を解析するため、さまざまな阻害剤を用いて実験を行ったが、いずれの阻害剤によってもインスリンによるレジスチン mRNA の発現低下は阻害されず、我々の実験においてはいずれの経路の関与も否定的であった。いずれの阻害剤も酵素活性や下流の蛋白のリン酸化は抑制していることから、阻害剤自体は十分な効果を有していると考えられ、インスリンによるレジスチン mRNA の発現抑制は、PI 3-キナーゼ経路、ERK 経路及び p38 MAP-キナーゼ経路を介さずに行われていることが示唆された。

PI 3-キナーゼ経路、ERK 経路及び p38 MAP-キナーゼ経路を介さないインスリンシグナル伝達経路として、CAP-Cbl 系、JAK-STAT 系、JNK 系などが知られている。3T3-L1 脂肪細胞において c-Cbl はインスリンによってリン酸化される(Ribon V, *et al.* 1997, Ribon V, *et al.* 1998)が、活性化された CAP-Cbl 複合体は PI 3-キナーゼ経路、MAP-キナーゼ経路非依存的に GLUT4 を膜へ移行することで糖取込みやグリコーゲン合成を促進する(Baumann CA, *et al.* 2000)。インスリンによる遺伝子発現の調節には、糖代謝産物が関与している報告もあるため(Vaulont S, *et al.* 1994)、インスリンによるレジスチン mRNA の発現抑制が CAP-Cbl 系を経由した糖取込みを介している可能性も考えられた。そこで我々は、ブドウ糖を含まない培養液で培養した細胞を用いて、インスリンによるレジスチン mRNA の発現抑制が起こるかを検討したところ、ブドウ糖を含まない培養液で培養した細胞においてもインスリンによるレジスチン mRNA の発現抑制が認められたことから、インスリンによって取込まれたブドウ糖がレジスチン mRNA の発現抑制を引き起こしている可能性は否定的である。しかしながら、CAP-Cbl 系の活性化が直接遺伝子に働いて遺伝子発現の調節を行っ

ている可能性は否定できないため、今後検討する必要がある。

JAK や STAT といった蛋白は肝臓や脂肪組織といったインスリン標的組織にも発現しており、JAK/STAT の一部はインスリン受容体の基質として作用することがわかっている (Sawka-Verhelle D, *et al.* 2000)。3T3-L1 細胞に関しては、STAT ファミリーが脂肪細胞への分化の過程において重要な役割を担っていることが示唆されたが (Deng J, *et al.* 2000)、成熟した 3T3-L1 脂肪細胞においてはインスリンによって STAT1、3、5a、5b 及び 6 は核内に移行しないという報告 (Balhoffer JP, *et al.* 1998)があるため、インスリンによるレジスチン mRNA の発現抑制が JAK/STAT 系を介している可能性は低いと考えられる。

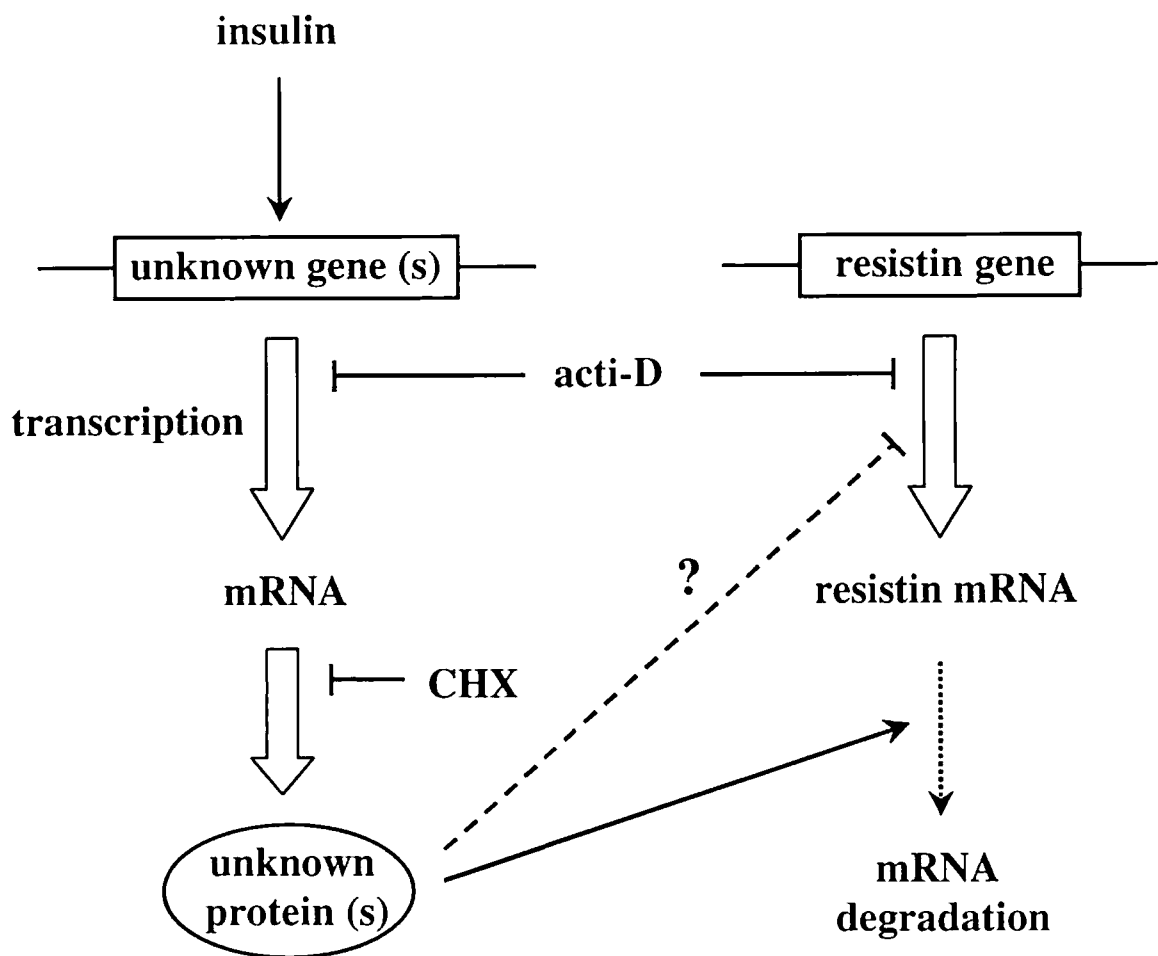
JNK/SAPK 経路は MAP-キナーゼ経路の一つである。肝臓においてグルココルチコイドは 6-phosphofructo-2-kinase (PF2K)の発現を増強するが、インスリンはこのグルココルチコイドの効果を JNK/SAPK 経路を介して阻害することがわかっている (De Los Pinos E, *et al.* 2001)。しかしながら、3T3-L1 脂肪細胞では JNK はリン酸化されないことから (Kayali AG, *et al.* 2000)、JAK/STAT 経路同様、インスリンによるレジスチン mRNA の発現抑制は JNK/SAPK 経路を介している可能性は低いと考えられる。いずれにしても、今後 JAK/STAT 経路、JNK/SAPK 経路を含め、インスリンシグナル伝達経路についてさらに解析する必要があると思われる。

### 8-(3) サイクロヘキサマイド及びアクチノマイシン D の効果

蛋白合成阻害剤サイクロヘキサマイドによってインスリンによるレジスチン mRNA の発現抑制が完全に抑制された。さらに、RNA 合成阻害剤アクチノマイシン D によってもインスリンの効果が阻害された。このことは、インスリンによるレジスチン mRNA の発現抑制が、ある遺伝子産物 (mRNA 及び蛋白) の合成を介して行われていることを意味する。phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)のように直接インスリンによって制御され

ている遺伝子の場合、1時間という短い時間でインスリンの効果が起こることがわかっているが(Sasaki K, *et al.* 1984)、レジスチンの場合インスリンの効果が現われるまで8時間以上の時間を要することからも、ある蛋白の合成を介してインスリンがレジスチン mRNA の発現を抑制していることが推察される。

インスリンは、遺伝子の転写を制御することや mRNA の安定性を変化させることによって遺伝子発現量の調節を行っていると考えられている(O'Brien RH, *et al.* 1996)が、現在のところ、インスリンが mRNA の安定性を変化させる機序については不明な点が多い。今回行ったアクチノマイシン D を用いた実験において、アクチノマイシン D によるレジスチン mRNA の減少速度に比べ、インスリン存在下でのレジスチン mRNA の減少速度のほうが明らかに速かった。仮にインスリンによるレジスチン mRNA の発現抑制が単にレジスチン遺伝子の転写の抑制によって起こっているだけであるならば、このような結果になることは考えられず、インスリンがレジスチン mRNA の発現を抑制する機序の少なくとも一部は、インスリンがレジスチン mRNA の分解を促進することによって起こっている可能性があると考えられる。しかしながら、インスリンがレジスチン mRNA の分解を促進しているという直接的な証拠はないため、今後この点に関しても検討する必要がある。また、アクチノマイシン D はレジスチン遺伝子の転写のみならず、インスリンによるレジスチン mRNA の発現抑制に関わると考えられる遺伝子の転写をも抑制するため(図 14)、インスリンがレジスチン遺伝子の転写を抑制するかどうかについては不明である。今後、レジスチン遺伝子のプロモーターを用いたレポーター実験を行い、レジスチン遺伝子の転写制御について検討する必要がある。



[図 14] インスリンによるレジスチン mRNA 発現抑制の機序 (仮説)

acti-D ; アクチノマイシン D、CHX ; サイクロヘキサマイド

## 9. 結語

糖尿病を含めた生活習慣病の発症にはインスリン抵抗性の増大が重要な役割を果たしている。肥満者の増加とともに生活習慣病患者の数が急増しているが、生活習慣病の発症予防を考えた場合、肥満に伴うインスリン抵抗性増強の機序を解明することが急務と考えられる。脂肪細胞から分泌されるレジスチンはインスリン抵抗性増強因子の一つと考えられており、レジスチンの発現を抑制する因子を同定し、その制御機構を解析することは意義があると思われる。

本研究では、3T3-L1 脂肪細胞におけるインスリンによるレジスチン mRNA の発現制御機構をより詳細に解析することを目的とした。

3T3-L1 細胞において、インスリンは濃度、時間依存性にレジスチン mRNA の発現を抑制したが、インスリンによるレジスチン mRNA の抑制は、ERK、p38 MAP-キナーゼ及びPI 3-キナーゼ非依存的な経路によって制御されていることがわかった。さらにその抑制は、新たな蛋白合成を介して行われ、RNA 合成阻害剤によるレジスチン mRNA の減少速度に比べインスリンによるレジスチン mRNA の減少速度の方が速かったことから、インスリンによるレジスチン mRNA の抑制の少なくとも一部はレジスチン mRNA の分解を促進することによると推測された。

本研究の結果より、インスリンは間接的にレジスチン遺伝子を負に制御していることが明らかとなったが、インスリンシグナル伝達経路に関しては明確にすることはできなかった。また現在のところ、レジスチンの本質的な作用やレジスチンによるインスリン抵抗性増強機序についてはほとんど明らかとなっていない。今後は、レジスチンがヒトにおいて、どの程度インスリン抵抗性の発症に関与しているのかを明らかにしていくことで、インスリン抵抗性の治療、ひいては2型糖尿病の治療に役立てられるものと期待している。



## 10. 参考文献

Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF (2001)

Phosphorylation of SER307 in IRS-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action.

J Biol Chem 277:1531-7

Akimoto K, Nakaya M, Yamanaka T, Tanaka J, Matsuda S, Weng QP, Avruch J, Ohno S (1998)

Atypical protein kinase Clambda binds and regulates p70 S6 kinase.

Biochem J 335: 417-24

Antonetti DA, Algenstaedt P, Kahn CR (1996)

Insulin receptor substrate 1 binds two novel splice variants of the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in muscle and brain.

Mol Cell Biol 16: 2195-203

Araki E, Lipes MA, Patti ME, Brüning JC, Haag B III, Johnson RS, Kahn CR (1994)

Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene.

Nature 372: 186-90

Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y (1999)

Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity.

Biochem Biophys Res Commun 257: 79-83

Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Kumada M, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Shimomura I, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y (2002)

Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell.

Circulation 105: 2893-8

Balhoff JP, Stephens JM (1998)

Highly specific and quantitative activation of STATs in 3T3-L1 adipocytes.

Biochem Biophys Res Commun 247: 894-900

Banerjee RR, Lazer MA (2001)

Dimerization of resistin and resistin-like molecules is determined by a single cysteine.

J Biol Chem 276: 25970-3

Baumann CA, Ribon V, Kanzaki M, Thurmond DC, Mora S, Shigematsu S, Bickel PE, Pessin JE, Saltiel AR (2000)

CAP defines second signaling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. Nature 407: 202-207

Brann DW, Wade MF, Dhandapani KM, Mahesh VB, Buchanan CD (2002)

Leptin and reproduction.

Steroids 67: 95-104

Chiang SH, Baumann CA, Kanzaki M, Thurmond DC, Watson RT, Neudauer CL, Macara IG, Pessin JE, Saltiel AR (2001)

Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10.

Nature 410: 944-8

Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB III, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI, Birnbaum MJ (2001)

Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta).

Science 292: 1728-31

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995)

Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B.

Nature 378: 785-9

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME (1997)

Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery.

Cell 91: 231-41

De Los Pinos E, Fernandez De Mattos S, Joaquin M, Tauler A (2001)

Insulin inhibits glucocorticoid-stimulated L-type 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene expression by activation of the c-Jun N-terminal kinase pathway.

Biochem J 353: 267-273

Deng J, Hua K, Lesser SS, Harp JB (2000)

Activation of signal transducer and activator of transcription-3 during proliferative phases of 3T3-L1 adipogenesis.

Endocrinology 141: 2370-6

Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, Edery M, Graf L, Clauser E, Ou JH, Masiarz F, Kan YW, Goldfine ID (1985)

The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling.

Cell 40: 747-58

Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, Normandin D, Cheng A, Himms-Hagen J, Chan CC, Ramachandran C, Gresser MJ, Tremblay ML, Kennedy BP (1999)

Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene.

Science 283: 1544-8

Engert JC, Vohl MC, Williams SM, Lepage P, Loredó-Osti JC, Faith J, Dore C, Renaud Y, Burt NP, Villeneuve A, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop LC, Despres JP, Gaudet D, Hudson TJ (2002)

5' flanking variants of resistin are associated with obesity.

Diabetes 51: 1629-34

Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R (2001)

Isoproterenol inhibits resistin gene expression through a Gs-protein-coupled pathway in 3T3-L1 adipocytes.

FEBS Lett 500: 60-3

Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R (2001)

Tumor necrosis factor alpha is a negative regulator of resistin gene expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes.

Biochem Biophys Res Commun 288: 1027- 31

Fruman DA, Cantley LC, Carpenter CL (1996)

Structural organization and alternative splicing of the murine phosphoinositide 3-kinase p85 alpha gene.

Genomics 37: 113-21

Fujita H, Fujishima H, Morii T, Koshimura J, Narita T, Kakei M, Ito S (2002)

Effect of metformin on adipose tissue resistin expression in db /db mice.

Biochem Biophys Res Commun 298: 345-9

Funaki M, Katagiri H, Kanda A, Anai M, Nawano M, Ogihara T, Inukai K, Fukushima Y, Ono H, Yazaki Y, Kikuchi M, Oka Y, Asano T (1999)

p85/p110-type phosphatidylinositol kinase phosphorylates not only the D-3, but also the D-4 position of the inositol ring.

J Biol Chem 274: 22019-24

Furukawa H, Carroll RJ, Swift HH, Steiner DF (1999)

Long-term elevation of free fatty acids leads to delayed processing of proinsulin and prohormone convertases 2 and 3 in the pancreatic beta-cell line MIN6.

Diabetes 48: 1395-401

Gainsford T, Willson TA, Metcalf D, Handman E, McFarlane C, Ng A, Nicola NA, Alexander WS, Hilton DJ (1996)

Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells.

Proc Natl Acad Sci USA 93: 14564-8

Goldstein BJ, Ahmad F, Ding W, Li PM, Zhang WR (1998)

Regulation of the insulin signalling pathway by cellular protein-tyrosine phosphatases.

Mol Cell Biochem 182: 91-9

Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, Shulman GI (1999)

Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C  $\theta$  and alterations in the insulin signaling cascade.

Diabetes 48: 1270-4

Hara K, Yonezawa K, Sakaue H, Kotani K, Kotani K, Kojima A, Waterfield MD, Kasuga M (1995)  
Normal activation of p70 S6 kinase by insulin in cells overexpressing dominant negative 85kD subunit of phosphoinositide 3-kinase.

Biochem Biophys Res Commun 208: 735-41

Haugen F, Jørgensen A, Drevon CH, Trayhurn P (2001)

Inhibition by insulin of resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes.

FEBS Lett 507: 105-8

Hayashi H, Kamohara S, Nishioka Y, Kanai F, Miyake N, Fukui Y, Shibasaki F, Takenawa T, Ebina Y (1992)

Insulin treatment stimulates the tyrosine phosphorylation of the  $\alpha$ -type 85-kDa subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in vivo.

J Biol Chem 267: 22575-80

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM (1993)

Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance.

Science 259: 87-91

Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM (1994)

Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor- $\alpha$ .

J Clin Invest 94: 1543-9

Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeier HK, Arita Y, Hansen BC, Matsuzawa Y (2001)

Circulating concentrations of the adipocyte protein, adiponectin, are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type-2 diabetes in rhesus monkeys.

Diabetes 50: 1126-33

Hunt CR, Ro JH, Dobson DE, Min HY, Spiegelman BM (1986)

Adipocyte P2 gene: developmental expression and homology of 5'-flanking sequences among fat cell-specific genes.

Proc Natl Acad Sci USA 83: 3786-3790

Jain R, Police S, Phelps K, Pekala PH (1999)

Tumour necrosis factor- $\alpha$  regulates expression of the CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBPs)  $\alpha$  and  $\beta$  and determines the occupation of the C/EBP site in the promoter of the insulin-responsive glucose-transporter gene in 3T3-L1 adipocytes.

Biochem J 338: 737-43

Kayali AG, Austin DA, Webster NJ (2000)

Stimulation of MAPK cascades by insulin and osmotic shock: Lack of an involvement of p38



mitogen-activated protein kinase in glucose transport in 3T3-L1 adipocytes.

Diabetes 49: 1783- 1793

Kim KH, Lee K, Moon YS, Sul HS (2001)

A Cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation.

J Biol Chem 276: 11252-256

Kitamura T, Kitamura Y, Kuroda S, Hino Y, Ando M, Kotani K, Konishi H, Matsuzaki H, Kikkawa U, Ogawa W, Kasuga M (1999)

Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt.

Mol Cell Biol 19: 6286-96

Klippel A, Reinhard C, Kavanaugh WM, Apell G, Escobedo MA, Williams LT (1996)

Membrane localization of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to activate multiple signal-transducing kinase pathways.

Mol Cell Biol 16: 4117-27

Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M, Matsui J, Eto K, Yamashita T, Kamon J, Satoh H, Yano W, Froguel P, Nagai R, Kimura S, Kadowaki T, Noda T (2002)

Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation.

J Biol Chem 277: 25863-6

Lavan BE, Lane WS, Lienhard GE (1997)

The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family.

J Biol Chem 272: 11439-43

Lavan BE, Fantin VR, Chang ET, Lane WS, Keller SR, Lienhard GE (1997)

A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family.

J Biol Chem 272: 21403-7

Le Lay S, Boucher J, Rey A, Castan-Laurell I, Krief S, Ferre P, Valet P, Dugail I (2001)

Decreased resistin expression in mice with different sensitivities to a high-fat diet.

Biochem Biophys Res Commun 289: 564-7

Lietzke SE, Bose S, Cronin T, Klarlund J, Chawla A, Czech MP, Lambright DG (2000)

Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains.

Mol Cell 6: 385-94

Ma X, Warram JH, Trischitta V, Doria A (2002)

Genetic variants at the resistin locus and risk of type 2 diabetes in Caucasians.

J Clin Endocrinol Metab 87: 4407-10

Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K (1996)

cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1).

Biochem Biophys Res Commun 221: 286-9

Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y (2002)

Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30.

Nature Med 8: 731-7

Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB (2002)

Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase.

Nature 415: 339-43

Moore GB, Chapman H, Holder JC, Lister CA, Piercy V, Smith SA, Clapham JC (2001)

Differential regulation of adipocytokine mRNAs by rosiglitazone in db/db mice.

Biochem Biophys Res Commun 286: 735-41

Nagaev I, Smith U (2001)

Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle.

Biochem Biophys Res Commun 285: 561-64

O'Brien RH, Granner DK (1996)

Regulation of gene expression by insulin.

Physiol Rev 76: 1109-61

Oral EA, Simha V, Ruiz E, Andewelt A, Premkumar A, Snell P, Wagner AJ, DePaoli AM, Reitman ML, Taylor SI, Gorden P, Garg A (2002)

Leptin-replacement therapy for lipodystrophy.

N Engl J Med 346: 570-8

Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda (2000)

Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signalling through camp-dependent pathway.

Circulation 102: 1296-1301

Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, Ishigami M, Kuriyama H, Kishida K, Nishizawa H, Hotta K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y (2001)

Adiponectin, adipocyte-derived plasma protein, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages.

Circulation 103: 1057-63

Ozes ON, Akca H, Mayo LD, Gustin JA, Maehama T, Dixon JE, Donner DB (2001)

A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway mediates and PTEN antagonizes tumor

necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin receptor substrate-1.

Proc Natl Acad Sci USA 98: 4640-5

Pizzuti A, Argiolas A, Di Paola R, Baratta R, Rauseo A, Bozzali M, Vigneri R, Dallapiccola B, Trischitta V, Frittitta L (2002)

An ATG repeat in the 3'-untranslated region of the human resistin gene is associated with a decreased risk of insulin resistance.

J Clin Endocrinol Metab 87: 4403-6

Pons S, Asano T, Glasheen E, Miralpeix M, Zhang Y, Fisher TL, Myers MG Jr, Sun XJ, White MF (1995)

The structure and function of p55PIK reveal a new regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase.

Mol Cell Biol 15: 4453-65

Pronk GJ, McGlade J, Pelicci G, Pawson T, Bos JL (1993)

Insulin-induced phosphorylation of the 46- and 52-kDa Shc proteins.

J Biol Chem 268: 5748-53

Rajala MW, Lin Y, Ranalletta M, Yang XM, Qian H, Gingerich R, Barzilai N, Scherer PE (2002)

Cell type-specific expression and coregulation of murine resistin and resistin-like molecule- $\alpha$  in adipose tissue.

Mol Endocrinol 16: 1920-30

Ren JM, Li PM, Zhang WR, Sweet LJ, Cline G, Shulman GI, Livingston JN, Goldstein BJ (1998)  
Transgenic mice deficient in the LAR protein-tyrosine phosphatase exhibit profound defects in  
glucose homeostasis.  
Diabetes 47: 493-7

Ribon V, Saltiel AR (1997)  
Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1  
adipocytes.  
Biochem J 324: 839- 846

Ribon V, Printen JA, Hoffman NG, Kay BK, Saltiel AR (1998)  
A novel, multifunctional c-Cbl binding protein in insulin receptor signaling in 3T3-L1 adipocytes.  
Mol Cell Biol 18: 872-879

Sakaue H, Ogawa W, Takata M, Kuroda S, Kotani K, Matsumoto M, Sakaue M, Nishio S, Ueno H,  
Kasuga M (1997)  
Phosphoinositide 3-kinase is required for insulin-induced but not for growth hormone- or  
hyperosmolarity-induced glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes.  
Mol Endocrinol 11: 1552-1562

Sasaki K, Cripe TP, Koch SR, Andreone TL, Petersen DD, Beale EG, Granner DK (1984)  
Multihormonal regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. The dominant

role of insulin.

J Biol Chem 259: 15242-15251

Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV, O'Rahilly S (2001)

Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  action in humans.

Diabetes 50: 2199-2202

Sawka-Verhelle D, Tartare-Deckert S, Decaux JF, Girard J, Van Obberghen E (2000)

Stat 5B, activated by insulin in a Jak-independent fashion, plays a role in glucokinase gene transcription.

Endocrinology 141: 1977-88

Shimabukuro M, Wang MY, Zhou YT, Newgard CB, Unger RH (1998)

Protection against lipopoptosis of beta cells through leptin-dependent maintenance of Bcl-2 expression.

Proc Natl Acad Sci USA 95: 9558-61

Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL (1999)

Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy.

Nature 401: 73-6

Shojima N, Sakoda H, Ogihara T, Fujishiro M, Katagiri H, Anai M, Onishi Y, Ono H, Inukai K, Abe

M, Fukushima Y, Kikuchi M, Oka Y, Asano T (2002)

Humoral regulation of resistin expression in 3T3-L1 and mouse adipose cells.

Diabetes 51: 1737- 44

Simpson DA, Feeney S, Boyle C, Stitt AW (2000)

Retinal VEGF mRNA measured by SYBR Green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR.

Molecular Vision 6: 178-183

Staal SP (1987)

Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma.

Proc Natl Acad Sci USA 84: 5034-7

Standaert ML, Galloway L, Karnam P, Bandyopadhyay G, Moscat J, Farese RV (1997)

Protein kinase C-zeta as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport.

J Biol Chem 272: 30075-82

Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima Rexford, Lazer MA (2001)

The hormone resistin links obesity to diabetes.

Nature 409: 307-12



Steppan CM, Brown EJ, Bhat S, Wright CM, Bhat S, Banerjee RR, Dai CY, Enders GH, Silberg DG, Wen X, Wu GD, Lazer MA (2001)

A family of tissue-specific resistin-like molecules.

Proc Natl Acad Sci USA 98: 502-6

Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF (1991)

Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein.

Nature 352: 73-7

Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers MG Jr, Glasheen E, Lane WS, Pierce JH, White MF (1995)

Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling.

Nature 377: 173-7

Sweeney G, Somwar R, Ramlal T, Volchuk A, Ueyama A, Klip A (1999)

An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase prevents insulin-stimulated glucose transport but not glucose transporter translocation in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes.

J Biol Chem 274: 10071-10078

Takada T, Matozaki T, Takeda H, Fukunaga K, Noguchi T, Fujioka Y, Okazaki I, Tsuda M, Yamao T, Ochi F, Kasuga M (1998)

Roles of the complex formation of SHPS-1 with SHP-2 in insulin-stimulated mitogen-activated protein kinase activation.

J Biol Chem 273: 9234-42

Tobe K, Matuoka K, Tamemoto H, Ueki K, Kaburagi Y, Asai S, Noguchi T, Matsuda M, Tanaka S, Hattori S, et al. (1993)

Insulin stimulates association of insulin receptor substrate-1 with the protein abundant Src homology/growth factor receptor-bound protein 2.

J Biol Chem 268: 11167-71

Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS (1997)

Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- $\alpha$  function.

Nature 389: 610-4.

Vaulont S, Kahn A (1994)

Transcriptional control of metabolic regulation genes by carbohydrates.

FASEB J 8: 28-35

Wang H, Chu WS, Hemphill C, Elbein SC (2002)

Human resistin gene: molecular scanning and evaluation of association with insulin sensitivity and type 2 diabetes in Caucasians.

J Clin Endocrinol Metab 87: 2520-4

Way JM, Görgün CZ, Tong Q, Uysal T, Brown KK, Harrington WW, Oliver WR, Wilson TM, Kliewer SA, Hotamisligil GS (2001)

Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by PPAR $\gamma$  agonists.

J Biol Chem 276: 25651-3

Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA (2001)

Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia.

J Clin Endocrinol Metab 86: 1930-5

White MF, Kahn CR (1994)

The insulin signaling system.

J Biol Chem 269: 1-4

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T (2001)

The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity.

Nature Med 7: 941-6

Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T (2002)

Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase.

Nat Med 8: 1288-95

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994)

Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.

Nature 372: 425-32.