

FIG. 4. APE is a PKB-specific binding protein and has a domain responsible for the association. *A*, PKB α structural domains and pEG202-PKB α fusion proteins. *B*, *in vivo* interaction of APE and PKB α structural domain. Interactions of APE-200 amino acids with PKB α , the PH domain, kinase domain, kinase domain with the hydrophobic domain, and the hydrophobic domain of PKB α are indicated as arbitrary units. *C*, *in vivo* interactions of PKB α and APE fragments. pEG202-PKB α was expressed in EGY48 with the indicated portion of the C-terminal of APE. β -Galactosidase activity is indicated as arbitrary units. *D*, *in vivo* interactions of APE and AGC kinases. pEG202-PKB α was expressed in EGY48 with PKB α , PKB β , SGK1, SGK2, PKC β , or PKC ϵ . These *in vivo* interactions were measured by β -galactosidase activity. *E*, physical association of APE and PKB *in vitro*. Extracts from *E. coli* BL21 cells expressing PKB α or APE with a pET system were used to test for APE or PKB α binding to the following bead matrices: GST beads coupled to either bacterially expressed GST or GST-PKB (amino acids 418–480) or GST-APE (amino acids 1646–1845). Extract bead complexes were washed three times to remove weakly bound protein prior to eluting off specifically bound proteins. The pulled down APE (FLAG-tagged) and PKB α (Myc-tagged) were resolved on an SDS-polyacrylamide gel and detected by α -FLAG or α -Myc antibody.

epitopes of these antibodies (Fig. 1*B*), identified three bands of 220, 213, and 203 kDa in mouse tissues, whereas the control antibody against GST did not recognize any of these bands (Fig. 2*B*). The largest band of 220 kDa was observed in the lungs,

testis, and fat. The 213-kDa band was detected in the brain, testis, heart, and fat. Finally, the smallest (203-kDa) band was detected in the lungs and spleen. These results were similarly obtained by immunoblotting of either immunoprecipitates of

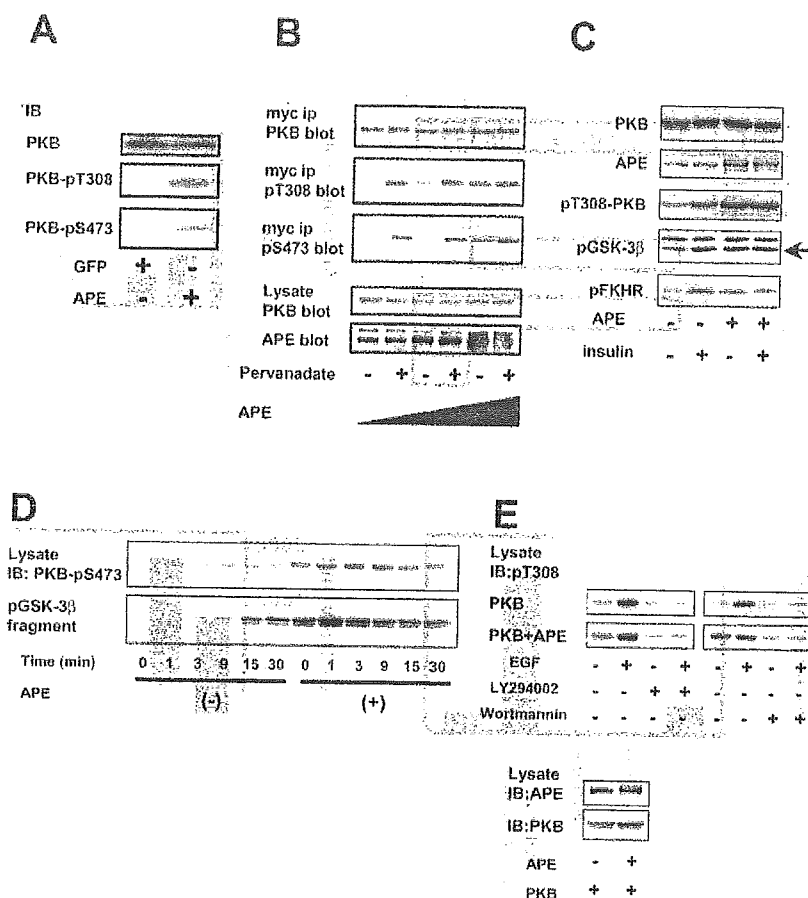


Fig. 5. APE enhances basal PKB activity without growth factor stimulation. *A*, basal phosphorylation of native PKB was enhanced by APE. COS-7 cells were transfected with GFP or APE and then serum-starved for 12 h. Basal phosphorylations of Thr³⁰⁸ and Ser⁴⁷³ were detected by specific antibodies. *IB*, immunoblot. *B*, APE enhances basal PKB phosphorylation without pervanadate stimulation. COS-7 cells were co-transfected with Myc-PKB α and with increasing amounts of APE. Cells were next serum-starved for 12 h and then stimulated with vehicle or 100 μ M pervanadate for 15 min at 37 $^{\circ}$ C. Cell lysates were next immunoprecipitated with Myc antibody, and the phosphorylation states of Thr³⁰⁸ and Ser⁴⁷³ were determined by specific antibodies. *C*, APE enhances downstream PKB α without insulin stimulation. HepG2 cells were transfected with Myc-PKB α and with or without APE, as indicated in *C*. Cells were serum-starved for 12 h and then stimulated with 10^{-7} M insulin for 15 min. Phosphorylations of Ser⁹ of GSK-3 β and Ser²⁹⁶ of FKHR were detected by specific antibodies. *D*, APE enhanced PKB kinase activity without pervanadate stimulation. Myc-PKB α was transfected into COS-7 cells in the presence or absence of APE, as indicated. Cells were serum-starved and then stimulated with vehicle control or 100 μ M pervanadate for the indicated times. Myc-PKB was immunoprecipitated, and phosphorylation of Ser⁴⁷³ of PKB was detected by a specific antibody. An *in vitro* kinase assay was performed using a GSK-3 β phospho-Ser⁹ antibody as the substrate for PKB kinase, and kinase activity was determined using the GSK-3 β phospho-Ser⁹ antibody. *E*, APE-induced basal phosphorylation of PKB α was inhibited by LY294002 and wortmannin. COS-7 cells were transfected with Myc-PKB α , with or without APE. Cells were serum-starved for 12 h and then stimulated with 50 μ M epidermal growth factor for 15 min. The cells were incubated with 10 μ M LY294002 or 1 μ M wortmannin for 1 h prior to epidermal growth factor stimulation.

tissue lysates (Fig. 2*B*, upper panel) or nonimmunoprecipitated lysate (Fig. 2*B*, lower panel). These results suggest the existence of alternatively spliced protein products from the APE gene because a search of human expressed sequence tag databases indicated the existence of alternatively spliced forms of APE (data not shown).

In Vivo Association of PKB and APE—Next, to demonstrate *in vivo* association between APE and PKB, full-length APE and c-Myc-tagged PKB α were overexpressed in COS-7 cells. As shown in the upper panel of Fig. 3*A*, APE was detected in the immunoprecipitate by the anti-Myc antibody (Fig. 3*A*, upper panel). Similarly, PKB was detected in the anti-APE immunoprecipitate (Fig. 3*A*, lower panel). This interaction between APE and PKB was demonstrated when both were overexpressed in Sf-9 insect cells or HepG2 cells (data not shown).

We also demonstrated an endogenous interaction between PKB and APE by coimmunoprecipitation of the endogenous proteins using specific antibodies in HeLa cells, and mouse testis. As shown in Fig. 3*B*, APE was coimmunoprecipitated by anti-PKB antibody in HeLa cells. PKB was also coimmunoprecipitated by anti-APE-C antibody as shown in the lower panel.

The PKB and APE interaction was reconfirmed by the same procedure using mouse testis homogenates (Fig. 3*C*), indicating that the PKB-APE interaction occurs under physiological conditions.

APE Binds to Nonphosphorylated PKB More Efficiently than Phosphorylated PKB—The effect of PKB phosphorylation on the interaction between APE and PKB was assessed by measuring the amount of APE co-immunoprecipitated with PKB in the presence and absence of insulin stimulation (Fig. 3*D*). Insulin stimulation induced the phosphorylation of PKB on Thr³⁰⁸ and Ser⁴⁷³. The amount of APE co-immunoprecipitated with PKB was revealed to be significantly lower in the insulin-stimulated condition, compared with the unstimulated condition (Fig. 3*D*, bottom panel). This result suggests that APE has a higher affinity for nonphosphorylated than for phosphorylated PKB.

APE Binds to the C-terminal Portion of PKB but Not to Other AGC Kinases—To determine the region of PKB responsible for binding with APE, we generated four deletion mutants consist-

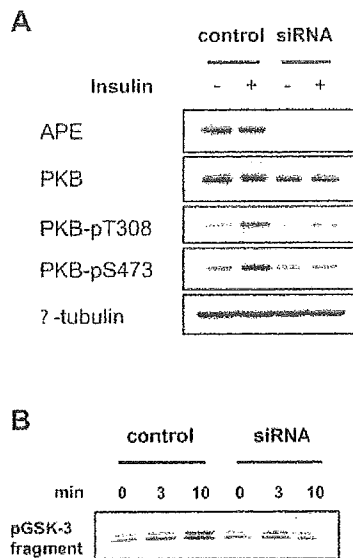


FIG. 6. APE siRNA reduced insulin-stimulated endogenous PKB phosphorylation and kinase activity in HepG2 cells. HepG2 cells were transfected with adenovirus expressing negative control siRNA or APE siRNA for 60 h, starved for 12 h, and treated with 100 nM insulin for 15 min. *A*, endogenous PKB were immunoprecipitated with α -PKB monoclonal antibody, and PKB phosphorylation was analyzed by Western blotting using phosphospecific antibodies of Thr³⁰⁸ or Ser⁴⁷³. PKB and APE expression levels were analyzed using cell extracts. *B*, endogenous PKB immunoprecipitated by α -PKB monoclonal antibody from control or APE-depleted HepG2 cells was also used for an *in vitro* kinase assay.

ing of a PH domain, kinase domain, kinase and hydrophobic domain, or the hydrophobic domain in the carboxyl terminus of PKB (16) (Fig. 4A). These mutants were subjected to baits in a yeast two hybrid screening with APE. It was revealed that the kinase domain with the hydrophobic motif or the hydrophobic motif alone binds with APE, whereas neither PH nor the kinase domain can bind with APE (Fig. 4B).

Subsequently, several deletion mutants of APE were produced to determine the portion responsible for the association with PKB. The C-terminal portion was shown to consist of 200 amino acids of APE, sufficient for the association with PKB. Since the deletion mutant amino acids 101–200 or 1–150 retain the ability to bind PKB, it is likely that the minimal portion necessary for the association with PKB is located within amino acid sequence 101–150 (Fig. 4C).

PKB belongs to a family of protein kinases, originally including protein kinase A, cGMP-dependent protein kinase and protein kinase C, termed the AGC family. Proteins in this family contain regions of high homology in their kinase domains (1). Since AGC kinases contain regions of high homology with the hydrophobic motif in PKB, we further examined whether APE interacted with AGC kinases other than PKB, using a yeast two-hybrid system. SGK1, SGK2, PKC β 2, PKC ϵ , and PKB β /Akt2 have a kinase domain and a hydrophobic motif highly homologous to those of PKB α . As a result, PKB β and PKB α bind efficiently to APE in yeast (Fig. 4D). Conversely, very little interaction with APE was observed for SGK1, SGK2, PKC β 2, or PKC ϵ . These results indicate that APE is not a common AGC kinase-binding protein but, rather, a PKB-specific binding protein.

In Vitro Association between Amino Acids 418–480 of PKB and Amino Acids 1646–1845 of APE—To examine whether the association of APE and PKB occurs *in vitro*, amino acids 418–480 of PKB and 1646–1845 of APE were expressed using *E. coli* and then purified. As shown in the left panel of Fig. 4E, GST-amino acids 418–480 of mouse PKB α fusion protein bound to

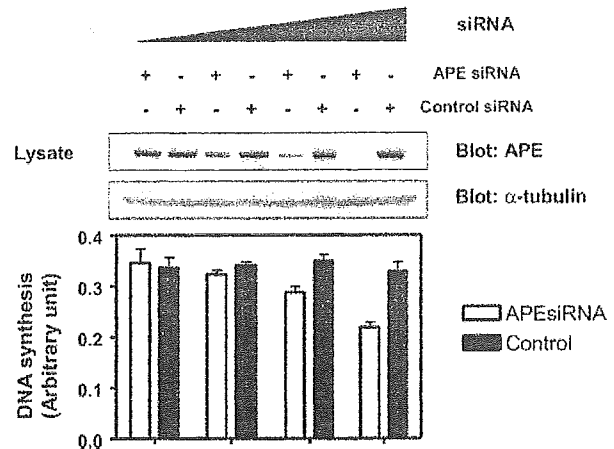


FIG. 7. Phosphorylation of PKB and DNA synthesis were reduced by knockdown of APE. HepG2 cells were transfected with adenovirus expressing negative control siRNA or APE siRNA. DNA synthesis in cells cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 0.2% bovine serum albumin was measured by BrdUrd incorporation.

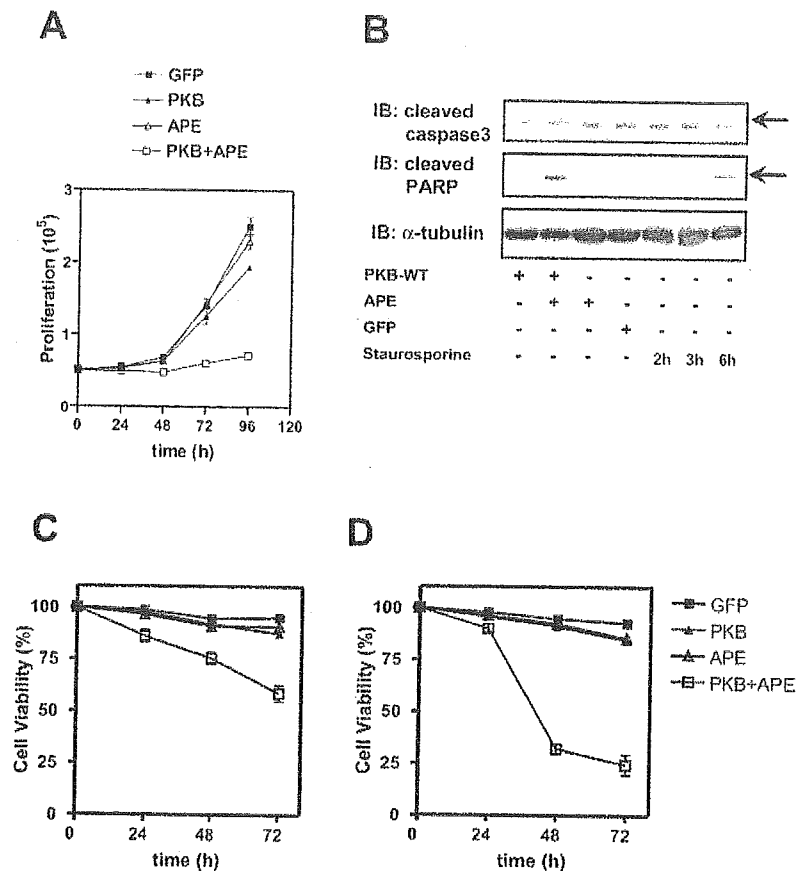
His-tagged amino acids 1646–1845 of mouse APE protein, whereas GST alone did not. Similarly, GST-amino acids 1646–1845 of mouse APE fusion protein, but not GST alone, bound to His-tagged amino acids 418–480 of mouse PKB α (Fig. 4E, right panel). These results indicate that the interaction between APE and PKB is direct.

APE Markedly Enhances Basal Phosphorylation of PKB—PKB α is activated via phosphorylation of Thr³⁰⁸ in the activation loop of the kinase domain and of Ser⁴⁷³ in the hydrophobic motif of the carboxyl terminus (17–21). To test the effect of APE binding on phosphorylation of PKB, basal phosphorylation of endogenous PKB α in COS-7 cells transfected with GFP adenovirus or APE adenovirus was analyzed. As shown in Fig. 5A, there was no significant phosphorylation on Thr³⁰⁸ or Ser⁴⁷³ of PKB α after 12-h serum starvation (left lane of Fig. 5A), but Thr³⁰⁸ and Ser⁴⁷³ of endogenous PKB were apparently phosphorylated in cells overexpressing APE. A similar result was obtained for HepG2 cells (data not shown).

Pretreatment with pervanadate increased PKB phosphorylation, time-dependently, as reported previously (11). To explore the effect of APE on enhanced PKB α phosphorylation, we treated COS-7 cells with adenoviruses expressing PKB α and various amounts of APE. APE overexpression increased PKB phosphorylation, in a titer-dependent manner, and the maximal phosphorylation of PKB obtained by APE overexpression was comparable with that achieved by long term pervanadate stimulation (Fig. 5B). These results suggest that APE overexpression can induce essentially maximal phosphorylation of PKB on Thr³⁰⁸ and Ser⁴⁷³, which indicates that APE is an enhancer of PKB *in vivo*.

Phosphorylation of PKB by APE Induces the Phosphorylation of GSK-3 α/β and FKHR—PKB reportedly phosphorylates several downstream molecules such as GSK-3 α/β and FKHR (17, 22). As a positive control, we confirmed that insulin stimulation induced PKB phosphorylation as well as downstream phosphorylation of Ser²⁵⁶ of FKHR and Ser⁹ of GSK-3 β in HepG2 cells. Then we examined whether PKB phosphorylated by the overexpressed APE can induce the phosphorylations of GSK-3 β and FKHR without growth factor stimulation. As shown in the right two lanes of Fig. 5C, overexpressed APE markedly enhanced phosphorylation of Ser²⁵⁶ of FKHR and Ser⁹ of GSK-3 β , to degrees similar to those seen with insulin stimulation.

FIG. 8. Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis by APE. *A*, overexpressions of PKB and APE inhibited cell growth. COS-7 cells were transfected with adenoviruses encoding GFP, PKB α , APE, or PKB α with APE. At the indicated time after transfection, MTT assays were performed to measure cell growth. *B*, PKB and APE induce caspase-3 and PARP cleavage. COS-7 cells were either uninfected or infected with adenoviruses encoding GFP, PKB α , APE, or PKB α plus APE, for 36 h. The uninfected cells were treated with 500 ng/ml staurosporine for the indicated time prior to harvest. Cells were lysed and separated by SDS-PAGE and Western blotted (*IB*) with the indicated antibodies, shown on the *left*. *C* and *D*, overexpression of PKB and APE reduced cell viability. COS-7 cells (*C*) and HepG2 cells (*D*) were transfected with adenovirus encoding GFP, PKB α , APE, and PKB α with APE. Cell viability was measured by trypan blue dye exclusion assay.



In Vitro Kinase Activity of PKB Enhanced by APE—To test the influence of APE binding on PKB kinase activity, we assayed kinase activity in immune complexes from transfected COS-7 cells treated with pervanadate. Pervanadate-stimulated PKB activity was time-dependently increased when COS-7 cells were transfected with PKB alone, and kinase activity paralleled the phosphorylations of Thr³⁰⁸ and Ser⁴⁷³. APE enhanced the basal phosphorylations of Thr³⁰⁸ and Ser⁴⁷³, and *in vitro* kinase activity was also maximally enhanced and paralleled these phosphorylations. These results indicate that APE induces maximal basal phosphorylation of PKB, thereby maximally enhancing its kinase activity (Fig. 5D).

PI 3-Kinase Activity Is Needed for APE-induced PKB Phosphorylation—To examine whether the APE-induced increase in PKB phosphorylation is mediated only by PI 3-kinase, we examined the effects of the PI 3-kinase specific inhibitors LY294002 and wortmannin on APE-induced PKB phosphorylation. As shown in Fig. 5E, both epidermal growth factor-induced and APE-induced phosphorylation of PKB were completely inhibited by LY294002 and wortmannin treatments. These results indicate PI 3-kinase activity to be essential for APE-induced phosphorylation of PKB.

APE siRNA Inhibits Insulin-stimulated PKB Phosphorylation and Activation—To verify the role of endogenous APE in PKB phosphorylation, HepG2 cells were transfected with the negative control or small interfering RNA (siRNA) mediated by the adenoviral expression system. Suppression of endogenous APE by APE siRNA overexpression markedly reduced the APE protein level (Fig. 6A, upper panel). Under these conditions, endogenous PKB phosphorylation of both Thr³⁰⁸ and Ser⁴⁷³ in response to insulin was apparently reduced (Fig. 6A, third and fourth panels). Consistent with the PKB phosphorylation results, insulin-induced PKB kinase activity measured by *in vivo*

kinase assay was also reduced in APE-deficient cells (Fig. 6B).

Knockdown of APE Reduces DNA Synthesis—To explore the effect of APE depletion on proliferation, DNA synthesis in HepG2 cells were measured by BrdUrd incorporation. It was shown that suppressed expression of endogenous APE by siRNA led to decreased DNA synthesis in an APE siRNA titer-dependent manner (Fig. 7).

Cell Death Induced by Overexpression of Both APE and PKB—Recent investigations have shown that overexpression of constitutively activated PKB mutants in many cell types promotes cellular proliferation and inhibits apoptosis (23–25). On the contrary, several lines of evidence indicate that down-regulation of PI 3-kinase/PKB is required to execute the mitotic program efficiently (26). To explore the effect of prolonged PKB activation induced by APE, we next analyzed the effect of APE on cellular proliferation using COS-7 cells (Fig. 8A). The expression of GFP protein by adenovirus had no effect on COS-7 proliferation. COS-7 cells expressing PKB α proliferated slightly more slowly than the control GFP-expressing cells. However, COS-7 cells expressing both PKB α and APE showed essentially no proliferation. Trypan blue exclusion was employed to assay cell viability in COS-7 cells and HepG2 cells overexpressing PKB and APE. COS-7 cells expressing both PKB α and APE showed reduced viability (*i.e.* these cells ultimately died) (Fig. 8C). Virtually the same observations were made in HepG2 cells (Fig. 8D).

Induction of Apoptosis by Overexpression of Both APE and PKB—To elucidate whether apoptosis is involved in the molecular mechanism of APE-induced inhibition of cellular proliferation and cell death, we analyzed the cleavage of caspase-3 and PARP (Fig. 8B). Caspase-3 and PARP are key mediators of apoptosis, and cleavage of these enzymes to their active form correlates with the onset of apoptosis (27, 28). When COS-7

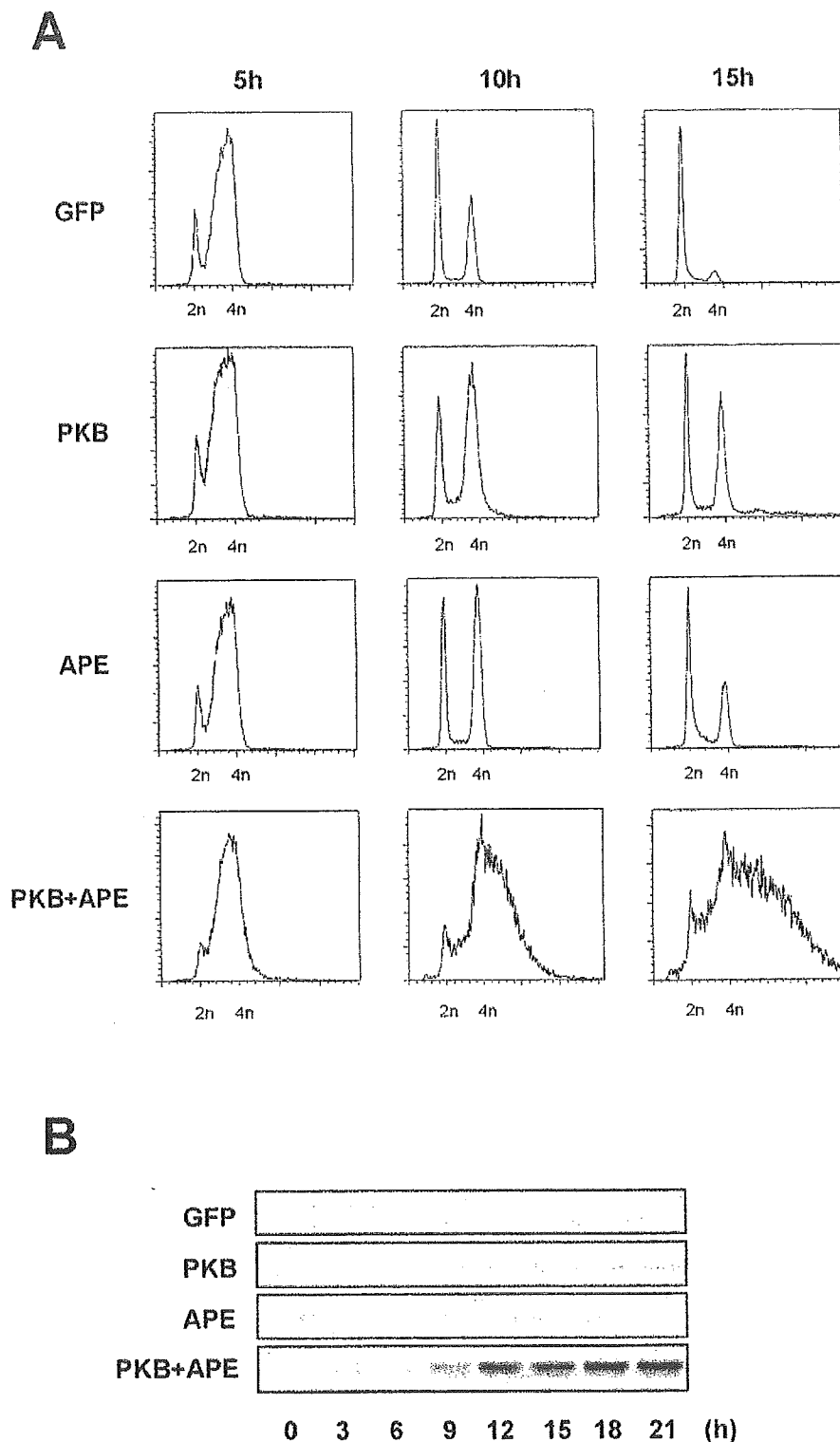


FIG. 9. Overexpressions of PKB α and APE result in cells with greater than 4n DNA content. *A*, APE and PKB, alone or in combination, were expressed with an adenovirus expression system, 18 h prior to thymidine release. Cells were collected at the indicated time points after thymidine release. As a control, cells expressing GFP were used. The DNA content was analyzed by fluorescence-activated cell sorting analysis. 2n (diploid) and 4n (tetraploid) represent the cells containing 2n and 4n DNA content, respectively. *B*, APE plus PKB α induces phosphorylation of Thr⁶⁸ of Chk2. HeLa cells arrested in G₂/S by a double-thymidine method were released into a synchronous cell cycle and sampled every 3 h. Phosphorylation of Chk2 was determined by immunoblotting with a specific antibody for phospho-Thr⁶⁸ of Chk2.

cells were treated with 1 μ M staurosporine, cleaved caspase-3 and cleaved PARP were detectable after 3–6 h, in a time-dependent manner. In COS-7 cells expressing GFP, PKB α , or

APE, using an adenovirus expression system, no cleavage of caspase-3 or PARP was detectable. However, in cells expressing both PKB α and APE, cleaved caspase-3 and PARP were

detected. These findings indicate that apoptosis is not induced by PKB alone but rather by the interaction between PKB and APE accompanying prolonged activation of PKB α .

Effect of APE-PKB Interaction on the Cell Cycle—To study the effect of the APE-PKB interaction on cell cycle progression, cell cycle profiles were analyzed using flow cytometry (Fig. 9A). Overexpression of PKB or APE alone did not promote rereplication. However, co-expression of PKB and APE generated cells that had DNA contents greater than normal G₂/M cells from 5 to 15 h after thymidine release, indicating that PKB and APE interact to induce DNA rereplication without mitosis.

APE-PKB Interaction Induces Chk2 Phosphorylation—Rereplication reportedly leads to DNA damage, and Vaziri *et al.* (29) demonstrated Chk2 phosphorylation in mammalian cells in which rereplication had been induced by overexpression of the replication license factors CDT1 and CDC6. The amount of Chk2 protein was not altered by PKB α or APE expression (data not shown). However, in HeLa cells overexpressing both PKB α and APE, Chk2 was apparently phosphorylated starting 6 h after thymidine block release, and peak phosphorylation was observed 12–21 h thereafter (Fig. 9B). In contrast, overexpression of neither PKB α nor APE induced apparent Chk2 phosphorylation.

DISCUSSION

In this study, we identified a novel PKB-binding protein using a yeast two-hybrid screening system and named it APE. The APE protein was detectable in many tissues including the brain, spleen, lung, fat, and heart, although APE mRNA was most abundant in the testis. In addition, from the immunoblotting results obtained using antibodies against different portions of APE, the presence of alternatively spliced protein products is likely.

The *in vivo* interaction of APE with PKB was clearly demonstrated by the overexpression of both proteins as well as by coimmunoprecipitation of the endogenous proteins. *In vitro* association was also demonstrated using bacterially expressed recombinant proteins. Notably, APE did not interact with any of the other AGC kinases tested in this study such as SGK1/2, PKC β 2, and PKC ϵ , which have regions highly homologous to the hydrophobic motif of PKB. Thus, it is reasonable to consider APE a PKB-specific binding protein.

Subsequently, by overexpressing APE, we demonstrated that this protein markedly enhances the phosphorylation and kinase activity of PKB, whereas reducing endogenous APE expression using siRNA suppressed both. In addition, although APE binds to both phosphorylated and nonphosphorylated PKB, it seems that more PKB binds to APE when PKB is nonphosphorylated. Taking into consideration that APE-induced phosphorylation of PKB did not occur in cells treated with wortmannin or LY294002, APE itself is not a kinase and it is likely that APE enhances or prolongs the PI 3-kinase-dependent phosphorylation of PKB. In other words, we speculate that APE functions as a scaffold protein and facilitates Thr³⁰⁸ and Ser⁴⁷³ phosphorylation of PKB by PDK1/2. Alternatively, the APE-PKB complex may inhibit access of serine/threonine phosphatases such as protein phosphatase 2A.

Recent evidence indicates that PI 3-kinase and PKB play important roles in regulating cell proliferation. In this study, it was demonstrated that suppression of APE by siRNA reduced DNA synthesis, with decreased phosphorylation and kinase activity of PKB. This result agrees with those of previous reports showing the important role of PKB in proliferation. Thus, when the level of PKB expression is limited, APE apparently enhances proliferation in cooperation with PKB.

On the other hand, interestingly, we demonstrated overexpressions of both APE and PKB to induce DNA rereplication rather than normal DNA synthesis, thereby proving that these

overexpressions together increase the cellular DNA content more than 4n in the S phase within 10 h after initiation of the S phase. Similar rereplication was reported with overexpression of the DNA replication factors Cdt1 and Cdc6 in either yeast or mammalian cells (29). In such cell systems, rereplication induced DNA damage, and the checkpoint pathway including Chk2 was activated. Chk2 activation is involved in the p53-dependent apoptotic response observed with DNA damage (30). In good agreement with these previous reports, we observed Chk2 phosphorylation and subsequent apoptosis in PKB and APE-expressing cells, after DNA rereplication. Thus, although the overexpression of both APE and PKB observed in this study may not be physiological, it is likely that the prolonged PKB phosphorylation induced by the association with APE does not lead to normal cell proliferation but rather to rereplication and the ensuing apoptosis. In other words, in the cells with high PKB expression, increased APE expression could lead to apoptosis after DNA rereplication.

Although we cannot explain how PKB and APE induce rereplication in human cells, we observed APE-induced PKB phosphorylation to be markedly enhanced not only in the cytoplasm but also the nucleus (data not shown). Thus, we speculate that overexpressed PKB and APE might phosphorylate some unidentified proteins in the nucleus such that normal replication licensing is blunted. However, this phenomenon was observed only with the overexpression system, and further study is needed to clarify whether this phenomenon is physiological.

In summary, we identified a novel PKB-binding protein, which enhances the phosphorylation of PKB and termed it APE. APE plays a role in regulating the phosphorylation state of PKB and the resultant DNA synthesis. In addition, DNA rereplication and the resultant apoptosis might be a novel mechanism that is induced by the enhanced interaction between APE and PKB, the physiological significance of which merits further investigation.

Acknowledgments—We thank K. Shibata and M. Hirano-Koyanagi for helpful discussions and technical assistance; T. Sugano, T. Kobayashi, M. Mimura, Y. Ito, and other laboratory members for technical assistance and K. Honjo for secretarial assistance.

REFERENCES

1. Lawlor, M. A., and Alessi, D. R. (2001) *J. Cell Sci.* **114**, 2903–2910
2. Datta, S. R., Brunet, A., and Greenberg, M. E. (1999) *Genes Dev.* **13**, 2905–2927
3. Walker, K. S., Deak, M., Paterson, A., Hudson, K., Cohen, P., and Alessi, D. R. (1998) *Biochem. J.* **331**, 299–308
4. Alessi, D. R., Caudwell, F. B., Andjelkovic, M., Hemmings, B. A., and Cohen, P. (1996) *FEBS Lett.* **399**, 333–338
5. Zhou, B. P., Liao, Y., Xia, W., Zou, Y., Spohn, B., and Hung, M. C. (2001) *Nat. Cell Biol.* **3**, 973–982
6. Zhou, B. P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M. H., and Hung, M. C. (2001) *Nat. Cell Biol.* **3**, 245–252
7. Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., and Guan, K. L. (2002) *Nat. Cell Biol.* **4**, 648–657
8. Potter, C. J., Pedraza, L. G., and Xu, T. (2002) *Nat. Cell Biol.* **4**, 658–665
9. Pekarsky, Y., Koval, A., Hallas, C., Bichi, R., Tresi, M., Malstrom, S., Russo, G., Tschlis, P., and Croce, C. M. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 3028–3033
10. Basso, A. D., Solit, D. B., Chiosis, G., Giri, B., Tschlis, P., and Rosen, N. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 39858–39866
11. Maira, S. M., Galetic, I., Brazil, D. P., Koeh, S., Ingley, E., Thelen, M., and Hemmings, B. A. (2001) *Science* **294**, 374–380
12. Du, K., Herzog, S., Kulkarni, R. N., and Montminy, M. (2003) *Science* **300**, 1574–1577
13. Iymedjian, P. B. (2004) *Biochem. J.* **386**, 113–118
14. Yamada, T., Katagiri, H., Asano, T., Inukai, K., Tsuru, M., Kodama, T., Kikuchi, M., and Oka, Y. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 5339–5345
15. Kamikubo, Y., Takaori-Kondo, A., Uchiyama, T., and Hori, T. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 17609–17614
16. Downward, J. (1998) *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 262–267
17. Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovic, M., and Hemmings, B. A. (1995) *Nature* **378**, 785–789
18. Andjelkovic, M., Alessi, D. R., Meier, R., Fernandez, A., Lamb, N. J., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Lucoq, J. M., and Hemmings, B. A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 31515–31524
19. Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., and Hemmings, B. A. (1996) *EMBO J.* **15**, 6541–6551

20. Stokoe, D., Stephens, L. R., Copeland, T., Gaffney, P. R., Reese, C. B., Painter, G. F., Holmes, A. B., McCormick, F., and Hawkins, P. T. (1997) *Science* **277**, 567-570
21. Stephens, L., Anderson, K., Stokoe, D., Erdjument-Bromage, H., Painter, G. F., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B., McCormick, F., Tempst, P., Coadwell, J., and Hawkins, P. T. (1998) *Science* **279**, 710-714
22. Nakae, J., Park, E. C., and Accili, D. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 15982-15985
23. Klippel, A., Escobedo, M. A., Wachowicz, M. S., Apell, G., Brown, T. W., Giedlin, M. A., Kavanaugh, W. M., and Williams, L. T. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 5699-5711
24. Kops, G. J., Medema, R. H., Glassford, J., Essers, M. A., Dijkers, P. F., Coffey, P. J., Lam, E. W., and Burgering, B. M. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2025-2036
25. Dudek, H., Datta, S. R., Franke, T. F., Birnbaum, M. J., Yao, R., Cooper, G. M., Segal, R. A., Kaplan, D. R., and Greenberg, M. E. (1997) *Science* **275**, 661-665
26. Alvarez, B., Martinez, A. C., Burgering, B. M., and Carver, A. C. (2001) *Nature* **413**, 744-747
27. Oliver, F. J., de la Rubia, G., Rolli, V., Ruiz-Ruiz, M. C., de Murcia, G., and Murcia, J. M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 33533-33539
28. Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., Lazebnik, Y. A., Munday, N. A., Raju, S. M., Smulson, M. E., Yamin, T. T., Yu, V. L., and Miller, D. K. (1995) *Nature* **376**, 37-43
29. Vaziri, C., Saxena, S., Jeon, Y., Lee, C., Murata, K., Machida, Y., Wagle, N., Hwang, D. S., and Dutta, A. (2003) *Mol. Cell* **11**, 997-1008
30. Jack, M. T., Woo, R. A., Hirao, A., Cheung, A., Mak, T. W., and Lee, P. W. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 9825-9829

特集 メタボリックシンドローム研究の最前線：肥満・糖尿病の予防と治療を目指して

序：肥満研究から明らかとなりつつある 個体としてのエネルギー恒常性維持機構

Obesity Research 15: Revealing the Mechanisms Underlying Systemic Energy Homeostasis

片桐秀樹

Hideki Katagiri

社会的な問題となっている肥満に基づくメタボリックシンドロームの急増もあって、エネルギー代謝の研究は急速に発展している。アディポサイトカインや神経系を介したシグナルが中枢神経を始めとする様々な臓器・組織に情報を伝えていることが明らかとなってきた。これらの成果は、病態の解明のみならず、個体としてエネルギー代謝の恒常性を維持する機構の解明につながる点から、生物学的にも非常に意義深いものである。

key words

肥満、メタボリックシンドローム、アディポサイトカイン、エネルギー代謝、視床下部、臓器・組織間クロストーク

1 片桐秀樹 東北大学大学院医学系研究科附属創生応用医学研究センター 再生治療開発分野 E-mail: katagiri@mail.tains.tohoku.ac.jp
1987年東京大学医学部医学科卒業、1989年東京大学第三内科入局。2001年東北大学病院糖尿病代謝科助手、2003年より現所属、教授。東北大学病院糖尿病代謝科兼務。2004年より東北大学21世紀COEプロジェクト(GRESCENDO)サプリーダー、2005年より東北大学先進医学研究機構(TUBERO)兼務。研究テーマはエネルギー恒常性維持機構、糖尿病に対する治療開発、遺伝子治療、再生医療。

はじめに

欧米先進各国では、脂肪分摂取の増大などによる摂取カロリー過剰と運動不足などによる消費カロリーの低下から、エネルギー蓄積過剰の状態、つまり肥満とそれに基づくメタボリックシンドローム患者の増加が深刻な社会問題となっており¹⁾、日本もその例外ではない。これらを基盤として発症する動脈硬化症は、日本でも悪性新生物と並んで主要な死因であり、医療福祉の点からも、医療経済の点からも、国民の関心事・重要課題となっていることは言うまでもない。

これを踏まえて、最近、エネルギー代謝の恒常性維持機構についての研究は、飛躍的な進歩を遂げている。特に、この分野は、本特集にご執筆いただいた先生方を始めとして、世界のトップランナーとして活躍されている日本人の研究者が多い分野である。これらの研究の成果は、単に、病気や医療に関することにとどまらず、以下に記すように、生物学的にもたいへん意義深いものであると思われる。

I. アディポサイトカイン

まず特筆すべきは、レプチンの発見などに代表される脂肪細胞(組織)から分泌される生理活性物質に関するものである。これらアディポサイトカインと呼ばれる分泌因子の発見により、脂肪細胞(組織)に対する我々の概念が大きく見直されるようになった²⁾。つまり、脂肪組織は、単なるエネルギーの貯蔵庫としての役割だけでなく、体内最大の

内分泌組織として、全身の代謝に関与し、またメタボリックシンドロームの病態に深く関わっていることが明らかになってきたわけである。さらに、内分泌組織としての脂肪細胞を見ると、1つの細胞が多くの内分泌物質を分泌すること、同じ白色脂肪組織でも解剖学的部位やエネルギーの蓄積状況などの環境により、その分泌プロファイルを大きく変えることなど、内分泌細胞そのものの概念にも一石を投じるような現象が次々と明らかになっている。特にレプチン³⁾は、摂食やエネルギー代謝さらには生殖能力にまで影響を及ぼす重要なアディポサイトカインであり、これらの作用の多くは、中枢神経、なかでも、視床下部に存在する受容体を介するものと考えられている。つまり、脳は、脂肪組織から液性因子によるシグナルを受けて、末梢からの代謝情報を得ているという機構が想定される。さらに、アディポネクチンは、抗糖尿病作用・抗動脈硬化作用・抗炎症作用を持つ主要なアディポサイトカインである。そこで、本特集では、脂肪組織の部位別特徴を千葉大学齋藤先生に、アディポネクチンの役割を大阪大学下村先生に、またその受容体シグナルについて東京大学門脇先生にご執筆いただいた。

II. 中枢神経の役割

2つ目としてこの分野の重要な研究ポイントは、脳における摂食調節とエネルギー消費調節機構であると考えられる。脳は、視床下部を中心とした部位から、エネルギー摂取や消費に関する様々なシグナルを発している。その1つが、前述のレプチン受容体シグナルである。脂肪組織からエネ

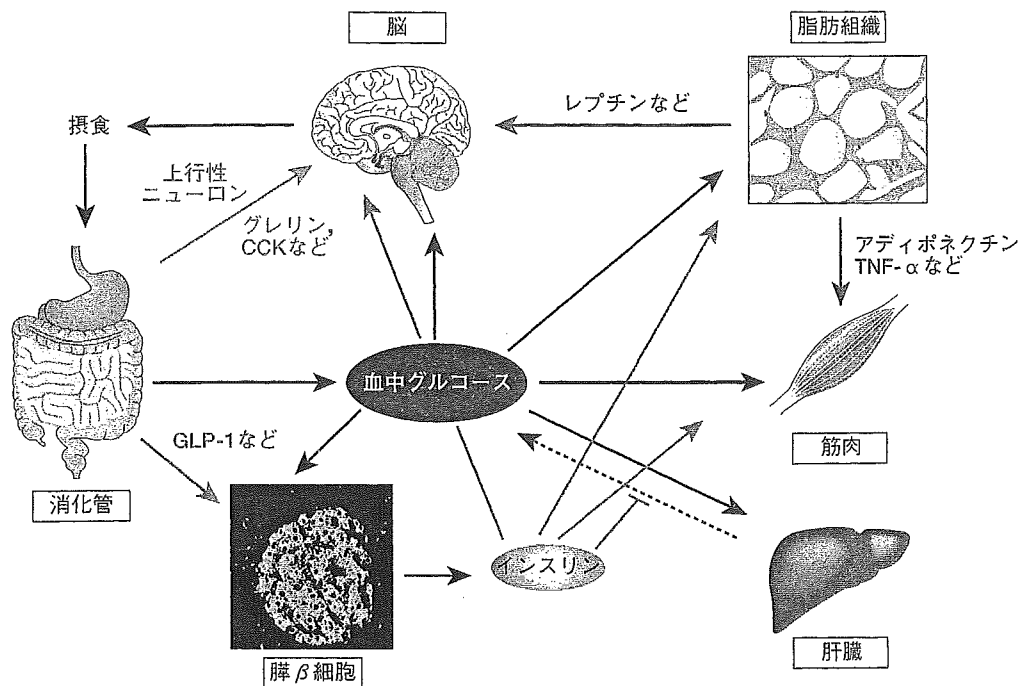


図1. 全身における糖代謝の調節

ギー貯蔵が十分であるというシグナル（レプチンの分泌増加）を受け、視床下部では、摂食の抑制と交感神経活性化につながるアウトプットが発せられる。これは、体重を一定の範囲に保つ重要なフィードバック機構であるものと考えられるが、肥満患者の多くでは、血中レプチンが高値であるにもかかわらず、このフィードバックのかけがえが悪いことが知られている。これはレプチン抵抗性と呼ばれ、インスリン抵抗性と並んで、肥満に基づく様々な病態の基盤をなしているものと考えられる。さらに、中枢神経は、消化管からの神経ペプチドによるシグナルを始めとして、神経系を介しても様々な情報を末梢組織から得て、統括的な代謝状況の調節を行っていると考えられる。中枢での代謝調節機構が乱れることが、肥満・糖尿病の病態に大きく関与していると考えられており⁴⁾、このことは、“肥満は脳の病気”と言われるゆえんである。そこで、本特集では、主に神経系を介した摂食調節機構について宮崎大学の中里先生に、また、レプチン作用の分子機構（中枢・末梢双方）について、生理学研究所の箕越先生にご執筆をお願いした。

Ⅲ. 治療への応用

これらの機序を踏まえ、実際に治療法はどうであろうか？ 残念ながら、現在、一般的に使用されている薬剤は、肥

満やそれに基づくメタボリックシンドローム・糖尿病に対して、十分効果があるものとは言いがたい。つまり、エネルギー過剰によるインスリン抵抗性状態に対して、さらにエネルギーを組織に送り込むことで血糖値を下げようとするインスリンを主とした治療法では、根本的な解決は困難であり、そのため、21世紀の現代であっても、自覚症状の乏しい患者に食事療法や運動療法を強いる医療が続いている。治療法の開発には、正確な病態の理解と新たなターゲットの検討が必要であると思われる。本特集では、インスリン抵抗性の分子機序について東京大学の浅野先生に、また、脂肪組織が消失し、重度のインスリン抵抗性を来す脂肪萎縮性糖尿病に対し、レプチンを用いた実際の臨床応用について京都大学中尾先生に詳しくご説明いただいた。また、東北大学山田先生には、エネルギー消費亢進に基づく治療法開発研究について、詳述いただいている。

おわりに

このように、肥満に関する研究から、代謝の維持を保つために、全身の組織・臓器がそれぞれに情報を出し合いながら、連携しているさまがある程度明らかになってきた（図1）。しかし、各種の臓器特異的遺伝子ノックアウトマウスの結果を始めとして、今わかっている機構だけではまっ

たく説明のつかない現象が次々と報告⁵⁾されており、これらの臓器・組織間クロストークに関しては、まだまだ知られていないことが非常に多いと考えられる。このことから、代謝研究は、個体としてのエネルギー恒常性維持機構という生物の根幹に関わる問題そのものを対象としていると同時

に、研究発展が実際に急増している患者に対する福音となりうるという両面から意義深く、その発展が期待されている。本特集が、この分野の研究の理解・発展の一助となれば私とすればこのうえない幸いである。

— 文献 —

1) Flier JS : Cell (2004) 116: 337-350

2) Matsuzawa Y, et al: Ann NY Acad Sci (1999) 57: 146-154

3) Friedman JM, et al: Nature (1998) 395: 763-770

4) Schwartz MW, et al: Science (2005) 307: 375-379

5) Minokoshi Y, et al: J Biol Chem (2003) 278: 33609-33612

特集 メタボリックシンドローム研究の最前線：肥満・糖尿病の予防と治療を目指して

肥満・糖尿病治療法開発研究

New Therapeutic Targets for Type 2 Diabetes Associated with Obesity

山田哲也 石垣 泰 岡 芳知 片桐秀樹

Tetsuya Yamada, Yasushi Ishigaki, Yoshitomo Oka, Hideki Katagiri

過食・運動不足などの近年の生活習慣の変化は、人類がこれまでに経験したことの無い未曾有のエネルギー過剰状態を引き起こし、進化の過程で獲得した精巧な代謝調節のメカニズムを根幹から揺るがさんとしている。したがって、複雑に絡み合った生活習慣病の病態を解析し、その本態を明らかにすることが新たな治療法の開発に必要な不可欠である。本稿では、個体としてのエネルギー収支に着目し、その全身に及ぼす影響を治療法の観点から論じる。

key words

メタボリックシンドローム, 肥満, 糖尿病, 治療, 脱共役タンパク質 (UCP), エネルギー消費

① 山田哲也 東北大学大学院医学系研究科 分子代謝病態学分野 E-mail: yamatetsu-ky@umin.ac.jp

2002年3月山口大学大学院医学研究科修了。2002年4月より東北大学大学院医学系研究科分子代謝病態学分野研究生。研究テーマは肥満・糖尿病の病態の解明。

石垣 泰, 岡 芳知 東北大学大学院医学系研究科 分子代謝病態学分野

片桐秀樹 東北大学大学院医学系研究科附属創生応用医学研究センター 再生治療開発分野

はじめに

近年の生活習慣の変化は、肥満・インスリン抵抗性をもとにした生活習慣病(メタボリックシンドローム)患者の増加を我が国にもたらした。食生活の欧米化によるカロリー摂取増加と運動不足(車社会の発達など)によるカロリー消費の低下によって生じた余剰カロリーは、我々に肥満を引き起こした。その結果、糖尿病・高脂血症・高血圧などを有する患者の数は増加の一途をたどり、失明や腎不全といった糖尿病性合併症に加え、動脈硬化性疾患の増加にもつながっている。

脳卒中や心筋梗塞といった動脈硬化性疾患は、現在、日本人の死因の主要なものであり、さらに、血液透析などの糖尿病性合併症治療による医療経済への圧迫は、大きな社会問題となりつつある。しかし、肥満症やそれに伴う糖尿病に対する治療法としては、現在でも食事療法による摂取カロリーの適正化と運動療法によるカロリー消費の増加がその中心であり、エネルギー収支の適正化に関する限り、さして効果的な薬物療法は見当たらないのが実情である。なぜなら、インスリン治療を含め、現在の糖尿病に対する薬物治療の大部分は、血中にあふれた過剰な血糖を筋・脂肪組織や肝臓へさらに無理やり送り込むことにより血糖値を低下させることをその作用機序としており、肥満を伴う糖尿病の場合、これらの治療は、一時的に血糖値の改善を招いても、かえって肥満・インスリン抵抗性を助長することとなるため、まったく本質的な治療法とは言えないからである。

さらに、最近の研究では、これまで単なるエネルギー貯蔵細胞であると考えられていた脂肪細胞が、様々なアディポサイトカインと総称される液性因子を分泌することが明らかになった。これらのアディポサイトカインの適正な分泌は全身の代謝調節においてきわめて重要な役割を果たしており、肥満時における適正な分泌の破綻がインスリン抵抗性を惹起する要因にもなっている。上述のようなアディポサイトカインの例を代表として、インスリン抵抗性は様々な臓器が相互に影響し合って形成されることが明らかになった。この点からも、過剰な血糖を筋・脂肪組織や肝臓へさらに無理やり送り込むといった単一の作用機序に基づく薬物治療では、複雑に入り組んだ肥満(インスリン抵抗性・レプチン抵抗性など)を伴う糖尿病に対しておのずと限界がある。

現在の治療においては、食事・運動療法の徹底が必要不可欠であるが、これは食事・運動療法が単にエネルギー収支の適正化だけにとどまらず、様々な効果をもたらすことができるからであるとも言える。しかしながら、自覚症状を伴わない初期の生活習慣病患者にこれらを長期間実行させることは実際問題として非常に困難であり、このことがまた、本疾患の合併症進展を助長させている一因であると考えられる。

I. エネルギー消費亢進によるメタボリックシンドローム治療戦略

余剰カロリーとは、摂取カロリーとエネルギー消費との差である。つまり、余剰カロリーを減らす手段としては、①摂取カロリーを減らす、②エネルギー消費を亢進させる、の2

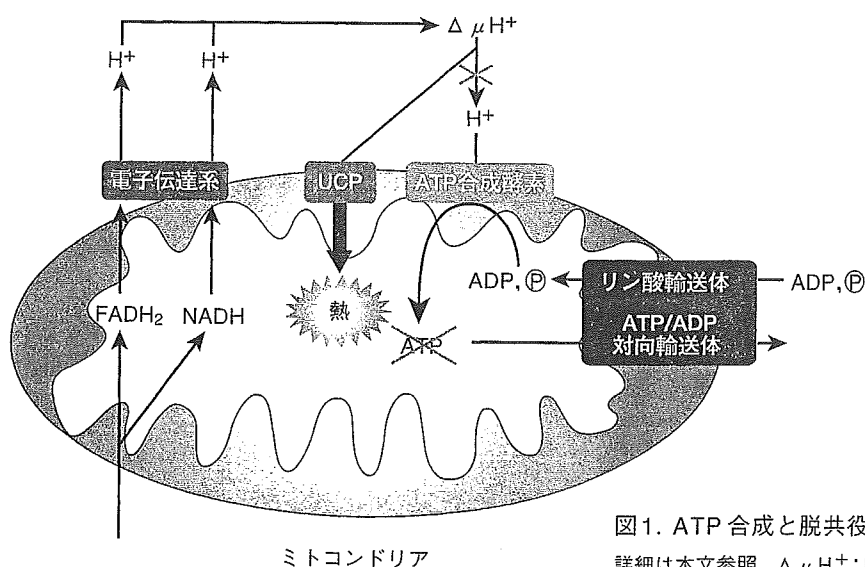


図1. ATP合成と脱共役タンパク質 (UCP)
詳細は本文参照。ΔμH⁺; H⁺ (プロトン) 密度勾配

つがある。このうち、筆者らは治療のターゲットとして②に着目した。また、これが全身の諸臓器に対してどのような遠隔効果をもたらすのか検討することにした。すなわち、エネルギー消費の亢進による細胞内エネルギー過剰蓄積の解消が、インスリン抵抗性の改善につながりメタボリックシンドロームの治療となる可能性があると考えたわけである。

II. UCP トランスジェニックマウス

これまで、トランスジェニックマウスやノックアウトマウスを用いた戦略にて、細胞内エネルギー消費の亢進や脂肪蓄積の減少を目指した様々な遺伝子改変動物が作製されている。その端的な例として脱共役タンパク質 (UCP) のトランスジェニックマウスが挙げられる。

ミトコンドリアでは、電子伝達系により、ミトコンドリア内膜を挟んで作られた電位勾配を利用し、ATP合成酵素がATPの産生を行うことが知られている。UCPは、プロトン輸送体として働き、この電位勾配を消失させることにより電子伝達系とATP合成とを脱共役し、熱としてエネルギーを放散する働きがある(図1)。この結果、基礎代謝を増やしエネルギー貯蔵を減少させる作用を有するタンパク質と考えられている。代表的なUCP1は褐色脂肪細胞に発現し、熱を産生させることで体温の維持などに関与している¹⁾。

脂肪細胞においてUCP1を発現させたトランスジェニックマウスは、遺伝的肥満モデルにおいて、体重の増加を抑制した²⁾。さらに、筋組織にUCP1を発現させたトランスジェニックマウスにおいては、高脂肪食負荷によっても肥満を生じにくく、インスリン抵抗性や糖尿病の発症を予防した³⁾。筋肉組織に特異的に発現している脱共役タンパク質であるUCP3を筋組織に過剰発現させたマウスでも同様の効果が認めら

れている⁴⁾。これらから、脱共役タンパク質の過剰発現は、エネルギー過剰状態における代謝疾患発症に予防的に働くことが示された。

III. 病態発症後のUCP1 遺伝子導入

しかし、実際に肥満糖尿病が発症した後にエネルギー代謝亢進を誘導してみないことには、この戦略が治療として有効であるかどうか、あるいはどのような作用機序をもってして全身の代謝状態を改善していくのかわからない。つまり、実際の治療に結び付けるためには、先天的遺伝子発現ではなく病態発症後の発現誘導を行う必要がある。

筆者らはアデノウイルスによる遺伝子導入を用いてインスリンシグナルの検討を進めてきた経験^{5),6)}を生かし、ウイルスベクターによる後天的遺伝子導入を試みた。高脂肪食を負荷することで肥満・糖尿病を発症させたマウスに、エネルギー代謝亢進作用あるいは脂肪酸酸化亢進作用を持つと考えられる遺伝子を各臓器に導入することで、その治療効果を判定するというコンセプトで研究を進めている。

まず、発現させる遺伝子としてUCP1を、発現させる臓器として肝臓を選んで、投与実験を行った。肝臓はインスリンの標的臓器の1つであり、糖・脂質代謝の面において、非常に重要な役割を果たしている。さらに、個体がエネルギー過剰状態になると肝臓内に脂肪が蓄積、つまり脂肪肝の状態となり、インスリン感受性の低下(インスリン抵抗性)を呈するようになる。このように、肝臓の蓄積エネルギーは、体内のエネルギーバランスを如実に反映させているものと考えられる。そこで、筆者らは肝臓におけるUCP1の異所性発現は、脂肪肝を解除し、肝臓へのエネルギー流入を促進させることで、肥満を伴う糖尿病状態に対し、全

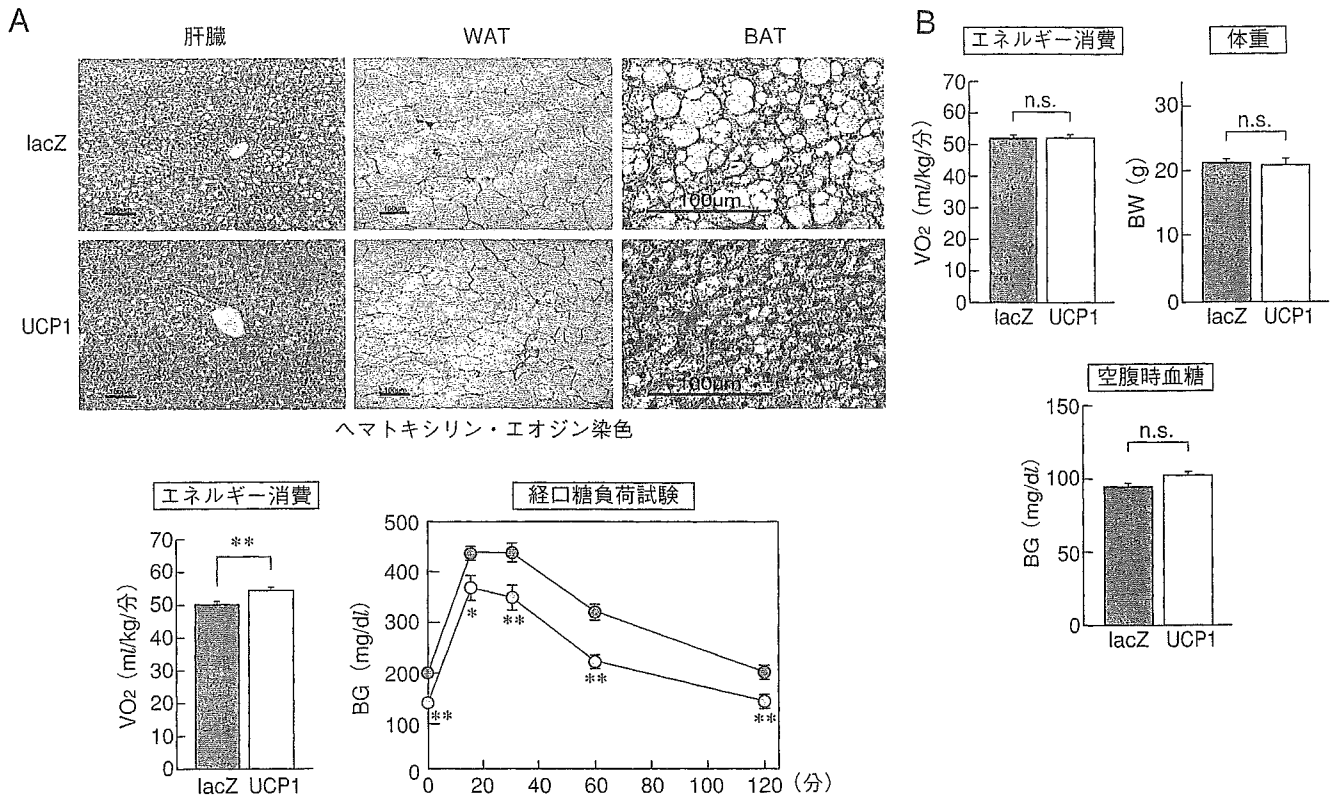


図2. 肥満糖尿病マウスの肝臓へのUCP1遺伝子導入による効果 (A), 標準餌による正常マウスの肝臓へのUCP1遺伝子導入による効果 (B)

WAT; 白色脂肪組織, BAT; 褐色脂肪組織, VO_2 ; 酸素消費量, BG; 血糖, BW; 体重.
*; $P < 0.05$, **; $P < 0.01$, n. s.; 有意差なし.

身における代謝改善につながる可能性を考えた。

UCP1の肝臓における異所性発現は、高脂肪食により肥満・糖尿病を発症させたマウスの酸素消費量の増加、すなわちエネルギー消費の亢進を引き起こした(図2A下段左)。その結果、肝臓においてAMPキナーゼが活性化し脂肪肝が改善したのみならず、興味深いことに、内臓脂肪組織の脂肪蓄積(図2A上段)の減少、骨格筋のインスリン抵抗性の改善、視床下部におけるレプチン抵抗性の改善といった多臓器における代謝改善効果もたらされた。このことは、血流などを介して臓器・組織間で代謝状態の情報をやりとりしているということを示している。これらのメカニズムにより、個体として耐糖能やインスリン感受性の改善(図2A下段右)・血中脂質の低下が認められ、メタボリックシンドロームに対する著明な治療効果を上げた。さらに、興味深いことに、標準餌により飼育している非肥満・非糖尿病マウスに対しては、肝臓へのUCP1発現によってもエネルギー代謝は亢進せず、体重や耐糖能には影響しないという結果が得られた(図2B)。その理由として、UCP1がプロトンを輸送する際、脂肪酸が必要である^{7), 8)}ことから、肝臓における異所性

UCP1のプロトン輸送活性は肝脂肪などのエネルギー代謝状況により調節される、つまり、肝臓内での異所性UCP1は、エネルギーバランスを感知し、エネルギー過剰状態のときにのみその機能を発揮することによるという機序が想定される。肝臓へのUCP1遺伝子導入では、余剰カロリーは効果的に消費されるが、必要カロリーの消費については影響を受けにくいというわけで、このことは実際の治療への応用を考えた場合、非常に好ましい結果である⁹⁾。

IV. 脂肪組織へのUCP1遺伝子導入

また、病態発症後の脂肪細胞におけるUCP1遺伝子導入においても、さらに強力な治療効果が認められている。肝臓へのUCP1遺伝子導入と同様に、高脂肪食により肥満・糖尿病を発症させたマウスの副睾丸周囲脂肪組織に、アデノウイルスベクターを用いてUCP1遺伝子導入を行った。UCP1の発現は局所的・限定的で、全身のエネルギー消費量には増加を認めない程度であったにもかかわらず、肥満・糖尿病の基本病態と考えられるインスリン抵抗性・レプチン抵抗性を改善し、糖尿病や肥満症への著明な治療効果を認めた。これ

もまた、脂肪組織と遠隔臓器・組織との情報のやりとりを示すものと考えられ、その機構が、肥満・糖尿病の新規治療の有望なターゲットとなりうる（筆者ら；投稿中）。

このように、病態発症後の後天的遺伝子導入による急性の治療効果を検討することにより、今までのトランスジェニックマウスやノックアウトマウスといった先天的遺伝子改変動物を用いた解析では解明できなかった臓器・組織間の相互作用・情報のやりとりを示唆する現象を観察することができる。さらに筆者らは、肝臓でのPPAR γ 発現による末梢脂肪組織への遠隔効果も観察しており（宇野ら；投稿中）、現在、これらの機構の解明を目指して研究を進めている。

おわりに

エネルギー蓄積過剰に基づく病態を改善させるには、エ

ネルギー摂取の抑制あるいはエネルギー消費の亢進が必要である。個体は1つ1つの臓器が独立して代謝を担っているだけでなく、これらの協調作用によって、全身のホメオスタシスが維持されている。この破綻が、肥満・インスリン抵抗性に基づく糖尿病やメタボリックシンドロームなどの代謝性疾患であると考えられる。摂食調節や臓器・組織間の情報のやりとりの機序も含め、解明すべき問題が数多く残されている。これらの分野の研究が進むことで、生体が個体としての恒常性を保つ根本的な機構の解明につながるものと考えられ、さらにこれにより画期的な治療法が開発されることを期待する。

文献

- 1) Enerback S, et al: Nature (1997) 387: 90-94
- 2) Kopecky J, et al: J Clin Invest (1995) 96: 2914-2923
- 3) Li B, et al: Nat Med (2000) 6: 1115-1120
- 4) Clapham JC, et al: Nature (2000) 406: 415-418
- 5) Katagiri H, et al: J Biol Chem (1996) 271: 16987-16990
- 6) Yamada T, et al: J Biol Chem (2001) 276: 5339-5345
- 7) Strielemann PJ, et al: J Biol Chem (1985) 260: 13402-13405
- 8) Winkler E, et al: J Biol Chem (1994) 269: 2508-2515
- 9) Ishigaki Y, et al: Diabetes (2005) 54: 322-332

● 研究成果発表 演題 1

肥満・糖尿病に対する先進的治療の開発

岡 芳知¹⁾ 石垣 泰¹⁾ 山田 哲也¹⁾ 片桐 秀樹²⁾

背景と目的

飽食の時代の過剰エネルギー摂取により急増している肥満・インスリン抵抗性にに基づく糖尿病を克服するためには、エネルギー消費亢進を目指した新たな発想の治療の開発が必要である。われわれは、肝臓・筋・脂肪組織に後天的に代謝亢進・脂肪燃焼をもたらす蛋白の遺伝子を導入し、インスリン抵抗性を解除し、肥満・糖尿病を改善するという全く新しい視点からの治療法の開発を目的として研究を行っている。

そこで今回は、肥満・糖尿病モデルマウスを用いて、肝臓へのuncoupling protein 1 (UCP1) 遺伝子導入により、肝臓での効果および他の臓器・全身に対する影響について検討した結果を述べる。

研究方法

UCPはミトコンドリアでの酸化リン酸化を脱共役させて酸化エネルギーを熱として散逸・消費させ、ATP合成を抑制する。すなわち、UCP発現により、基礎代謝量を増加させ、余剰エネルギーの蓄積を解除する効果が期待できる。現在、4種類のUCPが見出されており、なかでもUCP1は脱共役(uncoupling)が最も強く、通常、肝臓には発現がみられない。

5週齢のC57BL/6マウスを用いて、4週間の高脂肪食負荷により肥満・糖尿病を発症させた後、尾静脈からリコンビナントアデノウイルスにより肝臓にUCP1遺伝子を導入した(UCP1

群)。肝臓におけるUCP1発現をみると、UCP1遺伝子導入後1日目よりUCP1の発現がみられ、その後7~8日目まで一定レベルを保ったのち漸減、約14日間発現が持続した。遺伝子導入後、体重、血糖値、体温、食餌量を測定し、また導入後7日目に採血を行い、血中脂質値、インスリン抵抗性など全身への影響を検討した。コントロール群にはlacZ遺伝子を導入した。

結 果

UCP1群ではコントロール群に比べて体重の減少、血糖値の低下が有意にみられたが、体温は両群で有意差はみられず、UCP1発現による体温の上昇はみられなかった。また肝でのUCP1発現に伴い、基礎代謝率は増加したが、食餌摂取量および体重は有意に減少した(図1)。

脂肪の集積に関して、UCP1群の肝臓では肝重量の減少、中性脂肪量が有意に減少、脂肪肝の改善がみられた(図2)。組織所見をみると、UCP1遺伝子導入により肝臓だけでなく、褐色脂肪組織、白色脂肪組織など脂肪組織においても脂肪量の減少と細胞の小型化がみられた。

そこで、肝臓における脂質関連調節因子の発現をみると、図3に示すようにUCP1群では脂質合成系のSRBEP-1cの減少、脂肪酸合成酵素系のSCD1, FASなども減少した。また、PPAR α では有意差はみられなかったが増加傾向を示した。これらのことから、UCP1導入による中性脂肪の減少にはSRBEP-1cの発現抑制、PPAR α の

¹⁾ 東北大学大学院医学系研究科分子代謝病態学分野・糖尿病代謝科 ²⁾ 東北大学大学院医学系研究科附属創生応用医学研究センター再生治療開発分野

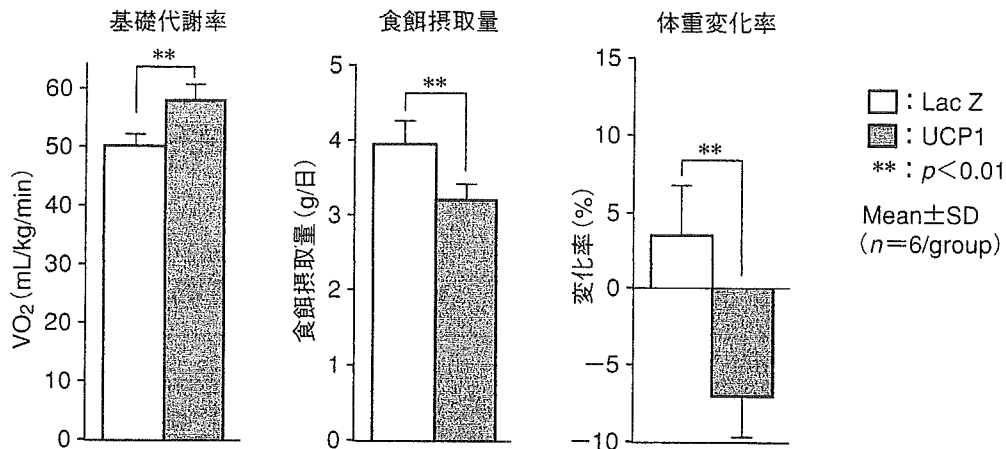


図1 肝臓におけるUCP1発現による基礎代謝率、食餌摂取量、体重への影響

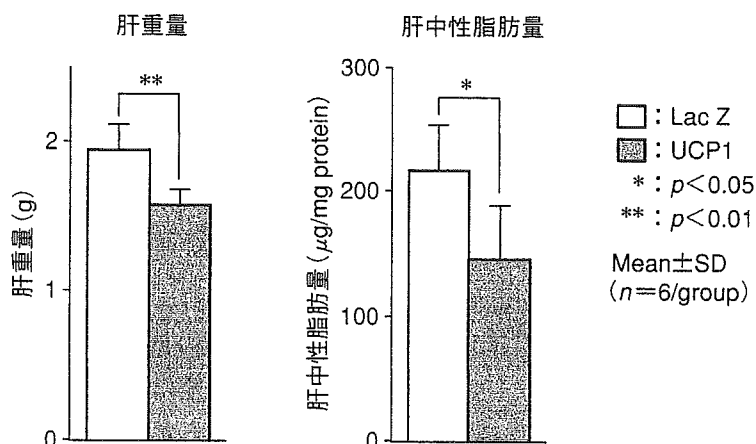


図2 UCP1導入による脂肪肝の改善

増加が関与していると考えられる。

次に肝臓のATPレベル、AMPキナーゼ (AMPK) について検討すると、UCP1群ではコントロール群に比べてATPが1/2に減少し、AMPK量は両群で変わらないが、UCP1群でAMPのリン酸化(活性化)がみられた(図4)。

これらのことから、肥満・糖尿病を発症したマウスの肝臓にUCP1を発現させると、ATPが減少して、AMPKの活性化が起り、SRBEP-1cの発現抑制により脂肪生成が減少し、脂肪肝が改善される。また同時に、ACC活性が低下し、マロニルCoAの減少により脂肪酸酸化が促進され、脂肪肝が改善されると考えられる。一方、別の経路では、脂肪組織からの脂肪酸動員の増

強により脂肪組織が小型化すると考えられるが、この機構はまだ不明な点が多く、今後の検討が必要であると考えている。

経口糖負荷試験(OGTT)ではUCP1群で血糖値の上昇が有意に抑制され、インスリン負荷試験(ITT)によりUCP1群でインスリン感受性の改善がみられ、血中インスリン値も有意に低下した(図5, 6)。

血中脂質値では、総コレステロールは両群で有意差がみられなかったが、中性脂肪、NEFAはUCP1群で有意に減少した。

アディポサイトカインについて、アディポネクチンとTNF-αは有意差がみられなかったが、レプチンはUCP1群で有意に減少した(図6)。す

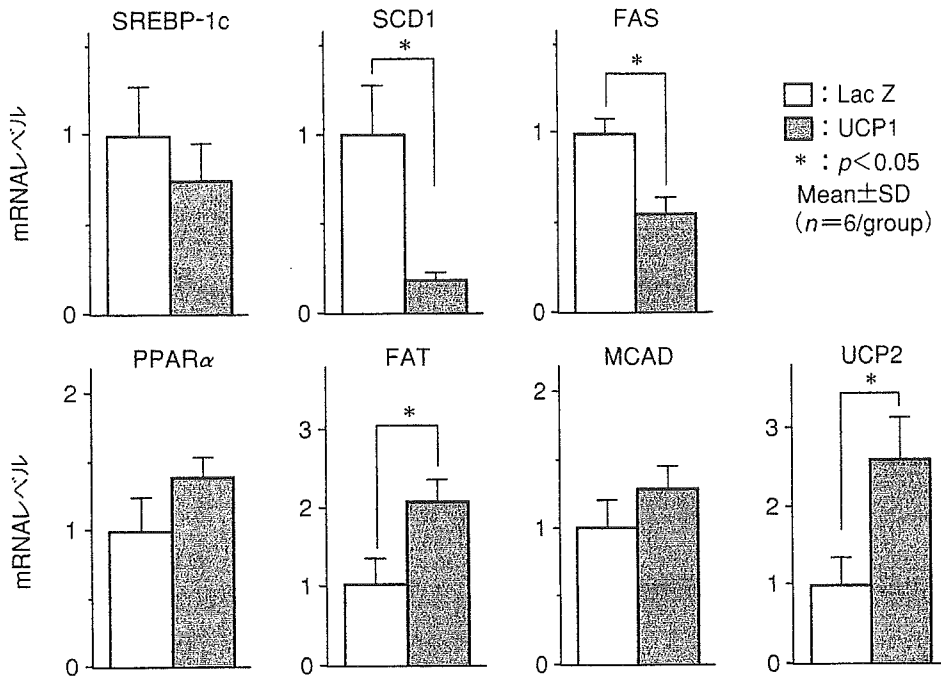


図3 肝臓における脂質合成関連および脂質分解関連酵素の遺伝子発現パターン

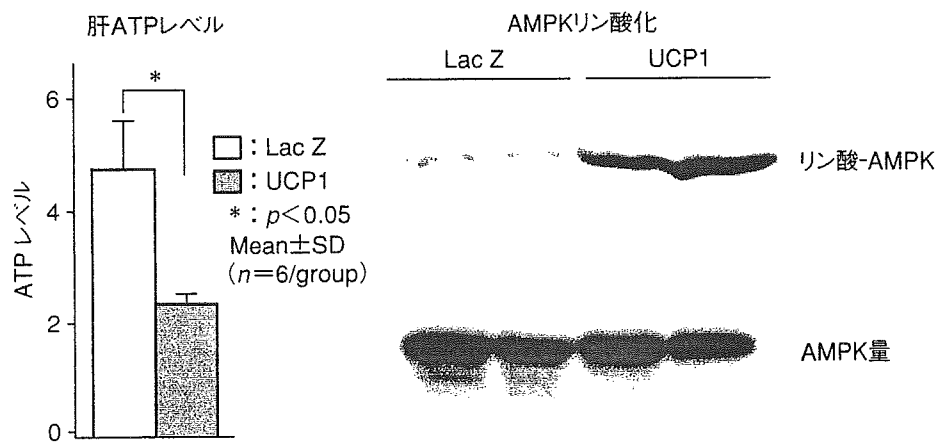


図4 肝へのUCP1導入によるATPレベル、AMPKリン酸化への影響

なわち、肝臓にUCP1を発現させることにより、亢進していた食欲が低下し、中枢でのレプチン感受性が改善した。

一方、普通食を負荷したマウスにUCP1を発現させて検討したところ、ATPの減少はみられず、基礎代謝率、食餌摂取、体重ともコントロール群と変化がなかった。また、肝臓の中性脂肪量や肝重量に変化はなく、脂肪組織の小型化もみられなかった。インスリン負荷試験でも、UCP1を発現させてもインスリン感受性は変

わらないことが示された。

まとめ

高脂肪食負荷により肥満・糖尿病を発症したマウスに対して、肝臓にUCP1を発現させることにより、エネルギー消費の亢進、肝臓の中性脂肪が減少した。さらに肝臓以外の褐色脂肪組織と白色脂肪組織においても脂肪集積が減少した。また視床下部でレプチンの感受性が上昇した。これらのことから、全身においてはインス

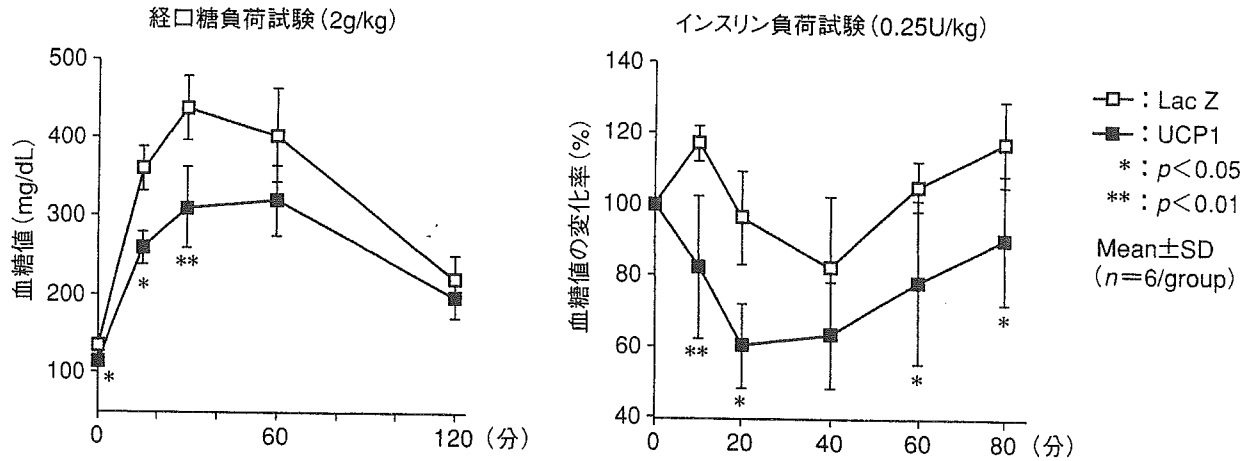


図5 肝へのUCP1導入によるインスリン抵抗性の改善

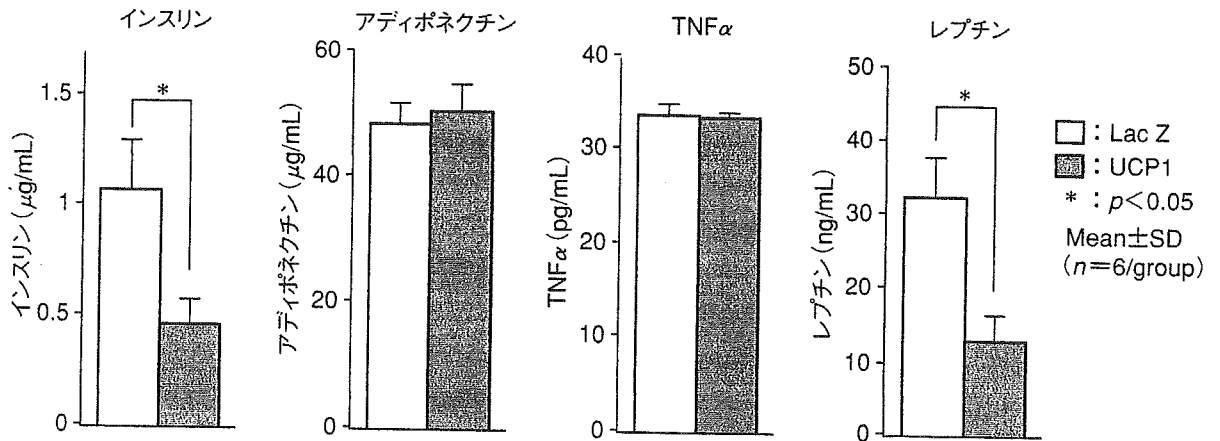


図6 肝へのUCP1導入によるインスリンおよびアディポサイトカインへの影響

リン感受性が改善し、血糖値も改善した。

一方、興味深いことに、普通食を負荷したマウスを用いた検討では、UCP1遺伝子導入によっても、エネルギー代謝、体重、血糖値などに影響はみられなかった。

以上のことから、肥満・糖尿病状態においてUCP1を発現させるとエネルギー消費が亢進するが、肥満・糖尿病でない場合、UCP1を発現させてもエネルギー消費は亢進しない。異所性に肝臓にUCP1を発現させると、余剰エネルギーを消

費し、メタボリックシンドロームと考えられる状態が改善されることが示唆され、肝臓での uncoupling は新しい食事由来性肥満の状態に対するターゲットの一つになりうると考えられた¹⁾。

文 献

- 1) Ishigaki Y, et al. Dissipating excess energy stored in the liver is a potential treatment strategy for diabetes associated with obesity. *Diabetes* 2005;54 (2):322-32.

レクチャー④

糖尿病の成因と病態の解明に関する
研究の進歩 (2)5 UCP1 遺伝子導入による肥満・
糖尿病に対する治療法開発の試み

片桐秀樹

東北大学大学院医学系研究科附属創生応用医学研究センター
再生治療開発分野, 東北大学病院糖尿病代謝科

はじめに

近年のライフスタイルの変化により, 先進諸国ではメタボリックシンドローム患者の急増が問題となっており, 日本もその例外ではない。

特に, 肥満に基づく糖尿病に対しては, 今でも食事運動療法の徹底がその治療の中心となっている。インスリンをはじめとする一般的な糖尿病の治療薬は, 血中から糖を組織内に取り込ませて血糖値を下げるメカニズムのものが中心であるため, 肥満患者に用いた場合, 食事療法の徹底がないとさらに肥満を悪化させ, インスリン抵抗性の増悪を招くからである。つまり, エネルギー摂取過剰・消費不足が原因となっている多くの現代の糖尿病患者においては, エネルギー代謝の平衡を保つことが重要であると考えられるが, それを目指した薬物は今のところ一般的には見当たらないのが現実である。しかし, 基本的に自覚症状に乏しい糖尿病患者に日々の食事運動療法を徹底させるには, 自ずと限界があり, これが, 糖尿病やその合併症患者の急増を招いている一因になっている。この観点から, エネルギー消費の亢進をもたらす治療法, あるいは, 摂食の調節を可能とする治療法の開発が必要である。そこで筆者らは, このような治療法の開発を目指して, 研究を行っており, その成果を中心に, 全身の糖代謝やエネルギー代謝の恒常性を維持する機構について, 論じてみたい。

後天的遺伝子導入による代謝改善の試み

これまで, トランスジェニックマウスやノックアウトマウスを用いた戦略にて, エネルギー消費の亢進を介して肥満や糖尿病の予防を目指した様々な遺伝子改変動物が作製されている¹⁾。しかし, 実際に肥満糖尿病が発症した後にエネルギー代謝亢進を誘導してみないことには, この戦略が治療として有効であるかどうか, あるいはどのような作用機序をもって全身の代謝状態を改善していくのかわからない。つまり, 実際の治療に結びつけるためには, 先天的遺伝子発現ではなく病態発症後の発現誘導を行う必要がある。さらに, 病態発症後に急性の代謝変化を生じさせることで, まだ知られていない代謝調節機構・臓器組織間のクロストークや病態発症機構の解明につながる可能性がある。そこで筆者らは, アデノウイルスによる遺伝子導入を用いて脂肪細胞でのインスリンシグナルの検討を進めてきた経験²⁾を生かし, 高脂肪食を負荷することにより肥満・糖尿病を発症させたマウスに, ウイルスベクターによる後天的遺伝子導入を試みた。本レクチャーでは, 主に, エネルギー代謝亢進作用を持つと考えられる脱共役蛋白 UCP1 遺伝子を肝に異所性に発現させる試みについて考察してみたい。

UCP 1

ミトコンドリアでは、電子伝達系により、ミトコンドリア内膜をはさんで、プロトンによる電位勾配が作られ、ATP合成酵素はこの電位勾配を利用し大量のATPを産生することが知られている。UCPは、プロトン輸送体として働き、この電位勾配を消失させることにより電子伝達系とATP合成とを脱共役し、熱としてエネルギーを放散する働きがある。この結果、基礎代謝を増やしエネルギー貯蔵を減少させる作用を有する蛋白と考えられている。代表的なUCP 1は褐色脂肪細胞に特異的に発現し、熱を産生させることで体温の維持などに関与していることが知られている³⁾。そこで筆者らは、インスリンの標的臓器の一つであり糖代謝・脂質代謝において、非常に重要な役割を果たしている肝臓にこのUCP 1蛋白を異所性に発現させることを試みた⁴⁾。

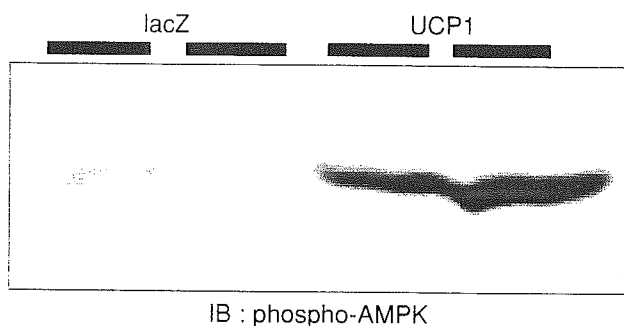


図1 リン酸化AMPK抗体によるWestern blot. 肝におけるUCP1発現により、AMPKのリン酸化が認められた。

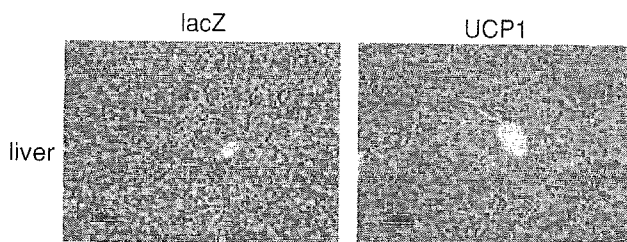


図2 肝組織のHE染色. 肝におけるUCP1発現により、白く抜けた脂肪蓄積部位の減少が認められる。

肝へのUCP 1 遺伝子導入

UCP 1の肝臓における異所性発現は、高脂肪食により肥満・糖尿病を発症させたマウスの酸素消費量の増加、すなわちエネルギー消費の亢進を引き起こした。その結果、肝臓においては、ATP含量の低下を伴うAMPKの活性化(図1)が認められ、脂肪肝が改善した(図2)。肝における脱共役はTCAサイクルを働かせながらATP産生を抑制する働きをもち、その結果として、 β 酸化による脂肪酸分解の亢進が惹起されたことが想定される。さらに興味深いことに、遺伝子が導入されていない骨格筋においてインスリン抵抗性は著明に改善し(図3)、内臓脂肪組織では脂肪蓄積の減少と脂肪細胞の縮小を認め(図4)、さらに視床下部のレプチン抵抗性も改善を示し、肝以外の多臓器・組織における代謝改善効果もたらされた。このことは、臓器・組織間で代謝状態の情報をやり取

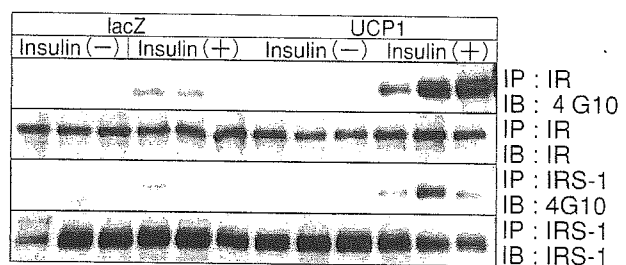


図3 筋におけるIR、IRS1のチロシンリン酸化. 肝におけるUCP1発現により、筋でのIR、IRS1のチロシンリン酸化の亢進が認められ、インスリン抵抗性の改善が示された。

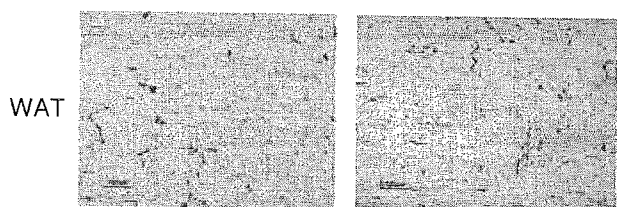


図4 脂肪組織のHE染色. 肝におけるUCP1発現により、脂肪細胞の縮小(脂肪蓄積の減少)が認められた。