

Thesis

マウス線維芽細胞3T3-L1細胞が脂肪細胞に分化する際の
細胞内情報伝達経路の検討

埼玉医科大学内科学内分泌・糖尿病内科部門

(指導：片山 茂裕教授)

富山 浩二

マウス線維芽細胞3T3-L1細胞は、isobutyl-methylxanthine (IBMX), dexamethasone (DEX), insulinによって効率良く脂肪細胞に分化する。Insulin受容体はチロシンリン酸化型の受容体の一つで、その生理作用の多くはphosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase)によって介される。そこで特異的PI3-kinase阻害薬であるwortmanninを用い、その脂肪細胞分化に及ぼす影響を見た。Wortmanninはinsulinで3T3-L1細胞を刺激した際のPI3-kinase活性を濃度依存的に抑制し、また3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化も同様に濃度依存的に抑制した。次に分化過程をDay 0-2の初期相とDay 2-4の後期相に分け、どちらか一方のみに薬剤を添加した場合の分化に及ぼす影響を見た。Wortmanninは分化の初期相、あるいは後期相のみに用いた場合も、3T3-L1細胞の分化を約50%に抑制した。同様の実験を3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA)還元酵素阻害剤simvastatinで行ったが、wortmannin同様後期相のみに用いても分化は抑制された。これらの結果から、3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化においてPI3-kinaseが重要な役割を演じていること、分化の過程における細胞内情報伝達経路は、その持続的な活性化のみでなく、初期相、あるいは後期相それぞれが単独でも重要であることが示唆された。

緒言

生活習慣の欧米化に伴い、高血圧、高脂血症、糖尿病等に代表される生活習慣病の罹患者数の増加が近年問題となっている。そしてこれらに共通する因子として、内臓脂肪の増加を特徴としたメタボリックシンドロームという概念が提唱された^{1,2)}。成熟した脂肪細胞はもはやその数において増加することはないので、脂肪組織の増大には前駆脂肪細胞が寄与する可能性が示唆されている³⁾。脂肪細胞は中胚葉系多機能細胞が分化してできるが、同じ中胚葉系前駆細胞である3T3-L1細胞はDEX, IBMX, insulinによる刺激で効率よく脂肪細胞に分化することが知られており⁴⁾、脂肪細胞分化の研究に広く用いられている。脂肪細胞への分化がどのような因子に影響を受けるかが解明されれば、肥満等に起因する疾患の原因解明に繋がることが期待できる。そこで、我々は3T3-L1細胞を用いて、その脂肪細胞への分化における細胞内情報伝達経路の

一端を見いだすべく実験を行った。そして特異的PI3-kinase阻害剤であるwortmanninによって脂肪細胞への分化が抑制されることを示し、PI3-kinaseの活性化が脂肪細胞分化に関与することを示した。また脂肪細胞への分化は、細胞内情報伝達経路の持続的な抑制のみでなく、初期相、あるいは後期相の抑制のみでも変化を受けることを、wortmanninとsimvastatinを用いて示した。

実験材料と方法

1. 3T3-L1細胞の培養と脂肪細胞への分化

細胞の培養及び脂肪細胞への分化は、Rubinらの方法によった⁴⁾。3T3-L1細胞(Japanese Cancer Research Resources Bank)を10% fetal calf serum (FCS) (JRH Biosciences)を含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco)で培養した。脂肪細胞への分化誘導は、細胞がconfluentになった2日後 (Day 0)に次のように実施した。10% FCS, 1 mM IBMX (Wako Pure Chemical Industry), 1 μ M DEX (Wako), 100

nMあるいは $1.7 \mu\text{M}$ のinsulin (Wako)を含むDMEMで3T3-L1細胞を培養した。48時間後 (Day 2), 元の10% FCSのみを含むDMEMに培養液を戻した。以降48時間毎に培養液の交換を行い, Day 8に分化の程度を評価した。分化を行わない細胞は, Day 0からDay 2の間, 10% FCSのみを含むDMEMで培養した。Wortmannin (Wako)とsimvastatin (Banyu Pharmaceutical Co. Ltd.)は, それぞれの項で示される時間に決められた濃度で用いた。

2. Glycerol 3-phosphate dehydrogenase (GPDH) 活性の測定

GPDH活性の測定はWiseらの方法によった⁵⁾。Day 8に細胞を回収し, 100 mM triethanolamine-HCL (pH 7.5), 2.5 mM EDTA, 0.1 mM 2-mercaptoethanol, 0.12 mM NADHを含む緩衝液中で超音波的に細胞を粉碎し, それに0.2 mM dihydroxyacetone phosphate (Sigma)を加え反応を開始した。その後25°C, 340 nmにおける吸光度の変化を吸光度計 (Shimadzu UV2000)で測定した。結果はmU/mg proteinで表した (1 mUは1 nmolのNADHを1分間に酸化する能力に相当する)。

3. PI3-kinase活性の測定

細胞がconfluentになった2日後, 一晚FCSを含まないDMEMで細胞を培養した。その後insulinで10分間細胞を刺激した後, これを回収した。次にantiphosphotyrosine antibody PY20 (Leinco)と anti-mouse IgG agarose (American Qurlex)を用いて免疫沈降物を得た。そして得られた免疫沈降物を用いてOkadaらの方法によりPI3-kinase活性を測定した⁶⁾。放射活性はFuji BAS2000 Bioimaging analyzerを用いて測定した。

結 果

1. Insulinで3T3-L1細胞を刺激した際のPI3-kinase活性に及ぼすwortmanninの影響

はじめにwortmanninのPI3-kinase活性に及ぼす影響をphosphatidylinositol (PI)を基質として用い測定を行った。WortmanninによってPI3-kinase活性は濃度依存的に抑制されたが, IC_{50} 値は100 nM以上の濃度であり, その効果は十分ではなかった⁷⁾。理由としてphosphatidylinositol 4-kinase (PI4-kinase)の関与が推測された⁶⁾。PI4-kinaseの関与を除外するため, phosphatidylinositol-4-phosphate (PI-4-P)を基質として同様の実験を行った。するとwortmanninはinsulin刺激時のPI3-kinase活性を濃度依存的に抑制し, その IC_{50} 値は1 nM以下であった (Fig. 1)。

2. Wortmanninの3T3-L1細胞の脂肪細胞分化に及ぼす影響

次にPI3-kinase活性を抑制することが示されたwortmanninが, 3T3-L1細胞の脂肪細胞分化にどのような影響を及ぼすかを検討した。そのためwortmanninを分化誘導開始30分前から分化誘導開始96時間後

(Day 4)まで培養液に添加したが, この際wortmanninは6時間毎に追加で添加した。本実験と同じように長時間wortmanninを用いた報告で, 頻回の添加が必要であることが示されていたからである⁸⁾。Day 8に分化の程度をOil Red Oによる脂肪染色及びGPDH活性の測定によって行った。するとwortmanninは3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化を形態学的にも⁷⁾, 生化学的にも

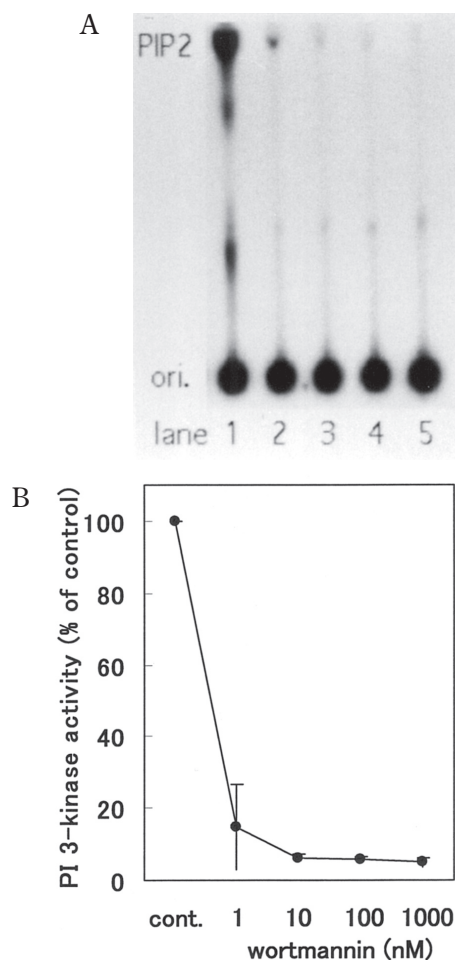


Fig. 1. Wortmannin's inhibitory effect on PI3-kinase activity on PI-4-P. Cells were stimulated with $1.7 \mu\text{M}$ insulin for 10 minutes. Then cells were lysed and immunoprecipitated. After washing the precipitates, wortmannin at indicated concentrations was added into reaction mixture. PI3-kinase activities were measured using PI-4-P as substrates as described in Materials and Methods. A) Autoradiogram of the thin layer chromatography (TLC) plate is shown (representative of three independent experiments). lane 1: control. lane 2-5: wortmannin was added at 1, 10, 100, 1000 nM. ori: origin. PIP2 phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. B) Dose dependent effect of wortmannin is shown. PI3-kinase activity on PI-4-P was shown as percent of the activity of control. Values are expressed as mean $\pm$ S.D. (n = 3). Reprinted from Biochem Biophys Res Commun, 212, Tomiyama K, et al. Wortmannin, a specific phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, inhibits adipocytic differentiation of 3T3-L1 cells, 263-9, 1995, with permission from Elsevier.

濃度依存的に抑制した (Fig. 2). Wortmanninが脂肪細胞分化を抑制した際の IC_{50} 値は約50 nMであり、先に示したwortmanninがPI3-kinase活性を抑制する場合の IC_{50} 値より高値であった. WortmanninはPI3-kinaseのみでなく, myosin light chain kinase (MLCK) や, PI4-kinase活性も抑制することが知られている⁹⁾. しかしそれらに対する IC_{50} 値は, 脂肪細胞分化が抑制された時の濃度よりさらに高値である事, PC12細胞のアポトーシスに関する研究¹⁰⁾でも我々と同じ濃度のwortmanninを用いていたこと等から, wortmanninはPI3-kinaseを抑制した結果, 3T3-L1細胞の脂肪細胞分化を抑制したと推測された.

3. HMG-CoA 還元酵素阻害剤の3T3-L1細胞の脂肪細胞分化に及ぼす影響

以前に我々はHMG-CoA還元酵素阻害剤の一つであるlovastatinがwortmannin同様, 3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化を形態学的にも生化学的にも濃度依存的に抑制することを示した¹¹⁾. この際lovastatinは分化開始時より分化程度の評価を行ったDay 10まで添加された. Lovastatinの脂肪細胞分化抑制作用は, メバロン酸の添加によってうち消されたため, lovastatinの効果はイソプレノイドの合成抑制が一因である可能性が示唆された. またlovastatinはPI3-kinase活性を抑制することも示されている¹²⁾. 我々はlovastatin

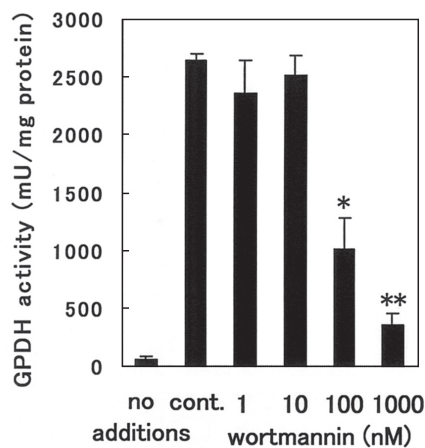


Fig. 2. The effect of wortmannin on GPDH activity. 8 days after the induction, GPDH activities were measured as described in Materials and Methods. Wortmannin was added from 30 minutes before the induction of differentiation until 96 hours after the induction. GPDH activity was expressed as mU/mg protein, where 1 mU is the activity for oxidation of 1nM NADH/min. no additions: differentiation was not induced. cont.:control. wortmannin: Wortmannin was added at indicated concentrations. Values are expressed as mean $\pm$ S.D. (n = 3). *, $p < 0.05$; **, $P < 0.01$. Reprinted from Biochem Biophys Res Commun, 212, Tomiyama K, et al. Wortmannin, s specific phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, inhibits adipocytic differentiation of 3T3-L1 cells, 263-9, 1995, with permission from Elsevier.

と同じHMG-CoA還元酵素阻害剤であるsimvastatinを用いてそのPI3-kinase活性に及ぼす影響を見たが, simvastatinもlovastatin同様PI3-kinase活性を抑制した (Fig. 3)¹³⁾. したがってHMG-CoA還元酵素阻害剤の脂肪細胞分化抑制効果は, wortmannin同様PI3-kinase活性の抑制による可能性も示唆された.

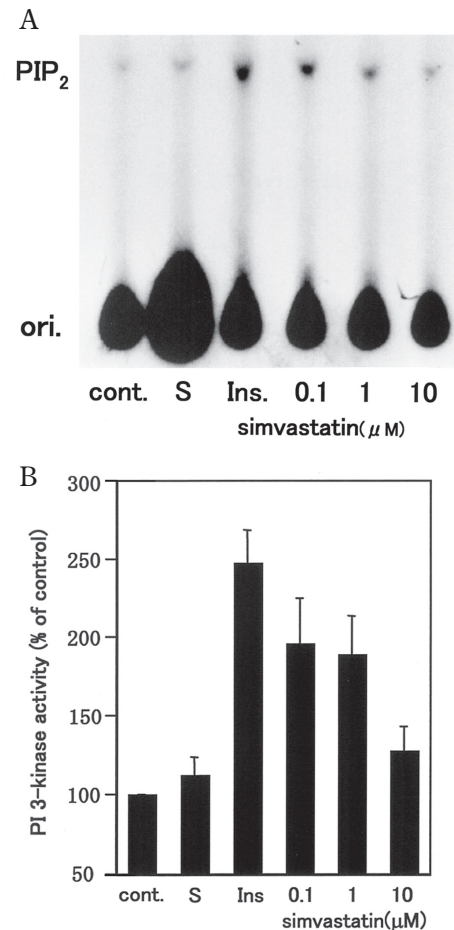


Fig. 3. Effect of simvastatin on PI3-kinase activity. After cells reached confluence, simvastatin at indicated concentrations was added 24 hours before the kinase assay and we starved the cells for serum. Then the cells were stimulated with 100 nM insulin. Ten minutes later, PI3-kinase activities were measured as described in Materials and Methods. A) Autoradiogram of the TLC plate is shown (representative of five independent experiments). cont.) Cells were not stimulated with insulin. S) Cells were not stimulated with insulin but pretreated with 10 μ M simvastatin. Ins.) Cells were stimulated with insulin but cells were not pretreated with simvastatin. 0.1- 10) After pretreatment of cells with 0.1-10 μ M simvastatin, cells were stimulated with 100 nM insulin. B) Dose dependent effect of wortmannin is shown. PI3-kinase activity on PI-4-P was shown as percent of the activity of control. Values are expressed as mean $\pm$ S.D. (n = 5). Reprinted from Jpn J Pharmacol., 80, Tomiyama K, et al. Both wortmannin and simvastatin inhibit the adipogenesis in 3T3-L1 cells during the late phase of differentiation. 375-8, 1999, with permission from the Japanese Pharmacological Society.

4. 細胞分化過程の初期相, 後期相それぞれに wortmannin, simvastatin が及ぼす影響

以上の実験から wortmannin, lovastatin は共に, 3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化を抑制することが示された。これらの実験で共通する点は, 両薬剤が分化誘導開始後長い時間にわたって培地に添加されたことである。Wortmanninを用いた実験では, wortmannin は不安定な物質であるため, 分化誘導開始96時間後まで6時間毎に培地に添加した。しかし, 分化開始前30分と分化誘導開始時に一度だけ wortmannin を添加した際も, その効果は十分ではなかったが脂肪細胞への分化は抑制された(結果未発表)。また3T3-L1細胞が脂肪細胞に分化する際は, 分化誘導後の時間に応じて特徴的な形態変化を示すこと⁴⁾, 分化開始後様々な遺伝子が発現することが分かっていた^{14, 15)}。そこで我々は分化誘導過程を, 分化誘導開始後から48時間までの早期相 (Day 0-2), 分化開始48時間後から96時間後までの後期相 (Day 2-4) に分けた (Fig. 4)。そして細胞内情報伝達経路の持続的な抑制のみでなく, 分化初期相あるいは後期相のみを抑制した場合, 3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化はどのような影響を受けるかを調べることにした¹⁶⁾。はじめに wortmannin を用い, GPDH活性の測定により脂肪細胞への分化の程度を評価した。1 μ M の wortmannin は分化初期相あるいは後期相のみに用いた場合も, 3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化を約50% 抑制した (Fig. 5)。次に lovastatin と同じく HMG-CoA還元酵素阻害薬である simvastatin を用いて同様の実験を行った。ここで simvastatin を後期相に用いる際, 分化誘導開始36時間後から96時間後まで用いたが, これは HMG-CoA還元酵素阻害薬はその作用発現に時間を要するからである¹²⁾。まず10 μ M の simvastatin を分化誘導初期相に用いた場合, 分化誘導中 (Day 0-2) に3T3-L1細胞は culture dish から剥

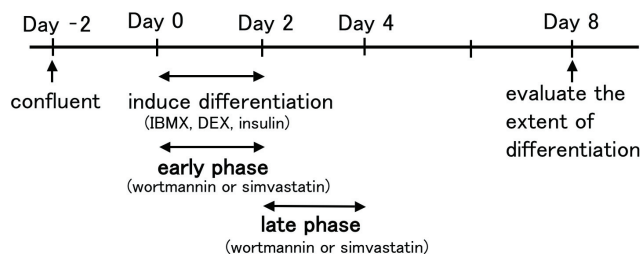


Fig. 4. Time course of the experiment. Differentiation was induced 2 days after cells reached confluence as described in Materials and Methods. In order to induce differentiation, cells were treated with isobutyl-methylxanthine, dexamethasone and insulin for 48 hours. In order to examine the effects of wortmannin or simvastatin during the early phase or late phase, we determined Day 0-2 as the early phase and Day 2-4 as the late phase.

がれてしまい, 分化に及ぼす影響を見ることはできなかった (Fig. 6)。しかし同じ濃度の simvastatin を分化後期相に用いると, 細胞の culture dish への接着は阻害されることなく, さらに lovastatin 同様, 濃度依存的に3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化は抑制された (Fig. 7)。これらの結果から, 3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化の際, 細胞内情報伝達経路の持続的な活性のみでなく, 分化初期相, あるいは後期相それぞれにより有意に機能する経路が存在することが示唆された。

考 察

3T3-L1細胞は IBMX, DEX 及び insulin の存在下で脂肪細胞に分化することが知られている。IBMX は細胞内 cAMP の上昇を通して, DEX は核内グルココルチコイド受容体に結合することによって, C/EBP β , C/EBP δ を活性化し脂肪細胞への分化を促進する^{17, 18)}。そしてこれらは PPAR- γ 活性を促進する。しかし脂肪細胞への分化においては, insulin の作用が必須であることが示されている¹⁹⁾。Insulin 受容体はチロシンリン酸化型の膜受容体であり, insulin が結合し受容体が活性化されると, insulin receptor substrate 1 (IRS-1) などの受容体結合タンパク質がリン酸化され, 引き続きそれらの下流にある Ras, mitogen activated

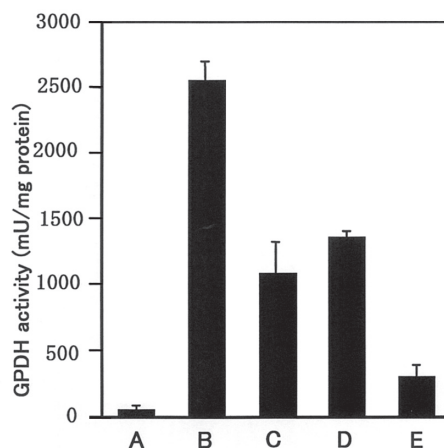


Fig. 5. Wortmannin during both the early and late phases inhibited differentiation. Differentiation was induced and the extent of differentiation was evaluated by measuring the GPDH activity on Day 8 as described. Differentiation was A) not induced, B) induced without wortmannin, C) induced in the presence of 1 μ M wortmannin from 30 min before the onset of differentiation to 48 hr after the onset of differentiation (early phase), D) induced in the presence of 1 μ M wortmannin from Day 2 to Day 4 (late phase), and E) induced with wortmannin from 30 minutes before the onset of differentiation to Day 6. Data are means $\pm$ S.D. (n = 3). Reprinted from Jpn J Pharmacol., 80, Tomiyama K, et al. Both wortmannin and simvastatin inhibit the adipogenesis in 3T3-L1 cells during the late phase of differentiation. 375-8, 1999, with permission from the Japanese Pharmacological Society.

protein kinase (MAPK), PI3-kinase, Aktなどが活性化される²⁰⁻²²⁾。そしてグリコーゲン合成、ブドウ糖の細胞内への取り込み、脂質代謝、細胞増殖などといった様々な生理作用を示す。それらinsulinの多彩な作用において、PI3-kinaseが主要な役割を果たすことが様々な研究者によって発表された²³⁻²⁵⁾。そこで我々は当時PI3-kinase活性を特異的に抑制することが示されたwortmanninに着目し、その3T3-L1細胞の脂肪細胞分化に及ぼす影響を見ることとした。まず始めにinsulinで3T3-L1細胞を刺激した後に上昇するPI3-kinase活性が、wortmanninによって濃度依存的に抑制されることを示した。次に3T3-L1細胞を脂肪細胞に分化誘導する際、wortmanninをDay 4まで用いると、その脂肪細胞への分化もwortmanninによって濃度依存的に抑制された。特異的PI3-kinase抑制剤であるwortmanninが脂肪細胞への分化を抑制したことは、すなわち、3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化において、PI3-kinaseが重要な役割を果たしていることを示唆した。PI3-kinaseがどのようにして脂肪細胞分化を抑制するかに関しては、当初はp42MAPKがその下流に位置する可能性を考えた。3T3-L1細胞²⁶⁾

やPC12細胞^{27, 28)}の分化やNIH3T3細胞²⁸⁾のトランスフォーメーションにp42MAPKに関与するとの研究成果が発表されていたからだ。一般にチロシンリン酸化型の受容体が活性化されると、Ras蛋白の活性化の後、p42MAPKが活性化される²⁹⁾。PI3-kinaseもまたRas蛋白によって活性化される³⁰⁾。しかしその後3T3-L1細胞の脂肪細胞分化においては、p42MAPKの活性化は、むしろ、その分化過程にもよるが脂肪細胞分化を抑制する傾向にあるとされている³¹⁾。現在PI3-kinaseの下流に位置する蛋白は、Aktとする考えが広く受け入れられるようになってきている³²⁾。

我々が着目したもう一つの点は、3T3-L1細胞が成熟脂肪細胞に分化するまでに約8日前後の時間を要する点であった。3T3-L1細胞の形態の変化は、IBMX, DEX, insulinを培養液中から取り除いた後も継続する。また分化誘導開始後、様々な遺伝子が発現するが、時間によって発現する遺伝子に違いがあることも示されていた^{14, 15)}。そこで分化過程の一部のみの変化で、脂肪細胞分化が影響されるのではないかと考えた。これを確かめるため分化過程をDay 0-2の早期相とDay 2-4の後期相に分け、wortmanninと

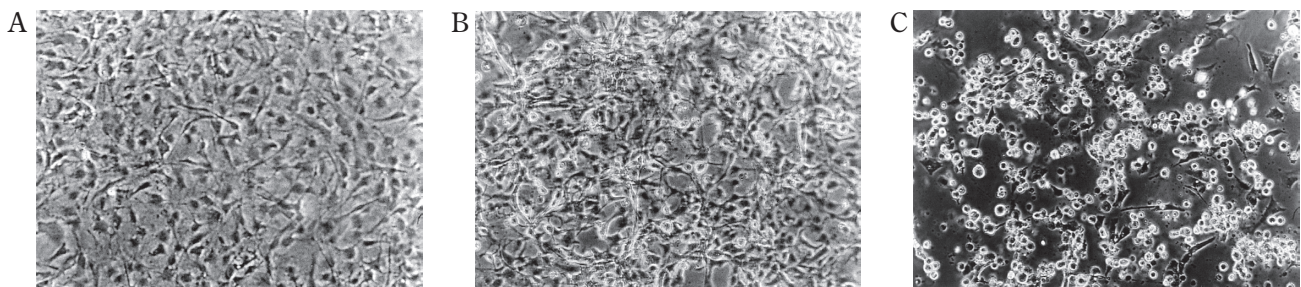


Fig. 6. Simvastatin during the early phase caused rounding-up of cell morphology. Differentiation was induced as described and microphotographs ($\times 400$) of culture dishes were obtained 48 hr after the onset of differentiation. Differentiation was A) not induced, B) induced without simvastatin, and C) induced in the presence of 10 μ M simvastatin from Day 0 to 48 hr after the onset of differentiation. Data represent four separate experiments. Reprinted from Jpn J Pharmacol., 80, Tomiyama K, et al. Both wortmannin and simvastatin inhibit the adipogenesis in 3T3-L1 cells during the late phase of differentiation. 375-8, 1999, with permission from the Japanese Pharmacological Society.

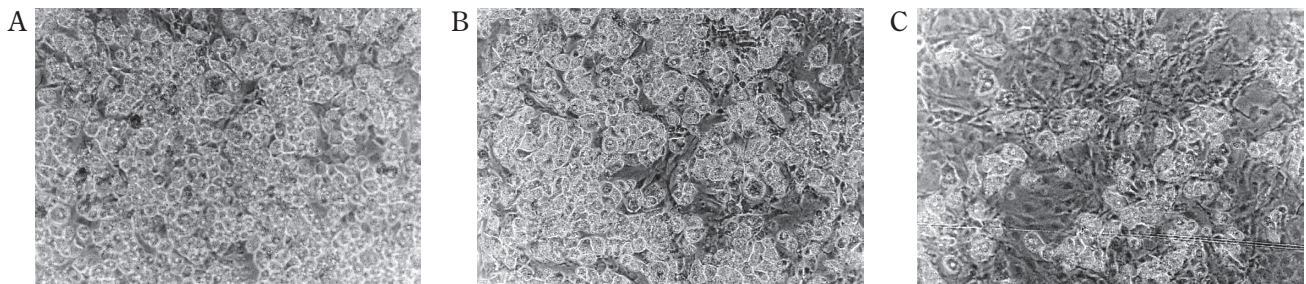


Fig. 7. Simvastatin during the late phase inhibited differentiation. Differentiation was induced as described. Cells were treated with A) 0.1, B) 1 and C) 10 μ M of simvastatin from 36 hr to 96 hr after the onset of differentiation. On Day 8, microphotographs ($\times 400$) of culture dishes were obtained. Data represent four separate experiments. Reprinted from Jpn J Pharmacol., 80, Tomiyama K, et al. Both wortmannin and simvastatin inhibit the adipogenesis in 3T3-L1 cells during the late phase of differentiation. 375-8, 1999, with permission from the Japanese Pharmacological Society.

simvastatinをそれぞれの相に用いてその影響をみた。するとwortmanninは早期相、後期相それぞれ単独で用いた場合も脂肪細胞分化を抑制した。Simvastatinに関しては、早期相においては細胞がその接着性を失いculture dishから剥がれてしまったため評価ができなかったが、後期相に関しては、早期相に用いたのと同じ濃度のsimvastatinによってwortmannin同様、脂肪細胞への分化が抑制された。いかにして分化を抑制したかに関してもっとも考えられることはPI3-kinaseの関与である。PI3-kinaseは細胞増殖、代謝、細胞骨格の形成など様々な作用に関与するといわれており^{25, 33, 34}、早期相、後期相それぞれにおいてPI3-kinaseが違った作用で脂肪細胞への分化を抑制したのではないかと考えた。その後いくつかの施設から、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化におけるPI3-kinaseの働きに関する研究結果が発表された^{35, 36}。これらに共通する点は、3T3-L1細胞の脂肪細胞分化過程においてPI3-kinaseの活性は、Day 4にかけてピークに達するという点である。これは後期相 (Day 2-4) のみに薬剤を添加することによって脂肪細胞分化が抑制された理由として、PI3-kinaseの関与を考えた我々の考察と矛盾しない。興味深いのは、Sakaue³⁵らがPI3-kinaseは、脂肪細胞分化に伴って発現するPPAR- γ を代表とする遺伝子の産生は抑制せず、遺伝子発現後、脂肪細胞分化に伴って増加する蛋白の合成を抑制したとの結果を示したのに対し、Miki³⁶らは、遺伝子の発現も抑制されたと報告しとり、相反する結果が示されている。我々の実験結果も含め、以上の事から、3T3-L1細胞が脂肪細胞に分化する際、PI3-kinaseが重要な役割を果たしている事が示唆され、その詳細な機序に関しては、今後引き続き検討が必要であろう。

脂肪細胞分化後期相にPI3-kinaseの活性化が重要であることは明らかになったが、早期相に関してはどうか。我々の実験では、wortmanninを早期相のみに用いた場合も分化は抑制された。我々はDay 0からDay 2までを早期相と定義した。しかし前述のSakaueらの報告にあるように、この間に既に分化に必要な変化は細胞内で生じており、早期相に用いたwortmanninが抑制した経路は、実は後期相に細胞が分化する際に必要な経路だった可能性もある。ここでsimvastatinを用いた実験を考えてみたい。10 mMのsimvastatinを早期相に用いると、細胞はその接着性を失ってしまった。これは薬剤の細胞毒性の結果かもしれない。しかし同じ濃度のsimvastatinを分化誘導しなかった細胞に添加しても、細胞は接着性を失うことはなかった。また10 mMのsimvastatinを後期相に用いた際も、細胞は接着性を失うことがなかった。この事は早期相に起こった変化が、simvastatinの細胞毒性によるものではないことを示唆するかもしれない。3T3-L1細胞が脂肪細胞に分化する際、多彩な形態変

化を示す。PI3-kinaseは細胞骨格の形成における役割も有する³³。またsmall G蛋白の一つであるRho蛋白の働きを抑制すると、細胞は球状化を起こしその接着性を失ってしまう³⁷。PI3-kinaseとRho蛋白の関与も示されており³⁸、後期相同様PI3-kinaseの関与、あるいは全く別の経路で3T3-L1細胞の形態変化に何らかの影響を及ぼし、これが細胞の接着性を失わせることとなった可能性も考えられる。PI3-kinaseはinsulin刺激によって活性化されるが、前述のように、その活性のピークは脂肪細胞への分化誘導開始後4日目であり、かなりの時間を要する。また脂肪細胞への分化において、PI3-kinaseが重要な役割を演じることはほぼ間違いないが、その上位に位置する細胞内情報伝達経路の解明はまだ明らかになっていない。初期相に用いたwortmanninとsimvastatinは、未知の経路に作用したのかもしれない (Fig. 8)。

結 語

我々は特異的PI3-kinase阻害薬であるwortmanninと、HMG-CoA還元酵素阻害薬であるsimvastatinを用いて、3T3-L1細胞が脂肪細胞に分化する際、その細胞内情報伝達経路の持続的活性化のみでなく、前期相、後期相どちらか一方のみの抑制でも脂肪細胞の分化が影響されること、後期相に関してはPI3-kinaseの関与が示唆されることを示した。しかしながら、その詳細に関しては、研究者間に結果の違いもあり、今後さらに検討する必要がある。脂肪細胞の分化過程の詳細が明らかにされ、メタボリックシンドロームともいわれ

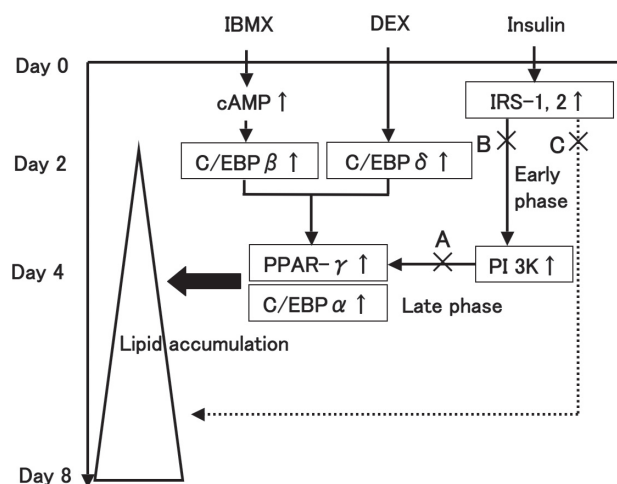


Fig. 8. Hypothesis of intracellular signal transduction during differentiation of 3T3-L1 cells to fat cells. A) Wortmannin or simvastatin added on Day 2-4 (late phase) inhibits PI3-kinase activity which reaches to the peak on Day 4. B) Wortmannin added on Day 0-2 (early phase) inhibits the same signal transduction from IRS-1 to PI3-kinase. C) Simvastatin or wortmannin added during the early phase may inhibit new pathway(s). ↑ indicates the increase in the activity.

る生活習慣病の病因が明らかにされ、その有効な治療に繋がることが期待される。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました埼玉医科大学内科学内分泌・糖尿病内科部門片山茂裕教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988;37:1595-607.
- 2) Fujioka S, Matsuzawa Y, Tokunaga K, Tarui S. Contribution of intraabdominal visceral fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity. *Metabolism* 1987;36:54-9.
- 3) Spiegelman BM, Flier JS. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell* 1996;87:377-89.
- 4) Rubin CS, Hirsch A, Fung C, Rosen OM. Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 1978;253:7570-8.
- 5) Wise LS, Green H. Participation of one isozyme of cytosolic glycerophosphate dehydrogenase in the adipose conversion of 3T3 cells. *J Biol Chem* 1979;254:273-5.
- 6) Okada T, Kawano O, Sakakibara T, Hazeki O, Ui M. Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin. *J Biol Chem* 1994;269:3568-73.
- 7) Tomiyama K, Nakata H, Hidenori S, Arimura S, Nishio E, Watanabe Y. Wortmannin, a specific phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, inhibits adipocytic differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;212:263-9.
- 8) Kimura K, Hattori S, Kabuyama Y, Shzawa Y, Takayanagi J, Nakamura S, et al. Neurite outgrowth of PC12 cells is suppressed by wortmannin, a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 1994;269:18961-7.
- 9) Ohara-Imaizumi M, Sakurai T, Nakamura S, Nakanishi S, Matsuda Y, Muramatsu S, et al. Inhibition of Ca(2+)-dependent catecholamine release by myosin light chain kinase inhibitor, wortmannin, in adrenal chromaffin cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;185:1016-21.
- 10) Yao R, Cooper GM. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 1995; 267:2003-6.
- 11) Nishio E, Tomiyama K, Nakata H, Watanabe Y. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor impairs cell differentiation in cultured adipogenic cells (3T3-L1). *Eur J Pharmacol* 1996; 301:203-6.
- 12) MaGuire TF, Corey SJ, Sehti SM. Lovastatin inhibits platelet-derived growth factor (PDGF) stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity as well as association of p85 subunit to tyrosine-phosphorylated PDGF receptor. *J Biol Chem* 1993;268:22227-30.
- 13) Tomiyama K, Nishio E, Nakata H, Arimura S, Watanabe Y. The effect of simvastatin on adipocytic differentiation of 3T3-L1 cells. *Jpn J Pharmacol* 1996;71(Suppl):71.
- 14) Sadowaski SB, Wheeler TT, Young DA. Gene expression during 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 1992;266:4722-31.
- 15) MacDougald OA, Lane MD. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem* 1995;64:345-73.
- 16) Tomiyama K, Nakata H, Sasa H, Arimura S, Nishio E, Watanabe Y. Both wortmannin and simvastatin inhibit the adipogenesis in 3T3-L1 cells during the late phase of differentiation. *Jpn J Pharmacol* 1999; 80:375-8.
- 17) Cao Z, Umek RM, McKnight SL. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* 1991;5:1538-52.
- 18) Reusch JE, Colton LA, Klemm DJ. CREB activation induces adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Mol Cell Biol* 2000;20:1008-20.
- 19) Smith PJ, Wise LS, Berkowitz R, Wan C, Rubin CS. Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 1988;263:9402-8.
- 20) White M, Kahn CR. The insulin signaling system. *J Biol Chem* 1994;269:1-4.
- 21) Backer JM, Myers MG Jr, Shoelson SE, Chin DJ, Sun XJ, Miralpeix M, et al. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *EMBO J* 1992;9:3469-79.
- 22) Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem* 1996;271:31372-8.
- 23) Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70

- S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol* 1994;14:4902-11.
- 24) Kanai F, Ito K, Todaka M, Hayashi H, Kamohara S, Ishii K, et al. Insulin-stimulated GLUT4 translocation is relevant to the phosphorylation of IRS-1 and the activity of PI3-kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;195: 762-8.
- 25) Toker A, Cantley LC. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 1997;387:673-6.
- 26) Sale EM, Atkinson PG, Sale GJ. Requirement of MAP kinase for differentiation of fibroblasts to adipocytes, for insulin activation of p90 S6 kinase and for insulin or serum stimulation of DNA synthesis. *EMBO J* 1995;14:674-84.
- 27) Traverse S, Gomez N, Paterson H, Marshall C, Cohen P. Sustained activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade may be required for differentiation of PC12 cells. Comparison of the effects of nerve growth factor and epidermal growth factor. *Biochem J* 1992;288:351-5.
- 28) Cowley S, Paterson H, Kemp P, Marshall CJ. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* 1994;77: 841-52.
- 29) Itoh T, Kaibuchi K, Masuda T, Yamamoto T, Matsuura Y, Maeda A, et al. A protein factor for ras p21-dependent activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase through MAP kinase kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:975-9.
- 30) Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, et al. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 1994;370:527-32.
- 31) Hu E, Kim JB, Sarraf P, Spiegelman BM. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science* 1996;274: 2100-3.
- 32) Fasshauer M, Klein J, Kriauciunas KM, Ueki K, Benito M, Kahn CR. Essential role of insulin receptor substrate 1 in differentiation of brown adipocytes. *Mol Cell Biol* 2001;21:319-29.
- 33) Kotani K, Yonezawa K, Hara K, Ueda H, Kitamura Y, Sakae H, et al. Involvement of phosphoinositide 3-kinase in insulin- or IGF-1-induced membrane ruffling. *EMBO J* 1994;13:2313-21.
- 34) Kovacsics TJ, Bachelot C, Toker A, Vlahos CJ, Duckworth B, Cantley LC, et al. Phosphoinositide 3-kinase inhibition spares actin assembly in activating platelets but reverses platelet aggregation. *J Biol Chem* 1995;270:11358-66.
- 35) Sakae H, Ogawa W, Matsumoto M, Kuroda S, Takata M, Sugimoto T, et al. Posttranscriptional control of adipocyte differentiation through activation of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 1998;273:28945-52.
- 36) Miki H, Yamauchi T, Suzuki R, Komeda K, Tsuchida A, Kubota N, et al. Essential role of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 2001;21:2521-32.
- 37) Paterson HF, Self AJ, Garrett MD, Just I, Aktories K, Hall A. Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *J Cell Biol* 1990;111:1001-7.
- 38) Zhang J, King WG, Dillon S, Hall A, Feig L, Rittenhouse SE. Activation of platelet phosphatidylinositol 3-kinase requires the small GTP-binding protein Rho. *J Biol Chem* 1993;268:22251-4.