

新たなインスリン抵抗性発症機序の電子顕微鏡による解析

関本 淳二, 井ノ口仁一

Elucidation of an Emerging Mechanism in the State of Insulin Resistance by Electron Microscopy

Junji SEKIMOTO and Jin-ichi INOKUCHI

(Received November 20, 2009)

Insulin resistance in adipocytes induced by tumor necrosis factor α (TNF α) has been analyzed by immunoelectron microscopy with special attention to the interaction between insulin receptor (IR) and ganglioside GM3 in plasma membranes. In normal adipocytes, most of the gold particles of GM3 molecules localized in the plane region with cluster formation and a small number of GM3 was detected in the surrounding area of caveolae. IR molecules were detected in caveolae region about 19% and the rest of IR were found in the plane region. The relative ratio of IR molecules localized in caveolae was greatly reduced by 20% when the state of insulin resistance was induced by TNF α , in which the amounts of GM3 in plasma membranes were up-regulated. Previously, we demonstrated that an inhibitor of ganglioside biosynthesis, D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol (D-PDMP), could normalize the impaired insulin signaling by blocking the increase of GM3 by TNF α . Here we could show that the decrease of IR molecules in caveolae region by TNF α was restored by D-PDMP. These observations strongly supports our working hypothesis concerning a new pathological feature of insulin resistance.

Key words — insulin resistance; adipocytes; GM3; caveolae; insulin receptor; electron microscopy

緒 言

肥満に伴うインスリン抵抗性発症が社会的問題となっている。インスリン抵抗性とは、正常な人のインスリン濃度に対して臓器や細胞の反応性が低下した状態と定義される。インスリン抵抗性は2型糖尿病の特徴的病態として重視されているばかりでなく、動脈硬化発症にかかわる病態である生活習慣病（高脂血症・高血圧症・高インスリン血症など）の原因ともなる。現代医療はインスリン抵抗性との戦いであるともいわれている。¹⁾

脂肪組織はインスリンの主要な標的器官の一つである。脂肪細胞はインスリンを細胞膜上のインスリン受容体 (IR) で受容し、細胞内の各シグナル系分子のリン酸化反応を開始することで細胞内にシグナルを伝達する (Fig. 1)。我々は、肥満による肥大化脂肪組織の慢性炎症状態における脂肪細胞インスリン抵抗性の発症機序として、炎症性サイトカイン tumor necrosis factor (TNF α) による GM3 の増加がカベオラからインスリン受容体を乖離させ、インスリンの代謝性シグナルを抑制することから、「2型糖尿病などの生活習慣病の病態は、スフィンゴ

糖脂質の異常発現によって細胞膜 (マイクロドメイン) の構成・構造および機能が変化し、シグナル伝達が異常になったマイクロドメイン病である」という新たな分子病態像を提唱している。²⁾

本研究ではこの説を形態学的に検証することを

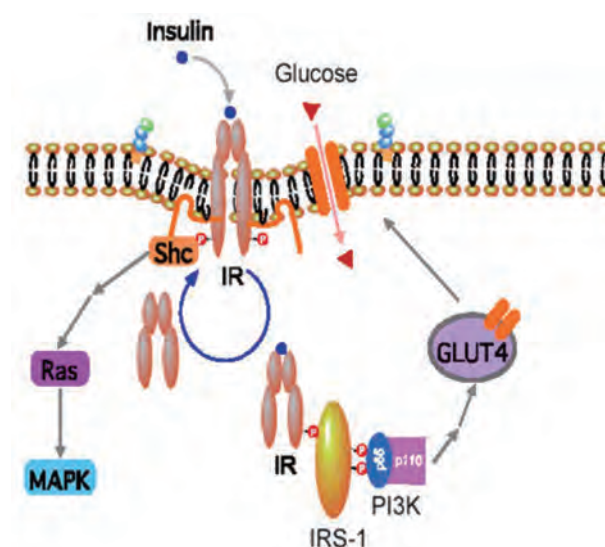


Fig. 1. Illustration of model on insulin signaling system in adipocyte

Dissociation of IR from caveolae disturb the insulin signaling.

目的とし、免疫電顕法を用いて、まず脂肪細胞株の細胞膜におけるガングリオシド GM3 とカベオラ構造との局在関係、カベオラ構造、カベオラマーカートンパク質 caveolin-1, IR 相互の局在関係を示した。そしてさらに、カベオラに近接する IR の比率の TNF α 及びスフィンゴ糖脂質合成阻害剤 D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol (D-PDMP) 処理による変化について検証した。

実験材料及び方法

試料

脂肪細胞株としてマウス 3T3-L1 を使用した。まず 10% calf serum 入り DMEM 中で 3 日間、次いで 10% fetal calf serum (FCS) 入り DMEM 中で培養し、コンフルエントに至らせた。脂肪細胞への分化誘導は、まずメディウム No.1 (10% FCS, 510 μ M 3-isobutyl-1-methylxanthine, 250 nM dexamethasone, 10 nM insulin を含む DMEM) 中で 48 時間、次いでメディウム No.2 (10% FCS, 10 nM insulin を含む DMEM) 中で 48 時間培養させることで行った。さらに 10% FCS 入り DMEM 中で 7-10 日間培養し、90%以上の細胞が内部に脂肪を蓄える状態となるまで分化させた。

インスリン抵抗性の誘導

インスリン抵抗性は、分化した 3T3-L1 を TNF α を含む DMEM (100 pM rat TNF α , 10% fetal serum bovine) 中で 96 時間培養することで誘導した。一部の試料は、TNF α に加えさらに D-PDMP (20 μ M) を含むメディウム中で同期間培養した。

免疫電顕試料の作製手順 (GM3 標識)

3T3-L1 をメディウム中に沈めたプラスチックシート (セルデスク LF, 住友ベークライト製) 上で培養し、パラホルムアルデヒド (4%, 0.1M リン酸緩衝液で希釈, 4 $^{\circ}$ C, 2 時間) で固定した。PBS で洗浄後、anti GM3 抗体 (GMR6, 生化学工業, 1:30 in PBS, 4 $^{\circ}$ C, 2 時間) と反応させた。PBS 洗浄の後、anti-IgM 抗体 (M8644, シグマ, 1:30 in PBS, 4 $^{\circ}$ C, 1 時間)、金コロイド結合プロテイン A (15 nm, BB International EM. PAG15, 1:30 in PBS, 室温, 2 時間) と反応させた。コントロール試料では anti-GM3 抗体を省いている。抗体標識の後、試料はグルタルアルデヒド (2.5%, 0.1 M リン酸緩衝液で希釈, 4 $^{\circ}$ C, 1 時間)、還元オスミウム固定液 (1% 四酸化オスミ

ウム, 1.5% フェロシアン化カリウム, 0.1 M カコジル酸緩衝液で希釈, 4 $^{\circ}$ C, 1 時間) で固定し、エタノール系列 (50% - 100%) で脱水、プロピレンオキシドを併用してエポキシ樹脂 (Quetol812, 日新 EM) を細胞中に浸透させた後重合 (60 $^{\circ}$ C, 48 時間) させた。樹脂に包埋された試料は薄切 (80nm 厚) し、クエン酸鉛染色液と 3 分間反応させ、電顕観察試料とした。

免疫電顕試料の作製手順 (Caveolin1, IR 標識)

電子顕微鏡観察用 Ni グリッドにフォルムバル膜を張り、さらにカーボンコーティング、イオンエッチング、ポリ-L-リジンコーティングを順に施した。培養ディッシュ中の 3T3-L1 を PBS で洗浄し、PBS を除いて露出した細胞層の上に上記グリッドをポリ-L-リジンコーティング面を下に向けて載せ、1 分静置した。ディッシュ内に PBS を静かに注ぐと、3T3-L1 の細胞膜が張り付いたグリッドが浮き上がる。これを直ちにパラホルムアルデヒド-グルタルアルデヒド固定液 (パラホルム 4% + グルタル 0.05%, 0.1 M リン酸緩衝液で希釈, 4 $^{\circ}$ C, 30 分間) で固定した。PBS 洗浄後、ブロッキング (1% BSA, 5% 正常ヤギ血清, 0.1% ゼラチン, PBS 希釈, 37 $^{\circ}$ C, 2 時間)、1 次抗体 (rabbit anti-caveolin1, Santa Cruz Biotechnology N20, 1 μ g/mL / rabbit anti-IR β , Santa Cruz Biotechnology C19, 4 μ g/mL, 上記ブロッキング液で希釈, 37 $^{\circ}$ C, 1 時間) と反応、PBS 洗浄の後 anti-IgG 金コロイド結合 2 次抗体 (12 nm, Jackson, 上記ブロッキング液にて 1:30 に希釈, 室温, 1 時間) と反応させた。PBS 洗浄の後グルタルアルデヒド (2.5%, 0.1 M リン酸緩衝液で希釈, 1 時間) 及びオスミウム酸 (1%, 0.1 M カコジル酸緩衝液で希釈, 室温, 10 分間) で固定、酢酸ウラン染色液で 10 分間染色の後エタノール系列 (50% - 100%) と t-ブチルアルコールで脱水から凍結乾燥を経て電顕観察試料とした。

電子顕微鏡観察と金粒子の統計処理

作製した試料は透過型電子顕微鏡 (JEM-1010, 日本電子) で観察した。カベオラと結合した IR を抗体-金粒子標識観察した場合には、観察される金粒子とカベオラとの間に最大で 40 nm の隙間が観察される。これは、caveolin-IR-IgG-IgG-gold と 3 個のタンパク質分子を介在して結合するためである。本観察ではカベオラの輪郭と金粒子との間に約 24 nm までのすき間がある金粒子をカベオラと結合しているとみなしてカウントした。またカベオラと GM3

の共局在の可能性を調べる際には同様の理由により、カベオラ内部及びカベオラ開口部から 30 nm までのすき間のある金粒子数を、カベオラに含まれる GM3 と結合した金粒子としてカウントした。

カベオラと IR の局在関係に対する TNF α 及び D-PDMP の影響の検証法は以下のとおりである。まず、各試料を $\times 20,000$ で写真撮影し、各写真に含まれる金粒子数をカウントした。次に、各試料の写真 1 枚あたりのカベオラ隣接金粒子数の平均値を算出した。これらの平均値について、正常試料と TNF α 処理試料、及び TNF α 処理試料と TNF α + D-PDMP 処理試料間でそれぞれで student t-test により $P < 0.05$ で有意差検定を行った。

実験結果

GM3 標識脂肪細胞の電子顕微鏡観察

脂肪細胞はほかの多くの細胞種と異なり、全体的に丸い形態を示す。細胞内部に複数の脂肪滴を含む

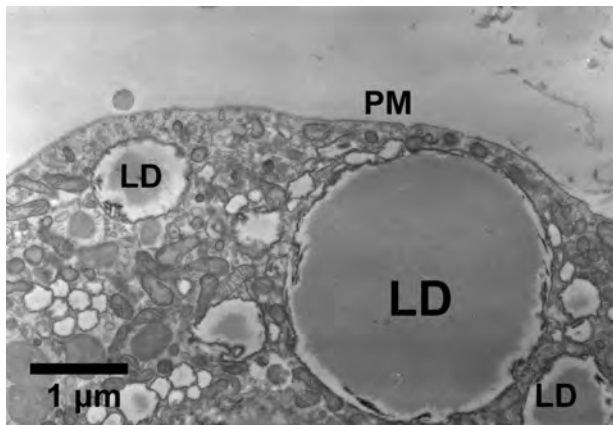


Fig. 2. Low magnification section image of 3T3-L1 adipocyte

Round shape of cell body and large lipid droplets in cell body are characteristic. PM: plasma membrane, LD: lipid droplet, Day 14 after induction of differentiation, fixed with 4% formaldehyde.

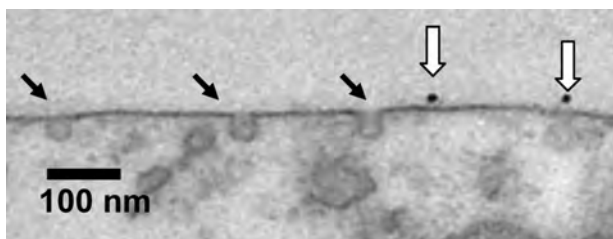


Fig. 3. Immunoelectron microscopy of GM3 molecules labeled with gold particles (\Rightarrow)

Invasions of plasma membrane (\rightarrow) indicate caveolae. There are many gold particles near caveolae, but are not seen in caveolae.

(Fig. 2). 細胞表面の拡大像 (Fig. 3) では、細胞膜が直径 50~80 nm ほどの壺状に陥入した構造が 3 個見える。これがカベオラ構造である。また細胞膜直上に 2 個ある黒い点は、GM3 に抗体を介して結合した金粒子である。カベオラの周辺領域に存在している GM3 に結合した金粒子の個数を計数した結果、85% はカベオラ内部及びカベオラ開口部から 30 nm までの距離には存在せず、細胞膜の平坦部に存在していた (Fig. 4)。この結果は、生化学的実験による、カベオラを多く含む分画と GM3 を多く含む分画とは別であるという報告³⁾を支持する。また、多くの金粒子は 3~10 個のクラスター構造を示していた (Fig. 5)。この結果は線維芽細胞、MDCK II 細胞などで GM3 は直径数百 nm のクラスター構造を取っているという報告⁴⁵⁾と同様の所見である。このほか、脂肪細胞として同様な形態を示しているにも拘らず、GM3 標識金粒子数が著しく異なる細胞がみられた (Fig. 6)。

Caveolin-1 及び IR 標識細胞膜の電子顕微鏡観察

脂肪細胞の細胞膜アピカル (頂端) 面を、グリッド上に張ったフォルムバル膜面に張り付けた全体の電子顕微鏡写真を Fig. 7 に示す。拡大すると、直径 100 nm 以下の丸い構造体が多数観察された。

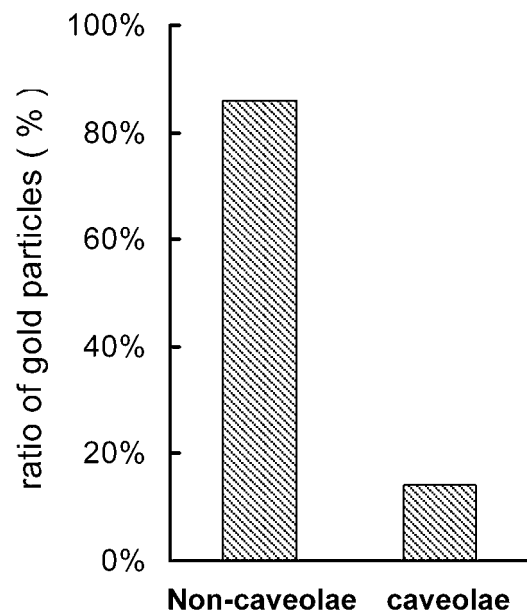


Fig. 4. The relative ratio of GM3 molecules on the distribution between caveolae and non-caveolae regions

GM3 molecules labeled with gold particles localized within 30 nm distance from caveolae were defined as caveolae localized GM3 and the others were flat-membrane GM3.

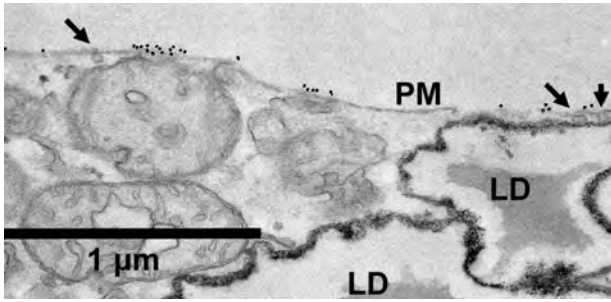


Fig. 5. The cluster formation of GM3. Arrows (↓) indicate caveolae

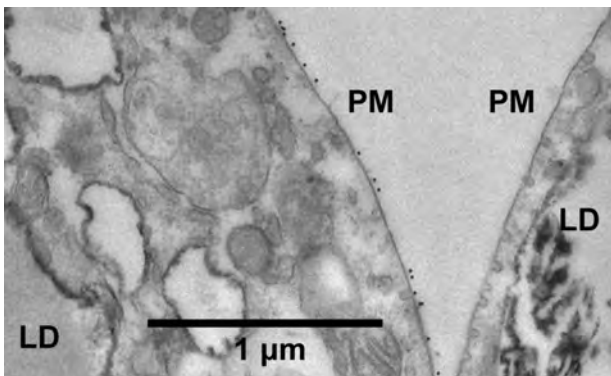


Fig. 6. Distinct difference on the expression levels of GM3 among adipocytes
Right cell have no GM3 molecules labeled with gold particles.

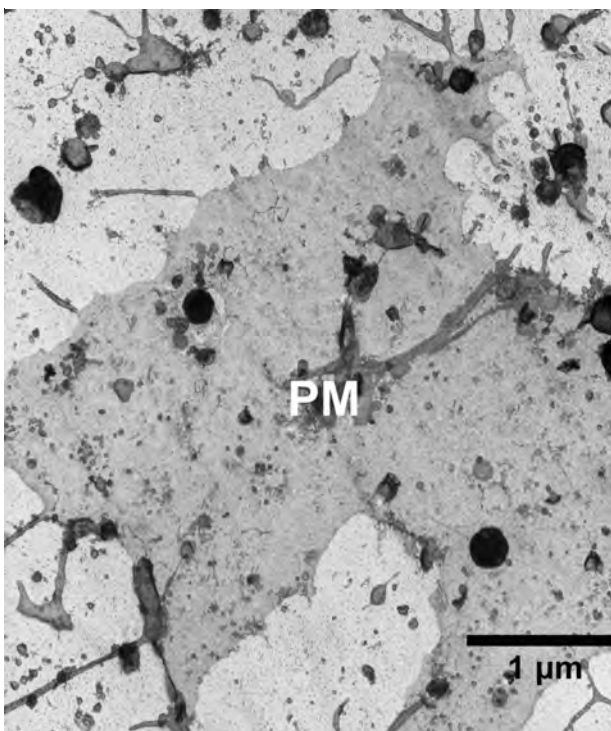


Fig. 7. A low Magnification image of stripped plasma membrane

Center region colored dark gray is plasma membrane attaching to formvar (resin) membrane. Many dots seen in plasma membrane are caveolae.

Anti-caveolin-1 で標識を行ったところ、金粒子のほぼすべてがこの丸みに結合したことから、この構造体がカベオラであると特定できた (Fig. 8). 次に、Anti-IR を用いて同様に標識を行った (Fig. 9). IR を示す金粒子の数密度は $2.0 \text{ 個}/\mu\text{m}^2$ で、caveolin-1 を示す金粒子のそれより少なかった. 大半の金粒子は細胞膜の平坦部にあったが、うち 19% はカベオラ及びその外周より 20 nm 以内の領域に位置していた (Fig.10). この領域内の金粒子は caveolin-1 と結合している IR の存在を示しているものと考えられる. その根拠としては、12 nm の金粒子の局在は結合した抗体分子の長さの分だけ、実際の分子の位置より離れて見えることである. 次に TNF α を作用させ GM3 量を増加させた細胞、TNF α と D-PDMP を共に作用させ GM3 の上昇を抑制した細胞のそれぞれと正常細胞との間で caveolin-1 と近接している IR 標識金粒子の個数に変化が見られるかどうかを

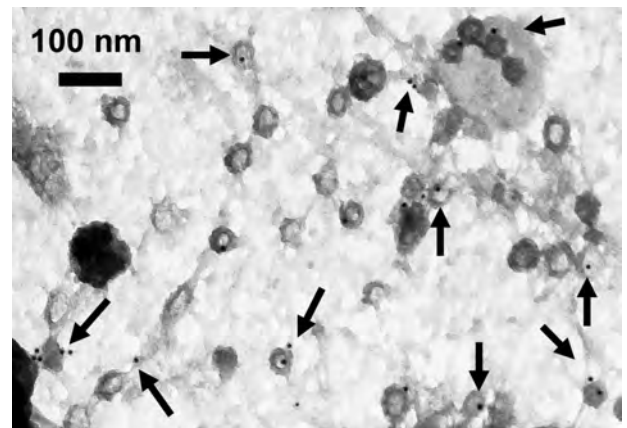


Fig. 8. Caveolin-1 molecules on a high magnification image of plasma membrane

Caveolin-1 molecules labeled with gold particles (↓) exclusively localized in caveolae.

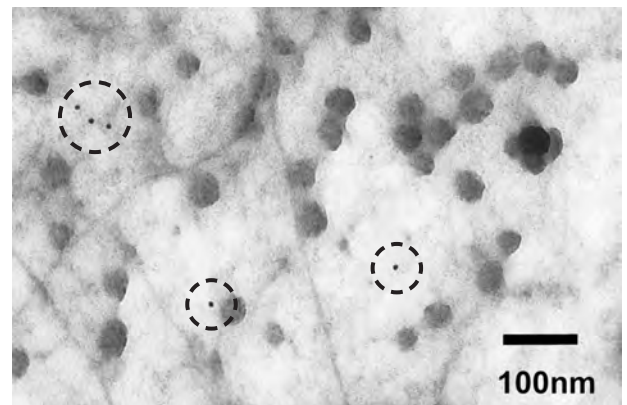


Fig. 9. Distribution of IR molecules labeled with gold particles in normal adipocytes

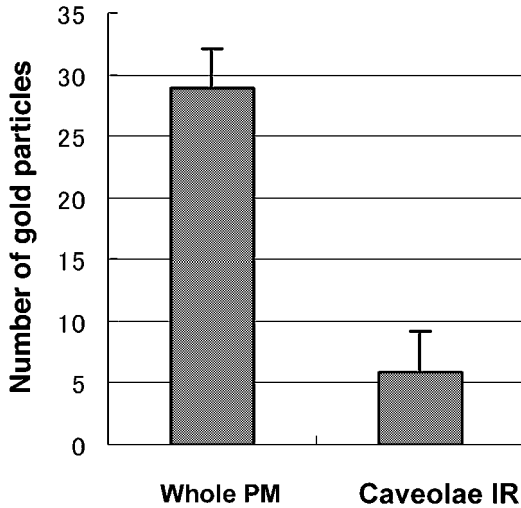


Fig. 10. The numbers of IR molecules in caveolae region
 IR molecules labeled with gold particles localized within 20 nm distance from caveolae were defined as caveolae localized IR. within 20 nm distance from caveolae were defined as caveolae localized IR and the others were flat-membrane IR.

調べた (Fig.11). 写真一枚当りにある金粒子数はいずれの試料でも少ないが、正常試料に対して TNF α 処理試料ではその個数は減少した。さらに D-PDMP を加えた試料では、減少は抑制された。これは同様の培養条件で行った生化学実験の結果を支持する。⁶⁾

考 察

これまで筋肉や肝臓におけるインスリン抵抗性発症メカニズムについては様々な面から研究がなされてきたが、脂肪細胞においては未解明の部分が多かった。これまでに我々の研究室などにより、肥満時に脂肪組織において TNF α mRNA が増加すること、⁷⁾ 脂肪細胞に TNF α をインスリン抵抗性誘導可能な濃度で投与するとガングリオシド GM3 が増加する、また GM3 は IR と下流のシグナル分子 IRS-1 との相互作用を阻害すること、⁸⁾ GM3 の増加に伴い IR はカベオラを含む Detergent resistant membrane microdomain (DRM) 分画から減少するが、スフィンゴ脂質合成阻害剤 D-PDMP を GM3 合成阻害可能な濃度で処理すると、カベオラドメインに IR が戻ってくる、⁶⁾ などが主に生化学的実験で示されている。さらに、GM3 がカベオラと IR との相互作用を阻害する際の分子メカニズムとしては、IR β サブユニットの細胞膜直上のリジン残基と GM3 のシアル酸残基の静電的相互作用であることが、免疫沈降法及び光感受性 GM3 を用いた架橋実

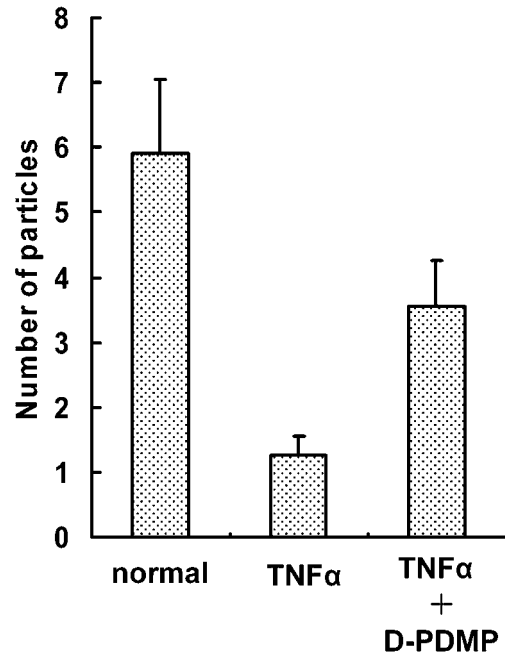


Fig. 11. The restoration of the impaired IR localization by TNF α in caveolae by the treatment of D-PDMP

験など⁹⁾ により示している。しかし、生化学的に細胞膜成分を分画する手法では IR の DRM 分画からの分離が使用する界面活性剤の濃度に依存することから、実際の生細胞の状況を直接反映する現象を理解することはできない。また、生細胞での画像計測法の一手法である Fluorescent Recovery After Photo bleaching (FRAP) 法では、カベオラと IR の相互作用を直接見出すことはできない。⁹⁾ そこで本研究では、上記の研究に引き続き新たに免疫電子顕微鏡法を用いて、形態学的側面から定量的アプローチを試みた。

免疫電顕法での GM3 局在解析はこれまで線維芽細胞、リンパ球、MDCK II 細胞などで行われており、^{4,5)} いずれの細胞でも GM3 局在を示す金粒子は細胞膜上で直径 0.20 μ m ほどのクラスターを組んでいることが示されていた。今回、脂肪細胞株 3T3-L1 での GM3 局在解析を行ったが、ここでも GM3 は同様なクラスターを形成する傾向があることがわかった。このクラスターは、細胞機能に対し重要な役割を果たすと指摘されている糖スフィンゴ脂質を中心とした流動的な微小領域である、glycosphingolipid enriched membrane microdomains (GEM) を示すものと考えられる。一方、非流動的な領域であるカベオラにおける GM3 の存在に関しては一致した見解が得られていない。^{3,10)} 今回の実験では、カベオラ内

IR とカベオラとの関係とその根拠の一覧

現象	実験的根拠
IR と caveolin-1 の直接結合	IR β サブユニットの caveolin 結合配列の存在
	IR と caveolin-1 の免疫共沈降
IR と caveolin-1 の共局在	シヨ糖密度勾配遠心法による低密度比重画分への集積
	蛍光顕微鏡による間接蛍光抗体染色
	蛍光顕微鏡による金コロイド抗体の共局在
カベオラを介するインスリンシグナル	インスリン刺激による caveolin-1 のチロシンリン酸化
	caveolin-1 KO マウスは脂肪組織特異的に IR を安定発現できずにインスリン抵抗性を惹起する
	コレステロール除去によるカベオラ構造の破壊はインスリン代謝性シグナルを抑制する
	GM3 の増加は IR を DRMs から解離し IR-IRSI シグナルを抑制する 生細胞イメージングを用いた IR-caveolin-1 複合体の GM3 による解離の証明

に GM3 標識金粒子の存在はほとんど認められなかった. さらに GM3 と金粒子との間に存在する抗体分の直径も考慮してカベオラ開口部から 30nm までの領域内に存在する金粒子も数えたが, それでも GM3 の粒子数は全体の 15% であった. 以上より, GM3 マイクロドメインとカベオラとは別々のドメインを形成するとするのが妥当と考えられ, 少なくとも GM3 がカベオラに集中する傾向は否定される. 同様に脂肪球を蓄えているにも関わらず, GM3 金粒子がほとんど観察されない脂肪細胞が観察された. GM3 の発現レベルが個々の細胞ごとに差があるのであれば, インスリンシグナルの伝達性もまた細胞ごとに異なる可能性がある. 同様の現象は線維芽細胞においても確認されており, 増殖する細胞は GM3 を発現しないという.⁴⁾ 一方, 分化した脂肪細胞はほとんど増殖しないため, 今後脂肪細胞における原因を解明する必要がある.

Caveolin-1 及び IR の免疫電顕観察においては樹脂切片法ではなく「膜はがし法」¹¹⁾ を使用した. この方法では細胞膜を平面的に観察するため, IR のような比較的希少な抗原の局在観察も可能となる. 細胞膜表面には多数の丸い構造体が観察され, この構造体に caveolin-1 存在を確認したことからカベオラ構造を確認した. 金粒子は特にカベオラの外縁部に多く存在したため, caveolin はカベオラの開口部から側面部にかけて存在すると考えられる. IR にはカベオリン結合ドメインがあり,¹²⁾ ここで caveolin と相互作用している IR にインスリンの代謝性シグナルを伝える. だが, IR がカベオラに局在しているかについては相反する報告がなされていた.^{13,14)} 本研

究での IR 標識観察では, 金粒子はカベオラ以外の膜領域に多く観察され, 一部 (全 IR の 19%) のみがカベオラ外縁部に近接していた. これはカベオラ-IR 共局在について否定的な結果に思える. しかし, IR は定常的にカベオラに存在する / しないということではなく, 生細胞中では細胞膜を拡散する過程で全 IR 分子集団での平均として一定時間だけカベオラに結合しており, その IR のみがシグナリングに関わっている, と考えるのが妥当である. そして「GM3 の増加に伴うカベオラ-IR 間相互作用阻害によるインスリン抵抗性発症モデル」は, カベオラと非カベオラ領域間での IR 局在比の平衡を非カベオラ側へ変化させることで生じると考えられるのである. FRAP 実験からもこの可能性を支持する結果が報告されている.⁶⁾ 以上の考えに基づきカベオラ近接金粒子の数が TNF α 及び D-PDMP の作用により変化するか検証したところ, TNF α によりインスリン抵抗性状態を誘導した場合, GM3 の増加に伴ってカベオラに近接した IR の金粒子数は減少した. さらに D-PDMP で TNF α による GM3 の増加を抑制し, インスリン抵抗が解除された状態では, IR のカベオラへの局在が回復することを電子顕微鏡を用いて初めて実証した.

結 び

本研究では, 脂肪細胞の TNF α によるインスリン抵抗性発症メカニズムについて, 本研究室で進められてきた生化学, 生細胞蛍光観察での知見をさらに深めるべく免疫電顕法による局在観察を行った.

GM3は細胞膜上の非カベオラ領域でクラスター構造を形成していた。カベオラに近接するIRの個数は、TNF α 処理で減少したが、D-PDMPとの併用では減少が解除された。これは、「脂肪細胞においてTNF α の作用により増加したGM3がカベオラよりIRを分離させる割合を増加させるためにインスリン代謝性シグナル伝達を阻害する」という我々の説を実証するものである。本研究で得られた知見が、新たなインスリン抵抗性発症機序解明の一助となることが期待される。

インスリン抵抗性改善効果が示されたD-PDMPの経口投与可能なアナログは、現在新規糖尿病薬として臨床応用が進められつつある。¹⁵⁾

REFERENCES

- 1) Alberti K.G., Zimmet P., Shaw J., *Nature*, **414**, 782–787 (2001).
- 2) Inokuchi J., *FEBS Lett.*, “in press.”
- 3) Iwabuchi K., Handa K., and Hakomori S., *J. Biol. Chem.*, **273**, 33766–33773 (1998).
- 4) Visco V., Lucania G., Sansolini T., Dolo V., Garofalo T., Sorice M., Frati L., Torrisi MR., Pavan A., *Histochem. Cell Biol.*, **113**, 43–50 (2000).
- 5) Chigorno V., Palestini P., Sciannamblo M., Dolo V., Pavan A., Tettamanti G., Sonnino S., *Eur. J. Biochem.*, **267**, 4187–4197 (2000).
- 6) Kabayama K., Sato T., Kitamura F., Uemura S., Kang B. W., Igarashi Y., and Inokuchi J., *Glycobiology*, **15**, 21–29 (2005).
- 7) Hotamisligil G. S., Shargill N. S., Spiegelman B. M., *Science*, **259**, 87–90 (1993).
- 8) Tagami S., Inokuchi J., Kabayama K., Yoshimura H., Kitamura F., Uemura S., Ogawa C., Ishii A., Saito M., Ohtsuka T., Sakaue S., and Igarashi Y., *J. Biol. Chem.*, **277**, 3085–3092 (2002).
- 9) Kabayama K., Sato T., Saito K., Loberto N., Prinetti A., Sonnino S., Kinjo M., Igarashi Y., Inokuchi J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 13678–13683 (2007).
- 10) Ortegren U., Karlsson M., Blazic N., Blomqvist M., Nystrom FH., Gustavsson J., Fredman P., Strålfors P., *Eur. J. Biochem.*, **271**, 2028–2036 (2004).
- 11) Voldstedlund M., Tranum-Jensen J., Vinten J., *J. Membr. Biol.*, **136**, 63–73 (1993).
- 12) Couet J., Li S., Okamoto T., Ikezu T., Lisanti MP., *J. Biol. Chem.*, **272**, 6525–6533 (1997).
- 13) Gustavsson J., Parpal S., Karlsson M., Ramsing C., Thorn H., Borg M., Lindroth M., Peterson KH., Magnusson KE., Strålfors P., *FASEB J.*, **13**, 1961–1971 (1999).
- 14) Souto RP., Vallega G., Wharton J., Vinten J., Tranum-Jensen J., Pilch PF., *J. Biol. Chem.*, **278**, 18321–18329 (2003).
- 15) Zhao H., Przybylska M., Wu IH., Zhang J., Siegel, C., Komarnitsky S., Yew NS., Cheng SH., *Diabetes*, **56**, 1210–1218 (2007).