

【トピックス】

## 肥満症脂肪組織におけるリソソーム機能障害とオートファジーに与える影響

水之江 雄平<sup>1,2</sup>、須藤 結香<sup>1,2</sup>、平岡 秀規<sup>1</sup>、沖田 直之<sup>2,3</sup>、樋上 賀一<sup>1,2</sup>

1. 東京理科大学大学院薬学研究科 分子病理・代謝学研究室
2. 東京理科大学総合研究院トランスレーショナルリサーチセンター
3. 公益財団法人 佐々木研究所

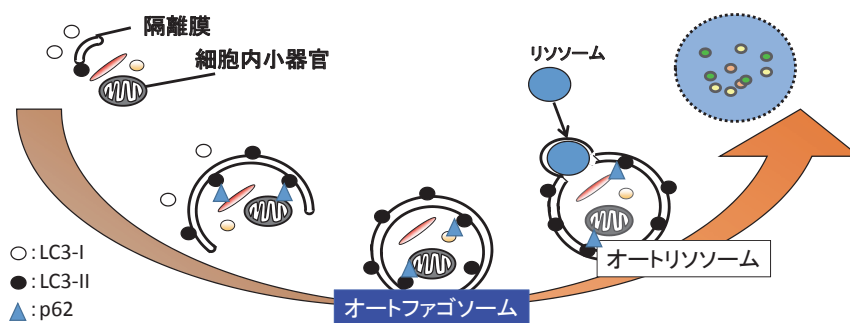


図1. オートファジーのメカニズム

飢餓などの刺激が起こると、隔離膜が細胞内小器官やタンパク質を取り囲み、リソソームと結合することで内容を分解する。

### 1. はじめに

今日我が国では、肥満症やそれを基盤として発症する生活習慣病の罹患者数が増加傾向にあり、メタボリックシンドロームという概念の浸透とともに社会問題となりつつある [1, 2]。肥満とはエネルギー摂取と消費のバランスの崩壊により誘発され、エネルギー貯蔵の場である脂肪細胞に余剰エネルギーを triglyceride (TG) として過剰に蓄積した状態で、肥満症患者の脂肪組織では脂肪細胞の肥大化と増加が観察される。近年、脂肪細胞はエネルギー貯蔵だけではなく、様々な生理活性物質であるアディポカインを分泌することが明らかとなってきた [3-4]。肥満症の脂肪細胞ではこの分泌バランスが崩壊し、善玉アディポカイン（アディポネクチンなど）の分泌は減少し、悪玉アディポカイン（TNF $\alpha$ 、PAI-1 など）の分泌が増加することで、結果的にインスリン抵抗性や

慢性炎症を惹起し、ひいては生活習慣病の原因となる [3, 4]。よって、脂肪細胞の恒常性維持は生体にとって極めて重要である。

オートファジーは、ユビキチン・プロテアソーム系と並ぶ細胞内の分解機構であり、細胞の生存、分化、発達、恒常性の維持に重要な役割を担っている [5, 6]。この機構ではまず隔離膜とよばれる膜構造体が自己の細胞内タンパク質や傷害を受けたオルガネラなどを包み込む。この隔離膜で囲まれた構造体はオートファゴソームと呼ばれ、リソソームと融合することでオートリソソームとなった後、隔離膜内の内容を分解する [図1]。このオートファゴソーム形成からオートリソソームによる分解までの一連の流れは‘オートファジーフラックス’と呼ばれ、オートファジーの亢進・抑制を判断するためにはオートファジーフラックスを正確に評価することが重要である。LC3-Iは、オートファジー誘導時にリン脂質と結合することでLC3-IIへと変換される。また、p62はオートファゴソーム形成部位に局在し、オートファジーにより選択的に分解される基質である。それゆえ、LC3-IIタンパク質の蓄積（増加）やp62タンパク質の分解（減少）がオートファジーのマーカーとして広く用いられている [7, 8]。近年では、様々なオートファジー遺伝子欠

連絡先：〒 278-8510

千葉県野田市山崎 2641

TEL：04-7124-1501（代）内線 6535-653

FAX：04-7121-3676

E-mail：3B14704@ed.tus.ac.jp

損マウスが作製され、オートファジーの異常が癌や神経変性疾患、代謝性疾患など様々な病態に関連することが示されてきた。それゆえオートファジーが生体の恒常性維持や種々の病態に及ぼす影響をより詳細に検討することは、重要な研究課題の一つである [6, 9-10]。

当研究室では、肥満症マウスの脂肪組織や、分化を誘導した脂肪細胞を用いてオートファジーフラックスを解析した。その結果、肥満の進行に伴ってオートファゴソームが顕著に増加することを見出し、オートファジーが肥満症の病態に関わる可能性を報告した[11]。そこで、肥満症脂肪組織におけるオートファジーの障害に関するより詳細な解明を目指して、研究を行った。本稿では我々が見出した知見をベースに、オートファジーにおいて最終的な分解過程を担うリソソーム機能に焦点を当てて解説する。

## 2. 肥満症とオートファジー

1993年に酵母のオートファジーに必須のオートファジー遺伝子が同定されて以来、酵母や線虫においてオートファジーの分子メカニズムに関する研究が急速に発展をとげてきた[5, 6]。しかしながら、*in vivo*においてオートファジーを解析することが困難なことから、様々な病態にオートファジーの障害がどのように関連するかは、未だ不明な点も多い [12]。

多くの臓器で肥満症がオートファジー機能に影響を及ぼすことはすでに報告されているものの、その影響は相反する結果となっている。肝臓では肥満症病態においてオートファジー機能が低下して、それがインスリン抵抗性の惹起につながると報告されている [13]。一方、膵臓では肥満症にともなってオートファジー機能が亢進して、ランゲルハンス島の機能維持に貢献していることが示されている[14]。肥満症脂肪組織におけるオートファジーについては主としてヒトの脂肪組織を用いて解析されてきた。Ostらは、肥満症脂肪組織において、オートファゴソームが増加すること、オートファジー阻害剤を用いたLC3 turnover assayによりオートファジーフラックスが亢進していることを報告した [15]。同様にKovsanらは肥満患者の内臓および皮下脂肪を用いてオートファジーを解析したところ、オートファジーフラックスの亢進がみられること、内臓脂肪組織においてそれが顕著であることを明らかとした [16]。しかしながら、肥満症マウスを用いた解析では、肥満症の進行にともないオートファジー機能が低下することが報告されている [17]。当研究室においても、肥満症マウスの脂肪組織ではオートファジーフラックスが低下していた [11]。これらの結果では、すべて肥満症の脂肪組織においてオートファゴソーム数が増加するという点では一致している。しかしながら、それがオートファゴソームの蓄積を意味するのか、オートファジーフラックスの亢進を意味するのかは、オートファジー基質の発現レベルや、その評価方法の違いなどから議論の余地がある。そこで我々は、過去の報告においてオートファゴソーム形成は共通している点から、リソソームの機能障害によりオー

トリソームの分解が低下しているのではないかという仮説のもと解析を進めた。

## 3. 肥満症とリソソーム機能

リソソームは多数の加水分解酵素を含む酸性オルガネラであり、その役割はエンドサイトーシスからエキソサイトーシス、オートファジー、細胞内代謝と多岐にわたる [18, 19]。リソソーム機能は膜タンパク質、含有加水分解酵素、リソソーム内 pH により制御されており、リソソーム酵素異常が引き金となって生じる lysosomal storage disease はリソソーム病として代表的な疾患である。また、近年では神経変性疾患や肥満症においてもリソソーム機能不全が生じることが明らかとなってきた [20, 21]。特に肥満症の肝臓ではリソソーム pH の低下やカテプシンの異常によりオートファジークリアランスが低下することも報告されている [21]。一般的にカテプシンなどのリソソームプロテアーゼは小胞体で合成・修飾されたのち、リソソームへ輸送される。リソソームに至ったプロテアーゼはその内腔の酸性環境下（一般的にリソソーム pH は 5 以下）で他のプロテアーゼや自身の活性によりプレペプチドが切断され活性型となる (maturation) [22]。我々は経時的に高脂肪食 (high-fat diet: HFD) を摂餌させたマウスの脂肪組織を解析した。その結果、活性型カテプシン L が優位に減少し、前駆型が増加する maturataion 異常を認め、同時に酵素活性も低下していた。一方、カテプシン B のタンパク質発現量や酵素活性は増加していた。脂肪細胞 3T3-L1 にカテプシン L の阻害剤を処置した解析においても、カテプシン B の活性が代償的に増加した。カテプシン B の発現増加は、リソソーム膜の不安定性 lysosomal destabilization を引き起こし、前アポトーシス状態となることが報告されている [23, 24]。実際に我々はカテプシン B の発現増加と相関して活性型マクロファージのマーカー (CD11c) が増加することを確認している [図 2]。つまり、この“カテプシンアンバランス”による

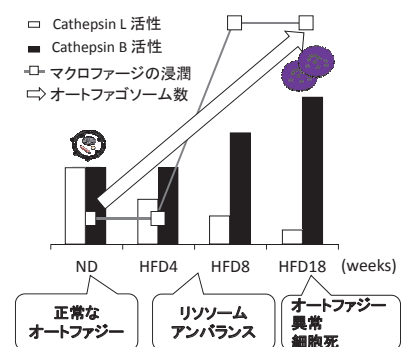


図2. 高脂肪食摂餌による脂肪組織におけるオートファゴソームの蓄積、リソソーム機能の変化とマクロファージの浸潤の経時的変化

高脂肪食 (HFD) によりカテプシン L の活性低下が先行して、それに引き続きカテプシン B 活性の増加やオートファゴソームの蓄積、活性型マクロファージマーカーである CD11c 発現の増加が観察される。

リソソーム機能障害が、一方では分解活性の低下によるオートファゴソームの蓄積となり、他方では lysosomal membrane permeabilisation (LMP) から前アポトーシス状態、ひいては細胞死へと繋がり、その結果、活性型マクロファージの浸潤が亢進するのではないかという可能性を考えている。

### おわりに

以上をまとめると、肥満症の脂肪組織では何らかの要因（リソソーム pH の上昇、内在性阻害剤の増加等）によりカテプシン L の maturation が低下し、活性が低下する。それによりカテプシン B が代償的にタンパク質レベルで増加し、さらに活性も上昇する。これらリソソーム機能の不安定性がオートファジー機能障害によるオートファゴソームの蓄積や前アポトーシス状態につながる。肥大化した脂肪細胞におけるオートファゴソームの蓄積は、アディポカイン分泌プロファイルを増悪させると報告されている [17]。また、肥満症脂肪組織でのアポトーシスの増加は活性型マクロファージのリクルートを促進し、活性型マクロファージから分泌される炎症性サイトカインは肥大化した脂肪細胞の機能低下や細胞死を誘導し、いわゆる悪性サイクルに陥る可能性が示唆される [図 3]。

代謝性疾患とリソソーム機能という点に着目した研究は少ない。今後は、脂肪組織のみではなく肝臓や骨格筋などにおいてもより詳細に解析することで、代謝性疾患の病態解明につなげたい。

### 参考文献

1. Yusuf, S., Hawken, S. and Ounpuu, S. et al. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet*. 366 :1640-9, 2005.
2. Mokdad, A.H., Ford, E.S. and Bowman, B.A. et al. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA*. 289 :76-9, 2003.
3. Ouchi, N., Parker, J.L. and Lugus, J.J. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* 11 :85-97, 2011.
4. Gnanińska, M., Małgorzewicz, S. and Stojek, M. et al. Role of adipokines in complications related to obesity: a review. *Adv. Med. Sci.* 54 :150-7, 2009.
5. Levine, B. and Kroemer, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 132 :27-42, 2008.
6. Mizushima, N. and Komatsu, M. Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell*. 147 :728-41, 2011.
7. Tanida, I., Minematsu-Ikeguchi, N. and Ueno, T. et al. Lysosomal turnover, but not a cellular level of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy*. 1 :84-91, 2005.
8. Moscat, J. and Diaz-Meco, M.T. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell*. 137 :1001-4, 2009.
9. White, E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 12 (6) :401-10, 2012.

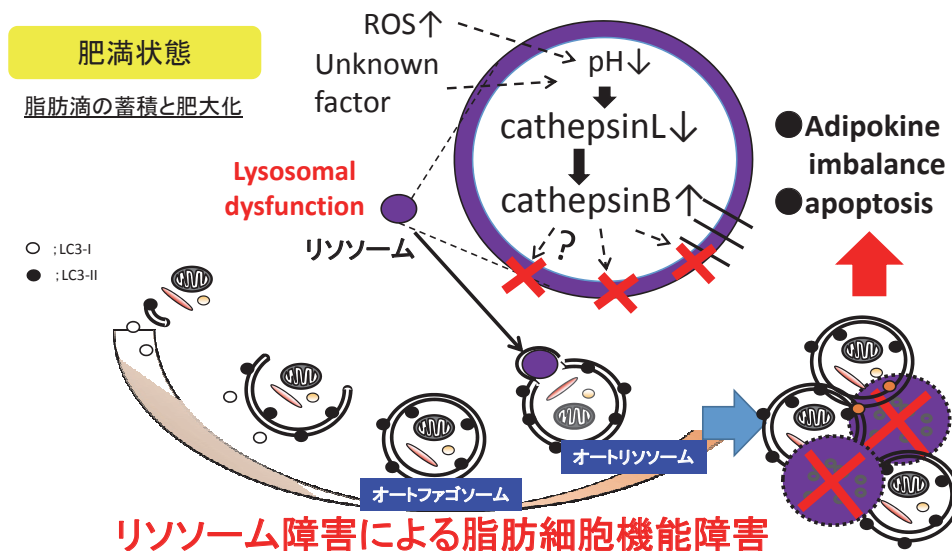


図3. 肥満症脂肪組織におけるリソソーム機能障害とオートファジー不全

肥満症の脂肪組織では何らかの要因によりカテプシン L の maturation が低下し、活性が低下する。それによりカテプシン B が代償的にタンパク質レベルで増加し、さらに活性も上昇する。この ‘カテプシンアンバランス’ がリソソーム機能障害となり、オートファジー分解活性の低下につながる。オートファジー機能障害は、脂肪細胞内におけるオートファゴソーム蓄積としてあらわれ、これらはアディポカイン分泌プロファイルの増悪やアポトーシスの増加によるマクロファージの浸潤へと至る。

10. Zhu, J. and Chu, C. T. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *J Alzheimers Dis.* ;20 Suppl 2 : S325-34, 2010
11. Mikami, K., Okita, N. and Tokunaga, Y. et al. Autophagosomes accumulate in differentiated and hypertrophic adipocytes in a p53-independent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 427 : 758-63, 2012.
12. Perry, C.N., Kyoji, S. and Hariharan, N. et al. Novel methods for measuring cardiac autophagy in vivo. *Methods Enzymol.* 453 : 325-42, 2009.
13. Yang, L., Li, P. and Fu, S. et al. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metab.* 11 (6) : 467-78, 2010.
14. Ebato, C., Uchida, T. and Arakawa, M. et al. Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metab.* 8 (4) : 325-32, 2008.
15. Ost, A., Svensson, K. and Ruishalme, I. et al. Attenuated mTOR signaling and enhanced autophagy in adipocytes from obese patients with type 2 diabetes. *Mol. Med.* 16 : 235-46, 2010.
16. Kovsan, J., Blüher, M. and Tarnovskii, T. et al. Altered autophagy in human adipose tissues in obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96 : E268-77, 2011.
17. Yoshizaki, T., Kusunoki, C. and Kondo, M. et al. Autophagy regulates inflammation in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417 : 352-7, 2012.
18. Saftig, P. and Klumperman, J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins : trafficking meets function. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 10 (9) : 623-35, 2009
19. Settembre, C., Fraldi, A. and Medina, D. L. et al. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 14 (5) : 283-96, 2013.
20. Dehay, B., Martinez-Vicente, M. and Caldwell, G. A. et al. Lysosomal impairment in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 28 (6) : 725-32, 2013.
21. Inami, Y., Yamashina, S. and Izumi, K. et al. Hepatic steatosis inhibits autophagic proteolysis via impairment of autophagosomal acidification and cathepsin expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412 : 618-25, 2011.
22. Turk, V., Stoka, V. and Vasiljeva, O. et al. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta.* 1824 (1) : 68-88, 2012.
23. Gornicka, A., Fettig, J. and Eguchi, A. et al. Adipocyte hypertrophy is associated with lysosomal permeability both in vivo and in vitro: role in adipose tissue inflammation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 303 : E597-606, 2012.
24. Guicciardi, M. E., Deussing, J. and Miyoshi, H. et al. Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest.* 106 (9) : 1127-37, 2000.