

第 64 回日本産科婦人科学会・学術講演会

## シンポジウム 2: 周産期「妊娠とインスリン抵抗性」

## エストロゲン・プロゲステロンによるインスリン抵抗性

富山大学大学院医学薬学研究部病態制御薬理学

助教 和田 努

## Insulin Resistance Induced by Estrogen and Progesterone

Tsutomu WADA

Department of Clinical Pharmacology, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Science for Research,  
University of Toyama, Toyamaはじめに

生活習慣の欧米化や晩婚化に伴い、妊娠糖尿病の罹患率は増加している。2010 年度には本邦において診断基準が国際標準と統一され、妊娠糖尿病は社会的にも関心を集めている。妊娠糖尿病は周産期・新生児合併症を増加させるだけでなく、母体の糖尿病発症、さらには児の将来の肥満や糖尿病発症にも影響することから、その病態生理の解明は効果的な予防法や治療対策を推進するうえで重要である。妊娠中に認められるインスリン抵抗性は本来胎児に適切に栄養を供給するための機構であるが、過度のインスリン抵抗性は母体の妊娠糖尿病発症に関わる。妊娠糖尿病の血糖コントロールは特に妊娠後期に悪化しやすく、またこの時期には胎盤由来のさまざまなホルモンや生理活性物質の分泌も増加する。妊娠中のインスリン抵抗性誘導にはこれらの因子の関与が想定されてきたが、その詳細な機序は不明な点も多い。一方、閉経女性やエストロゲン作用が欠損したマウスにおいてもインスリン抵抗性が認められる。これらは一見矛盾する知見であるが、生理的濃度のエ

ストロゲンはインスリン感受性を高め、妊娠中に認められる高エストロゲンはインスリン抵抗性を誘導するという、エストロゲンの濃度依存的な二相性の作用特性に起因している。またプロゲステロンの糖代謝への影響とメカニズムを直接検討した報告はほとんどなく、その関与も不明な点が多い。そこで本研究ではエストロゲン(E<sub>2</sub>)およびプロゲステロン(P<sub>4</sub>)がインスリン感受性に及ぼす影響とその分子メカニズムを、代表的なインスリンの標的細胞である脂肪細胞を用いて検討した。また著者は近年注目されている視床下部を起点としたエストロゲンの中枢性代謝制御機構についても検討しており、最近の成績を紹介する。

妊娠中のインスリン抵抗性の意義と、  
胎盤ホルモンの血中濃度推移

2 型糖尿病におけるインスリン抵抗性は、インスリン分泌低下を含む相対的なインスリン作用の低下とともに病態の基盤を形成する因子である。これに対し、妊娠中の母体におけるインスリン抵抗性は、胎児側へ効率的に栄養素を供給するためのシステムとして重要である<sup>1)</sup>。図 1 に母体・胎児

Key Words: Cbl-TC10, Estrogen, Insulin resistance, PI3 kinase, Progesterone

今回の論文に関連して、開示すべき利益相反状態はありません。

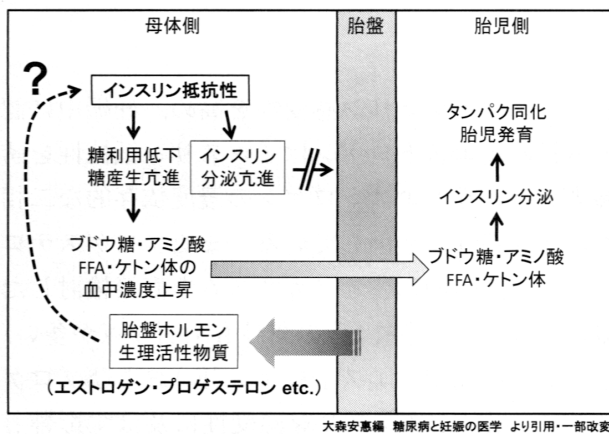
間の栄養素とホルモンの交流を模式的に示した。母体にインスリン抵抗性を生じると、母体での糖利用が低下し糖新生が亢進する。その結果、ブドウ糖を中心としたさまざまな栄養素が胎盤を通過し、効率的に胎児側へ移行する。母体側が妊娠糖尿病を発症した場合、母体での血糖の上昇が著明となり、ブドウ糖が胎児側へ過剰に輸送されることとなる。その結果胎児のインスリン分泌が過度に刺激され、巨大児や産後の新生児低血糖の原因となる。胎盤は胎盤ホルモンを含むさまざまな生理活性物質を産生し、これらの多くは妊娠週数と共に分泌量が増加することが知られている(図

2)。これらの胎盤ホルモンが母体で生じるインスリン抵抗性の誘導に関わることが想定されてきた。実際 placental growth hormone (hPGH) はインスリンシグナルに重要な PI3 キナーゼの p85 サブユニットを増加させ IRS1 との結合を阻害することでインスリン抵抗性を誘導すること<sup>2)</sup>や、脂肪細胞において Placental Lactogen (hPL) と prolactin がインスリンの糖取り込み作用を障害すること<sup>3)</sup>が示されている。E<sub>2</sub> および P<sub>4</sub> は妊娠末期にその血中濃度が上昇すること(図 2)からもインスリン抵抗性への関与が想定されるが、その詳細な機序は不明であった。

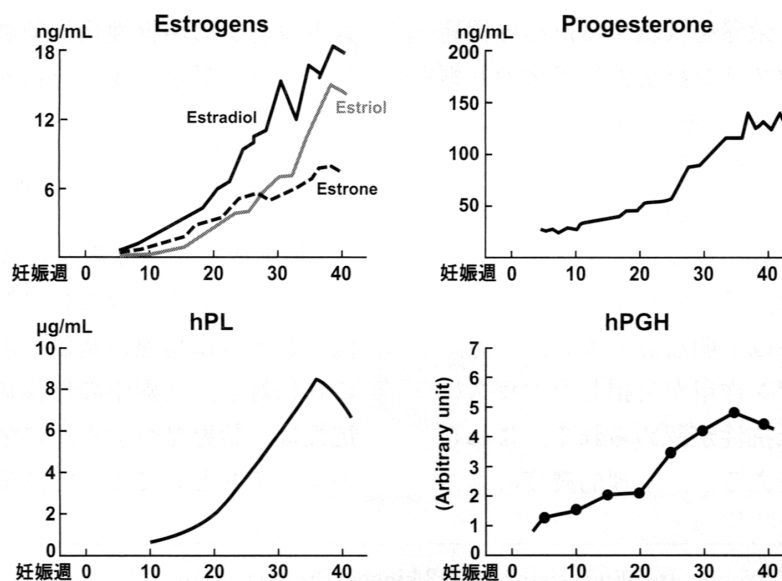
### 実験 1 エストロゲンによるインスリン抵抗性 メカニズムの解明<sup>4)</sup>

#### 【方法】

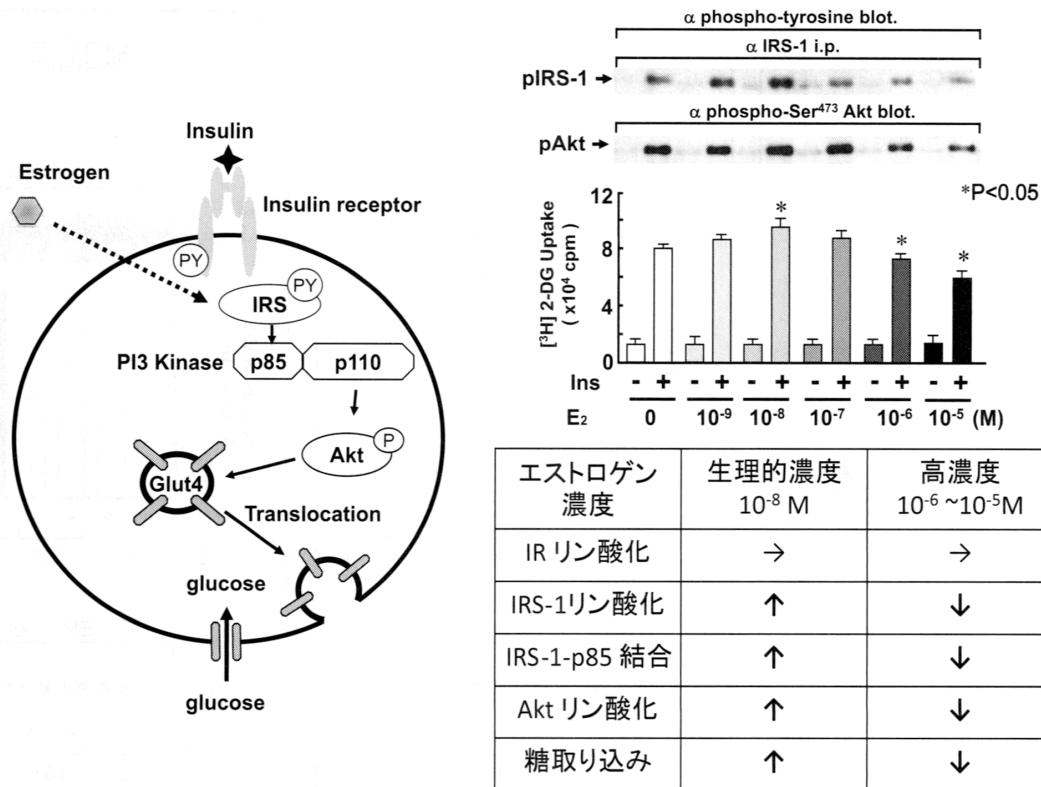
インスリンの主要な標的組織のひとつである脂肪細胞を用いて、E<sub>2</sub> がインスリン抵抗性に及ぼす影響とそのメカニズムを検討した。3T3L1 脂肪細胞に 10<sup>-9</sup>~10<sup>-5</sup>M の E<sub>2</sub> を 16 時間前処置し、インスリン刺激による糖取り込み作用とインスリン抵抗性発現に至るインスリンシグナル伝達を検討した。細胞への糖取り込み作用は [<sup>3</sup>H] 2-deoxy-glucose の取り込みをシンチレーションカウンタで測定した。エストロゲン受容体(ER)の細胞内局



【図 1】 母体と胎児の栄養素の流れ



【図 2】 妊娠中の胎盤ホルモンの血中濃度推移



【図3】 エストロゲンがインスリンシグナルに及ぼす影響

在は、蔗糖密度勾配超遠心法により細胞分画を細胞膜、細胞質、核の各分画に分離し解析した。

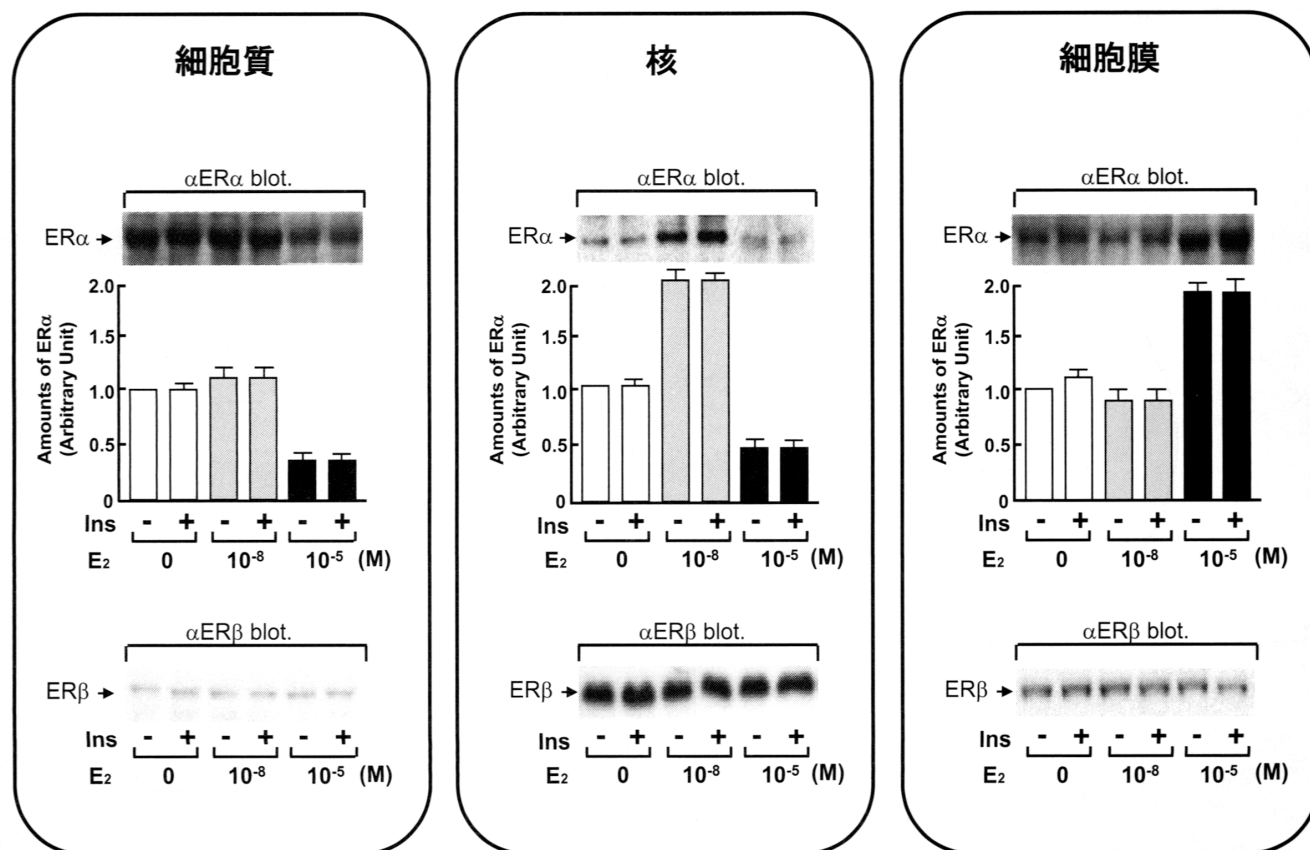
#### 【結果】

はじめに E<sub>2</sub> の前処置が、インスリンシグナルおよびインスリンの糖取り込み作用に与える影響を検討した(図3)。E<sub>2</sub> はインスリン受容体(IR)の蛋白発現およびインスリンによるリン酸化には影響を与えなかった。興味深いことに、生理的濃度を想定した 10<sup>-8</sup>M の E<sub>2</sub> 前処置はインスリン刺激によるインスリン受容体基質1(IRS-1)のチロシンリン酸化と下流の Akt リン酸化を亢進させ、糖取り込み作用を増加させた。一方妊娠末期を想定した高濃度(10<sup>-6</sup>および 10<sup>-5</sup>M)の E<sub>2</sub> 前処置はインスリンによる IRS1 のチロシンリン酸化および Akt のリン酸化を抑制し、糖取り込みも抑制した。以上より E<sub>2</sub> は濃度に応じてインスリン感受性を正と負に制御することが示唆される。

胎盤からは TNF $\alpha$  も分泌され、特に妊娠高血圧症候群患者において血清レベルが上昇することが報告されている。TNF $\alpha$  はインスリン抵抗性を誘

導することから、妊娠後期を想定した 10<sup>-6</sup>M の E<sub>2</sub> と TNF $\alpha$  を共処置したところ、インスリン刺激による IRS1 および Akt のリン酸化が相加的に抑制された。このことより E<sub>2</sub> と TNF $\alpha$  の両者が妊娠後期のインスリン抵抗性に連携して関わる可能性が考えられる。

E<sub>2</sub> によるインスリン感受性に対する二相性の作用はともに ER 阻害剤である ICI 182,780 処置により消失したことから、これらの E<sub>2</sub> の作用は ER を介することが示唆された。そこで ER $\alpha$  と ER $\beta$  の細胞内局在の変化を検討した。興味深いことに ER $\alpha$  は 10<sup>-8</sup>M の E<sub>2</sub> 処置により細胞質から核へと移行したが、10<sup>-5</sup>M の E<sub>2</sub> 処置では核への移行はむしろ減少し、細胞膜分画への移行が認められた(図4)。さらに細胞膜を透過できない E<sub>2</sub>-BSA の前処置は、10<sup>-8</sup>M で認められたインスリン感受性の亢進作用を示さず、10<sup>-6</sup>、10<sup>-5</sup>M で認められた E<sub>2</sub> のインスリンシグナル抑制作用のみを示した。一方 ER $\beta$  の細胞内局在はいずれの濃度の E<sub>2</sub> 処置によっても変化を認めなかった。これらの結果は、



【図4】 低濃度および高濃度エストロゲンがERαとERβの細胞内局在に及ぼす影響

高濃度 E<sub>2</sub> 処置により細胞膜へ移行した ERα がインスリン抵抗性を誘導することを示唆している。阻害剤を用いた検討により、高濃度の E<sub>2</sub> は細胞膜に移行した ERα を介して JNK を活性化し、これが IRS-1 のセリン 307 残基を特異的にリン酸化することでインスリンシグナルを抑制すると考えられた。

#### 【考察】

脂肪細胞において、E<sub>2</sub> は濃度により、核内 ERα および細胞膜に局在する ERα を介した特異的経路によりインスリンシグナルを調節することが明らかとなった(図5)。これらの機構は、妊娠中に増加するエストロゲンが母体のインスリン抵抗性を誘導するメカニズムを説明するだけでなく、閉経期や遺伝子改変マウス等で示されるエストロゲン作用不足によりインスリン感受性が低下するメカニズムにも該当すると考えられる。さらに、妊娠中に胎盤で産生される TNFα を高濃度エストロゲンと共処置することで、インスリン抵抗性が相

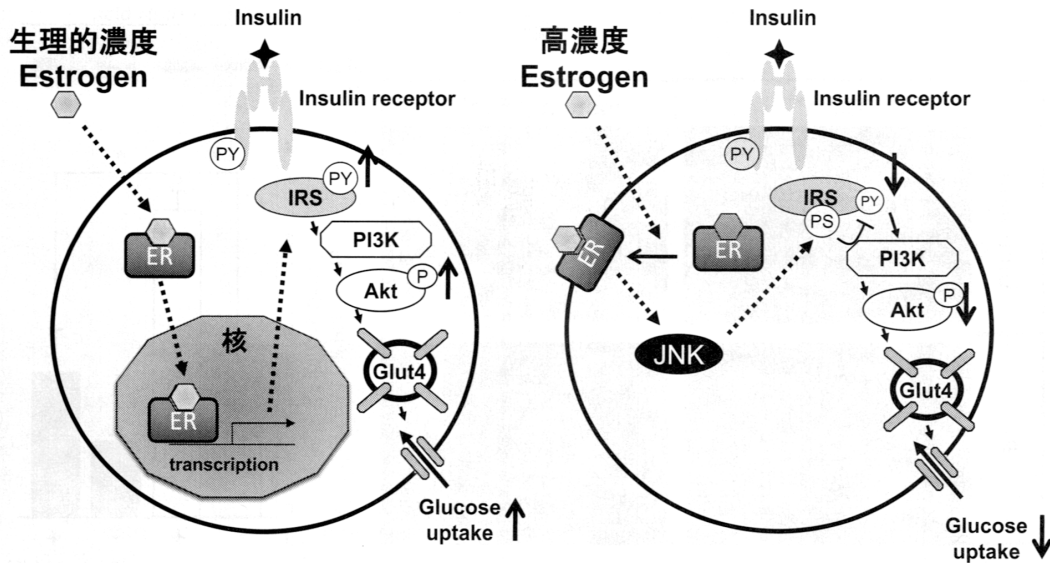
加的に悪化することから、妊娠後期の脂肪細胞におけるインスリン抵抗性病態の形成に、エストロゲンと TNFα が協調的に関与する可能性が想定された。

#### 実験2 プロゲステロンによるインスリン抵抗性メカニズムの解明<sup>5)</sup>

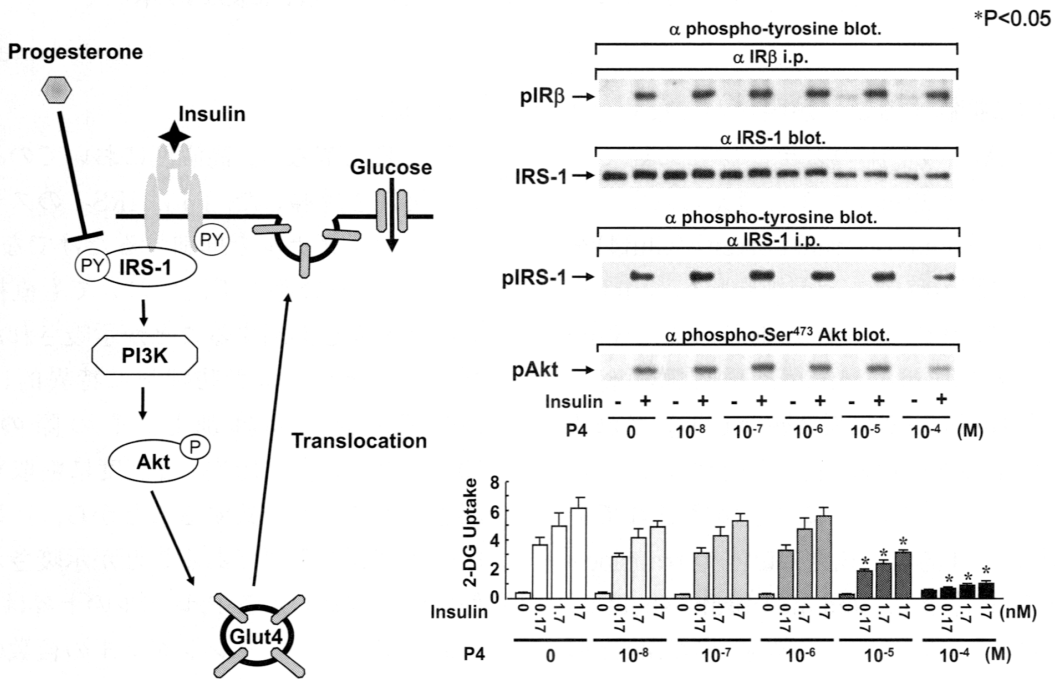
##### 【方法】

脂肪細胞を用いて、P<sub>4</sub> がインスリン抵抗性に及ぼす影響とそのメカニズムを解析した。3T3L1 脂肪細胞に 10<sup>-8</sup> ~ 10<sup>-4</sup> M の P<sub>4</sub> を 16 時間前処置し、実験1と同様の実験手法を用いてその影響を検討した。恒常活性化型 PI3 キナーゼおよび Akt の各 mutant はアデノウイルスを用いて脂肪細胞に発現した。Glut4 の細胞膜へのトランスロケーションは蛍光免疫染色を用いた plasma membrane sheet assay により、共焦点レーザー顕微鏡を用いて定量した。TC10 活性は細胞膜分画の PAK1-GST pull-down 法にて検討した。





【図5】 エストロゲンは濃度依存性に異なったメカニズムでインスリンシグナルを調節する

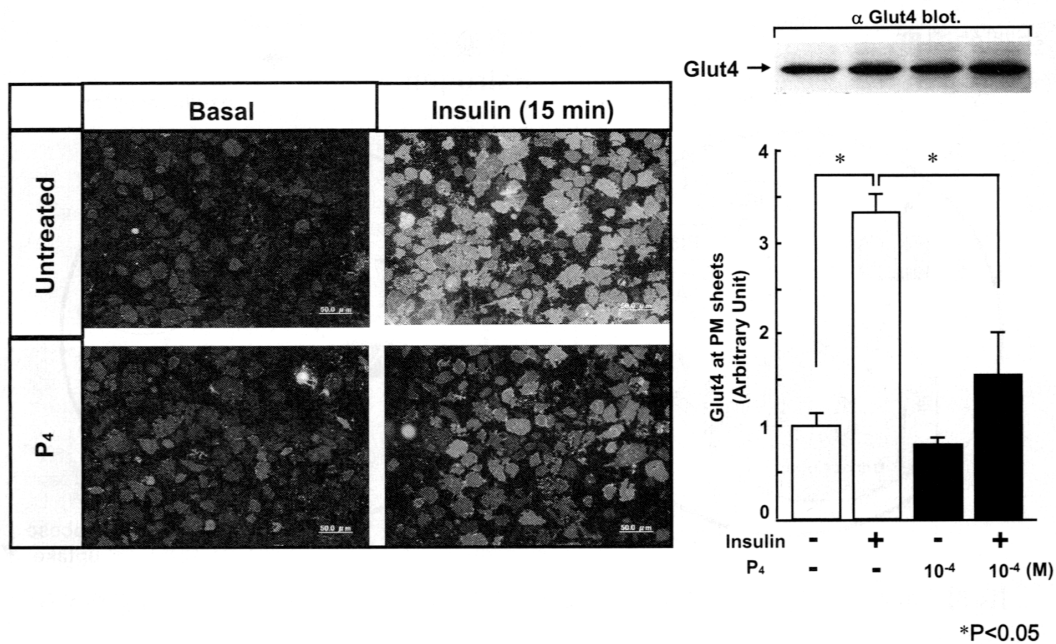


【図6】 プロゲステロンがインスリンシグナルに及ぼす影響

【結果】

E<sub>2</sub>と異なり P<sub>4</sub>は低濃度ではインスリンシグナルに影響を与えなかったが、妊娠中を想定した 10<sup>-5</sup> および 10<sup>-4</sup>M の P<sub>4</sub>前処置は IRS-1 の蛋白量を減少させ、その結果インスリン刺激による IRS-1 のチロシンリン酸化と Akt リン酸化を低下させた。さらに P<sub>4</sub>はインスリン濃度依存性に認められる糖取り込み作用を抑制した(図6)。

P<sub>4</sub>前処置による糖取り込み作用の抑制が、IRS-1 のステップでのシグナル抑制に比べ高度であったことから、P<sub>4</sub>による糖取り込み抑制には他のメカニズムの存在が想定された。そこで、インスリン刺激の代わりに PI3 キナーゼと Akt の恒常活性化型 mutant を発現し、これらによる糖取り込み作用に対する P<sub>4</sub>前処置の影響を検討した。その結果 P<sub>4</sub>はこれら両者の mutant 発現による糖取り込み



【図7】 プロゲステロンがインスリンの Glut4 translocation に及ぼす影響

作用も部分的に抑制することが明らかとなり、 $P_4$ は少なくとも Akt の下流のステップにおいてもインスリンシグナルを抑制すると考えられた。

インスリンは glucose transporter 4 (Glut4) を細胞質から細胞膜へ移動させ、細胞膜へ Glut4 を挿入することで糖取り込みが促進される。Glut4 の細胞膜直下への translocation と、細胞膜近傍まで輸送された Glut4 が細胞膜と融合し挿入されるステップには、各々個別の機構が存在する。これらのどちらのステップが  $P_4$  により障害されているかを検討する目的で、 $P_4$  が Glut4 の translocation に与える影響を plasma membrane sheet assay にて検討した(図7)。その結果  $P_4$  は Glut4 の細胞膜への translocation を抑制することが明らかとなった。

脂肪細胞におけるインスリンの糖取り込みシグナルは PI3 キナーゼ経路に加え、Cbl/TC10 経路の重要性が知られているため、本経路に対する  $P_4$  の影響を検討した(図8)。興味深いことにインスリン刺激による Cbl のチロシンリン酸化は  $10^{-5}$  M および  $10^{-4}$  M の  $P_4$  処置により強力に抑制され、その抑制はインスリンの糖取り込み抑制作用と類似した濃度特性を示した(図6)。

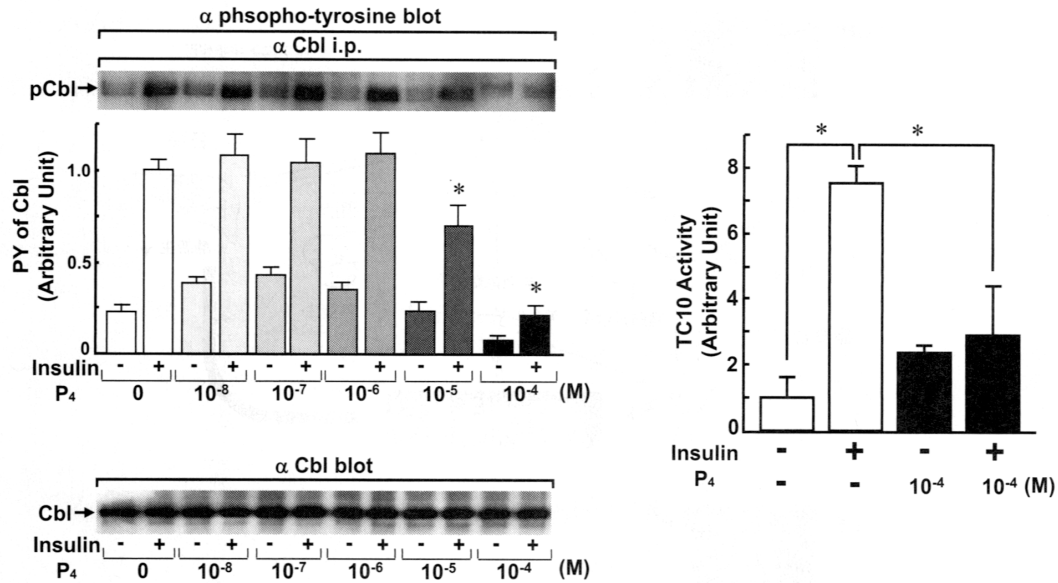
### 【考察】

$P_4$  は  $E_2$  と異なり、高濃度においてのみインスリン抵抗性を誘導した。 $P_4$  は IRS-1 のステップでインスリンシグナルを抑制するだけでなく、IRS-1-PI3 キナーゼ経路の下流においても直接インスリンシグナルを抑制することが示唆された。さらにプロゲステロンは脂肪細胞に特異的に存在する Cbl-TC10 経路も抑制し、その際の  $P_4$  濃度は  $10^{-5}$  M で中等度、 $10^{-4}$  M で高度に糖取り込みが抑制されることと一致することから、 $P_4$  によるこの経路の抑制が重要であることが示唆された。以上、妊娠中に認められる  $P_4$  レベルの上昇は、脂肪組織においてはインスリンシグナルの複数のステップを阻害することで、顕著にインスリン抵抗性を誘導すると考えられた(図9)。

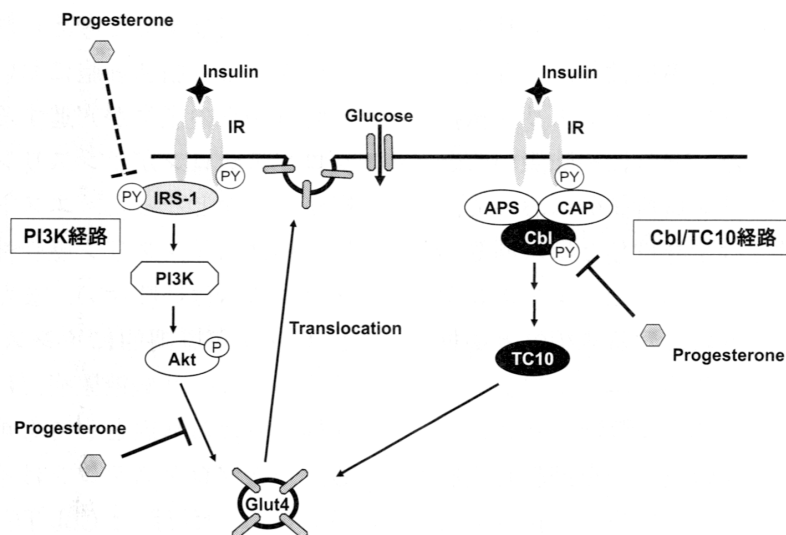
### 実験3 エストロゲンの中枢性および末梢性糖代謝改善作用機構の検討

#### 【方法】

最後に近年、著者はエストロゲンの中枢性代謝改善作用に関する知見を得たので、その成績を紹介する。エストロゲンの中枢性代謝制御作用は、卵巣摘出(OVX)マウスに6週間高脂肪食を負荷したインスリン抵抗性マウスを作製し、これらに



【図8】 プロゲステロンがCblリン酸化とTC10活性に及ぼす影響



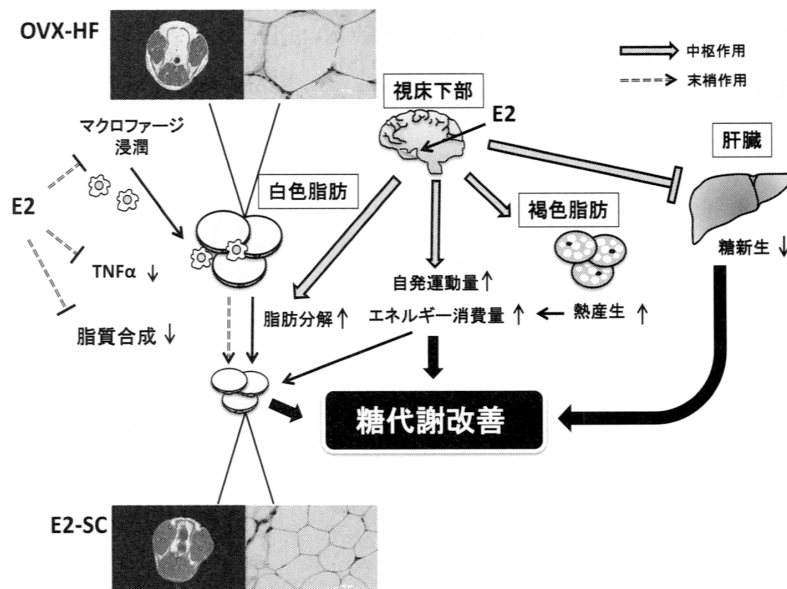
【図9】 プロゲステロンはPI3キナーゼ経路とCbl/TC10経路の両者を抑制し、インスリン抵抗性を誘導する

10日間、E<sub>2</sub>を浸透圧ポンプにて皮下投与(50 $\mu$ g/kg/day)、または側脳室内への中樞選択的持続投与(1 $\mu$ g/kg/day)を行い、代謝表現型に与える影響を糖負荷試験、インスリン負荷試験、MRI、代謝ケージを用いて比較検討した。

#### 【結果および考察】

近年全身の糖脂質代謝やインスリン感受性は、インスリンやレプチンなどの末梢組織からの入力が視床下部に作用することで統合され、その結果

各末梢組織のインスリン感受性やエネルギー代謝が制御されている。興味深いことに、エストロゲンはレプチン同様に食欲を抑制すること、視床下部にはERが発現していること、エストロゲンは視床下部でStat3のリン酸化を誘導することなどが報告された<sup>6)</sup>。これらの知見からエストロゲンはインスリンやレプチン同様、視床下部に作用することで全身のインスリン感受性や糖脂質代謝に影響を及ぼすことが考えられる。そこで卵巣摘出



【図 10】 エストロゲンによる中枢性および末梢性代謝調節作用

高脂肪食負荷により生じたマウスのインスリン抵抗性に対するエストロゲンの中枢投与、全身投与がマウス個体のエネルギー代謝とインスリン抵抗性に及ぼす影響を検討した。非常に興味深いことに、糖負荷試験やインスリン負荷試験において、エストロゲンの中枢投与は全身投与とほぼ同等のインスリン感受性改善効果を示した。エストロゲンの糖代謝改善メカニズムにおける末梢性と中枢性作用の役割を解析したところ、エストロゲンは末梢性に白色脂肪組織(WAT)の脂質取り込み・合成に関わる LPL や FAS の遺伝子を抑制し脂肪量を減少させ、また WAT の慢性炎症を抑制することでインスリン感受性を亢進すると考えられた。一方エストロゲンは中枢性に WAT の脂肪分解酵素の発現を亢進させ、肝糖新生の律速酵素である PEPCK と G6Pase の発現を抑制し、褐色脂肪組織の UCP 発現を亢進した。その結果中枢エストロゲン作用は脂肪量を軽度減少させ、マウスの体温、自発運動量、酸素消費量、エネルギー消費量を亢進し、インスリン感受性を高めると考えられた(図 10)。

### 総 括

妊娠時のインスリン抵抗性に対する生理的意義が明らかになり、またその発現には胎盤由来のホ

ルモンが関与すると考えられている。本研究により少なくとも脂肪細胞において、妊娠週数に伴って胎盤からの産生が亢進するエストロゲンおよびプロゲステロンがインスリン抵抗性を誘導する機構が明らかとなった。エストロゲンは濃度依存的に二相性にインスリン感受性に影響を及ぼすそのメカニズムは興味深い。また高濃度エストロゲンと TNF $\alpha$  が協調的にインスリン抵抗性を増悪させる機構は、妊娠糖尿病だけでなく妊娠高血圧症候群における病態としても重要な知見と考えられる。一方プロゲステロンはインスリンシグナルの PI3 キナーゼ経路と Cbl/TC10 経路の両者を阻害することで顕著にインスリン抵抗性を誘導すると考えられた。さらに最近の進歩として、マウスを用いたエストロゲンの中枢性および末梢性の糖エネルギー代謝調節機構の差異についても示した。これらの成績により妊娠糖尿病の病態の理解が進み、女性のインスリン抵抗性に対する新たな介入法の開発に繋がることが期待される。

### 謝 辞

本研究発表の機会を下さいました、平松祐司会長、並びにシンポジウム座長の労をお執り頂きました齋藤 滋先生、工藤美樹先生に厚く御礼申し上げます。

本研究に際してご指導いただきました、富山大学産科婦

人科学 齋藤 滋先生, 富山大学病態制御薬理学 笹岡利安先生, 恒枝宏史先生に厚く御礼申し上げます。

また共同研究者として多大なるご協力を頂いた, 富山大学産科婦人科学 柳楽清文先生, 米澤理可先生, 富山大学病態制御薬理学 松本奈都美先生, 森田真裕子先生, 澤川香苗先生に心からお礼申し上げます。

### 文 献

- 1) 大森安恵. 糖尿病と妊娠の関わり合い. 糖尿病と妊娠の医学. 株式会社文光堂 2008; 28-30
- 2) Barbour LA, Shao J, Qiao L, Leitner W, Anderson M, Friedman JE, Draznin B. Human placental growth hormone increases expression of the p85 regulatory unit of phosphatidylinositol 3-kinase and triggers severe insulin resistance in skeletal muscle. *Endocrinology* 2004; 145: 1144—1150
- 3) Ryan EA, Enns L. Role of gestational hormones in the induction of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67: 341—347
- 4) Nagira K, Sasaoka T, Wada T, Fukui K, Ikubo M, Hori S, Tsuneki H, Saito S, Kobayashi M. Altered subcellular distribution of estrogen receptor  $\alpha$  is implicated in estradiol-induced dual regulation of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* 2006; 147: 1020—1028
- 5) Wada T, Hori S, Sugiyama M, Fujisawa E, Nakano T, Tsuneki H, Nagira K, Saito S, Sasaoka T. Progesterone inhibits glucose uptake by affecting diverse steps of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 298: E881—888
- 6) Gao Q, Mezei G, Nie Y, Rao Y, Choi CS, Bechmann I, Leranth C, Toran-Allerand D, Priest CA, Roberts JL, Gao XB, Mobbs C, Shulman GI, Diano S, Horvath TL. Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals. *Nat Med* 2007; 13: 89—94

## Synopsis

Maternal insulin resistance is essential for efficient provision of nutrients to the fetus. However, excess development of insulin resistance in pregnancy is associated with the onset of gestational diabetes. Although precise molecular mechanisms of maternal insulin resistance are unknown, some of hormones or cytokines derived from placenta are thought to be implicated in its development. Therefore, we investigated the effect of estrogen (E2) and progesterone (P4) on the insulin signaling and their actions in 3T3-L1 adipocytes.

Treatment the cells with high concentrations of E2 ( $10^{-3}$ M; postulated concentration in late pregnancy) suppressed insulin signaling at the step of IRS1. The E2 promoted accumulation of estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) at the plasma membrane, and stimulated phosphorylated of IRS1 at Ser<sup>307</sup> through membrane-located ER $\alpha$  and JNK, resulting in the inhibition of insulin-induced tyrosine-phosphorylation of IRS1 and downstream signals leading to glucose uptake. In contrast, low concentrations of E2 ( $10^{-8}$ M; physiological concentration) enhanced insulin-induced tyrosine-phosphorylation of IRS1 and glucose uptake.

In the case of P4, low doses of progesterone did not affect insulin signaling and glucose uptake. However, higher concentrations of P4 inhibited insulin signaling at multiple steps. Progesterone at  $10^{-1}$ M reduced the amount of IRS1 and suppressed downstream signals. Subsequently, insulin-induced translocation of GLUT4 to the plasma membrane and glucose uptake were decreased. Surprisingly, P4 suppressed glucose uptake elicited by adenovirus-mediated expression of constitutive-active mutant of PI3-kinase and Akt, indicating that P4 suppressed insulin signaling independent to the reduction of IRS1 protein. Interestingly, insulin-induced tyrosine phosphorylation of Cbl and activation of TC10 were inhibited by P4.

In summary, we clarified the molecular mechanisms of insulin resistance induced by female sex hormones, E2 or P4. In particular, the concentration-dependent biphasic action of E2 on the insulin signaling is of clinical importance. Present findings would contribute to the further understanding of pathophysiology in maternal insulin resistance and GDM.

---