

厚生労働科学研究費補助金  
長寿科学総合研究事業

加齢による筋肉減少（サルコペニア）／脂肪量増加  
機序の解明と予防法に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

|       |      |
|-------|------|
| 主任研究者 | 江崎 治 |
| 分担研究者 | 門脇 孝 |
|       | 田畑 泉 |

平成15（2003）年3月

## 目 次

|  |       |
|--|-------|
| I. 総括研究報告書   | 1~8   |
| 加齢による筋肉量減少（サルコペニア）／<br>脂肪量増加機序の解明と予防法に関する研究<br>江崎 治                          |       |
| II. 分担研究報告書  |       |
| 1. 加齢による筋肉量減少（サルコペニア）<br>／脂肪量増加機序の解明と予防法に関する研究<br>江崎 治                       | 9~14  |
| 2. PPAR $\gamma$ とその転写共役因子 CBP による<br>脂肪蓄積とインスリン感受性調節メカニズムに<br>関する研究<br>門脇 孝 | 15~20 |
| 3. 身体運動トレーニングが骨格筋の PGC-1<br>mRNA 発現量に及ぼす影響に関する研究<br>田畑 泉                     | 21~22 |
| III. 研究成果に刊行に関する一覧表  | 23~26 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷（別途一部添付）  |       |

加齢による筋肉量減少（サルコペニア）／脂肪量増加機序の解明と予防法に関する研究

主任研究者 江崎 治（独立行政法人国立健康・栄養研究所 生活習慣病研究部長）

研究要旨

加齢に伴う筋肉量の低下は、サルコペニアと呼ばれ、老化に伴う基礎代謝量の低下、糖／脂質代謝の低下、脂肪の蓄積の主因となっている。筋肉の糖／脂質代謝に関する転写因子群及び共役因子（PGC-1、SREBP-1c、FKHR）を同定し、運動、絶食、摂食時のこれらの遺伝子の発現量変動を調べ、サルコペニアとの関連を推定した。また、サルコペニアに伴う脂肪組織の肥大化は、レプチン抵抗性を生じ、アディポネクチンの分泌減少を介して、筋肉での糖／脂質代謝を抑制する。アディポネクチンの筋肉での作用機序を明らかにした。

分担研究者

門脇 孝（東京大学医学部糖尿病・代謝内科  
助教授）

田畑 泉（独立行政法人国立健康・栄養研究所  
健康増進研究部 運動生理・指導研  
究室長）

A. 研究目的

老化に伴い、心筋梗塞、脳梗塞、脳出血による死亡率が増加する。これらの基礎となる病態が糖尿病、高脂血症、動脈硬化症等の栄養関連疾患である。これらの疾患は、筋肉量低下（サルコペニア）による脂肪量の増大に起因すると考えられている。

近年、ジーンチップによる解析により、老化に伴い、筋肉ではエネルギー代謝に関係する酵素の発現量の低下、ストレス反応の増加に関係する酵素、及び神経支配の再構築に関する酵素の発現量が増加する事が示された（Science, 1999, vol285, P1390-1393）。老化に

於いては細胞自体の代謝活性の低下が主要な変化であり、それに伴い、生体の反応として、ストレスの増加、神経支配の再構築が生じていると考えられる。

これを予防する方法として、レジスタンストレーニング、有酸素運動がある。しかしこれらの運動によりサルコペニアの進行は遅くできるが、その効果は満足できるものではない。又、高齢者になると、意欲の低下や関節の機能低下により、定期的に運動を行うのは難しくなる。

また、老化に伴い、筋肉massの低下でなく代謝機能低下も生じる。ミトコンドリアの数の低下による脂肪酸のβ酸化の低下、LPLの発現量の減少による血中からの脂質の取り込みの低下が認められ、同時に脂肪細胞の肥大化を伴うインスリン抵抗性の出現により筋肉での糖の取り込みの減少も認められる。脂肪酸の代謝の低下の方が糖の代謝の低下よりも顕著なため、老化した筋肉で糖代謝がエネルギー代謝主体

になってくる。

ミトコンドリアの数の低下は、転写因子のコファクターであるPGC-1の発現量の低下で説明されるが、筋肉でのLPLの発現低下に關与する転写因子は見出されていない。LPLの低下は脂肪酸の流入を減少させるため、筋肉内の脂肪の蓄積も減少させる可能性がある。

逆に、定期的な運動は転写因子のコファクターであるPGC-1の発現増加を介し、ミトコンドリアの数を増加させ、脂肪酸のβ酸化能を亢進させる。一方、運動選手の筋肉組織はインスリンの感受性が亢進しているにもかかわらず脂肪の蓄積が多い。

本年度はPGC-1の機能、筋肉に於ける脂肪合成、及びLPLの発現に關する転写因子、SREBP-1cやFKHRの機能について研究を行い、ザルコペニアとの関連について調べた。同時に、ザルコペニアに伴う脂肪組織の肥大化は、脂肪細胞由来の分泌ホルモン、レプチン、アディポネクチンの分泌量、感受性を低下させ、筋肉での糖/脂質代謝を減弱する。本年度はアディポネクチンの筋肉での作用機序を明らかにした。

## B. 研究方法

A) マウスPGC-1の201~797アミノ酸コードするDNAをおとりとした。スイミング後、約12時間後に腓腹筋を採取し、mRNAを抽出、cDNAを合成し、AD-ライブラリーを作製した。

ライブラリーの導入及び陽性クローンの検出に關しては、おとりタンパク質cDNAを導入した酵母にライブラリーDNAをトランスフォームし、酵母two-hybrid法で陽性クローンを得た。

B) 各種運動後にSREBP-1c、及び脂肪合成に關する遺伝子の発現量を測定した。

C) マウスを絶食、再摂食、糖尿病状態にして、

転写因子、FKHR及び脂肪代謝関連遺伝子の発現パターンを調べた。また、筋肉のモデル細胞であるC<sub>2</sub>C<sub>12</sub>細胞にFKHRをレトロウィルスで過剰発現させたステーブルな細胞ラインを確立した。この細胞を用いて脂質代謝関連遺伝子の発現量をノザンプロット法で調べた。

D) 運動終了直後にラットから前肢筋のepitrochlearisと後肢筋のヒラメ筋を摘出し、核分画抽出後、ウエスタンプロット法によりPGC-1量を測定した。また、ラットのepitrochlearisを取り出し、AMPKの活性化剤であるAICAR (2 mM)で、18時間インキュベーションし、その時のPGC-1のmRNA濃度をRT-PCR法で測定した。

E) アディポネクチン欠損マウスを作製して、その表現型を解析した。

F) アディポネクチン過剰発現マウスを作製し、肥満・糖尿病のモデルであるob/obマウスとの掛け合わせを行ない、その表現型を解析した。

G) 著明な痩せと良好なインスリン感受性を示すCBPヘテロ欠損マウスを用いてアディポネクチンの個体レベルでの機能を明らかにすることを試みた。

H) アディポネクチンを標的とした薬剤の開発を行うため、アディポネクチンの作用機構を明らかにすることを試みた。

(倫理面への配慮)

研究所内での動物取り扱い基準に従って、動物実験を行っている。又、動物に痛みを与えないようにネンブタール麻酔を行ってから、屠殺した。

## C. 研究結果

A) マウスPGC-1(Δ1-200)タンパク質をおとりとして、運動負荷マウス骨格筋cDNAライブラリー4.8 x 10<sup>6</sup>独立クローンをスクリーニングし、陽

性クローンの DNA 配列を解析した。RNA 修飾に関与すると考えられている apoB editing enzyme complex 2 (APOBEC-2) が得られた。

B) SREBP-1 に増加して、運動後 SREBP-1c、及び SREBP-1 のターゲット遺伝子で脂肪合成に関係する ACC-1 (acetyl-CoA carboxylase)、SCD-1 (stearoyl-CoA desaturase-1)、DGAT-1 (acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase-1) の発現量が運動後増加した。

C) フォークヘッドタイプの転写因子FKHRの発現量増加に伴い、LPLの発現量も増加した。また、 $C_2C_{12}$ 細胞でFKHRの過剰発現により、LPLの7倍程度の発現量の増加が認められ、PPAR $\alpha$ のリガンドであるWy14643刺激によってもLPLの9倍程度の発現増加が認められた。これらの効果は相加的であった。

D) 6時間の水泳運動後、主働筋epitrochlearisのPGC-1濃度は75%増加したが、非活動筋ヒラメ筋のPGC-1濃度は変化しなかった。AICARで18時間インキュベーションしたepitrochlearisのPGC-1のmRNA濃度はAICAR非添加の場合に比べて7倍高かった。

E) アディポネクチンヘテロ欠損マウスもホモ欠損マウスも予想外なことに、体重に著変を認めなかった。ホモ欠損マウスではヘテロ欠損マウスと比較してもさらに血糖降下作用が減弱しており、さらに強いインスリン抵抗性が存在することが示唆された。また糖負荷試験において、アディポネクチンホモ欠損マウスでは野生型マウスと比較して有意に血糖が上昇しており、耐糖能障害が存在することが示唆された。これらの表現型は高脂肪食負荷によりさらに増悪を認めた。

F) アディポネクチンは脂肪酸燃焼に関わるACOやエネルギー浪費に関わるUCPの発現を増加さ

せることが明らかとなった。これらの遺伝子はPPAR $\alpha$ の標的遺伝子であるので、次に先ずはPPAR $\alpha$ の発現量を検討したところ、PPAR $\alpha$ の発現量そのものが増加しているのが認められた。さらに興味深いことにアディポネクチンによってPPAR $\alpha$ の内因性リガンド活性が増加していることも認められた。

G) CBPヘテロ欠損マウスでは摂餌に関わる脳内ペプチドの発現量に有意な変化を認めず、実際体重当りの摂餌量に著変を認めなかったが、エネルギー消費が亢進しており、野生型マウスの2/3程度の体重を示した。白色脂肪組織では脂肪酸流入に関わる分子の発現低下、肝臓・骨格筋・脂肪組織では脂肪合成に関わる酵素の発現低下及び脂肪酸燃焼に関わるACOやエネルギー消費に関わるUCPの発現増加を認めた。これらは、レプチン感受性の亢進とアディポネクチンの血中レベルが増加していたのと合致する所見と考えられた。

H) アディポネクチンがAMPキナーゼを活性化するのが認められた。ドミナントネガティブAMPキナーゼを用いた検討により、アディポネクチンによる骨格筋での脂肪酸燃焼、糖取込み、糖利用の促進、肝臓での糖新生の抑制、in vivoでのアディポネクチンの急性の投与で認められる血糖値の低下は、少なくとも一部AMPキナーゼの活性化を介したものである可能性が示された。

#### D. 考察

細胞は外部のエネルギー供給状況により細胞内の代謝を変化させる。筋肉組織は運動を行うとATPを多量に消費するため、エネルギー供給が不足しATP合成を促進しようとして、糖/脂質代謝の分解を促進するよう酵素の活性及び量に変化する。一方、運動が終わり、食事をして、

エネルギー供給不足が解消すると、筋肉は今まで使用したエネルギーを蓄積するように働き、筋肉内での脂肪の蓄積、及びグリコーゲンの合成が生じる。グリコーゲンの合成は糖輸送体 (GLUT4) の増加で、脂肪の蓄積は脂肪の合成をコントロールしている、転写因子 SREBP-1c の発現の増加で説明されることを見出した。また、ミトコンドリアの増加は AMP キナーゼを介した PGC-1 の発現増加で説明された。運動後の GLUT4 蛋白の増加は、同時にインスリンの感受性の亢進を生じ、糖尿病に対し予防的に働く。また、脂肪の合成を介してエネルギーを蓄積し、次の運動に備え、予備能を高めている。また、運動中には筋肉で LPL の発現量が増加し、血液中の中性脂肪の分解が進む。運動選手に見られる血中中性脂肪値の低下と HDL-コレステロールの増加 (動脈硬化の予防に関与) は、筋肉で LPL の発現量の増加が関与している可能性が高い。また、筋肉に於ける LPL の発現量が転写因子 FKHR により増加することを見出した。また、脂肪組織が肥大化するとアディポネクチンが低下することを見出し、筋肉組織に於いてこれが原因でインスリン抵抗性が発症していることを示した。

老化に伴う筋肉の糖/脂質代謝の減少は、部分的に運動により改善させることが出来る。このため PGC-1、SREBP-1、FKHR の発現量の増加は、老化に伴う代謝の低下を改善させると考えられる。また、老化に伴うインスリン抵抗性の発症にアディポネクチンが関与していることが想定された。

## E. 結論

運動負荷マウス cDNA ライブラリーより、PGC-1 結合タンパク質の検索を行い、心臓と骨格

筋に特異的に発現する APOBEC2 を検出した。長時間の運動後、マウスを自由に摂食する状態においておくと、脂肪合成酵素である SREBP-1c の発現量が増加することが示された。また、転写因子 FKHR が LPL の発現を増加することを示し、ザルコペニアを予防する上で、これらの転写因子、コファクターを活性化し、筋肉量を増加させる新しい治療法が考えられた。

アディポネクチンが急性には AMP キナーゼを、慢性には PPAR $\alpha$  を活性化し、脂肪酸燃焼などを促進して、組織内中性脂肪含量を低下させて、インスリン抵抗性を改善させていることを見出した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

江崎 治

1) Kamei Y, Mizukami J, Miura S, Suzuki M, Takahashi N, Kawada T, Taniguchi T, Ezaki O. (2003) A forkhead transcription factor FKHR up-regulates lipoprotein lipase expression in skeletal muscle. *FEBS Letters*. Feb 11;536(1-3):232-236.

2) Nakatani T, Kim H-J, Kaburagi Y, Yasuda K, Ezaki O. (2003) A low fish oil inhibits SREBP-1 proteolytic cascade, while a high-fish-oil feeding decreases SREBP-1 mRNA in mice liver: relationship to anti-obesity. *J. Lipid. Res.* 44(2): 369-379.

3) Ikeda S, Miyazaki H, Nakatani T, Kai Y, Kamei Y, Miura S, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O. (2002) Up-regulation of SREBP-1c and lipogenic genes in skeletal muscles after exercise training. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296(2):395-400.

4) Takahashi M, Tsuboyama-Kasaoka N, Nakatani T, Ishii M, Tsutsumi S, Aburatani H, and Ezaki O. (2002) Fish oil feeding alters liver gene expressions to defend against PPAR $\alpha$

activation and ROS production. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 282: G338-G348.

5) Nakatani T, Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Miura S, Ezaki O. (2002) Mechanism for PPAR  $\alpha$  activators-induced up-regulation of UCP2 mRNA in rodent hepatocytes. *J Biol Chem*, 277:9562-9569.

門脇孝

1) Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Imai, Y., Shimozawa, N., Hioki, K., Uchida, S., Ito, Y., Takakuwa, K., Matsui, J., Takata, M., Eto, K., Terauchi, Y., Komeda, K., Tsunoda, M., Murakami, K., Ohnishi, Y., Naitoh, T., Yamamura, K., Ueyama, Y., Froguel, P., Kimura, S., Nagai, R., and Kadowaki T. : Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *J. Biol. Chem.* 278:2461-2468, 2003.

2) Yamauchi, T., Oike, Y., Kamon, J., Waki, H., Komeda, K., Tsuchida, A., Date, Y., Li, M., Miki, H., Akanuma, Y., Nagai, R., Kimura, S., Saheki, T., Nakazato, M., Yamamura, K., and Kadowaki, T. : Increased insulin sensitivity despite lipodystrophy in Crebbp heterozygous mice. *Nature Genetics* 30:221-226, 2002.

3) Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., Eto, K., Akanuma, Y., Froguel, P., Foufelle, F., Ferre, P., Carling, D., Kimura, S., Nagai, R., Kahn, B.B., and Kadowaki, T. : Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine.* 8:1288-1295, 2002.

4) Kubota, N., Terauchi, Y., Yamauchi, T., Kubota, T., Moroi, M., Matsui, J., Eto, K., Yamashita, T., Kamon, J., Satoh, H., Yano, W., Nagai, R., Kimura, S., Kadowaki, T., and Noda, T. : Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J. Biol. Chem.* 277:25863-25866, 2002.

5) Colombo, C., Cutson, J.J., Yamauchi, T., Vinson, C., Kadowaki, T., Gavrilova, O., and Reitman, M.L. : Transplantation of adipose tissue lacking leptin is unable to reverse the metabolic abnormalities associated with

lipodystrophy. *Diabetes* 51:2727-2733,2002.

6) Mori Y, Otabe S, Dina C, Yasuda K, Populaire C, Lecoeur C, Vatin V, Durand E, Hara K, Okada T, Tobe K, Boutin P, Kadowaki T, Froguel P. Genome-wide search for type 2 diabetes in Japanese affected sib-pairs confirms susceptibility genes on 3q, 15q, and 20q and identifies two new candidate Loci on 7p and 11p. *Diabetes.* 2002 Apr;51(4): 1247-1255.

7) Hara, K., Boutin, P., Mori, Y., Tobe, K., Dina, C., Yasuda, K., Yamauchi, T., Otabe, S., Okada, T., Kadowaki, H., Hagura, R., Akanuma, Y., Ito, C., Yazaki, Y., Kimura, S., Nagai, R., Taniyama, M., Matsubara, K., Yoda, M., Nakano, Y., Tomita, M., Froguel, P. and Kadowaki, T. : Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes* 51: 536-540, 2002.

8) Terauchi Y, Matsui J, Suzuki R, Kubota N, Komeda K, Aizawa S, Eto K, Kimura S, Tobe K, Lienhard GE, Kadowaki T. Impact of genetic background and ablation of IRS-3 on IRS-2 knockout mice. *J Biol Chem.* published on line on Dec 18, 2002.

9) Hara K, Tobe K, Okada T, Kadowaki H, Akanuma Y, Ito C, Kimura S, Kadowaki T. A genetic variation in the PGC-1 gene could confer insulin resistance and susceptibility to Type II diabetes. *Diabetologia.* 2002 May;45(5):740-3.

10) Vasseur F, Helbecque N, Dina C, Lobbens S, Delannoy V, Gaget S, Boutin P, Vaxillaire M, Lepretre F, Dupont S, Hara K, Clement K, Bihain B, Kadowaki T, Froguel P. Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. *Hum Mol Genet.* 2002 Oct 1;11(21):2607-14.

11) Tobe K, Asai S, Matuoka K, Yamamoto T, Chida K, Kaburagi Y, Akanuma Y, Kuroki T, Takenawa T, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T. Cytoskeletal reorganization induced by

insulin: involvement of Grb2/Ash, Ras and phosphatidylinositol 3-kinase signalling. *Genes Cells*. 2003 Jan;8(1):29-40.

12) Terauchi Y, Kadowaki T. Insights into molecular pathogenesis of type 2 diabetes from knockout mouse models. *Endocr J*. 2002 Jun;49(3):247-63.

13) Shibuya A, Wada K, Nakajima A, Saeki M, Katayama K, Mayumi T, Kadowaki T, Niwa H, Kamisaki Y. Nitration of PPARgamma inhibits ligand-dependent translocation into the nucleus in a macrophage-like cell line, RAW 264. *FEBS Lett*. 2002 Aug 14;525(1-3):43-7.

14) Hara, K., Noda, M., Waki, H., Tobe, K., Yamauchi, T., Kadowaki, H., Satou, H., Tsukamoto, K., Nagamatsu, S., Yamagata, K., Matsuzawa, Y., Akanuma, Y., Kimura, S., and Kadowaki, T. : Maturity-onset diabetes of the young resulting from a novel mutation in the HNF-4alpha gene. *Intern. Med*. 41:848-852, 2002.

田畑 泉

1) Terada S, I Tabata, et al. Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epitrochlearis muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 296: 350-354, 2002.

## 2. 学会発表

国際学会  
江崎 治

1) Low level overexpression of ucp2 in adipose tissues up-regulates PGC-1 and ameliorates high fat diet-induced obesity and metabolic abnormalities. Tsuboyama-Kasaoka N, Y. Kamei, Miura S, M. Takahashi, Ezaki O: National Institute of Health and Nutrition, Tokyo, Japan. 9th International congress on obesity: 2002.8: SAO PAULO: August 24-29, 2002,

門脇 孝

1) June 16, 2002 American Diabetes Association, 62nd Scientific Sessions, San Francisco, California Toshimasa Yamauchi<sup>1</sup>, Junji Kamon<sup>1</sup>, Yasuo Terauchi<sup>1</sup>, Naoto Kubota<sup>1</sup>, Hironori Waki<sup>1</sup>, Yasumichi Mori<sup>2</sup>, Kazuo Hara<sup>1</sup>, Kajuro Komeda<sup>3</sup>, Atsuko Tsuchida<sup>3</sup>, Yasuo Akanuma<sup>4</sup>, Satoshi Kimura<sup>1</sup>, Kazuyuki Tobe<sup>1</sup>, Madoka Yoda<sup>5</sup>, Motowo Tomita<sup>5</sup>, Philippe Froguel<sup>2</sup> and

Takashi Kadowaki<sup>1</sup>(Department of Metabolic Diseases, Graduate School of Medicine, University of Tokyo) Adiponectin /Leptin -Dependent and -Independent Pathways Regulating Insulin Sensitivity and Body Weight

2) September 25, 2002 The 4th international symposium on insulin action at Ehime Toshimasa Yamauchi, Junji Kamon, Naoto Kubota, Hironori Waki, Yasuo Terauchi, Kazuyuki Tobe & Takashi Kadowaki (Department of Metabolic Diseases, Graduate School of Medicine, University of Tokyo) The mechanisms by which PPARγ, adiponectin and CBP regulate energy homeostasis and insulin sensitivity ---- Emerging molecular targets for anti-obesity and anti-diabetes drugs

3) October 16, 2002 The 5th Lillie International Symposium on "Child Obesity" at Kobe Toshimasa Yamauchi & Takashi Kadowaki(Department of Metabolic Diseases, Graduate School of Medicine, University of Tokyo) Adiponectin and Obesity

4) January 19, 2003 Keystone Symposium Obesity at Keystone, Colorado Toshimasa Yamauchi, Junji Kamon, Yuichi Oike, Hironori Waki, Masamitsu Nakazato, Kenichi Yamamura & Takashi Kadowaki Department of Metabolic Diseases, University of Tokyo Adiponectin/leptin-dependent and -independent pathways regulating insulin sensitivity and body weight

田畑 泉

1) Terada S, Tabata I, et al. Effects of high and low-intensity exercise on PGC-1 mRNA expression in rat skeletal muscle. 50th Annual Meeting of the Amer. Coll. Sports Med. 31 May 2002, St Louis, USA

国内学会

江崎 治

1) ヒトにおける脂質、糖代謝の側面から  
江崎治: 第37回日本循環器管理研究協議会総会・日本循環器病予防学会: 2002. 5. 30: 東京

2) 運動トレーニングによる骨格筋内の脂肪合成系遺伝子発現の増加機序, 宮崎裕美、笠岡(坪山) 宣代、江崎治: 第56回日本栄養・食糧学会大会: 2002. 7. 20: 北海道



3) 共役リノール酸 (CLA) の適正摂取条件に関する検討およびSREBP1を介した肝臓脂肪蓄積メカニズムの解析, 笠岡(坪山) 宜代、宮崎裕美、江崎治: 第56回日本栄養・食糧学会大会: 2002. 7. 21: 北海道

4) 高脂肪食摂取マウスの白色脂肪細胞における遺伝子発現: ジーンチップを用いた解析, 高橋真由美、笠岡(坪山) 宜代、油谷浩幸、江崎治: 第56回日本栄養・食糧学会大会: 2002. 7. 21: 北海道

5) PPAR $\alpha$ 活性化を介したマウス及びラット肝実質細胞でのUCP2mRNA発現増加メカニズム, 仲谷照代、笠岡(坪山) 宜代、高橋真由美、三浦進司、江崎治: 第56回日本栄養・食糧学会大会: 2002. 7. 21: 北海道

6) 糖輸送体GLUT4発現と転写共役因子PGC-1の関連性について, 三浦進司、池田仁子、甲斐裕子、亀井康富、江崎治: 第56回日本栄養・食糧学会大会: 2002. 7. 21: 北海道

#### 門脇 孝

1) 平成14年4月17日 第1回日本再生医療学会総会 於京都, 山内敏正、加門淳司、脇裕典、原 一雄、窪田直人、寺内康夫、門脇 孝 東京大学医学部糖尿病・代謝内科脂肪細胞分化・形質転換の制御によるインスリン感受性調節

2) 平成14年5月18日 第45回日本糖尿病学会年次学術集会, 山内敏正、加門淳司、原一雄、脇裕典、伊藤祐介、内田晶子、窪田直人、寺内康夫、門脇 孝, 東京大学大学院医学系研究科内科, アディポネクチンによる個体レベルでのインスリン感受性調節メカニズム

4) 平成14年5月19日 第45回日本糖尿病学会年次学術集会 (シンポジウム) 於東京 T Yamauchi, T Kadowaki, (Department of Metabolic Diseases, University of Tokyo) The mechanisms by which PPAR $\gamma$  regulates insulin sensitivity

5) 平成14年6月28日 第75回日本内分泌学会学術総会於大阪, 山内敏正、尾池雄一、加門淳司、脇裕典、佐伯武頼、中里雅光、山村研一、門脇 孝, 東京大学大学院医学系研究科 糖尿病・代謝内科、熊本大学医学部発生医学研究センター、鹿児島大学 医学部 生化学、宮崎医

科大学 第三内科, CBP ヘテロ欠損マウスは脂肪萎縮にも関わらず良好な耐糖能を呈する

6) 平成14年6月29日 第75回日本内分泌学会学術総会 (シンポジウム) 於大阪, 山内敏正、加門淳司、原一雄、脇裕典、窪田直人、寺内康夫、門脇 孝 (東京大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝内科) アディポカインによる個体レベルでのインスリン感受性調節メカニズム

7) 平成14年8月17日 第11回アディポサイエンス研究会 於大阪山内敏正、窪田直人、加門淳司、脇 裕典、内田晶子、伊藤祐介、原一雄、寺内康夫、戸辺一之、永井良三、木村哲、門脇 孝 (東京大学糖尿病・代謝内科1) アディポネクチンと生活習慣病

8) 平成14年10月1日 第23回日本肥満学会 於京都 (シンポジウム) 山内敏正、加門淳司、窪田直人、脇 裕典、寺内康夫、戸辺一之、門脇 孝 (東京大学 糖尿病・代謝内科) 脂肪細胞による糖・脂質代謝の調節メカニズム

9) 平成14年10月2日 第23回日本肥満学会 於京都, 山内敏正、尾池雄一、加門淳司、脇裕典、永井良三、木村哲、佐伯武頼、中里雅光、山村研一、門脇 孝, 東京大学大学院医学系研究科 内科、熊本大学医学部 発生医学研究センター、鹿児島大学医学部 生化学、宮崎医科大学 第三内科CBPヘテロ欠損マウスを用いたレプチン/アディポネクチン非依存性の体重・糖代謝調節経路同定

10) 平成14年10月20日 第17回日本糖尿病合併症学会 於東京, 山内敏正、加門淳司、高桑啓輔、脇 裕典、内田晶子、伊藤祐介、原一雄、窪田直人、寺内康夫、戸辺一之、永井良三、木村 哲、門脇 孝 (東京大学内科) アディポネクチンは動脈硬化のリスクファクターの改善とは独立に生体内で動脈硬化巣に対する直接的な抗動脈硬化作用も有する

11) 平成15年1月17日 第17回日本糖尿病動物研究会年次学術集会 於八戸, 山内敏正、加門淳司、窪田直人、脇 裕典、寺内康夫、門脇 孝, 東京大学大学院医学系研究科 糖尿病・代謝内科モデル動物を用いたアディポネクチンの糖・脂質代謝、動脈硬化制御メカニズムの解析

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

- 1) 発明の名称：インスリン抵抗性改善剤、出願日：平成14年1月30日
- 2) 発明の名称：肥満及び／又は糖尿病を抑制する新規経路、出願日：平成14年4月5日
- 3) 発明の名称：アディポネクチンノックアウトマウスの作製、出願日：平成14年5月24日
- 4) 発明の名称：動脈硬化症予防治療剤、出願日：平成14年5月24日
- 5) AMP活性化プロテインキナーゼ活性化剤、出願日：平成14年6月12日

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

加齢による筋肉量減少（サルコペニア）／脂肪量増加機序の解明と予防法に関する研究

主任研究者 江崎 治 独立行政法人国立健康・栄養研究所 生活習慣病研究部長

研究要旨

加齢に伴う筋肉量の低下は、サルコペニアと呼ばれ、老化に伴う基礎代謝量の低下、糖／脂質代謝の低下、脂肪の蓄積の主因となっている。筋肉の糖／脂質代謝に関する転写因子群及び共役因子（PGC-1、SREBP-1c、FKHR）を同定し、運動、絶食、摂食時のこれらの遺伝子の発現量変動を調べ、サルコペニアとの関連を推定した。

A. 研究目的

老化に伴い、心筋梗塞、脳梗塞、脳出血による死亡率が増加する。これらの基礎となる病態が糖尿病、高脂血症、動脈硬化症等の栄養関連疾患である。これらの疾患は、筋肉量低下（サルコペニア）による脂肪量の増大に起因すると考えられている。

近年、ジーンチップによる解析により、老化に伴い、筋肉ではエネルギー代謝に関係する酵素の発現量の低下、ストレス反応の増加に関係する酵素、及び神経支配の再構築に関する酵素の発現量が増加する事が示された（Science, 1999, vol285, P1390-1393）。老化に於いては細胞自体の代謝活性の低下が主要な変化であり、それに伴い、生体の反応として、ストレスの増加、神経支配の再構築が生じていると考えられる。

これを予防する方法として、レジスタンストレーニング、有酸素運動がある。しかしこれらの運動によりサルコペニアの進行は遅くできるが、その効果は満足できるものではない。又、

高齢者になると、意欲の低下や関節の機能低下により、定期的に運動を行うのは難しくなる。

また、老化に伴い、筋肉massの低下でなく代謝機能低下も生じる。ミトコンドリアの数の低下による、脂肪酸のβ酸化の低下、LPLの発現量の減少による血中からの脂質の取り込みの低下が認められ、同時にインスリン抵抗性の出現により糖の取り込みの減少も認められる。脂肪酸の代謝の低下の方が糖の代謝の低下よりも顕著なため、老化した筋肉で糖代謝がエネルギー代謝主体になってくる。

ミトコンドリアの数の低下は、転写因子のコファクターであるPGC-1の発現量の低下で説明されるが、筋肉でのLPLの発現低下に関与する転写因子は見出されていない。LPLの低下は脂肪酸の流入を減少させるため、筋肉内の脂肪の蓄積も減少させる可能性がある。

逆に、定期的な運動は転写因子のコファクターであるPGC-1の発現増加を介し、ミトコンドリアの数を増加させ、脂肪酸のβ酸化能を亢進させる。一方、運動選手の筋肉組織はインスリン

の感受性が亢進しているにもかかわらず脂肪の蓄積が多い。その理由として「運動中は筋肉中のエネルギー貯蔵物質であるグリコーゲンや脂肪をATP合成のため使用するが、運動後はこれらを逆に蓄積し、運動選手は次の運動に備える必要があり、より多くのグリコーゲンや脂肪を蓄積する」ためと考えられている。

本年度はPGC-1の機能、筋肉に於ける脂肪合成、及びLPLの発現に関する転写因子、SREBP-1cやFKHRの機能について研究を行い、ザルコペニアとの関連について調べた。

## B. 研究方法

### A) PGC-1 結合蛋白の同定

#### 1) おとりタンパク質 cDNA の作成と酵母への導入

PGC-1の1~200アミノ酸にはレポーター遺伝子転写活性化領域が含まれるため、その部分を除いたマウスPGC-1の201~797アミノ酸コードするDNAを、pGBKT7プラスミドのマルチプルクロニングサイトに挿入した。酵母AH109に、PEG/LiAc法により、おとりタンパク質cDNAをトランスフォーメーションした。その後、トリプトファン欠乏培地に播種し、30°Cにて数日間培養した。最も大きいコロニーを採取し、おとりタンパク質cDNAの挿入された酵母を得た。

#### 2) ライブラリーの作成

C57/BL6マウスを35°Cのプールで30分間スイミングさせた後、10分間休憩させた。これを5日間4セットづつ繰り返して行った。最後のスイミング終了後、約12時間後に腓腹筋を採取し、mRNAを抽出、精製した。このmRNAよりoligo(dT)法によりcDNAを合成し、pGAD10プラスミドのEcoRIサイトに挿入し、ライブラリーとした。

#### 3) ライブラリーの導入及び陽性クローンの検出

おとりタンパク質cDNAを導入した酵母を対数増

殖期になるように培養し、ライブラリーDNAをPEG/LiAc法によりトランスフォーメーションした。その後、ロイシンおよびトリプトファン欠乏培地に播種し、30°Cにて数日間培養した。生育したライブラリーの挿入された酵母をレプリカ法によりロイシン、トリプトファン、ヒスチジン欠乏培地に播種し、さらに30°Cにて数日間培養した。生育したコロニーをレプリカ法によりロイシン、トリプトファン、ヒスチジン、アデニン欠乏、X-Gal添加培地に播種し、さらに30°Cにて数日間培養した。青色コロニーを形成した酵母を陽性クローンとした。

#### 4) 陽性クローンからのプラスミド調製

陽性クローンをロイシン、ヒスチジン欠乏液体培地中、30°Cにて培養後、lyticase処理を行い酵母ホモジネートを調製した。これをCHROMA SPIN-1000 Columnにて精製し、プラスミド溶液を得た。酵母から調製したプラスミドを大腸菌にトランスフォーメーションし、アンピシリン添加培地に播種した。37°Cで一晩培養後、アンピシリン耐性菌を採取し、液体培養を行った。一晩培養後プラスミドを調製し、pGAD10に特異的に結合するオリゴヌクレオチドを用いてDNA配列を解析した。

### B) 筋肉に於ける脂肪合成の役割；SREBP-1の関与

マウスを水温35°Cのプールで30分間スイミングさせた後、10分間休憩させ、これをさらに3セット/日行い、2週間続けた。約3時間、22時間後に腓腹筋を摘出し、total RNAを抽出した。また、異なる運動方法の効果を調べるため、マウスを15m/分で45分間ランニングさせた後、5分間休憩させ、これをさらに7セット行わせた。最後のランニング終了後、約12時間後に腓腹筋を摘出し、RNAを抽出した。また、1時間の1回のみ運動を行った後、3時間、24時間後に腓腹筋を取り出しRNA

を行った

### C) 筋肉でのLPLの発現調節 ; FKHRの関与

マウスを24h、48h絶食にし、また48h絶食後、食事を8h与え、RNAを腓腹筋から抽出した。ストレプトゾトシンを投与し、糖尿病を発症させ、腓腹筋からRNAを抽出。また、6時間のトレッドミル後、アドリブで食事を摂取させ、2h、16h後、RNAを抽出した。筋肉のモデル細胞であるC<sub>2</sub>C<sub>12</sub>細胞に転写因子であるFKHRをレトロウイルスで過剰発現させたステーブルな細胞ラインを確立した。この細胞を用いて脂質代謝関連遺伝子の発現量をノザンプロット法で調べた。

(倫理面への配慮)

研究所内での動物取り扱い基準に従って、動物実験を行っている。又、動物に痛みを与えないようにネンプタル麻酔を行ってから、屠殺した。

## C. 研究結果

### A) PGC-1 結合蛋白の同定

マウス PGC-1 ( $\Delta 1-200$ ) タンパク質をおとりとして、運動負荷マウス骨格筋 cDNA ライブラリー  $4.8 \times 10^6$  独立クローンをスクリーニングし、陽性クローンの DNA 配列を解析した。39 個の陽性クローンのうち、12 クローンが逆向きに挿入された遺伝子、10 クローンがミトコンドリア DNA 由来の遺伝子をコードしたもの、5 クローンが vector のみの遺伝子であった。その他、apoB editing enzyme complex 2 (APOBEC-2)、myosin heavy chain、rRNA が各 2 クローンずつ、adenine nucleotide translocase I、Nit protein 2 および筋繊維に関連する myosin、nebulin、troponin I、troponin C が各 1 クローンずつ得られた。修飾に関与すると考えられている APOBEC-2 が得られた。

### B) 筋肉に於ける脂肪合成の役割 ; SREBP-1 の関与

マウスを 2 週間水泳させ、水泳後 3 時間、12 時間後にマウスを殺し、SREBP-1 の発現量を筋組織 gastrocnemius と quadriceps で調べた。両筋肉で SREBP-1 の発現量が 3 時間、12 時間後に増加していることがわかった。SREBP-1 のターゲット遺伝子で脂肪合成に関係する ACC-1 (acetyl-CoA carboxylase)、SCD-1 (stearoyl-CoA desaturase-1)、D GAT-1 (acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase -1) の発現量が運動後 3 時間に増加した。

6 時間のトレッドミルを用いたランニングの後、数時間後に GLUT4 の発現量が増加することが知られている。マウスを運動した後、自由に摂食させ 12 時間後に SREBP-1、GLUT4 の発現量を調べた。SREBP-1 も GLUT4 も 1.8 倍程度増加した。RNase プロテクション法により SREBP-1a は増加しないが、SREBP-1 c が増加することが示され、肝と同じように SREBP-1 c が脂肪の合成亢進に関与していることが推定された。

### C) 筋肉でのLPLの発現調節 ; FKHRの関与

#### 1) 絶食の影響

24h、48hの絶食により筋肉でフォークヘッドタイプの転写因子 (FKHR、AFK、FKHRL1) の全ての発現量が2~6倍増加した。絶食後、摂食することにより、これらの転写因子の増加は基礎状態に戻った。これらの転写因子の中でFKHRの増加が著明であった。絶食に伴い、LPL、CD36/FAT、PPAR $\alpha$ の発現量が増加した。

#### 2) ストレプトゾトシン (STZ) 糖尿病の影響

STZ注射後、10日目の筋肉ではFKHR、LPLが2倍程度増加した。AFX、FKHRL1の増加は著明で

はなかった。

3) 6時間の運動後、2時間でFKHRの5倍程度のLPLの1.5倍程度の発現増加が認められた。しかし、摂食後16時間ではこれらの変化は認められなかった。

4) FKHRの過剰発現へのC<sub>2</sub>C<sub>12</sub>の影響

C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>細胞でFKHRの過剰発現により、LPLの7倍程度の発現量の増加が認められ、PPAR $\alpha$ のリガンドであるWy14643刺激によってもLPLの9倍程度の発現増加が認められた。これらの効果は相加的であった。

#### D. 考察

PGC-1のターゲット遺伝子の同定を試み、その結果APOBEC-2を同定した。APOBEC-2は、骨格筋と心臓に特異的に発現し、ApoBの2153番目のアミノ酸GlnをコードするDNA配列CAAをUAAへ変換するAPOBEC-1のホモログである。APOBEC-2は、APOBEC-1のアミノ酸配列C末端側に存在するApoB認識配列を欠損しているため、ApoB mRNAを基質とはしない。現在までにどのmRNAを基質としているかは報告されておらず、今回、PGC-1との結合するものとして検出されたことにより、APOBEC-2がPGC-1依存的に発現が増加するmRNAの修飾に関与している可能性が示唆された。PGC-1は標的遺伝子の転写調節をおこなうだけでなく、RNA polymerase II およびRNA スプライシングに関与するタンパク質の結合部位を有し、RNAの修飾にも関与する。APOBEC-2もRNA修飾因子の一つであることから、PGC-1のRNAスプライシング因子結合部位に結合することが想定された。

肝臓で今までよく研究されている脂肪合成に関与する、acetyl-CoA carboxylase-1 (ACC-1)、stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1)、acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase-1 (DGAT-1) と

呼ばれている遺伝子のmRNAが増加することを見出した。また、これらの遺伝子の発現を制御している転写因子SREBP-1cの発現量の増加も認められ、肝臓と同じようにSREBP-1cの増加が、筋肉でも脂肪の合成をコントロールしていることが示唆された。尚、これらの脂肪合成関連遺伝子の発現の増加は、1回の運動では認められず、長期間の持続した運動が必要であることも示された。すなわち、転写因子SREBP-1cの発現量増加が運動後の脂肪蓄積を生じていることが示唆された。最近、糖尿病患者の筋肉でのSREBP-1cの発現量がコントロールの悪い患者ほど減少することが報告されている。これらの結果から、SREBP-1cが筋が良い) となり得る。

核内受容体はステロイドなどの脂溶性ホルモンをリガンドとし、標的遺伝子の転写調節を行なう。近年、核内受容体の転写調節にはコファクターと呼ばれる蛋白質との相互作用が重要であることがわかってきた。いままで報告されたコファクターのほとんどは、様々な組織にユビキタスに発現する。本研究において、核内受容体コファクターとして機能することが報告されているFKHRが、絶食時、糖尿病また運動直後の骨格筋(マウス)で発現誘導されることを見出した。さらに、培養筋肉細胞を用いた実験により、FKHRは核内受容体のPPAR $\alpha$ と協調的に働き、リポプロテインリパーゼ(LPL)の遺伝子発現を活性化することを見出した。高齢者では筋肉でのLPLが低下することが示されていて、FKHRの発現量を増加させることが望まれる。

細胞は外部のエネルギー供給状況により細胞内の代謝を変化させる。筋肉組織は運動を行うとATPを多量に消費するため、エネルギー供給が不足しATP合成を促進しようとして、糖/脂質代謝の分解を促進するよう酵素の活性及び量に変化する。一方、運動が終わり、食事をして、

エネルギー供給不足が解消すると、筋肉は今まで使用したエネルギーを蓄積するように働き、筋肉内での脂肪の蓄積、及びグリコーゲンの合成が生じる。グリコーゲンの合成は糖輸送体 (GLUT4) の増加で、脂肪の蓄積は脂肪の合成をコントロールしている、転写因子 SREBP-1c の発現の増加で説明されることを見出した。運動後の GLUT4 蛋白の増加は、同時にインスリンの感受性の亢進を生じ、糖尿病に対し予防的に働く。また、脂肪の合成を介してエネルギーを蓄積し、次の運動に備え、予備能を高めている。また、運動中には筋肉で LPL の発現量が増加し、血液中の中性脂肪の分解が進む。運動選手に見られる血中中性脂肪値の低下と HDL-コレステロールの増加 (動脈硬化の予防に関与) は、筋肉で LPL の発現量の増加が関与している可能性が高い。また、筋肉に於ける LPL の発現量が転写因子 FKHR により増加することを見出した。

老化に伴う筋肉の糖/脂質代謝の減少は、部分的に運動により改善させることが出来る。このため PGC-1、SREBP-1、FKHR の発現量の増加は、老化に伴う代謝の低下を改善させると考えられる。

## E. 結論

運動負荷マウス cDNA ライブラリーより、PGC-1 結合タンパク質の検索を行い、心臓と骨格筋に特異的に発現する APOBEC2 を検出した。長時間の運動後、マウスを自由に摂食する状態においておくと、脂肪合成酵素である SREBP-1c の発現量が増加することが示された。また、転写因子 FKHR が LPL の発現を増加することを示し、ザルコペニアを予防する上で、これらの転写因子、コファクターを活性化し、筋肉量を増加させ新しい治療法が機能を亢進させる

と考えられる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Kamei Y, Mizukami J, Miura S, Suzuki M, Takahashi N, Kawada T, Taniguchi T, Ezaki O. (2003) A forkhead transcription factor FKHR up-regulates lipoprotein lipase expression in skeletal muscle. *FEBS Letters*. Feb 11:536(1-3):232-236.

2) Nakatani T, Kim H-J, Kaburagi Y, Yasuda K, Ezaki O. (2003) A low fish oil inhibits SREBP-1 proteolytic cascade, while a high-fish-oil feeding decreases SREBP-1 mRNA in mice liver: relationship to anti-obesity. *J. Lipid. Res.* 44(2): 369-379.

3) Ikeda S, Miyazaki H, Nakatani T, Kai Y, Kamei Y, Miura S, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O. (2002) Up-regulation of SREBP-1c and lipogenic genes in skeletal muscles after exercise training. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296(2):395-400.

4) Takahashi M, Tsuboyama-Kasaoka N, Nakatani T, Ishii M, Tsutsumi S, Aburatani H, and Ezaki O. (2002) Fish oil feeding alters liver gene expressions to defend against PPAR $\alpha$  activation and ROS production. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 282: G338-G348.

5) Nakatani T, Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Miura S, Ezaki O. (2002) Mechanism for PPAR $\alpha$  activators-induced up-regulation of UCP2 mRNA in rodent hepatocytes. *J Biol Chem*, 277:9562-9569.

6) Takahashi M, Tsuboyama-Kasaoka N, Nakatani T, Ishii M, Tsutsumi S, Aburatani H, and Ezaki O. (2002) Fish oil feeding alters liver gene expressions to defend against PPAR $\alpha$  activation and ROS production. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 282:G338-G348.

### 2. 学会発表

国際学会

1) Low level overexpression of ucp2 in adipose

tissues up-regulates PGC-1 and ameliorates high fat diet-induced obesity and metabolic abnormalities. Tsuboyama-Kasaoka N, Y. Kamei, Miura S, M. Takahashi, Ezaki O: National Institute of Health and Nutrition, Tokyo, Japan. 9th International congress on obesity: 2002.8: SAO PAULO: August 24-29, 2002,

該当なし

#### 国内学会

1) ヒトにおける脂質、糖代謝の側面から

江崎治: 第37回日本循環器管理研究協議会総会・日本循環器病予防学会: 2002. 5. 30: 東京

2) 運動トレーニングによる骨格筋内の脂肪合成系遺伝子発現の増加機序, 宮崎裕美、笠岡(坪山) 宜代、

江崎治: 第56回日本栄養・食糧学会大会: 2002. 7. 20: 北海道

3) 共役リノール酸 (CLA) の適正摂取条件に関する検討およびSREBP1を介した肝臓脂肪蓄積メカニズムの解析, 笠岡(坪山) 宜代、宮崎裕美、江崎治: 第56回日本栄養・食糧学会大会: 2002. 7. 21: 北海道

4) 高脂肪食摂取マウスの白色脂肪細胞における遺伝子発現: ジーンチップを用いた解析, 高橋真由美、笠岡(坪山) 宜代、油谷浩幸、江崎治: 第56回日本栄養・食糧学会大会: 2002. 7. 21: 北海道

5) PPAR $\alpha$ 活性化を介したマウス及びラット肝実質細胞でのUCP2mRNA発現増加メカニズム, 仲谷照代、笠岡(坪山) 宜代、高橋真由美、三浦進司、江崎治: 第56回日本栄養・食糧学会大会: 2002. 7. 21: 北海道

6) 糖輸送体GLUT4発現と転写共役因子PGC-1の関連性について, 三浦進司、池田仁子、甲斐裕子、亀井康富、江崎治: 第56回日本栄養・食糧学会大会: 2002. 7. 21: 北海道

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他



アディポネクチンの作用機構と生理学的及び病態生理学的役割に関する研究

分担研究者 門脇 孝 東京大学医学部附属病院 糖尿病・代謝内科助教授

研究要旨

遺伝子組み換え蛋白の投与実験等により、我々はレプチンと共にアディポネクチンが脂肪組織由来のインスリン感受性ホルモンであることを報告した(Nat.Med.7:941,2001)。本研究では、アディポネクチンによる糖・脂質代謝の制御メカニズムを明らかにすることを試みた。アディポネクチンヘテロ欠損マウスで、普通食下でもインスリン抵抗性を認め、ホモ欠損マウスではより強いインスリン抵抗性・耐糖能障害を認めた。これらの表現型は高脂肪食負荷でさらに増悪した(JBC.277:25863,2002)。著明な痩せと良好なインスリン感受性を示す CBP ヘテロ欠損マウスでは、レプチン作用及びアディポネクチンレベルの著明な増加を認めた(Nat.Genet.30:221,2002)。アディポネクチン過剰発現 ob/ob マウスでは高 FFA 血症・糖尿病の改善を認めたが、肥満の改善は認められなかった(JBC.278:2461,2003)。優性抑制型 AMPK を用いた検討より、アディポネクチンは AMPK 活性化を介して骨格筋で脂肪酸燃焼、糖取り込みを促進し、肝臓で糖新生を抑制し、血糖を低下させることが示された(Nat.Med.8:1288,2002)。これら遺伝子操作マウスを用いた解析より、アディポネクチンは個体レベルでの生理的なインスリン感受性、糖・脂質代謝の重要な調節因子であることが示された。その補充は生活習慣病を改善させることが示された。

A. 研究目的

日本人の糖尿病患者は推定 700 万人でその数はなお増加の一途をたどっている。従って糖尿病の原因遺伝子を解明し、これに立脚して糖尿病の根本的な予防や治療法の確立に役立てることが重要である。大部分の糖尿病を占める一般の 2 型糖尿病は、遺伝的要因が強く関与し、これに生活習慣などの環境因子が加わって発症する多因子病である。我々は全ゲノムマッピングと候補遺伝子的アプローチ併用によって日本人 2 型糖尿病の原因遺伝子のひとつがアディポネクチンであることを同定した。すなわち先ず遺伝的にはアディポネクチンの血中レベルを下げる遺伝子多型(SNP)が糖尿病の原因となり、アディポネクチンだけで全体の 30%の糖尿病を説明しうることを明らかにした。また高脂肪食などの生活習慣・環境因子によってもアディポネクチンの血中レベルは低下し、糖尿病の原因となりうることを明らかにした。さらにこのアディポネクチンの補充がインスリン抵抗性改善の新規ストラテジーとなることを動物実験で明らかにした。

本研究では、アディポネクチンの (1) 生理的意義、(2) 病態生理学的意義、及び (3) 作

用機構を明らかにすることを試みた。

B. 研究方法

(1) アディポネクチンの生理的意義を明らかにするため、アディポネクチン欠損マウスを作製して、その表現型を解析した。

(2) アディポネクチンの病態生理学的意義を明らかにするために、アディポネクチン過剰発現マウスを作製し、肥満・糖尿病のモデルである ob/ob マウスとの掛け合わせを行ない、その表現型を解析した。

(3) 著明な痩せと良好なインスリン感受性を示す CBP ヘテロ欠損マウスを用いてアディポネクチンの個体レベルでの機能を明らかにすることを試みた。

(4) アディポネクチンを標的とした薬剤の開発を行うため、アディポネクチンの作用機構を明らかにすることを試みた。

C. 研究結果

(1) アディポネクチンヘテロ欠損マウスもホモ欠損マウスも予想外なことに、体重に著変を認めなかった。インスリン感受性試験において、アディポネクチンヘテロ欠損マウスでは野生型

マウスと比較して、インスリンによる血糖降下作用が有意に減弱しており、インスリン抵抗性が存在することが示唆された。ホモ欠損マウスではヘテロ欠損マウスと比較してもさらに血糖降下作用が減弱しており、さらに強いインスリン抵抗性が存在することが示唆された。また糖負荷試験において、アディポネクチンホモ欠損マウスでは野生型マウスと比較して有意に血糖が上昇しており、耐糖能障害が存在することが示唆された。これらの表現型は高脂肪食負荷によりさらに増悪を認めた。またアディポネクチン欠損マウスはインスリン抵抗性が存在するにも関わらず、糖負荷試験時のインスリンが低値を示した。このことからアディポネクチンがインスリン分泌にも重要な役割を果たしていることがはじめて明らかとなった。(JBC.277:25863,2002)。

(2) 自由摂餌下の高脂肪食負荷下のアディポネクチン過剰発現 ob/ob マウスでは、ob/ob マウスで認められるインスリン抵抗性・膵β細胞の疲弊・高中性脂肪血症が低減されていたが、肥満の改善は認められなかった。Pair-feedingにより肥満も抑制されたことより、自由摂餌下ではエネルギー消費の亢進が摂餌量の増加によって代償されている可能性が考えられた。次にアディポネクチンによるインスリン抵抗性改善及び高中性脂肪血症低減のメカニズム解明を試みたところ、アディポネクチンは脂肪酸燃焼に関わる ACO やエネルギー消費に関わる UCP の発現を増加させることが明らかとなった。これらの遺伝子は PPAR $\alpha$  の標的遺伝子であるので、次にまずは PPAR $\alpha$  の発現量を検討したところ、PPAR $\alpha$  の発現量そのものが増加しているのが認められた。さらに興味深いことにアディポネクチンによって PPAR $\alpha$  の内因性リガンド活性が増加していることも認められた(JBC.278:2461, 2003)。

(3) 次に PPAR $\gamma$  の主要な転写共役因子である CBP(cAMP response element binding protein(CREB) binding preotein)の脂肪蓄積やインスリン感受性制御における生理的な役割を CBP 欠損マウスを用いて検討した。CBP ホモ欠損マウスは胎生致死であった。CBP ヘテロ欠損マウスでは摂餌に関わる脳内ペプチドの発現量に有意な変化を認めず、実際体重当りの摂餌量に著変を認めなかったが、エネルギー消費が亢進しており、野生型マウスの 2/3 程度の体重を示した。本マウスの体重当たりの組織重量は白色脂肪組織においてのみ著減していた。in vivo においては脂肪細胞分化の障害は認められず、白

色脂肪組織量の著減は脂肪細胞の数の減少ではなく、脂肪細胞のサイズが小さいこと、すなわち脂肪蓄積が抑制されていることに起因しているものと考えられた。本マウスでは普通食、高脂肪食下共に、より良好な耐糖能、インスリン感受性、インスリン分泌を示した。これらは、レプチン感受性が亢進し、インスリン感受性ホルモンであるアディポネクチンの発現量、血中濃度が増加していたこと、及びインスリン抵抗性を惹起する遊離脂肪酸の血中濃度、TNF $\alpha$  の発現量が低下していたことによるものと考えられた。次に CBP ヘテロ欠損マウスのインスリン感受性が良好であるメカニズムを明らかにする目的で、骨格筋において脂肪酸代謝やエネルギー消費に関わる分子の発現と、高脂肪食負荷によるインスリン抵抗性惹起の原因と考えられている組織内中性脂肪含量(14)の測定を行なった。CBP ヘテロ欠損マウスでは、野生型の littermate と比較して、白色脂肪組織では脂肪酸流入に関わる分子の発現低下、肝臓・骨格筋・脂肪組織では脂肪合成に関わる酵素の発現低下及び脂肪酸燃焼に関わる ACO やエネルギー消費に関わる UCP の発現増加を認めた。これらは、レプチン感受性の亢進とアディポネクチンの血中レベルが増加していたのと合致する所見と考えられた。CBP ヘテロ欠損マウスでは、これらの遺伝子発現の増加と相関して、骨格筋内中性脂肪含量が低下しているのが認められ、このことが、CBP ヘテロ欠損マウスのインスリン感受性が良好であることのひとつのメカニズムとなっているものと考えられた(Nature Genetics 30:221, 2002)。

(4) アディポネクチンによる脂肪酸燃焼促進の時間依存性を in vitro の骨格筋のモデル細胞である C2C12 で検討する過程で、アディポネクチンが 1 時間という短い時間で脂肪酸燃焼を促進することが認められた。1 時間という時間は、PPAR $\alpha$  を活性化して ACO など脂肪酸燃焼に関わる分子の発現増加を介して脂肪酸燃焼を促進するには短い可能性も考えられたので、我々はまず、転写の阻害剤であるアクチノマイシン D によって、1 時間のアディポネクチン添加によって促進される脂肪酸燃焼が抑制されるかどうかを検討した。興味深いことにアクチノマイシン D は、1 時間のアディポネクチン添加によって促進される脂肪酸燃焼を全く抑制しなかった。このことより、1 時間のアディポネクチン添加は転写を介さないで脂肪酸燃焼を促進する可能性が示唆された。転写を介さない脂肪酸燃焼促進のパスウェイとして AMP キナーゼの活性化によ

るリン酸化を介した情報伝達経路が存在することが知られている。AMPキナーゼは元々運動によって活性化されることが知られていた分子であり、インスリン非依存性の糖の取り込みや脂肪酸の燃焼を促進して、運動に必要なエネルギーの供給を司る分子と考えられている。このAMPキナーゼの活性化による脂肪酸燃焼促進のメカニズムは次のように考えられている。すなわち、AMPキナーゼはACCをリン酸化してACCの活性を抑制し、CPT-1の活性を抑制するマロニルCoAの量を低下させる。ミトコンドリアへの脂肪酸の流入を促進し、脂肪酸を燃焼させるCPT-1の活性の抑制の解除が脂肪酸の燃焼を促進するものと考えられている。さらに最近AMPキナーゼはインスリン感受性ホルモンであるレプチンや、抗糖尿病薬であるメトフォルミンによって活性化されることが報告され、非常に注目を集めている。1時間のアディポネクチン添加による転写を介さない脂肪酸燃焼促進はAMPキナーゼの活性化によるものである可能性も想定され得たので、アディポネクチンがAMPキナーゼを活性化するかどうか検討した(12)。非常に興味深いことに、アディポネクチンがAMPキナーゼを活性化するのが認められた。ドミナントネガティブAMPキナーゼを用いた検討により、アディポネクチンによる骨格筋での脂肪酸燃焼、糖取込み、糖利用の促進、肝臓での糖新生の抑制、in vivoでのアディポネクチンの急性の投与で認められる血糖値の低下は、少なくとも一部AMPキナーゼの活性化を介したものである可能性が示された (Nature Medicine.8:1288,2002)。

#### D. 考察

本研究より、肝臓や骨格筋において、AMPキナーゼを活性化する化合物がインスリン抵抗性改善薬として作用しうる可能性が考えられるので、現在そのスクリーニングを行なっている。またAMPキナーゼとPPAR $\alpha$ 情報伝達経路のクロストークに関しては、ドミナントネガティブAMPKの発現がアディポネクチンによるPPAR $\alpha$ リガンド活性の増加作用を遮断しなかったことより、独立したものである可能性が考えられた(未発表データ)。アディポネクチン作用におけるAMPキナーゼとPPAR $\alpha$ 情報伝達経路の相対的な寄与に関してはドミナントネガティブAMPKトランスジェニックマウスやPPAR $\alpha$ 欠損マウスを用いて現在検討中である。さらにDNAチップを用いた解析を組み合わせることで、アディポネクチンの細胞内情報伝達経路で、AMPキナーゼ/PPAR $\alpha$ 情報伝達経路非依

存性のパスウェイの同定を試みている。

アディポネクチンの標的器官である骨格筋や肝臓、マクロファージや血管内皮細胞における未同定のアディポネクチン受容体のクローニングは、アディポネクチンの細胞内情報伝達経路や生理学的役割解明に役立つだけでなく、

病態生理学的役割の解明を促進し、新規抗糖尿病、抗動脈硬化薬の開発に繋がるものと考えられ、非常に期待される。

#### E. 結論

我々はアディポネクチンが急性にはAMPキナーゼを、慢性にはPPAR $\alpha$ を活性化し、脂肪酸燃焼などを促進して、組織内中性脂肪含量を低下させて、インスリン抵抗性を改善させていることを見出した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Imai, Y., Shimozawa, N., Hioki, K., Uchida, S., Ito, Y., Takakuwa, K., Matsui, J., Takata, M., Eto, K., Terauchi, Y., Komeda, K., Tsunoda, M., Murakami, K., Ohnishi, Y., Naitoh, T., Yamamura, K., Ueyama, Y., Froguel, P., Kimura, S., Nagai, R., and **Kadowaki T.** : Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *J. Biol. Chem.* 278:2461-2468, 2003.

2) Yamauchi, T., Oike, Y., Kamon, J., Waki, H., Komeda, K., Tsuchida, A., Date, Y., Li, M., Miki, H., Akanuma, Y., Nagai, R., Kimura, S., Saheki, T., Nakazato, M., Yamamura, K., and **Kadowaki, T.** : Increased insulin sensitivity despite lipodystrophy in Crebbp heterozygous mice. *Nature Genetics* 30:221-226, 2002.

3) Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., Eto, K., Akanuma, Y., Froguel, P., Foufelle, F., Ferre, P., Carling, D., Kimura, S., Nagai, R., Kahn, B.B., and **Kadowaki, T.** : Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine.* 8:1288-1295, 2002.

4) Kubota, N., Terauchi, Y., Yamauchi, T.,

Kubota, T., Moroi, M., Matsui, J., Eto, K., Yamashita, T., Kamon, J., Satoh, H., Yano, W., Nagai, R., Kimura, S., Kadowaki, T., and Noda, T. : Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J. Biol. Chem.* 277:25863-25866, 2002.

5) Colombo, C., Cutson, J.J., Yamauchi, T., Vinson, C., Kadowaki, T., Gavrilova, O., and Reitman, ML. : Transplantation of adipose tissue lacking leptin is unable to reverse the metabolic abnormalities associated with lipotrophy. *Diabetes* 51:2727-2733,2002.

6) Mori Y, Otabe S, Dina C, Yasuda K, Populaire C, Lecoeur C, Vatin V, Durand E, Hara K, Okada T, Tobe K, Boutin P, Kadowaki T. Froguel P.Genome-wide search for type 2 diabetes in Japanese affected sib-pairs confirms susceptibility genes on 3q, 15q, and 20q and identifies two new candidate Loci on 7p and 11p. *Diabetes.* 2002 Apr;51(4):1247-55.

7) Hara, K., Boutin, P., Mori, Y., Tobe, K., Dina, C., Yasuda, K., Yamauchi, T., Otabe, S., Okada, T., Kadowaki, H., Hagura, R., Akanuma, Y., Ito, C., Yazaki, Y., Kimura, S., Nagai, R., Taniyama, M., Matsubara, K., Yoda, M., Nakano, Y., Tomita, M., Froguel, P. and Kadowaki, T. : Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes* 51: 536-540, 2002.

8) Terauchi Y, Matsui J, Suzuki R, Kubota N, Komeda K, Aizawa S, Eto K, Kimura S, Tobe K, Lienhard GE, Kadowaki T. Impact of genetic background and ablation of IRS-3 on IRS-2 knockout mice. *J Biol Chem.* published on line on Dec 18, 2002.

9) Hara K, Tobe K, Okada T, Kadowaki H, Akanuma Y, Ito C, Kimura S, Kadowaki T. A genetic variation in the PGC-1 gene could confer insulin resistance and susceptibility to Type II diabetes. *Diabetologia.* 2002 May;45(5):740-3.

10) Vasseur F, Helbecque N, Dina C, Lobbens S, Delannoy V, Gaget S, Boutin P, Vaxillaire M, Lepretre F, Dupont S, Hara K, Clement K, Bihain B, Kadowaki T. Froguel P.

Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. *Hum Mol Genet.* 2002 Oct 1;11(21):2607-14.

11) Tobe K, Asai S, Matuoka K, Yamamoto T, Chida K, Kaburagi Y, Akanuma Y, Kuroki T, Takenawa T, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T. Cytoskeletal reorganization induced by insulin: involvement of Grb2/Ash, Ras and phosphatidylinositol 3-kinase signalling. *Genes Cells.* 2003 Jan;8(1):29-40.

12) Terauchi Y, Kadowaki T. Insights into molecular pathogenesis of type 2 diabetes from knockout mouse models. *Endocr J.* 2002 Jun;49(3):247-63.

13) Shibuya A, Wada K, Nakajima A, Saeki M, Katayama K, Mayumi T, Kadowaki T. Niwa H, Kamisaki Y. Nitration of PPARgamma inhibits ligand-dependent translocation into the nucleus in a macrophage-like cell line, RAW 264. *FEBSLett.* 2002 Aug 14;525(1-3):43-7.

14) Hara, K., Noda, M., Waki, H., Tobe, K., Yamauchi, T., Kadowaki, H., Satou, H., Tsukamoto, K., Nagamatsu, S., Yamagata, K., Matsuzawa, Y., Akanuma, Y., Kimura, S., and Kadowaki, T. : Maturity-onset diabetes of the young resulting from a novel mutation in the HNF-4alpha gene. *Intern. Med.* 41:848-852, 2002.

## 2. 学会発表 国際学会

1) June 16, 2002 American Diabetes Association, 62nd Scientific Sessions, San Francisco, California Toshimasa Yamauchi1, Junji Kamon1, Yasuo Terauchi1, Naoto Kubota1, Hironori Waki1, Yasumichi Mori2, Kazuo Hara1, Kajuro Komeda3, Atsuko Tsuchida3, Yasuo Akanuma4, Satoshi Kimura1, Kazuyuki Tobe1, Madoka Yoda5, Motowo Tomita5, Philippe Froguel2 and Takashi Kadowaki1(Department of Metabolic Diseases, Graduate School of Medicine, University of Tokyo) Adiponectin /Leptin -Dependent and -Independent Pathways Regulating Insulin Sensitivity and Body Weight