

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

目 次

課題番号

20030933A KH51041	臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究	梨井 康 …… 1
934A KH51042	組換えDNA食品遺伝子産物の慢性経口毒性評価モデルの確立	廣瀬 雅雄 …… 5
935A KH51043	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦 善治 …… 10
936A KH51044	細胞内脂質輸送系に着目した血清脂質改善薬の開発のための基礎的研究	最上 知子 …… 16
KH51045	粘膜インフルエンザワクチンの実用化に関する研究	佐多 徹太郎 …… 21
937A KH51046	日本人糖尿病感受性遺伝子に基づく脂肪細胞を分子標的とした糖尿病・肥満の予防及び治療薬の開発	門脇 孝 …… 24
938A KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチン開発のための基礎研究	竹森 利忠 …… 27
939A KH51048	ノーウォークウイルスの超高感度核酸定量システム、及びベッドサイド抗原検出システムの開発	武田 直和 …… 31
940A KH51049	ワクチン創製の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島 朝人 …… 38
941A KH51050	食品および環境中の食中毒原因菌の病原因子に対する免疫学的高感度検出法に関する研究	五十君 静信 …… 43
942A KH51051	安全なアジュバントを用いた粘膜ワクチンの開発に関する研究	後藤 紀久 …… 48
943A KH51052	リポソーム表面結合型抗原のアレルギー予防・治療への応用に関する研究	内田 哲也 …… 55
944A KH51053	肺炎球菌感染症の標準的抗体価測定方法の確立に関する研究	岡部 信彦 …… 61
945A KH51054	PPAR α をターゲットとした生活習慣病予防薬の開発	片山 茂裕 …… 64
946A KH51055	感染症領域における先端的遺伝子診断技術の開発に関する研究	薄井 貢 …… 68
947A KH51056	乳幼児下痢症の原因ウイルス検出法に関する研究	西尾 治 …… 71
948A KH51057	可溶性ウイルス受容体等によるウイルス吸着阻止を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口 文広 …… 77
949A KH51058	EPA・DHA含有エステル交換構造脂質の体脂肪蓄積抑制効果に関する研究	斎藤 衛郎 …… 86
950A KH51059	エネルギー消費調節機構に立脚した生活習慣病予防薬に関する基礎研究	大坂 寿雅 …… 89
951A KH51060	遺伝子解析によるヒトエンテロウイルス同定の標準化	清水 博之 …… 93
952A		

日本人糖尿病感受性遺伝子に基づく脂肪細胞を分子標的とした糖尿病・肥満の予防及び治療薬の開発

所 属 東京大学医学部糖尿病・代謝内科
研究者 門脇 孝

研究要旨 アディポネクチンがインスリン抵抗性改善作用とともに動脈硬化抑制作用を持つことを明らかにし、アディポネクチン受容体を初めて単離・同定した。アディポネクチンを標的とする薬剤は糖尿病・動脈硬化の根本的治療となると期待される。

分担研究者

- (1) ㈱医薬分子設計研究所 板井昭子
- (2) 厚生労働省国立医薬品食品衛生研究所
有機化学部生薬 合田幸広
- (3) 東京大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝内科
戸辺一之
- (4) 東京大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝内科
山内敏正
- (5) 東京大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝内科
原一雄

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。糖尿病の大部分を占める一般の2型糖尿病は、複数の感受性遺伝子が組合わさり、更に生活習慣などの環境因子が重なって発症する多因子病である。糖尿病増加の最大の原因は食生活の欧米化、特に高脂肪食と身体活動の減少など生活習慣に起因した肥満とそれに伴うインスリン抵抗性の増大と考えられる。肥満の本態である脂肪細胞の肥大によってインスリン抵抗性惹起物質の過剰分泌やインスリン感受性促進物質の分泌不足が引き起こされ、インスリン抵抗性と糖代謝異常、脂質代謝異常、高血圧などメタボリックシンドロームが発症・進展すると考えられる。従って、脂肪細胞の肥大に関与する遺伝子、脂肪細胞から分泌されインスリン感受性の調節に重要な役割を担っている遺伝子の多型が2

型糖尿病をはじめとする生活習慣病の主要な遺伝的素因を形成している可能性が高く、その解明は2型糖尿病やメタボリックシンドロームの激増を阻止する上で必須である。本研究では全ゲノム解析とDNAチップによる発現プロファイリングの結果を照らし合わせて日本人における2型糖尿病感受性遺伝子を網羅的に同定し、機能を解明した上で感受性遺伝子を標的とした薬剤の開発を進めていく。本研究によって生活習慣病の発症メカニズムの解明と根本的治療法の開発に道が開かれ、活力ある高齢化社会が実現することに寄与したい。

B. 研究方法

(1) ゲノム解析による2型糖尿病遺伝素因の解明
罹患者同胞対を利用した全ゲノムスキャンによってマップされた日本人2型糖尿病感受性領域に存在し、機能的にも感受性遺伝子の候補となる遺伝子について、SNP(1塩基置換)を利用した相関解析を行い、日本人2型糖尿病感受性遺伝子としての意義を検討した。

(2) 2型糖尿病感受性遺伝子の機能解析
アディポネクチンのインスリン感受性亢進作用を個体レベルで検討するため、ob/obマウスとアディポネクチン過剰発現マウスを交配しその表現型を詳細に解析した。更に動脈硬化モデル動物であるApoE欠損マウスとアディポネクチン過剰発現マウスを交配し、アディポネクチンの動脈硬化に対する作用

を個体レベルで解析した。

(3) 遺伝子・機能情報に基づいた革新的な糖尿病・肥満治療薬の開発: インスリン感受性物質であることを明らかにしたアディポネクチンについて発現クローニングの手法を用いて特異的な受容体の単離・同定を行った。

C. 研究結果

(1) ゲノム解析による日本人 2 型糖尿病感受性遺伝子の同定: 罹患同胞対法によりマップした計 9 箇所の 2 型糖尿病原因遺伝子座のうち、先にアディポネクチン遺伝子が日本人における主要な 2 型糖尿病感受性遺伝子であることを明らかにした染色体 3 番以外の領域について SNP による患者対照相関解析を行った。アディポネクチン受容体遺伝子(AdipoR1, AdipoR2)について最低でも 10kb にひとつの割合で SNP を同定し患者対照相関解析を行い日本人における 2 型糖尿病感受性遺伝子としての意義を検討した(*Diabetes*, submitted for publication)。

(2) 遺伝子改変動物の作製による 2 型糖尿病感受性遺伝子の機能解析: アディポネクチンの作用を個体レベルで明らかにするため、ob/ob マウスとアディポネクチン過剰発現マウスを交配しその表現型を詳細に解析した。アディポネクチン過剰発現によって ob/ob マウスのインスリン抵抗性・高血糖が改善したことから、アディポネクチンがインスリン感受性の調節に重要であることが明らかとなった(*J. Biol. Chem.* 278: 2461-2468, 2003)。また、動脈硬化のモデル動物である ApoE 欠損マウスとアディポネクチン過剰発現マウスを交配したマウスは、ApoE 欠損マウスにみられる動脈硬化巣が減少していたことから、アディポネクチンが直接動脈硬化を抑制する作用があることを個体レベルで明らかにした(*J. Biol. Chem.* 278: 2461-2468, 2003)。

(3) 遺伝子・機能情報に基づいた、脂肪細胞を分子標的とする革新的な糖尿病・肥満治療薬の開発:

アディポネクチンとの特異的結合を指標にアディポネクチン受容体(AdipoR)1 と 2 をクローニングした(*Nature* 423: 762-769, 2003)。AdipoR 1 は骨格筋に多く発現が認められたのに対し、AdipoR 2 は肝臓に多く発現が認められた。AdipoR 1 と 2 は 7 回膜貫通型の構造

を有すると考えられるが、既知の G プロテイン共役型受容体ファミリーとは構造的・機能的に異なったファミリーに属するものと考えられた。AdipoR 1 もしくは R 2 の培養細胞への発現は、globular アディポネクチン及び全長アディポネクチンの特異的結合を増加させ、アディポネクチンによる AMP キナーゼ、及び PPAR α の活性化を増強し、脂肪酸燃焼促進を増強した。逆に siRNA を用いて内因性 AdipoR 1 もしくは R 2 の発現レベルを低下させると、globular アディポネクチン及び全長アディポネクチンの特異的結合が減少し、アディポネクチンによる脂肪酸燃焼や糖取り込み促進効果が減弱することを明らかにした。以上の結果からアディポネクチンの受容体作動薬を開発することは生活習慣病・動脈硬化の根本的な治療薬となり得ることが明らかとなった。

D. 考察

アディポネクチン過剰発現によって ob/ob マウスのインスリン抵抗性・高血糖が改善したことから、アディポネクチンがインスリン感受性の調節に重要であることを明らかとした。また、インスリン抵抗性など他のリスクファクターに改善が認められない程度のアディポネクチン過剰発現によって動脈硬化のモデル動物である ApoE 欠損マウスの動脈硬化が抑制されたことから、アディポネクチンはインスリン抵抗性改善作用と独立して、直接作用により動脈硬化を改善する作用があることを明らかにした。更に発現クローニングの手法を用いてアディポネクチンの特異的な受容体を世界で初めて単離・同定することに成功した。現在アディポネクチン受容体作動薬について化合物のスクリーニングを進めており、今後の画期的な抗糖尿病・抗動脈硬化薬の開発に道が開かれたと考えられる。

本研究では全ゲノム解析と DNA チップによる発現解析を照らし合わせることによって効率的に生活習慣病の感受性遺伝子アディポネクチンを同定することが出来た。更に感受性遺伝子アディポネクチンの機能を発生工学的手法を用いて個体レベルで明らかにした。更に発現クローニングの手法を用いてアディポネクチンの特異的受容体を単離・同定することに成功した。一連の成果は我々のアプローチが有効であることを実証しており、本研

究終了後も同様のアプローチによって、日本人2型糖尿病感受性遺伝子の同定とその機能解析、標的薬の開発を行っていきたい。具体的には、PPAR γ 拮抗薬、アディポネクチン補充療法への応用、アディポネクチン受容体作動薬の開発などを行って行く。本研究の成果は、日本人において増加の一途を辿っている生活習慣病の根本的・理想的な治療法を開発し活力ある長寿社会の実現に貢献すると考えられる。

E. 結論

- (1) 動脈硬化モデル動物である ApoE 欠損マウスとアディポネクチン過剰発現マウスを掛け合わせ、その表現型を解析することによって、アディポネクチンが直接的に動脈硬化抑制作用を持つことを個体レベルで初めて明らかにした。
- (2) アディポネクチンの特異的受容体を世界で初めて単離・同定に成功した。本受容体に対する作動薬は糖尿病・動脈硬化の根本的治療薬として期待される。

F. 研究成果

1. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T: Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423: 762-769, 2003
2. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimozawa N, Hioki K, Uchida S, Ito Y, Matsui J, Eto K, Komeda K, Tsunoda M, Murakami K, Ohnishi Y, 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.
3. Hara K, Ohe K, Kadowaki T, Kato N, Imai Y, Tokunaga K, Nagai R, Omata M: Establishment of a method of anonymization of DNA samples in genetic research. *J. Hum. Genet.* 48: 327-330, 2003
4. Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, Hara K, Hada Y, Vasseur F, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T: Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes: Molecular structure and

multimer formation of adiponectin. *J. Biol. Chem.*, 278:40352-63, 2003

5. Tobe K, Asai S, Matsuoka 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. *Gene to Cells* 8: 29-40, 2003
6. Terauchi Y, Matsui J, Suzuki R, Kubota N, Komeda K, Aizawa S, Eto K, Kimura S, Nagai R, Tobe K, Lienhard GE, Kadowaki T: Impact of genetic background and ablation of insulin receptor substrate (IRS)-3 on IRS-2 knock-out mice. *J. Biol. Chem.* 278: 14284-14290, 2003
7. Suzuki R, Tobe K, Terauchi Y, Komeda K, Kubota N, Eto K, Yamauchi T, Azuma K, Kaneto H, Taguchi T, Koga T, German MS, Watada H, Kawamori R, Wright CV, Kajimoto Y, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T: Pdx1 expression in Irs2 deficient mouse β cells is regulated in a strain-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 278:43691-8, 2003
8. Suzuki R, Tobe K, Aoyama M, Yamauchi T, Kamon J, Kubota N, Terauchi Y, Yoshimatsu H, Matsuhisa M, Nagasaka S, Ogata H, Tokuyama K, Nagai R, Kadowaki T. Both insulin signaling defects in the liver and obesity contribute to insulin resistance and cause diabetes in Irs2^{-/-} mice. *J. Biol. Chem.* 2004 Mar 17

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
東京大学 TLO などによる特許取得は計 8 件
2. 実用新案登録
特記事項なし
3. その他
特記事項なし

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

平成16年9月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社