

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

生活習慣病の鍵分子、アディポネクチン受容体  
の病態生理的意義と情報伝達経路の解明

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山内 敏正

平成19（2007）年 4月

## 目 次

I. 総括研究報告		
「生活習慣病の鍵分子、アディポネクチン受容体の病態生理的意義と 情報伝達経路の解明」		
山内敏正	-----	3
II. 分担研究報告		
1. 「生活習慣病の鍵分子、アディポネクチン受容体の病態生理的意義の解明」		
窪田直人	-----	9
2. 「アディポネクチン受容体の結合タンパクを用いた情報伝達経路の解明」		
植木浩二郎	-----	12
3. 「アディポネクチン受容体の生理的意義と情報伝達経路の解明」		
門脇 孝	-----	15
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	19
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	20

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

総括研究報告書

「生活習慣病の鍵分子、アディポネクチン受容体の病態生理的意義と

情報伝達経路の解明」

主任研究者 山内敏正 東京大学医学部附属病院 客員助教授

研究要旨：過剰発現と遺伝子欠損による機能解析により、AdipoR1・R2 が個体レベルでアディポネクチンの結合と作用に必須の主要な受容体である事、R1・R2 が糖・脂質代謝、炎症、酸化ストレス制御に個体レベルで重要な役割を果たす事、R1 はアディポネクチンによる AMPK 活性化、R2 は PPAR $\alpha$  活性化の経路と、それぞれより強くリンクしている事を証明した (Nat Med 13: 332 - 339, 2007)。(2) AdipoR1・R2 それぞれの特異的結合タンパクによって機能の役割分担の分子機構を説明出来る可能性を示した。

分担研究者

窪田 直人 東京大学医学部附属病院  
客員助手

植木浩二郎 東京大学医学部附属病院  
特任助教授

門脇 孝 東京大学医学部附属病院  
教授

#### A. 研究目的

本研究においては、(1) 遺伝子改変マウスの解析によるアディポネクチン受容体 AdipoR1 と R2 の生理的・病態生理的意義の解明、(2) AdipoR1 と R2 結合蛋白の同定とそれに基づいた細胞内情報伝達機構の解明を行ない、新規の革新的な抗メタボリックシンドローム・抗動脈硬化薬の開発に繋げることを交付申請時の目的とした。

#### B. 研究方法

AdipoR1 と AdipoR2 のアデノウイルスによる発現系を構築し、293 細胞を用いて増やした後にアデノウイルスの精製を行った。メタボリックシンドロームのモデルマウスである db/db マウスにこのアデノウイルスを感染させ、肝臓特異的に過剰発現させて、その表現型を解析した。AdipoR1 と AdipoR2 の遺伝子欠損マウスを ES 細胞を用いた相同組み換えの手法により作製し、さらに両者を掛け合

わせることによって AdipoR1・R2 ダブル欠損マウスを作製した。そして 129 と B6 の mixed background の遺伝子欠損マウスを littermates 同士で比較し、表現型を解析すると共に、B6 background への戻し交配を行い、B6 pure background の AdipoR1 欠損マウスと AdipoR2 欠損マウスと AdipoR1・R2 ダブル欠損マウスを作製し、解析した。gC1qR の RNAi による遺伝子ノックダウンを行い、アディポネクチンによる AMPK のリン酸化を検討した。GST- gC1qR 融合タンパクを作製した。タグを付けた AdipoR1 あるいは AdipoR2 を過剰発現させた mammalian 細胞の膜可溶画分を調整し、GST- gC1qR 融合タンパクと incubate させ、結合性を検討した。タグを付けた種々の AdipoR1 と AdipoR2 のキメラタンパクを作製し、GST- gC1qR 融合タンパクとの結合性を検討した。

#### C. 研究結果

AdipoR1, AdipoR2 の発現量を TaqManPCR で検討したところ、ノックアウトマウスで消失、db/db マウスの肝臓で AdipoR1, AdipoR2 共に約半分に低下しているのが認められた。Db/db マウス肝臓で約半分に低下している AdipoR1, AdipoR2 の発現量は、AdipoR1, AdipoR2 を発現するアデノウイルスの感染により、アデノ

ウイルスの濃度依存性に増加し、野生型マウスに戻る程度から野生型の3倍程度に発現増加する程度まで、調節可能であった。

AdipoR1・R2 ダブル欠損マウスから初代培養肝細胞を採取し、RI で標識した全長アディポネクチンを用いて binding assay を行うと、野生型マウスで認められる全長アディポネクチンの細胞膜表面への特異的な結合が AdipoR1・R2 ダブル欠損マウスの初代培養肝細胞では消失しているのが、認められた。

野生型マウスへの全長アディポネクチンの投与は、AMPK の活性化や糖新生の抑制などを介して、数時間というタイムコースで有意に血糖値を低下させるが、AdipoR1・R2 ダブル欠損マウスにおいては、全長アディポネクチンは血糖値を低下させなかった。

AdipoR1・R2 ダブル欠損マウスにおいては AMPK と PPAR $\alpha$  両方の経路の活性が低下しており、クランプ試験において、糖新生の増加と糖取り込みの低下、そして全身での糖利用の低下が認められ、糖負荷試験において高血糖・高インスリン血症を認め、耐糖能障害とインスリン抵抗性が存在することが示唆された。

AdipoR1・R2 ダブル欠損マウスの脂肪組織においてケモカイン MCP-1 やマクロファージのマーカー Mac-1 の発現量を TaqManPCR で検討したところ、増加しているのが認められ、アディポネクチン作用の低下によりマクロファージが引き寄せられ、炎症が惹起されていることが示唆された。関連して酸化ストレス消去系の Catalase や SOD1 の発現量を TaqManPCR で検討したところ、低下しているのが認められ、実際に酸化ストレス TBARS が上昇しているのが認められた。

Db/db マウスに AdipoR1 あるいは AdipoR2 を発現させるアデノウイルスを感染させて AdipoR の発現を肝臓特異的に増加させたところ、耐糖能障害がそれぞれ改善するのが認められた。AdipoR1 の過剰発現では AMPK が活性化され、糖新生に関わる分子の発現抑制、ピルビン酸負荷試験で評価した糖新生の抑制、脂肪酸合成に関わる分子の発現抑制と脂肪酸燃焼の促進を介して、肝細胞内中性脂肪含量の低下傾向を認めて、インスリン抵抗性が改善しているのが認められた。AdipoR2 の過剰発現では PPAR $\alpha$  自体の増加と活性化を介した脂肪酸燃焼やエネルギー消費に関わる分子の発現増加と脂肪酸燃焼活性の増加を介して肝細胞内中性脂肪含量の低下傾向を認めた。さらに炎症性サイトカインや酸化ストレス消去に関わる分子の発現増加と TBARS の低下傾向を認めてインスリン抵抗性が改善しているのが認められた。

gC1qR の RNAi による遺伝子ノックダウンにより、アディポネクチンによる AMPK のリン酸化が著明に低下するのが認められた。

GST- gC1qR に、タグを付けた AdipoR1 あるいは AdipoR2 を過剰発現させた mammalian 細胞の膜可溶画分を incubate させたところ、AdipoR1 のみが特異的に結合するのが認められた。キメラタンパクを用いた解析から、TM4-5 のみが AdipoR1 になった AdipoR2 は、AdipoR1 同様、結合出来るようになることが示唆された。

#### D. 考察

AdipoR1 と R2 の遺伝子欠損マウスの解析の上記結果より、

(1) in vivo において AdipoR1 および AdipoR2 がアディポネクチンの結合と作用に必須の主要な受容体であることが証明された。

(2) AdipoR1 および R2 は in vivo において血糖制御や脂質代謝、炎症や酸化ストレスの制御に重要な役割を果たすことが示唆された。

(3) 我々は以前、肥満症の病態においては AdipoR の発現が低下しており、外からアディポネクチンを投与しても、アディポネクチン作用が十分に伝わらない“アディポネクチン抵抗性”の病態が存在することを報告していたのが、(JBC 279: 30817, 2004)、アデノウイルスを用いて肝臓特異的に AdipoR1 又は R2 を過剰発現させることが実際に治療法になることが明らかとなった。

(4) AdipoR の増加による抗糖尿病作用は、アディポネクチンによる活性化が必要であることが明らかとなった。AdipoR の特異的結合タンパクを用いた細胞内情報伝達経路解析により、AdipoR1 と R2 にそれぞれ特異的に結合する細胞内シグナル分子の違いで R1 と R2 の役割分担を説明出来る可能性が示唆された。

#### E. 結論

(1) AdipoR1 および AdipoR2 が個体レベルにおいても、アディポネクチンの結合と作用に必須の主要な受容体である。

(2) AdipoR1 および R2 は個体レベルにおいて血糖制御や脂質代謝、炎症や酸化ストレスの制御に重要な役割を果たす。

(3) AdipoR1 と R2 にそれぞれ特異的に結合する細胞内シグナル分子の違いで R1 と R2 の役割分担を説明出来る可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報 特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kawamoto S, Kubota N, Kubota T, Ito Y, Kamon J, Tsuchida A, Kumagai K, Kozono H, Hada Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Awazawa M, Takamoto I, Froguel P, Hara K, Tobe K, Nagai R, Ueki K, Kadowaki T. : Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nature Medicine* 13: 332 - 339, 2007

##### 2. 学会発表

###### 国内

第 103 回日本内科学会講演会 横浜、2006, 4

山内敏正、窪田直人、原 一雄、植木浩二郎、戸辺一之、永井良三、門脇 孝  
「アディポネクチン・アディポネクチン受容体の病態生理的意義解明と生活習慣病診断・治療への応用」(口演発表)

第 79 回日本内分泌学会学術総会 神戸、2006, 5

山内敏正、窪田直人、原 一雄、植木浩二郎、戸辺一之、永井良三、門脇 孝  
アディポネクチン・アディポネクチン受容体の病態生理的意義解明と生活習慣病診断・治療への応用 (口演)

第 49 回 日本糖尿病学会年次学術集会  
東京、2006, 5

山内敏正、仁尾泰徳、牧敏之、窪田直人、高澤健、羽田裕亮、岩部真人、岩部美紀、栗澤元晴、高本偉碩、植木浩二郎、門脇孝

肝臓でのアディポネクチン受容体の過剰発現は AMPK, PPAR $\alpha$  経路の活性化を介し、耐糖能障害を改善させる

仁尾泰徳、山内敏正、牧敏之、窪田直人、高澤健、羽田裕亮、岩部真人、岩部美紀、栗澤元晴、高本偉碩、植木浩二郎、門脇孝

遺伝子欠損マウスを用いたアディポネクチン受容体の生理学的意義の解明

第 11 回アディポサイエンス研究会 大阪、2006, 8

仁尾泰徳、山内敏正、栗澤元晴、植木浩二郎、門脇孝

Overexpression of AdipoR1 or R2 in liver ameliorated insulin resistance and diabetes linked to obesity via AMP kinase and PPARalpha activation by adiponectin

第 8 回インスリン作用シンポジウム 滋賀、2006, 9

仁尾泰徳、山内敏正、栗澤元晴、植木浩二郎、門脇孝

Overexpression of AdipoR1 or R2 in liver ameliorated insulin resistance and diabetes linked to obesity via AMP kinase and PPARalpha activation by adiponectin

第 27 回日本肥満学会学術集会、神戸、2006, 10

仁尾泰徳、山内敏正、牧敏之、窪田直人、高澤健、羽田裕亮、岩部真人、岩部美紀、栗澤元晴、高本偉碩、植木浩二郎、門脇孝

脂肪細胞研究の最前線 遺伝子欠損マウスを用いたアディポネクチン受容体の生理学的意義の解明

東京大学生命科学研究ネットワークシンポジウム 東京、2006, 11

仁尾泰徳、山内敏正、窪田直人、羽田裕亮、岩部真人、岩部美紀、栗澤元晴、高本偉碩、戸辺一之、植木浩二郎、門脇孝  
AdipoR1・R2 はアディポネクチンの特異的結合・血糖降下作用に必須であり、AdipoR1・R2 ダブル欠損マウスはインスリン抵抗性・耐糖能障害を呈する

第 18 回 分子糖尿病学シンポジウム 松山、2006, 12

仁尾泰徳、山内敏正、窪田直人、羽田裕亮、岩部真人、岩部美紀、栗澤元晴、高本偉碩、戸辺一之、植木浩二郎、門脇孝  
AdipoR1・R2 はアディポネクチンの特異的結合・血糖降下作用に必須であり、AdipoR1・R2 ダブル欠損マウスはインスリン抵抗性・耐糖能障害を呈する

第 10 回日本病態栄養学会年次学術集会 横浜、2007, 1

山内敏正、仁尾泰徳、高澤健、岩部真人、岩部美紀、河本幸子、羽田裕亮、窪田直人、原一雄、植木浩二郎、戸辺一之、門脇孝

「アディポネクチン/AdipoR の病態生理的意義解明と過食/高脂肪食等による生活習慣病 診断治療への応用」

仁尾泰徳、山内敏正、羽田裕亮、岩部真人、岩部美紀、栗澤元晴、窪田直人、植木浩二郎、戸辺一之、門脇孝  
肝臓でのアディポネクチン受容体の過剰発現は AMPK、PPAR $\alpha$  経路の活性化を介し、過食による肥満に伴う耐糖能障害を改善させる

第一回炎症、脂質、メタボローム研究会 東京, 2007, 1

仁尾泰徳、山内敏正、岩部真人、岩部美紀、羽田裕亮、窪田直人、栗澤元晴、高本偉碩、植木浩二郎、戸辺一之、門脇孝  
抗メタボリックシンドローム作用を有するアディポネクチンの受容体 AdipoR1・R2 のダブル欠損は脂質代謝異常・炎症を惹起して耐糖能障害を来す

#### 国外

Scientific Sessions 66<sup>th</sup> American Diabetes Association, Washington, 2006. 6

Toshimasa Yamauchi. Targeted Disruption of AdipoR1 and R2 Abrogated Adiponectin Binding and Impaired AMP Kinase and PPAR $\alpha$  Activation, Leading to Diabetes

FASEB Summer Research Conference entitled “AMPK: Impact on Mammalian Metabolism and Disease “ (Snowmass, 2006. 8)

Takashi Kadowaki, Naoto Kubota, Tetsuya Kubota, Toshimasa Yamauchi : Adiponectin-induced modulation of AMPK activity in peripheral tissues and brain —their physiological and pathophysiological roles—

KEYSTONE SYMPOSIA (Keystone Resort, Keystone, Colorado, 2007.1)

Toshimasa Yamauchi. Diabetes: Molecular Genetics, Signaling Pathways and Integrated Physiology (J1-2007) Adipokines 「Adiponectin Receptors」

#### 3、招聘講演・シンポジウム

23<sup>rd</sup> Live Demonstration in Kokura 2006, 4

山内敏正：Evening Seminar 4 糖尿病患者を如何に治すか？新規病変抑制 (Metabolic Syndrome)

先端医療開発研究クラスターシンポジウム (第2回) 東京大学 本郷キャンパス 2006, 4

山内敏正：「環境・遺伝相互作用研究から出発した生活習慣病の根本的治療法・画期的診断法の開発」

第49回 日本糖尿病学会年次学術集会 リリー賞受賞講演 東京、2006, 5

山内敏正：「脂肪細胞由来の抗糖尿病・抗動脈硬化ホルモン、アディポネクチンの受容体同定と作用メカニズム・病態生理学的意義の解明」

49th Annual Meeting of the Japan Diabetes Society 東京、2006, 5  
Symposium8: “Adipokine network: a new era”

Toshimasa Yamauchi, Naoto Kubota, Kazuo Hara, Kohjiro Ueki, Kazuyuki Tobe and Takashi Kadowaki :

「Pathophysiological roles of Adiponectin and AdipoRs」

動脈硬化学会 東京 2006, 7  
山内敏正; 「アディポネクチン受容体の  
生理的・病態生理的意義」

第 43 回日本臨床分子医学会学術集会  
札幌、2006, 7

Translational Research Forum III :メ  
タボリック症候群  
山内敏正:メタボリックシンドロームの  
分子メカニズムと治療戦略 - PPAR とア  
ディポネクチンを中心にしてー

文部科学省第 1 回ナノバイオサマース  
クール「生命現象を知る」人材開発セ  
ンター富士研修所、2006, 8  
山内敏正:脂肪細胞機能と肥満の病態生  
理—特に PPAR とアディポカインにつ  
いてー

The 11th Adiposcience Symposium 大  
阪 2006, 8

Toshimasa Yamauchi, Naoto Kubota,  
Kazuo Hara, Kohjiro Ueki, Kazuyuki  
Tobe and Takashi Kadowaki :  
「Implication of Adipocytokine and  
Metabolic Syndrome」

Pathophysiological roles of  
adipokine network in metabolic  
syndrome

第 4 1 回 糖尿病学の進歩 札幌  
2006, 9

山内敏正:糖尿病の成因と病態に関する  
研究の進歩 (2) (インスリン抵抗性)  
「PPARs とアディポカイン」(レクチャ  
ー)

第 2 7 回 日本肥満学会 神戸、2006,  
10

シンポジウム 3:メタボリックシンドロ  
ームの病態のすべて

山内敏正:「アディポネクチン/AdipoR  
のメタボリックシンドローム発症にお  
ける病態生理的意義」

第 1 4 回 日本血管生物医学会学術大  
会 東京、2006, 12

山内敏正;ランチョンセミナー「メタボ  
リックシンドロームの分子メカニズム  
と治療戦略」

第 3 回先端医療開発研究クラスターシ  
ンポジウム 東京大学医学部附属病院  
中央診療棟 2 2006, 12 第 2 回  
2 2 世紀医療センター合同シンポジウ  
ム

山内敏正:「脂肪組織を標的とした生活  
習慣病の画期的診断法・根本的治療法  
の開発」

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

(ア) 特許出願  
「アディポネクチン受容体遺伝子欠損  
非ヒト動物およびその用途」(特許出願)  
2006.10

(イ) 実用新案登録  
なし

(ウ) その他  
なし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書  
「生活習慣病の鍵分子、アディポネクチン受容体の病態生理的意義の解明」

分担研究者 窪田直人 東京大学医学部附属病院 客員助手

研究要旨：2肥満・2型糖尿病モデルマウスで低下している AdipoR をアデノウイルスを用いて肝臓特異的に過剰発現を行ったところ耐糖能障害を改善させ得ることが示唆された。そのメカニズムとして AdipoR1 はアディポネクチンと結合して AMPK を活性化することにより、AdipoR2 はアディポネクチンと結合して PPAR $\alpha$  を活性化することによってインスリン抵抗性を改善させていることを明らかにした。さらにアディポネクチン欠損マウスではこの改善効果が消失したことより、AdipoR の過剰発現による抗糖尿病作用は、アディポネクチンによる活性化が必要であることが示唆された (Nat Med 13: 332 - 339, 2007)。

#### A. 研究目的

本研究においては、遺伝子過剰発現マウスの解析によるアディポネクチン受容体 AdipoR1 と R2 の病態生理的意義の解明を行ない、新規の革新的な抗メタボリックシンドローム・抗動脈硬化薬の開発に繋げることを交付申請時の目的とした。

#### B. 研究方法

AdipoR1 と AdipoR2 のアデノウイルスによる発現系を構築し、293細胞を用いて増やした後にアデノウイルスの精製を行った。メタボリックシンドロームのモデルマウスである db/db マウスにこのアデノウイルスを感染させ、肝臓特異的に過剰発現させて、その表現型を解析した。

#### C. 研究結果

AdipoR1, AdipoR2 の発現量を TaqManPCR で検討したところ、Db/db マウス肝臓で約半分に低下している AdipoR1, AdipoR2 の発現量は、AdipoR1, AdipoR2 を発現するアデノウイルスの感染により、アデノウイルスの濃度依存性に増加し、野生型マウスに戻る程度から野生型の3倍程度に発現増加する程度まで、調節可能であった。Db/db マウスに AdipoR1 あるいは AdipoR2 を発現させる

アデノウイルスを感染させて AdipoR の発現を肝臓特異的に増加させたところ、耐糖能障害がそれぞれ改善するのが認められた。AdipoR1 の過剰発現では AMPK が活性化され、糖新生に関わる分子の発現抑制、ピルビン酸負荷試験で評価した糖新生の抑制、脂肪酸合成に関わる分子の発現抑制と脂肪酸燃焼の促進を介して、肝細胞内中性脂肪含量の低下傾向を認めて、インスリン抵抗性が改善しているのが認められた。AdipoR2 の過剰発現では PPAR $\alpha$  自体の増加と活性化を介した脂肪酸燃焼やエネルギー消費に関わる分子の発現増加と脂肪酸燃焼活性の増加を介して肝細胞内中性脂肪含量の低下傾向を認めた。さらに炎症性サイトカインや酸化ストレス消去に関わる分子の発現増加と TBARS の低下傾向を認めてインスリン抵抗性が改善しているのが認められた。実際、この AdipoR の増加による抗糖尿病作用は、アディポネクチンを欠損させたマウスでは認められなくなってしまうことを示した。これらの成果を論文発表した (Nature Medicine 13:332-339, 2007)。

#### D. 考察

(1)我々は以前、肥満症の病態において

は AdipoR の発現が低下しており、外からアディポネクチンを投与しても、アディポネクチン作用が十分に伝わらない“アディポネクチン抵抗性”の病態が存在することを報告していたのが、(JBC 279: 30817, 2004)、アデノウイルスを用いて肝臓特異的に AdipoR1 又は R2 を過剰発現させることが実際に治療法になることが明らかとなった。

(2) AdipoR の増加による抗糖尿病作用は、アディポネクチンによる活性化が必要であることが明らかとなった。

#### E. 結論

AdipoR1 はアディポネクチンと結合して AMPK を活性化することにより、AdipoR2 はアディポネクチンと結合して PPAR $\alpha$  を活性化することによってインスリン抵抗性を改善させていることが明らかとなった。

#### F. 健康危険情報 特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kawamoto S, Kubota N, Kubota T, Ito Y, Kamon J, Tsuchida A, Kumagai K, Kozono H, Hada Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Awazawa M, Takamoto I, Froguel P, Hara K, Tobe K, Nagai R, Ueki K, Kadowaki T. : Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. Nature Medicine 13: 332 - 339, 2007

#### 2. 学会発表

##### 国内

第 103 回日本内科学会講演会 横浜、2006, 4

山内敏正、窪田直人、原 一雄、植木浩二郎、戸辺一之、永井良三、門脇 孝  
「アディポネクチン・アディポネクチン受容体の病態生理的意義解明と生活習慣病診断・治療への応用」(口演発表)

第 79 回日本内分泌学会学術総会 神戸、2006, 5

山内敏正、窪田直人、原 一雄、植木浩二郎、戸辺一之、永井良三、門脇 孝  
アディポネクチン・アディポネクチン受容体の病態生理的意義解明と生活習慣病診断・治療への応用 (口演)

第 49 回 日本糖尿病学会年次学術集会 東京、2006, 5

山内敏正、仁尾泰徳、牧敏之、窪田直人、高澤健、羽田裕亮、岩部真人、岩部美紀、栗澤元晴、高本偉碩、植木浩二郎、門脇 孝  
肝臓でのアディポネクチン受容体の過剰発現は AMPK, PPAR $\alpha$  経路の活性化を介し、耐糖能障害を改善させる

第 10 回日本病態栄養学会年次学術集会 横浜、2007, 1

山内敏正、仁尾泰徳、高澤 健、岩部真人、岩部美紀、河本幸子、羽田裕亮、窪田直人、原 一雄、植木 浩二郎、戸辺一之、門脇 孝  
「アディポネクチン/AdipoR の病態生理的意義解明と過食/高脂肪食等による生活習慣病

診断治療への応用」

仁尾泰徳、山内敏正、羽田裕亮、岩部真人、岩部美紀、栗澤元晴、窪田直人、植木浩二郎、戸辺一之、門脇孝  
肝臓でのアディポネクチン受容体の過剰発現は AMPK、PPAR $\alpha$ 経路の活性化を介し、過食による肥満に伴う耐糖能障害を改善させる

#### 国外

FASEB Summer Research Conference entitled “AMPK: Impact on Mammalian Metabolism and Disease “ (Snowmass, 2006. 8)

Takashi Kadowaki, Naoto Kubota, Tetsuya Kubota, Toshimasa Yamauchi : Adiponectin-induced modulation of AMPK activity in peripheral tissues and brain —their physiological and pathophysiological roles—

### 3、招聘講演・シンポジウム

49th Annual Meeting of the Japan Diabetes Society 東京、2006, 5  
Symposium8: “Adipokine network: a new era”

Toshimasa Yamauchi, Naoto Kubota, Kazuo Hara, Kohjiro Ueki, Kazuyuki Tobe and Takashi Kadowaki :

「Pathophysiological roles of Adiponectin and AdipoRs」

The 11th Adiposcience Symposium 大阪 2006, 8

Toshimasa Yamauchi, Naoto Kubota, Kazuo Hara, Kohjiro Ueki, Kazuyuki Tobe and Takashi Kadowaki :

「Implication of Adipocytokine and Metabolic Syndrome」

Pathophysiological roles of adipokine network in metabolic syndrome

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(ア) 特許出願

なし

(イ) 実用新案登録

なし

(ウ) その他

なし

分担研究者 植木浩二郎 東京大学医学部附属病院 特任助教授

研究要旨：AdipoR1 に特異的に結合する分子としてスクリーニングされてきた gC1qR が実際に AdipoR2 とは結合しないこと、さらにキメラ蛋白を用いた実験により AdipoR1 内の結合に必要なドメインを明らかにした。gC1qR の遺伝子ノックダウンにより、アディポネクチンによる AMPK のリン酸化が著明に低下したことより、AdipoR1 と R2 にそれぞれ特異的に結合する細胞内シグナル分子の違いで R1 と R2 の役割分担を説明出来る可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

本研究においては、AdipoR1 と R2 結合蛋白の同定とそれに基づいた細胞内情報伝達機構の解明を行ない、新規の革新的な抗メタボリックシンドローム・抗動脈硬化薬の開発に繋げることを交付申請時の目的とした。

#### B. 研究方法

gC1qR の RNAi による遺伝子ノックダウンを行い、アディポネクチンによる AMPK のリン酸化を検討した。GST- gC1qR 融合タンパクを作製した。タグを付けた AdipoR1 あるいは AdipoR2 を過剰発現させた mammalian 細胞の膜可溶画分を調整し、GST- gC1qR 融合タンパクと incubate させ、結合性を検討した。タグを付けた種々の AdipoR1 と AdipoR2 のキメラタンパクを作製し、GST- gC1qR 融合タンパクとの結合性を検討した。

#### C. 研究結果

gC1qR の RNAi による遺伝子ノックダウンにより、アディポネクチンによる AMPK のリン酸化が著明に低下するのが認められた。GST- gC1qR に、タグを付けた AdipoR1 あるいは AdipoR2 を過剰発現させた mammalian 細胞の膜可溶画分を incubate させたところ、AdipoR1 の

みが特異的に結合するのが認められたキメラタンパクを用いた解析から、TM4-5 のみが AdipoR1 になった AdipoR2 は、AdipoR1 同様、結合出来るようになることが示唆された。

#### D. 考察

AdipoR の特異的結合タンパクを用いた細胞内情報伝達経路解析により、AdipoR1 と R2 にそれぞれ特異的に結合する細胞内シグナル分子の違いで R1 と R2 の役割分担を説明出来る可能性が示唆された。

#### E. 結論

AdipoR1 に特異的に結合する分子としてスクリーニングされてきた gC1qR が実際に AdipoR1 と特異的に結合して AdipoR2 と結合しないこと、さらにキメラ蛋白を用いた実験により TM4, 5 のみ AdipoR1 にした AdipoR2 は gC1qR と結合出来るようになることが明らかとなった。gC1qR が AdipoR1 と結合して、アディポネクチンによる AMPK 活性化に重要な役割を果たすことが示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kawamoto S, Kubota N, Kubota T, Ito Y, Kamon J, Tsuchida A, Kumagai K, Kozono H, Hada Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Awazawa M, Takamoto I, Froguel P, Hara K, Tobe K, Nagai R, Ueki K, Kadowaki T. : Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nature Medicine* 13: 332 - 339, 2007

### 2. 学会発表

#### 国内

第 103 回日本内科学会講演会 横浜、2006, 4

山内敏正、窪田直人、原 一雄、植木浩二郎、戸辺一之、永井良三、門脇 孝  
「アディポネクチン・アディポネクチン受容体の病態生理的意義解明と生活習慣病診断・治療への応用」(口演発表)

第 79 回日本内分泌学会学術総会 神戸、2006, 5

山内敏正、窪田直人、原 一雄、植木浩二郎、戸辺一之、永井良三、門脇 孝  
アディポネクチン・アディポネクチン受容体の病態生理的意義解明と生活習慣病診断・治療への応用 (口演)

第 49 回 日本糖尿病学会年次学術集会 東京、2006, 5

山内敏正、仁尾泰徳、牧敏之、窪田直人、高澤健、羽田裕亮、岩部真人、岩部美紀、

栗澤元晴、高本偉碩、植木浩二郎、門脇孝

肝臓でのアディポネクチン受容体の過剰発現は AMPK, PPAR $\alpha$  経路の活性化を介し、耐糖能障害を改善させる

仁尾泰徳、山内敏正、牧敏之、窪田直人、高澤健、羽田裕亮、岩部真人、岩部美紀、栗澤元晴、高本偉碩、植木浩二郎、門脇孝

遺伝子欠損マウスを用いたアディポネクチン受容体の生理学的意義の解明

第 11 回アディポサイエンス研究会 大阪、2006, 8

仁尾泰徳、山内敏正、栗澤元晴、植木浩二郎、門脇孝

Overexpression of AdipoR1 or R2 in liver ameliorated insulin resistance and diabetes linked to obesity via AMP kinase and PPARalpha activation by adiponectin

第 8 回インスリン作用シンポジウム 滋賀、2006, 9

仁尾泰徳、山内敏正、栗澤元晴、植木浩二郎、門脇孝

Overexpression of AdipoR1 or R2 in liver ameliorated insulin resistance and diabetes linked to obesity via AMP kinase and PPARalpha activation by adiponectin

第 27 回日本肥満学会学術集会、神戸、2006, 10

仁尾泰徳、山内敏正、牧敏之、窪田直人、高澤健、羽田裕亮、岩部真人、岩部美紀、栗澤元晴、高本偉碩、植木浩二郎、門脇孝

脂肪細胞研究の最前線 遺伝子欠損マウスを用いたアディポネクチン受容体の生理学的意義の解明

東京大学生命科学研究ネットワークシンポジウム 東京, 2006, 11

仁尾泰徳、山内敏正、窪田直人、羽田裕亮、岩部真人、岩部美紀、栗澤元晴、高本偉碩、戸辺一之、植木浩二郎、門脇孝 AdipoR1・R2 はアディポネクチンの特異的結合・血糖降下作用に必須であり、AdipoR1・R2 ダブル欠損マウスはインスリン抵抗性・耐糖能障害を呈する

第 18 回 分子糖尿病学シンポジウム 松山, 2006, 12

仁尾泰徳、山内敏正、窪田直人、羽田裕亮、岩部真人、岩部美紀、栗澤元晴、高本偉碩、戸辺一之、植木浩二郎、門脇孝 AdipoR1・R2 はアディポネクチンの特異的結合・血糖降下作用に必須であり、AdipoR1・R2 ダブル欠損マウスはインスリン抵抗性・耐糖能障害を呈する

第 10 回日本病態栄養学会年次学術集会 横浜, 2007, 1

山内敏正、仁尾泰徳、高澤 健、岩部真人、岩部美紀、河本幸子、羽田裕亮、窪田直人、原 一雄、植木浩二郎、戸辺一之、門脇 孝

「アディポネクチン/AdipoR の病態生理的意義解明と過食/高脂肪食等による生活習慣病

診断治療への応用」

仁尾泰徳、山内敏正、羽田裕亮、岩部真人、岩部美紀、栗澤元晴、窪田直人、植木浩二郎、戸辺一之、門脇孝 肝臓でのアディポネクチン受容体の過

剰発現は AMPK、PPAR $\alpha$  経路の活性化を介し、過食による肥満に伴う耐糖能障害を改善させる

第一回炎症、脂質、メタボローム研究会 東京, 2007, 1

仁尾泰徳、山内敏正、岩部真人、岩部美紀、羽田裕亮、窪田直人、栗澤元晴、高本偉碩、植木浩二郎、戸辺一之、門脇孝 抗メタボリックシンドローム作用を有するアディポネクチンの受容体 AdipoR1・R2 のダブル欠損は脂質代謝異常・炎症を惹起して耐糖能障害を来す

### 3、招聘講演・シンポジウム

49th Annual Meeting of the Japan Diabetes Society 東京, 2006, 5  
Symposium8: "Adipokine network: a new era"

Toshimasa Yamauchi, Naoto Kubota, Kazuo Hara, Kohjiro Ueki, Kazuyuki Tobe and Takashi Kadowaki :

「Pathophysiological roles of Adiponectin and AdipoRs」

The 11th Adiposcience Symposium 大阪 2006, 8

Toshimasa Yamauchi, Naoto Kubota, Kazuo Hara, Kohjiro Ueki, Kazuyuki Tobe and Takashi Kadowaki :

「Implication of Adipocytokine and Metabolic Syndrome」

Pathophysiological roles of adipokine network in metabolic syndrome

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書  
「アディポネクチン受容体の生理的意義と情報伝達経路の解明」

分担研究者 門脇 孝 東京大学医学部附属病院 教授

研究要旨：遺伝子欠損による機能解析により、AdipoR1・R2 が個体レベルでアディポネクチンの結合と作用に必須の主要な受容体である事、R1・R2 が糖・脂質代謝、炎症、酸化ストレス制御に個体レベルで重要な役割を果たす事、R1 はアディポネクチンによる AMPK 活性化、R2 は PPAR $\alpha$  活性化の経路と、それぞれより強くリンクしている事を証明した (Nat Med 13: 332 - 339, 2007)。

#### A. 研究目的

本研究においては、遺伝子欠損マウスの解析によるアディポネクチン受容体 AdipoR1 と R2 の生理的意義の解明を行ない、新規の革新的な抗メタボリックシンドローム・抗動脈硬化薬の開発に繋げることを交付申請時の目的とした。

#### B. 研究方法

AdipoR1 と AdipoR2 の遺伝子欠損マウスを ES 細胞を用いた相同組み換えの手法により作製し、さらに両者を掛け合わせることで AdipoR1・R2 ダブル欠損マウスを作製した。そして 129 と B6 の mixed background の遺伝子欠損マウスを littermates 同士で比較し、表現型を解析すると共に、B6 background への戻し交配を行い、B6 pure background の AdipoR1 欠損マウスと AdipoR2 欠損マウスと AdipoR1・R2 ダブル欠損マウスを作製し、解析した。

#### C. 研究結果

AdipoR1 と R2 の遺伝子欠損マウスを作成し、(1) AdipoR1 と R2 のダブル欠損によりアディポネクチンの結合と作用が認められなくなることを明らかにし

た。(2) AdipoR1 および R2 の欠損マウスは高血糖・高インスリン血症を示し、アディポネクチン受容体の生理的意義と情報伝達経路の解明耐糖能障害とインスリン抵抗性を呈した。そのメカニズムとして、肝臓や骨格筋、脂肪組織などインスリンの標的臓器において、細胞内中性脂肪含量が増加し、炎症が惹起され、酸化ストレスも増加していることが明らかとなった。(3) そのメカニズムとして AdipoR1 はアディポネクチンと結合して AMPK 経路を活性化することにより、また AdipoR2 は PPAR $\alpha$  経路を活性化することによりインスリン抵抗性を改善させることを示した。これらの成果を論文発表し (Nature Medicine 13:332-339, 2007)、ノックアウトマウスの特許申請を行った。

#### D. 考察

AdipoR1 と R2 の遺伝子欠損マウスの解析の上記結果より、(1) in vivo において AdipoR1 および AdipoR2 がアディポネクチンの結合と作用に必須の主要な受容体であることが証明された。

(2) AdipoR1 および R2 は in vivo において血糖制御や脂質代謝、炎症や酸化ス

トレスの制御に重要な役割を果たすことが示唆された。

#### E. 結論

(1) AdipoR1 および AdipoR2 が個体レベルにおいても、アディポネクチンの結合と作用に必須の主要な受容体である。

(2) AdipoR1 および R2 は個体レベルにおいて血糖制御や脂質代謝、炎症や酸化ストレスの制御に重要な役割を果たす。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kawamoto S, Kubota N, Kubota T, Ito Y, Kamon J, Tsuchida A, Kumagai K, Kozono H, Hada Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Awazawa M, Takamoto I, Froguel P, Hara K, Tobe K, Nagai R, Ueki K, Kadowaki T. : Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nature Medicine* 13: 332 - 339, 2007

##### 2. 学会発表

###### 国内

第 103 回日本内科学会講演会 横浜、2006, 4

山内敏正、窪田直人、原 一雄、植木浩二郎、戸辺一之、永井良三、門脇 孝  
「アディポネクチン・アディポネクチン受容体の病態生理的意義解明と生活習慣病診断・治療への応用」(口演発表)

第 79 回日本内分泌学会学術総会 神戸、2006, 5

山内敏正、窪田直人、原 一雄、植木浩二郎、戸辺一之、永井良三、門脇 孝  
アディポネクチン・アディポネクチン受容体の病態生理的意義解明と生活習慣病診断・治療への応用 (口演)

第 49 回 日本糖尿病学会年次学術集会 東京、2006, 5

山内敏正、仁尾泰徳、牧敏之、窪田直人、高澤健、羽田裕亮、岩部真人、岩部美紀、栗澤元晴、高本偉碩、植木浩二郎、門脇 孝

肝臓でのアディポネクチン受容体の過剰発現は AMPK, PPAR $\alpha$  経路の活性化を介し、耐糖能障害を改善させる

仁尾泰徳、山内敏正、牧敏之、窪田直人、高澤健、羽田裕亮、岩部真人、岩部美紀、栗澤元晴、高本偉碩、植木浩二郎、門脇 孝

遺伝子欠損マウスを用いたアディポネクチン受容体の生理学的意義の解明

第 11 回アディポサイエンス研究会大阪、2006, 8

仁尾泰徳、山内敏正、栗澤元晴、植木浩二郎、門脇 孝

Overexpression of AdipoR1 or R2 in liver ameliorated insulin resistance and diabetes linked to obesity via AMP kinase and PPAR $\alpha$  activation by adiponectin

第 8 回インスリン作用シンポジウム滋賀、2006, 9

仁尾泰徳、山内敏正、栗澤元晴、植木浩二郎、門脇 孝

Overexpression of AdipoR1 or R2 in liver ameliorated insulin resistance and diabetes linked to obesity via AMP kinase and PPARalpha activation by adiponectin

第 27 回日本肥満学会学術集会、神戸、2006, 10

仁尾泰徳、山内敏正、牧敏之、窪田直人、高澤健、羽田裕亮、岩部真人、岩部美紀、栗澤元晴、高本偉碩、植木浩二郎、門脇孝

脂肪細胞研究の最前線 遺伝子欠損マウスを用いたアディポネクチン受容体の生理学的意義の解明

東京大学生命科学研究ネットワークシンポジウム 東京、2006, 11

仁尾泰徳、山内敏正、窪田直人、羽田裕亮、岩部真人、岩部美紀、栗澤元晴、高本偉碩、戸辺一之、植木浩二郎、門脇孝  
AdipoR1・R2 はアディポネクチンの特異的結合・血糖降下作用に必須であり、AdipoR1・R2 ダブル欠損マウスはインスリン抵抗性・耐糖能障害を呈する

第 18 回 分子糖尿病学シンポジウム 松山、2006, 12

仁尾泰徳、山内敏正、窪田直人、羽田裕亮、岩部真人、岩部美紀、栗澤元晴、高本偉碩、戸辺一之、植木浩二郎、門脇孝  
AdipoR1・R2 はアディポネクチンの特異的結合・血糖降下作用に必須であり、AdipoR1・R2 ダブル欠損マウスはインスリン抵抗性・耐糖能障害を呈する

第 10 回日本病態栄養学会年次学術集会 横浜、2007, 1

山内敏正、仁尾泰徳、高澤 健、岩部真人、岩部美紀、河本幸子、羽田裕亮、窪田直人、原 一雄、植木 浩二郎、戸辺一之、門脇 孝

「アディポネクチン/AdipoR の病態生理的意義解明と過食/高脂肪食等による生活習慣病 診断治療への応用」

仁尾泰徳、山内敏正、羽田裕亮、岩部真人、岩部美紀、栗澤元晴、窪田直人、植木浩二郎、戸辺一之、門脇孝

肝臓でのアディポネクチン受容体の過剰発現は AMPK、PPAR $\alpha$  経路の活性化を介し、過食による肥満に伴う耐糖能障害を改善させる

第一回炎症、脂質、メタボローム研究会 東京、2007, 1

仁尾泰徳、山内敏正、岩部真人、岩部美紀、羽田裕亮、窪田直人、栗澤元晴、高本偉碩、植木浩二郎、戸辺一之、門脇孝  
抗メタボリックシンドローム作用を有するアディポネクチンの受容体 AdipoR1・R2 のダブル欠損は脂質代謝異常・炎症を惹起して耐糖能障害を来す

#### 国外

FASEB Summer Research Conference entitled “AMPK: Impact on Mammalian Metabolism and Disease “ (Snowmass, 2006. 8)

Takashi Kadowaki, Naoto Kubota, Tetsuya Kubota, Toshimasa Yamauchi : Adiponectin-induced modulation of AMPK activity in peripheral tissues and brain —their physiological and pathophysiological roles—

3、招聘講演・シンポジウム

49th Annual Meeting of the Japan  
Diabetes Society 東京、2006, 5  
Symposium8: "Adipokine network: a new  
era"

Toshimasa Yamauchi, Naoto Kubota,  
Kazuo Hara, Kohjiro Ueki, Kazuyuki  
Tobe and Takashi Kadowaki :

「Pathophysiological roles of  
Adiponectin and AdipoRs」

The 11th Adiposcience Symposium 大  
阪 2006, 8

Toshimasa Yamauchi, Naoto Kubota,  
Kazuo Hara, Kohjiro Ueki, Kazuyuki  
Tobe and Takashi Kadowaki :

「Implication of Adipocytokine and  
Metabolic Syndrome」  
Pathophysiological roles of  
adipokine network in metabolic  
syndrome

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許出願

「アディポネクチン受容体遺伝子欠損  
非ヒト動物およびその用途」(特許出願)  
2006. 10

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Toshimasa Yamauchi <sup>3,7</sup> , Yasunori Nio <sup>1,2,7</sup> , Toshiyuki Maki <sup>1,7</sup> , Masaki Kobayashi <sup>1</sup> , Takeshi Takazawa <sup>1</sup> , Masato Iwabu <sup>1,2</sup> , Miki Okada-Iwabu <sup>1,2</sup> , Sachiko Kawamoto <sup>1</sup> , Naoto Kubota <sup>1-3</sup> , Tetsuya Kubota <sup>1</sup> , Yusuke Ito <sup>1</sup> , Junji Kamon <sup>1</sup> , Atsushi Tsuchida <sup>1</sup> , Katsuyoshi Kumagai <sup>1</sup> , Hideki Kozono <sup>1</sup> , Yusuke Hada <sup>1,3</sup> , Hitomi Ogata <sup>4</sup> , Kumpei Tokuyama <sup>4</sup> , Masaki Tsunoda <sup>5</sup> , Tomohiro Ide <sup>5</sup> , Kouji Murakami <sup>5</sup> , Motoharu Awazawa <sup>1,3</sup> , Iseki Takamoto <sup>1-3</sup> , Philippe Froguel <sup>6</sup> , Kazuo Hara <sup>1,3</sup> , Kazuyuki Tobe <sup>1,3</sup> , Ryoza Nagai <sup>1</sup> , Kohjiro Ueki <sup>1</sup> & Takashi Kadowaki <sup>1,3</sup>	Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions	NATURE MEDICINE	13	332-339	2007

# Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions

Toshimasa Yamauchi<sup>1-3,7</sup>, Yasunori Nio<sup>1,2,7</sup>, Toshiyuki Maki<sup>1,7</sup>, Masaki Kobayashi<sup>1</sup>, Takeshi Takazawa<sup>1</sup>, Masato Iwabu<sup>1,2</sup>, Miki Okada-Iwabu<sup>1,2</sup>, Sachiko Kawamoto<sup>1</sup>, Naoto Kubota<sup>1-3</sup>, Tetsuya Kubota<sup>1</sup>, Yusuke Ito<sup>1</sup>, Junji Kamon<sup>1</sup>, Atsushi Tsuchida<sup>1</sup>, Katsuyoshi Kumagai<sup>1</sup>, Hideki Kozono<sup>1</sup>, Yusuke Hada<sup>1,3</sup>, Hitomi Ogata<sup>4</sup>, Kumpei Tokuyama<sup>4</sup>, Masaki Tsunoda<sup>5</sup>, Tomohiro Ide<sup>5</sup>, Kouji Murakami<sup>5</sup>, Motoharu Awazawa<sup>1,3</sup>, Iseki Takamoto<sup>1-3</sup>, Philippe Froguel<sup>6</sup>, Kazuo Hara<sup>1,3</sup>, Kazuyuki Tobe<sup>1,3</sup>, Ryozi Nagai<sup>1</sup>, Kohjiro Ueki<sup>1</sup> & Takashi Kadowaki<sup>1,3</sup>

Adiponectin plays a central role as an antidiabetic and antiatherogenic adipokine. AdipoR1 and AdipoR2 serve as receptors for adiponectin *in vitro*, and their reduction in obesity seems to be correlated with reduced adiponectin sensitivity. Here we show that adenovirus-mediated expression of AdipoR1 and R2 in the liver of *Lepr<sup>-/-</sup>* mice increased AMP-activated protein kinase (AMPK) activation and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\alpha$  signaling pathways, respectively. Activation of AMPK reduced gluconeogenesis, whereas expression of the receptors in both cases increased fatty acid oxidation and lead to an amelioration of diabetes. Alternatively, targeted disruption of AdipoR1 resulted in the abrogation of adiponectin-induced AMPK activation, whereas that of AdipoR2 resulted in decreased activity of PPAR- $\alpha$  signaling pathways. Simultaneous disruption of both AdipoR1 and R2 abolished adiponectin binding and actions, resulting in increased tissue triglyceride content, inflammation and oxidative stress, and thus leading to insulin resistance and marked glucose intolerance. Therefore, AdipoR1 and R2 serve as the predominant receptors for adiponectin *in vivo* and play important roles in the regulation of glucose and lipid metabolism, inflammation and oxidative stress *in vivo*.

Adiponectin (also known as Acrp30)<sup>1-4</sup> is a hormone secreted by adipocytes that acts as a major antidiabetic and antiatherogenic adipokine. Plasma adiponectin levels are decreased in obesity, insulin resistance and type 2 diabetes<sup>1-4</sup>. Decreased adiponectin is implicated in the development of insulin resistance in obesity, which is reversed by the replenishment of adiponectin<sup>5-7</sup>. This insulin-sensitizing effect of adiponectin seems to be mediated by the inhibition of gluconeogenesis<sup>7</sup> and the stimulation of fatty acid oxidation<sup>5,6</sup> via activation of AMP-activated protein kinase (AMPK)<sup>8,9</sup> and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\alpha$  (refs. 10,11). Adiponectin also has antiatherogenic properties: for instance, it has anti-inflammatory effects in endothelial cells and macrophages<sup>1-4</sup>.

We reported previously that AdipoR1 and R2 serve as receptors for adiponectin *in vitro*<sup>12</sup> and that their expression levels are reduced in obesity, apparently in correlation with reduced adiponectin sensitivity<sup>13</sup>. However, it remains to be clarified whether AdipoR1 and AdipoR2 serve as the major receptors for adiponectin, while also acting as key physiological regulators of glucose and lipid metabolism, *in vivo*.

We report here that adenovirus-mediated expression of either AdipoR1 or AdipoR2 in the liver ameliorated obesity-linked insulin resistance and diabetes. In contrast, simultaneous disruption of AdipoR1

and R2 abrogated adiponectin-specific binding and the glucose-lowering effect of adiponectin, and resulted in marked glucose intolerance and insulin resistance. We also demonstrate functional differences between AdipoR1 and AdipoR2 in adiponectin-signaling pathways: namely, that AdipoR1 may be more tightly linked to activation of AMPK pathways, whereas AdipoR2 seems to be associated with the activation of PPAR- $\alpha$  pathways and the inhibition of inflammation<sup>14</sup> and oxidative stress<sup>15</sup>. These data indicate that AdipoR1 and R2 serve as the physiologically most important receptors for adiponectin, while playing crucial roles in the regulation of glucose and lipid metabolism, as well as inflammation and oxidative stress, *in vivo*.

## RESULTS

**AdipoR1 and r2 expression in *Lepr<sup>-/-</sup>* mice improves diabetes**  
AdipoR mRNA levels are decreased in obesity<sup>13</sup>, so we first examined the expression levels of AdipoR mRNAs in the liver of *Lepr<sup>-/-</sup>* (also known as *db/db*) mice, a genetic animal model of human obesity. Expression levels of *AdipoR1* and *AdipoR2* decreased to approximately 65% and 55%, respectively, in the liver of *Lepr<sup>-/-</sup>* mice as compared with wild-type mice (Fig. 1a).

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo 113-8655, Japan. <sup>2</sup>Department of Integrated Molecular Science on Metabolic Diseases, 22nd Century Medical and Research Center, University of Tokyo, Tokyo 113-8655, Japan. <sup>3</sup>Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology, Tokyo 332-0012, Japan. <sup>4</sup>Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8577, Japan. <sup>5</sup>Bioscience Division 1, Metabolic Discovery Research Laboratories, Kyorin Pharmaceutical Co. Ltd., Shimotsuga 329-0114, Japan. <sup>6</sup>Section of Genomic Medicine, Imperial College London, Hammersmith Hospital, Du Cane Road, London W12 0NN, UK. <sup>7</sup>These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to T.K. (kadowaki-3im@h.u-tokyo.ac.jp).

Received 19 December 2006; accepted 26 January 2007; published online 1 February 2006; doi:10.1038/nm1557