

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業
ヒトゲノムテーラーメイド研究

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19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山内 敏正

平成20（2008）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 8

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 11

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 14

「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 客員准教授

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 α 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

植木浩二郎 東京大学医学部附属病院

門脇 孝 東京大学医学部附属病院

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

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。

(倫理面への配慮)

平成 15 年 7 月 30 日に厚生労働省によって策定された「臨床研究に関する倫理指針」を遵守して研究を遂行する。

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 α 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 α 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 (*Nature Medicine* 13: 332-339, 2007)。

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 (*Nature Medicine* 13: 332-339, 2007)、

(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。

AdipoR1 と R2 の全身欠損マウスを解析終了し、公刊した (*Nature Medicine* 13: 332-339, 2007)。組織特異的欠損マウス解析により、ミトコンドリア機能や動脈硬化における意義を見出し、公刊に向けて準備中であり、ほぼ達成されたと言える。

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

Hara K, Yamauchi T, Imai Y, Manabe I, Nagai R, Kadowaki T: Reduced adiponectin level is associated with severity of coronary artery disease. *Int. Heart. J.* 48: 149-153, 2007

Hashimoto H, Arai T, Ohnishi Y, Eto T, Ito M, Suzuki R, Yamauchi T, Ohsugi M, Saito M, Ueyama Y, Tobe K, Kadowaki T, Tamaoki N, Kosaka K: Phenotypes of IRS-2 deficient mice produced by reproductive technology are stable. *Exp. Anim.* 56: 149-154, 2007

Ishikawa M, Kitayama J, Yamauchi T, Kadowaki T, Maki T, Miyata H, Yamashita H, Nagawa H: Adiponectin inhibits the growth and peritoneal metastasis of gastric cancer through its specific membrane receptors AdipoR1 and AdipoR2. *Cancer Sci.* 98: 1120-1127, 2007

Hada Y, Yamauchi T, Waki H, Tsuchida A, Hara K, Yago H, Miyazaki O, Ebinuma H, Kadowaki T: Selective purification

and characterization of adiponectin multimer species from human plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356: 487-493, 2007

Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Okamoto S, Shiuchi T, Suzuki R, Satoh H, Tsuchida A, Moroi M, Sugi K, Noda T, Ebinuma H, Ueda Y, Kondo T, Araki E, Ezaki O, Nagai R, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K, Minokoshi Y, Kadowaki T: Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake.

Cell Metabolism 6: 55-68, 2007

Ebinuma H, Miida T, Yamauchi T, Hada Y, Hara K Kadowaki T: Improved ELISA for selective measurement of adiponectin multimers and identification of adiponectin in human cerebrospinal fluid.

Clin. Chem. 53: 1541-1544, 2007

Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K: Adiponectin and adiponectin receptors in obesity-linked insulin resistance. *Fatty Acids and Lipotoxicity in Obesity and Diabetes (Novartis Foundation Symposium 286)*, John Wiley & Sons, Ltd, pp164-182, 2007

Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N: The physiological and pathophysiological role of adiponectin and adiponectin receptors in the peripheral tissues and CNS.

2. 学会発表

国内

第 104 回日本内科学会講演会 (於: 大阪) 2007 年 4 月 3 日

山内敏正「アディポカインネットワーク破綻の分子機構解明とメタボリックシンドローム治療への応用」

第 27 回日本医学会総会 (於: 大阪) 2007 年 4 月 7 日

山内敏正「メタボリックシンドローム II - その分子病態 -」

第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会 (於: 仙台) 2007 年 5 月 23 日

山内敏正「アディポネクチン・アディポネクチン受容体の生理的・病態生理的意義」(シンポジウム)

山内敏正「アディポネクチン受容体の生理的・病態生理的意義の解明」(口演)

第 44 回日本臨床分子医学会学術総会 (2007 年 7 月 和歌山)

・山内敏正, 原一雄, 窪田直人, 植木浩二郎, 戸辺一之, 門脇孝: 「メタボリックシンドローム アディポネクチン/AdipoR の病態生理的意義」

第 11 回 日本病態栄養学会年次学術集会 (2008 年 1 月 京都)

山内敏正: 「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の改善食材の探索」
第 42 回糖尿病学の進歩 (2008 年 2 月 高松)

山内敏正: 「アディポネクチンとインスリン抵抗性」

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（創薬基盤推進研究事業）

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 特任准教授

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 α 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、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。

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 α 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。

これらの成果を論文発表した (Nature Medicine 13:332-339, 2007)。

さらに肝臓特異的 AdipoR 欠損マウスの作製・解析も進めており、血糖制御や脂質代謝、炎症や酸化ストレスの制御に AdipoR が重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。

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。

(3)肝臓特異的 AdipoR 欠損マウスの作製・解析を進めることにより、血糖制御や脂質代謝、炎症や酸化ストレスの制御における AdipoR のさらなる詳細なメカニズムに迫る可能性が示唆される。

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 α 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

Terauchi, Y., Takamoto, I., Kubota, N., Matsui, J., Suzuki, R., Komeda, K., Hara, A., Toyoda, Y., Miwa, I., Aizawa, S., Tsutsumi, S., Tsubamoto, Y., Hashimoto, S., Eto, K., Nakamura, A., Noda, M., Tobe, K., Aburatani, H., Nagai, R., and Kadowaki, T.:

Requirement of glucokinase and Irs2 for compensatory beta-cell hyperplasia in response to high-fat-diet-induced insulin resistance.

J. Clin. Invest. 117: 246-257, 2007

Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Okamoto S, Shiuchi T, Suzuki R, Satoh H, Tsuchida A, Moroi M, Sugi K, Noda T, Ebinuma H, Ueda Y, Kondo T, Araki E, Ezaki O, Nagai R, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K, Minokoshi Y, Kadowaki T: Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake.

Cell Metabolism 6: 55-68, 2007

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

Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara
K, Ueki K: Adiponectin and
adiponectin receptors in
obesity-linked insulin resistance.

*Fatty Acids and Lipotoxicity in
Obesity and Diabetes (Novartis
Foundation Symposium 286)*, John
Wiley & Sons, Ltd, pp164-182, 2007

2. 学会発表

国内

第 50 回 日本糖尿病学会年次学術集会
仙台、2007, 5

窪田直人, 窪田哲也, 小園秀樹, 伊藤
晋介, 山内敏正, 植木浩二郎, 寺内康
夫, 戸辺一之, 門脇孝: 「アディポネク
チンの中枢における役割の検討」

第 44 回日本臨床分子医学会学術総会
(2007 年 7 月 和歌山)

・窪田哲也, 窪田直人, 熊谷洋紀, 小園
秀樹, 伊藤晋介, 植木浩二郎, 門脇
孝: 「血管内皮細胞におけるインスリン
受容体基質 2 の役割の解明」

第 28 回日本肥満学会 東京, 2007, 10
窪田直人, 窪田哲也, 山内敏正, 植木
浩二郎, 寺内康夫, 箕越靖彦, 門脇孝:
「アディポネクチンの中枢における役
割の検討」

山口 麻美子, 山内 敏正, 仁尾 泰徳,
窪田 直人, 植木 浩二郎, 門脇 孝
ARB はアディポネクチン及び AdipoR を
増やし、抗メタボリックシンドローム作
用を発揮する

廣瀬 理沙、山内 敏正、岩部 美紀、
岩部 真人、小林 加奈子、仁尾 泰徳、
窪田 直人、植木 浩二郎、門脇 孝
過食・高脂肪食などによる耐糖能障害を
改善しうるアディポネクチン受容体ア
ゴニストの探索・解析

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

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

「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」

分担研究者 植木浩二郎 東京大学医学部附属病院 准教授

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。また、野生型マウス及び糖尿病モデルマウスにおいて、gC1qR の RNAi による遺伝子ノックダウンにより、血糖値の変化

及び、in vivo におけるアディポネクチンシグナルへの影響の検討に着手した。

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 のみの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。さらに in vivo でのアディポネクチンシグナルにおける gC1qR の役割の検討を重ねる必要性があり、今後の

in vivo における gClqR の意義についてさらなるデータが期待される。

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 gClqR 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 gClqR と結合出来るようになることが明らかとなった。gClqR 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

Horikoshi M, Hara K, Ito C, Shojima N, Nagai R, Ueki K, Froguel P, Kadowaki T: Variations in the HHEX gene are associated with increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetologia*, in press, 2007

Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Okamoto S, Shiuchi T, Suzuki R, Satoh H, Tsuchida A, Moroi M, Sugi K, Noda T, Ebinuma H, Ueda Y, Kondo T, Araki E, Ezaki O, Nagai R, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K, Minokoshi Y, Kadowaki T: Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake.

Cell Metabolism 6: 55-68, 2007

Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K: Adiponectin and adiponectin receptors in obesity-linked insulin resistance. *Fatty Acids and Lipotoxicity in Obesity and Diabetes (Novartis Foundation Symposium 286)*, John Wiley & Sons, Ltd, pp164-182, 2007

Horikoshi M, Hara K, Ito C, Shojima N, Nagai R, Ueki K, Froguel P, Kadowaki T: Variations in the HHEX gene are associated with increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetologia* 50: 2461-2466, 2007

2. 学会発表

国内

第 50 回 日本糖尿病学会年次学術集会
仙台、2007, 5

岩部 真人, 山内 敏正, 岩部 美紀, 仁尾 泰徳, 羽田 裕亮, 窪田 直人, 植木 浩二郎, 戸辺 一之, 門脇 孝
過食や高脂肪食による耐糖能障害を補充によって改善させるアディポネクチン様作用を有する分子の探索

金子和真, 植木浩二郎, 橋本信嗣, 栗沢元晴, 窪田直人, 戸邊一之, 門脇孝: 「膵 β 細胞における Class IA PI3 キナーゼの役割」

第 44 回日本臨床分子医学会学術総会
(2007 年 7 月 和歌山)

・窪田哲也, 窪田直人, 熊谷洋紀, 小園秀樹, 伊藤晋介, 植木浩二郎, 門脇

孝：「血管内皮細胞におけるインスリン受容体基質2の役割の解明」

第28回日本肥満学会 東京, 2007, 10

山口 麻美子, 山内 敏正, 仁尾 泰徳,
窪田 直人, 植木 浩二郎, 門脇 孝

ARBはアディポネクチン及びAdipoRを増やし、抗メタボリックシンドローム作用を発揮する

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

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 α 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

AdipoR1・R2 ダブル欠損マウスにおいては AMPK と PPAR α 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。

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、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

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

Horikoshi M, Hara K, Ito C, Nagai R, Froguel P, Kadowaki T: A genetic variation of the transcription factor 7-like 2 gene is associated with risk of type 2 diabetes in the Japanese population.

Diabetologia 50:747-751, 2007

Hara K, Yamauchi T, Imai Y, Manabe I, Nagai R, Kadowaki T: Reduced adiponectin level is associated with severity of coronary artery disease.

Int. Heart. J. 48: 149-153, 2007

Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Okamoto S, Shiuchi T, Suzuki R, Satoh H, Tsuchida A, Moroi M, Sugi K, Noda T, Ebinuma H, Ueda Y, Kondo T, Araki E, Ezaki O, Nagai R, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K, Minokoshi Y, Kadowaki T: Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake.

Cell Metabolism 6: 55-68, 2007

Horikoshi M, Hara K, Ito C, Shojima N, Nagai R, Ueki K, Froguel P, Kadowaki T: Variations in the HHEX gene are associated with increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population.

Diabetologia, in press, 2007

Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K: Adiponectin and adiponectin receptors in obesity-linked insulin resistance. *Fatty Acids and Lipotoxicity in Obesity and Diabetes (Novartis Foundation Symposium 286)*, John Wiley & Sons, Ltd, pp164-182, 2007

Horikoshi M, Hara K, Ito C, Shojima N, Nagai R, Ueki K, Froguel P, Kadowaki T: Variations in the HHEX gene are associated with increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population.

Diabetologia 50: 2461-2466, 2007

Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N: The physiological and pathophysiological role of adiponectin and adiponectin receptors in the peripheral tissues and CNS.

FEBS Letters 582: 74-80, 2008

2. 学会発表

国内

第 50 回 日本糖尿病学会年次学術集会
仙台、2007、5

岩部 真人, 山内 敏正, 岩部 美紀, 仁
尾 泰徳, 羽田 裕亮, 窪田 直人, 植木 浩
二郎, 戸辺 一之, 門脇 孝

過食や高脂肪食による耐糖能障害を補
充によって改善させうるアディポネク
チン様作用を有する分子の探索

羽田 裕亮, 山内 敏正, 仁尾 泰徳, 河
本 幸子, 窪田 直人, 植木 浩二郎, 門
脇 孝

脂肪萎縮性糖尿病モデルマウスにおけ
るアディポネクチン及びアディポネク
チン受容体補充によるインスリン抵抗
性改善作用

岩部 美紀, 山内 敏正, 岩部 真人, 小
林 加奈子, 仁尾 泰徳, 栗澤 元晴, 窪
田 直人, 植木 浩二郎, 門脇 孝
過食・高脂肪食などによる耐糖能障害を
改善しうるアディポネクチン受容体
AdipoR のアゴニストの野菜・果物など
からの探索・解析

窪田直人, 窪田哲也, 小園秀樹, 伊藤
晋介, 山内敏正, 植木浩二郎, 寺内康
夫, 戸辺一之, 門脇孝:「アディポネク
チンの中枢における役割の検討」

山内敏正, 仁尾泰徳, 岩部真人, 岩部
美紀, 河本幸子, 羽田裕亮, 山口麻美
子, 栗澤元晴, 高本偉碩, 窪田直人,
植木浩二郎, 門脇孝:「アディポネクチ
ン受容体の生理的・病態生理的意義の解
明」

栗澤元晴, 植木浩二郎, 金子和真, 窪
田直人, 山内敏正, 門脇孝:「アディポ
ネクチンによるインスリン感受性亢進
のメカニズムの解明」

第 28 回日本肥満学会 東京, 2007, 10

羽田 裕亮, 山内 敏正, 脇 裕典, 海老沢
宏幸, 矢後 弘和, 宮崎 修, 岩部 真人,
岩部 美紀, 原 一雄, 門脇 孝
ヒト血中からの各多量体アディポネク
チンの精製・活性検討と診断・治療への
応用

岩部 真人, 山内 敏正, 岩部 美紀, 仁尾
泰徳, 羽田 裕亮, 山口 麻美子, 廣瀬 理
沙, 栗澤 元晴, 高本 偉碩, 窪田 直人,
植木 浩二郎, 門脇 孝

AdipoR 欠損マウスを用いたアディポネク
チン経路の骨格筋における生理的意義の
解明

岩部 美紀, 山内 敏正, 岩部 真人, 仁尾
泰徳, 羽田 裕亮, 窪田 直人, 植木 浩二
郎, 戸辺 一之, 門脇 孝

過食や高脂肪食による耐糖能障害を補充
により改善するアディポネクチン様作用を
有する分子の探索

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