

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合 研究事業

ヒトES細胞を用いたin vitro血管神経細胞分化システムに
よる「虚血脳再生ホルモン」の探索と
ホルモン補償による新規認知症治療法の開発
に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科 伊藤 裕

平成 21年 4月 10日

目 次

| | | |
|--|-------|----|
| I. 総括研究報告 | | |
| ヒトES細胞を用いたin vitro血管神経細胞分化システムによる 「虚血脳再生ホルモン」の探索とホルモン補償による新規認知症治療法の開発 慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科 伊藤裕 | ----- | 2 |
| II. 分担研究報告 | | |
| 1. 血管ホルモンによるミトコンドリア制御に関する研究 慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科 伊藤裕 | ----- | 4 |
| 2. 虚血脳再生ホルモン（アドレノメデュリン）を用いた 皮質下血管性認知症の治療法の開発に関する研究 京都大学医学研究科神経内科 高橋良輔 | ----- | 5 |
| 3. メタボリックシンドローム患者における認知機能障害の解析と 血中血管神経前駆細胞の動態解析 国立循環器病センター動脈硬化代謝内科 吉政康直 | ----- | 6 |
| 4. アドレノメデュリンのリンパ管内皮細胞に対する作用 国立循環器病センター研究所再生医療部 山原研一 | ----- | 7 |
| 5. ヒトES細胞を用いた神経細胞への分化誘導法の開発 田辺三菱製薬先端医療研究所 近藤靖 | ----- | 9 |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- | 11 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 | ----- | 13 |

厚生労働科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)
総括研究報告書

【ヒト ES 細胞を用いた *in vitro* 血管神経細胞分化システムによる「虚血脳再生ホルモン」の探索
とホルモン補償による新規認知症治療法の開発】

研究代表者 伊藤 裕 慶應義塾大学 医学部 腎臓内分泌代謝内科 教授

研究要旨 認知症は極めて深刻な医学的問題であるが、これまで根治的治療法は開発されておらず、最先端医学の結集による新しい治療法の開発に期待が寄せられている。本年度我々は、血管ホルモンと幹細胞を用いた新しい虚血脳再生治療の開発に向けた研究を推進し、虚血脳再生ホルモン アドレノメデュリンが、血管-神経再生作用のみならず多彩な作用を発揮して、慢性低灌流による血管性認知症の回復に寄与する可能性を明らかにした。またヒト ES 細胞から神経細胞への分化誘導法の開発に成功し、薬剤スクリーニングに応用可能なヒト ES 細胞由来神経細胞分化システムを確立した。

A. 研究目的

認知症は極めて深刻な医学的問題であるが、これまで根治的治療法は開発されておらず、最先端医学の結集による新規治療法の開発に期待が寄せられている。

我々はこれまで血管ホルモンの臨床的意義について研究を続け、血管拡張ホルモンであるナトリウム利尿ペプチド (NP) やアドレノメデュリン (AM) が血管トーンを制御するのみならず、血管再生を促進することを明らかにした。また脳梗塞後に発現が著増する血管拡張ペプチドである AM の病態生理学的意義について検討を続け、AM が虚血脳において血管再生作用と神経再生作用を発揮することを明らかにした。また胚性幹細胞 (ES 細胞) の再生医療への応用を目指し、血管内皮細胞と血管平滑筋細胞に分化しうるサル ES 細胞由来“血管前駆細胞 (VPC)”を同定した。

これらの経験を踏まえ本研究では、内分泌学、神経内科学、再生医学の知識を集学的に結集し、ホルモン補償による認知症の新規治療法開発ならびに、ヒト ES 細胞から神経、血管細胞への分化誘導能を指標とした、新規虚血脳再生ホルモンの探索を目指した。

B. 研究方法

本年度、研究代表者伊藤はミトコンドリア機能不全が認知症発症に関与する可能性を検討した。分担研究者高橋は AM を用いた皮質下血管性認知症の治療法開発に関する研究を行った。分担研究者吉政は血管内皮前駆細胞の病態生理学的意義について検討した。分担研究者山原は AM の内皮細胞における作用を詳細に検討した。分担研究者近藤は ES 細胞から神経系各細胞への分化誘導法の開発に関する研究を行った。

C. 研究結果

研究代表者伊藤は、血管ホルモンがミトコンドリア制御分子である PGC1 α , ATP synthase, UCP3, SOD2 の発現調節を介して、ミトコンドリアを量的機能的に制御し、脂質燃焼などの細胞代謝を変化させることを見出した。このことが認知症発症進展に関与す

る可能性も考えられた。分担研究者高橋は AM 過剰発現トランスジェニックマウスに、血管性認知症のモデルとなるコイルを用いた両側頸動脈狭窄術 (BCAS) を施行すると、大脳局所で早期の血流回復とグリオーシスの有意な抑制を認めることを見出した。このことより、慢性脳低灌流によって生ずる白質病変に対して AM が保護再生効果を発揮する可能性が示された。分担研究者吉政は末梢血中 CD34 陽性血管前駆細胞の減少が慢性腎臓病増悪に関与する可能性を見出した。分担研究者山原は AM がリンパ管内皮細胞において炎症惹起性細胞接着分子発現を抑制することで抗炎症作用を発揮し、リンパ浮腫を軽減することを見出した。分担研究者近藤はヒト ES 細胞から神経幹細胞の同定ならびに神経幹細胞増殖継代法の開発、さらには神経系各細胞への分化誘導法の開発に成功し、薬剤の薬効ならびに副作用を簡便かつ短時間でスクリーニングに応用可能なヒト ES 細胞由来神経細胞分化システムを確立した。

D. 考察

我々が虚血脳再生ホルモンと位置付けた AM が、血管神経再生作用のみならず多彩な作用を発揮して、虚血脳回復に寄与することを見出した。またヒト ES 細胞から神経細胞への分化システムの開発に成功し、虚血脳再生ホルモンスクリーニングへの応用ならびに、細胞移植による虚血脳再生治療への応用可能性を明らかにした。

E. 結論

今回の研究において、内分泌学、神経内科学、再生医学の知識ならびに手法を有機的に組み合わせることにより、独自の発想に基づく認知症新規治療法開発を推進することができた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

[伊藤]

1. Mitsuishi M, Miyashita K, Muraki A, Itoh H. Angiotensin II Reduces Mitochondrial Content in Skeletal Muscle and Affects Glycemic Control. *Diabetes*. 2009 58:710-7.

2. Ishiguro K, Hayashi K, Sasamura H, Sakamaki Y, Itoh H. "Pulse" treatment with high-dose angiotensin blocker reverses renal arteriolar hypertrophy and regresses hypertension. *Hypertension*. 2009 Jan;53(1):83-9.

3. Iigaya K, Kumagai H, Nabika T, Harada Y, Onimaru H, Oshima N, Takimoto C, Kamayachi T, Saruta T, Itoh H. Relation of blood pressure quantitative trait locus on rat chromosome 1 to hyperactivity of rostral ventrolateral medulla. *Hypertension*. 2009 Jan;53(1):42-8.

4. Oyamada N, Sone M, Miyashita K, Park K, Taura D, Inuzuka M, Sonoyama T, Tsujimoto H, Fukunaga Y, Tamura N, Itoh H, Nakao K. The role of mineralocorticoid receptor expression in brain remodeling after cerebral ischemia. *Endocrinology*. 2008 Aug;149(8):3764-77.

5. Mitsuishi M, Miyashita K, Itoh H. cGMP rescues mitochondrial dysfunction induced by glucose and insulin in myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Mar 21;367(4):840-5.

6. Park K, Itoh H, Yamahara K, Sone M, Miyashita K, Oyamada N, Sawada N, Taura D, Inuzuka M, Sonoyama T, Tsujimoto H, Fukunaga Y, Tamura N, Nakao K. Therapeutic potential of atrial natriuretic peptide administration on peripheral arterial diseases. *Endocrinology*. 2008 Feb;149(2):483-91.

7. Yamahara K, Sone M, H. Itoh, Yamashita J, Yurugi-Kobayashi T, Homma K, Ting-Hsing Chao, Miyashita K, Kwijun Park, Oyamada N, Sawada N, Taura D, Fukunaga Y, Tamura N, Nakao K. Augmentation of Neovascularization in Hindlimb Ischemia by Combined Transplantation of Human Embryonic Stem Cells-derived Endothelial and Mural Cells. *PLoS ONE J* : 2008; 3(2) : e1666, 2008.

[高橋]

1. Yamamoto Y, Ihara M, Oakley AE, Roger L, Slade JY, Polvikoski TM, Moss T, Kalaria RN. Neuropathological Correlates of Temporal Pole White Matter Hyperintensities in CADASIL. *Stroke* 2009, in press.

2. Tomimoto H, Ihara M, Takahashi R, Fukuyama H. Functional imaging in Binswanger's disease *Rinsho Shinkeigaku*. 2008 :48(11):947-50.

[吉政]

1. Okada S, Makino H, Nagumo A, Sugisawa T, Fujimoto M, Kishimoto I, Miyamoto Y, Kikuchi-Taura Akie, Soma T, Taguchi A, Yoshimasa Y: Circulating

CD34-Positive Cell Number Is Associated With Brain Natriuretic Peptide level in Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Care*, 31:157-158, 2008.

2. Kokubo Y et al. Impact of Metabolic Syndrome Components on the Incidence of Cardiovascular Disease in a General Urban Japanese Population: The Suita Study. *Hypertens Res*, 31:2027-2035, 2008.

3. Okamura T, Kokubo Y, Watanabe M, Higashiyama A, Miyamoto Y, Yoshimasa Y, Okayama A. Low-density lipoprotein cholesterol and non-high-density lipoprotein cholesterol and the incidence of cardiovascular disease in an urban Japanese cohort study: The Suita study. *Atherosclerosis*. Jul 26, 2008

4. Makino H, Okada S, Nagumo A, Sugisawa T, Miyamoto Y, Kishimoto I, Akie TK, Soma T, Taguchi A, Yoshimasa Y: Pioglitazone treatment stimulates circulating CD34-positive cells in type 2 diabetes patients. *Diabetes Res Clin Pract*, 81(3) : 327-330, 2008.

5. Makino H, Doi K, Hiuge A, Nagumo A, Okada S, Miyamoto Y, Suzuki M, Yoshimasa Y. Impaired flow-mediated vasodilatation and insulin resistance in type 2 diabetic patients with albuminuria. *Diabetes Res Clin Pract*. 79(1) : 177, 2008.

[山原]

1. Jin D, Harada K, Ohnishi S, Yamahara K, Kangawa K, Nagaya N. Adrenomedullin induces lymphangiogenesis and ameliorates secondary lymphoedema. *Cardiovasc Res*. 2008 80(3) :339-45.

[近藤]

1. K. Saeki, Y. Yoghishi, M. Nakahara, S. Matsuyama, A. Koyanagi, H. Yagita, M. Koyanagi, Y. Kondo, A. You. Highly efficient and feeder-free production of subculturable vascular endothelial cell from primate embryonic Stem cells, *J. Cell Physiol.*, 217, 261-280, 2008.

2. H. Michibata, T. Okuno, N. Konishi, K. Wakimoto, K. Kyono, K. Aoki, Y. Kondo, K. Takata, Y. Kitamura, T. Taniguchi, Inhibition of mouse GPM6A expression leads to decreased differentiation of neurons derived from mouse embryonic stem cells, *Stem Cell Development.*, 4, 641-651, 2008.

H. 知的財産の出願・登録状況

[高橋]

1. 近藤科江、田中正太郎、藤田祐之、猪原匡史、冨本秀和、平岡真寛、発明名称「生体光イメージングプローブ」、特願 2008-251351 号 (出願日: H20. 9. 29)、整理番号 A8864 (国際特許)

【血管ホルモンによるミトコンドリア制御に関する研究】

研究代表者 伊藤 裕 慶應義塾大学 医学部 腎臓内分泌代謝内科 教授

研究要旨 認知症患者において大脳 ATP 産生低下が認められることより、ミトコンドリア機能不全が認知症の病態において中心的役割を担う可能性が指摘されている。そこで血圧を調節する血管ホルモンがミトコンドリア制御を介して認知症発症に関与する可能性を検討したところ、ナトリウム利尿ペプチドやアンジオテンシン II がミトコンドリアを量的機能的に制御することを見いだした。このような血管ホルモンによるミトコンドリア制御が認知症発症進展に関与する可能性が考えられた。

A. 研究目的

認知症早期において大脳 ATP 産生や TCA 回路活性の低下が認められ、ミトコンドリアにおけるエネルギー代謝の低下が認知症の病態において中心的役割を担う可能性が指摘されている。そこで今回ナトリウム利尿ペプチド(NP)やアンジオテンシン II(AII)などの血管ホルモンが、ミトコンドリアの量的機能的制御に関与する遺伝子群の発現変化を介して細胞代謝を制御し、認知症発症に関与する可能性を検討した。

B. 研究方法

血管ホルモンによるミトコンドリア制御を明らかにする目的で、培養骨格筋細胞 C2C12 に NP のセカンドメッセンジャーである cGMP を添加し、48 時間後にミトコンドリア量、ミトコンドリア ROS 産生、ATP 産生を定量し、ミトコンドリア制御に関与する遺伝子群の発現変化を評価した。培養骨格筋細胞ミトコンドリアにおける AII の作用も同様に評価し、また、ミトコンドリアに対する作用を担う AII レセプターを検討した。浸透圧ポンプを用いてマウスに AII 持続投与を一週間行い、耐糖能やエネルギー代謝を評価し、骨格筋におけるミトコンドリアの変化を検討した。

C. 研究結果

培養骨格筋細胞への cGMP 添加により、ミトコンドリア量と ATP 産生が増加し、一方、ミトコンドリア ROS 産生は低下した。過栄養を模倣する高グルコース高インスリン条件下でミトコンドリア量は減少し ROS 産生は増加したが、cGMP の添加によりミトコンドリア制御に関与

する PGC1 α , ATP synthase, UCP3, SOD2 の発現が増加してミトコンドリア量が回復し ROS 産生が減少した。

培養骨格筋細胞への AII 添加ではミトコンドリア量が減少し、ROS 産生が増加した。AT2R の阻害により、ミトコンドリア量は回復したが、AT1R の阻害ではミトコンドリア量に有意な変化を認めなかった。AII 持続投与マウスにおいては耐糖能が悪化し、また、呼気ガス分析で検討した脂質燃焼が低下して骨格筋脂質蓄積が増加していた。骨格筋ミトコンドリアは AII 投与マウスにおいて有意に減少しており、AT1R と AT2R のどちらの阻害でもミトコンドリア量が回復し、また耐糖能も改善した。

D. 考察

NP/cGMP カスケードはミトコンドリア制御に関与する遺伝子群の発現を変化させることで、骨格筋細胞ミトコンドリアを増加させ、また、ROS 産生を低下させることにより、過栄養に拮抗する細胞代謝変化をもたらすと考えられた。AII 投与マウスでは骨格筋ミトコンドリア量の減少と脂質燃焼低下により、異所性脂質蓄積が増加し、耐糖能が悪化することが示唆された。

E. 結論

血管ホルモンはミトコンドリアの量的機能的変化を介して細胞代謝を制御した。このことが認知症発症進展に関与する可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

虚血脳再生ホルモン（アドレノメデュリン）を用いた
皮質下血管性認知症の治療法の開発に関する研究
分担研究者 高橋良輔 京都大学神経内科教授

研究要旨：独自に確立した慢性脳低灌流モデルマウスを用い、慢性脳低灌流と白質病変
に対してアドレノメデュリンが保護効果を有することを示した

A. 研究目的

動脈硬化症に起因する脳虚血障害は難治性かつ重篤であり、患者の日常生活が大きく制限されるのみならず、患者家族の介護負担も増加する。しかしながら、脳卒中後の運動障害や認知症など、脳虚血障害後遺症に対する根治的な治療法は未だ開発されておらず、保存的療法が現在の臨床医学の限界であると言わざるを得ない。その一方、最近の基礎研究の進歩で、成獣虚血脳においても失われた神経細胞の再生が明らかとなり、新しい治療戦略である再生医療による虚血脳治療への扉が開かれた。そこで、申請者は、血管壁で産生される血管拡張ホルモンであり、血管再生作用を有するアドレノメデュリン（AM）に着目し、血管性認知症の新規治療法として有効かどうかを検証しようと着想した。

B. 研究方法

昨年度の結果報告書にも記載した如く、我々はマウスの両側総頸動脈に内径0.18mmの微小コイルを装着することで、血管性認知症のモデルマウス「慢性脳低灌流モデルマウス」を独自に開発することに成功した。そこで、AM過剰発現（AM-Tg）マウスと同腹仔の野生型マウスにこの手法を用いて、慢性脳低灌流状態を再現した。1, 3, 7, 14, 28日後の脳血流と組織変化について2群を比較検討した。脳血流は二次元レーザーベックル血流計を用いて評価した（AM-Tg, n=18; 野生型, n=17）。白質粗鬆化をKB染色で評価し、GFAP, Iba-1, GSTpi抗原に対する抗体を用いた免疫染色にて、アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイトをそれぞれ評価した（AM-Tg, n=6; 野生型, n=6）。さらに、抗PECAM-1抗体を用いた免疫染色により血管密度を測定し、血管新生の程度を評価した。

C. 研究結果

AM-Tg群の脳血流は、虚血7, 14日後に野生型群に比し有意の早期改善を示した。虚血7日後では、前値を100%とした時の野生型の血流値は83%であるが、AM-Tgマウスの血流値は98%とほぼ正常値まで回復した。虚血14, 28日後には、AM-Tg群の白質アストロサイトと活性化ミクログリア数が有意に減少し、オリゴデンドロサイトが有意に増加した。28日後の白質粗鬆化は、AM-Tg群で有意に軽減した。さらに、AM-Tg群では、血管新生が有意に増加しており、その血管新生の程度は、虚血負荷を加えていないAM-Tg群よりも有意に増強していた。

D. 考察

AMが血管再生を促し、慢性脳低灌流モデルにおける白質病変を軽減している可能性が高いと考えられる。AM-Tgマウスでは、虚血負荷を加えることで、血管新生のさらなる増強が見られた。虚血負荷を加えたAM-Tgマウスでは、同負荷を加えないAM-Tgマウスより脳内cAMP濃度が上昇するという参考結果を得ており、AMは虚血侵襲に対して優れた保護効果を示すホルモンと考えられる。今後、ヒトの血管性認知症に対する臨床応用が期待される。

E. 結論

慢性脳低灌流によって生ずる白質病変に対してアドレノメデュリンが保護効果を有することを示した。

F. 健康危険情報

AMには血圧降下作用があるが、マウスにおける有害事象は認めなかった。

メタボリックシンドローム患者における認知機能障害の解析と
血中血管神経前駆細胞の動態解析

分担研究者 吉政 康直 国立循環器病センター 動脈硬化代謝内科 部長

研究要旨：近年、末梢血中の血管内皮前駆細胞（Endothelial progenitor cell; EPC）が動脈硬化性疾患の進展に対し保護的な役割をしていることが明らかになりつつある。しかし慢性腎臓病とEPCの関連は不明である。今回の横断解析において糖尿病患者において尿アルブミン排泄とEPCに負の相関があることが明らかになり、更に前向き研究において低EPC血症では1年後の尿アルブミン排泄増加が認められることを明らかにした。今後更に長期の観察をおこない、メタボリックシンドローム、糖尿病患者における心血管病、慢性腎臓病進展における意義を明らかにする必要がある。

A.研究目的：

近年、末梢血中のEPCが血管内皮機能の維持や血管新生に作用し、動脈硬化性疾患の進展に対し保護的な役割をしていることが明らかになりつつある。実際いくつもの臨床研究によって末梢血EPCの低下が心血管病の発症の危険因子であることも示されている。一方メタボリックシンドロームは腹部肥満を中心に一個人に耐糖能障害、高血圧、脂質代謝異常などが複数合併し、動脈硬化疾患の新しい危険因子として注目されている。メタボリックシンドローム、特に耐糖能障害における心血管病、慢性腎臓病の発症・進展に対する末梢血EPCの意義を明らかにする。

B.研究方法：

国立循環器病センター通院中の40-70歳の腎症1,2期の糖尿病患者85名に対して末梢血EPC陽性細胞数（CD34陽性細胞数）を測定し、尿アルブミン排泄量と推定GFRとの相関を検討、更にこれらの患者をEPC数で4分位にわけ1年間前向きに観察した。

（倫理面への配慮）臨床研究については、当センター内の高度先駆的治療委員会、倫理委員会の審議を受ける。患者本人の意志を尊重し、臨床成績発表の際にも最大限にプライバシー保護に努める。

C.研究結果：

CD34陽性細胞数は尿アルブミン排泄と有意な負の相関を認めたが（ $r = -0.289$, $p < 0.05$ ）、推定GFRは有意な相関を示さなかった。CD34陽性細胞数と尿アルブ

ミン排泄との相関は年齢、性、HbA1c、血圧、medicationをいれた多変量解析でも有意であった。また前向き観察研究において、高CD34陽性細胞数群では1年後の有意な尿アルブミン排泄の増加は認められなかったが、低CD34陽性細胞数群では有意な尿アルブミン排泄の増加を認めた（ $34.3 \pm 7.0 \rightarrow 53.6 \pm 10.8$ mg/gCr, $p < 0.05$ ）。

D.考察：

今回の検討ではCD34陽性細胞数が糖尿病患者における腎臓病進展と相関することが明らかになった。この結果とこれまでの我々の知見を考え合わせると、末梢血EPCは耐糖能障害における特に循環器系の臓器障害に関与していると考えられる。今後メタボリックシンドロームにおける臓器障害の予防にEPCを増加させる治療法を開発していく必要がある。

E.結論

末梢血CD34陽性細胞数が糖尿病患者における慢性腎臓病増悪に関連していることが明らかになった。

F.健康危険情報

特になし

アドレノメデュリンのリンパ管内皮細胞に対する作用の検討
分担研究者 山原 研一 国立循環器病センター研究所再生医療部 室長

研究要旨 前年度までの研究成果から、アドレノメデュリン（AM）はリンパ管内皮細胞の増殖遊走促進を介したリンパ管新生作用を有することが明らかとなった。今回、AMのリンパ管内皮細胞に対する直接作用を詳細に検討した。DNAアレイを用いた検討では、AM添加によりリンパ管内皮細胞において多くの遺伝子発現に変化が認められ、特にE-selectin, ICAM-1, VCAM-1を中心とした炎症に関連する細胞接着因子の発現が著明に抑制された。このAMによるリンパ管内皮細胞に対する接着因子発現の抑制は、AMの下流シグナルであるcAMP、更には転写因子NF- κ bの活性抑制を介したものであることが明らかとなった。AMが持つ抗炎症作用の一つに、リンパ管血管内皮における細胞接着因子発現抑制を介した機序の存在が示唆された。

A. 研究目的

アドレノメデュリン（AM）は強力な血管拡張性の心血管ホルモンであり、また、血管新生作用や抗炎症作用など多様な生理作用を持つことが知られている。前年度までに我々はAMが強力なリンパ管新生効果を持ち、それは直接的なリンパ管内皮細胞に対する増殖・遊走促進作用に由来することを報告してきた¹。今回我々は、AMのリンパ管内皮細胞に対する直接作用に関して詳細な検討を行なった。

B. 研究方法

AMの培養ヒトリンパ管内皮細胞に対する作用を1) DNAマイクロアレイ（Affymetrix社 GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0）を用いて検討した。サブコンフルエントの市販培養ヒトリンパ管内皮細胞に対し、AM (10^{-7} M) を添加し、4時間後 RNA 回収を行った。以後、説明書に従い遺伝子発現解析を行った。2) ICAM-1, VCAM-1 発現解析により検討した。同

細胞を用い、TNF- α (1ng/ml) 刺激存在下でのAM (10^{-7} M) および 8-Br-cAMP (cAMP アナログ) 添加による ICAM-1, VCAM-1 の発現変化を FACS および qRT-PCR 法により解析した。3) 転写因子 NF- κ b 発現解析から検討した。同細胞における、TNF- α (1ng/ml) 存在下で AM (10^{-7} M) および 8-Br-cAMP 添加による NF- κ b の細胞内局在変化を Western blotting 法により検討した。

C. 研究結果

1) ヒトリンパ管内皮細胞において、AM 添加により2倍以上発現が低下した161遺伝子中、炎症関連は31遺伝子あった。(図1)。特に上位はE-selectin, ICAM-1, VCAM-1などの炎症関連の細胞接着因子であった。

図1 培養リンパ管内皮細胞におけるAM添加による遺伝子発現変化



2) そこで、AM のリンパ管内皮細胞に対する作用に関し、抗炎症の観点から検討を行った。リンパ管内皮細胞における TNF- α による ICAM-1, VCAM-1 発現亢進は、AM 添加により著明に抑制されることが FACS および qRT-PCR により確認された (図2)。この効果は AM の下流シグナルである cAMP のアナログ 8Br-cAMP 添加でも同様であった (図2)。

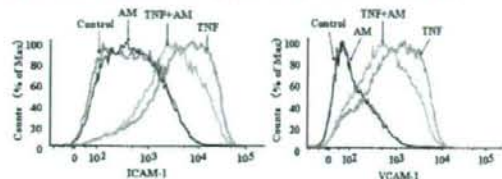


図2 培養リンパ管内皮細胞における AM による ICAM-1, VCAM-1 発現調節: FACS による検討

3) 更に、AM のリンパ管内皮細胞に対する細胞接着因子発現調節における NF- κ b の関与に関し検討を行った。TNF- α による NF- κ b の核移行は AM あるいは 8Br-cAMP 添加により著明に抑制されており、NF- κ b 活性が AM により抑制されることが推測された (図3)。

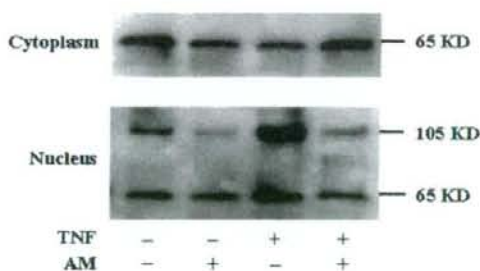


図3 リンパ管内皮細胞における AM による NF- κ b の細胞内局在変化

D. 考察

以上の結果から、AM はリンパ管血管内皮に対し ICAM-1, VCAM-1 などの細胞接着因子発現を著明に抑制することが明らかとなった。リン

パ管内皮細胞は、これら細胞接着因子の発現を介しリンパ管におけるリンパ球の遊走などの生体防御機構に関与していることが知られている。AM はリンパ管内皮細胞の接着因子発現を抑制することで、リンパ球などの炎症性細胞の遊走を抑制し、抗炎症に働いている可能性が考えられる。

E. 結論

AM が持つ抗炎症作用として、リンパ管血管内皮における細胞接着因子発現抑制を介した機序の存在が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

—ヒト ES 細胞を用いた神経細胞への分化誘導法の開発—

分担研究者 近藤 靖 田辺三菱製薬株式会社 先端医療研究所

本年度はヒト ES 細胞からの神経細胞への分化誘導法の確立を目指して研究を行った。その結果、ヒト ES 細胞から神経細胞へ分化誘導する途上で得られる「神経幹細胞」と呼称できる分化段階の細胞を in vitro で継代増幅できる技術を開発し、その細胞を用いた神経細胞への分化誘導法を確立することに成功した。

A. 研究目的

本研究課題において、主任研究者伊藤らが血管神経再生作用を有し、既に心血管疾患患者への試験的投与を開始している心血管ホルモンに関する知見と我々が樹立保有する霊長類 ES 細胞とその維持培養技術を融合させることによって、霊長類 ES 細胞を用いた血管神経細胞分化系を構築しそのシステムを駆使することにより新たな虚血脳再生ホルモンの探索を行い、痴呆治療における臨床的有用性を検討することを目的としている。

これまでに、伊藤らは ES 細胞より血管を構成する内皮細胞及び血管平滑筋細胞の双方に分化する「血管前駆細胞 (VPC)」の同定に成功し、我が国で発見された心臓血管ホルモンの臨床的意義について研究を続け、血管拡張作用を有するナトリウム利尿ペプチド (ANP, BNP, CNP) 及びアドレノメジュリン (AM) が、血管再生及び神経再生促進することを明らかにしている。またヒト ES 細胞由来の VPC を用いて DNA マイクロアレイ法を行うことによりヒト血管細胞分化遺伝子発現データベースの構築にも成功している。臨床においては、メタボリックシンドローム (MS) に伴う ASO 患者に対して ANP の低用量持続投与を試行し、著明な治療効果を得ている。また永谷らは、心不全、肺高血圧症患者に対する AM 投与により良好な臨床成績を得ている。

本年度は、主任研究者伊藤らとともに、新たな虚血脳再生ホルモンの探索に必須と思われる in vitro 血管神経細胞分化誘導系の構築に伴い、以前に確立したサル ES 細胞から分化誘導した神経幹細胞の継代増幅手法と神経細胞

への分化誘導法を用いてヒト ES 細胞にも応用できるか検討を行う。

B. 研究方法

1. ヒト ES 細胞を用いた神経幹細胞の継代増幅手法の開発と神経細胞への分化誘導法の確立

[ヒト ES 細胞から神経幹細胞への分化と継代培養法]

ヒト ES 細胞は VitroHES 培地を用いてマウス胎仔線維芽細胞上で培養した。継代後 2 日目のヒト ES 細胞のコロニーを、ガラスキャピラリーを用いてピックアップし、神経培養培地 (住友ベークライト) に 20 ng/ml の Human Recombinant FGF basic (bFGF) (R&D Systems) を加えた培地中で浮遊培養した。bFGF を毎日添加し、2 週間培養して Neurosphere 状の凝集塊を作製した。この凝集塊を Poly-L-Lysine (PLL) コーティングディッシュ (住友ベークライト) にさらに 5 µg/ml Laminin (LA) でコートしたディッシュにプレーティングし、接着培養を行った。この際、B27 (Invitrogen), 20 ng/ml bFGF, Human Recombinant EGF (hrEGF) (R&D Systems) を含む Neurobasal medium を培地として用い、bFGF と hrEGF は毎日添加した。この条件で、7 日培養を続けることで、神経幹細胞が増幅する。神経幹細胞は Neurosphere 状の凝集塊をプレーティングした際に来る凝集塊をガラスピペットで剥離して PLL+LA コートしたディッシュにプレーティングすることによって継代培養を行った。

[神経幹細胞から神経細胞への分化誘導法]

増殖した神経幹細胞は Dissociation Buffer (Invitrogen) を用いて剥離回収し、神経培養培地 (bFGF および hrEGF の添加なし) に懸濁して、PLL+LA コートしたディッシュにプレATINGし、4-8 週間培養することによって神経分化を誘導した。

[免疫染色法]

細胞を PBS にて 1 回洗浄した後に、4% パラホルムアルデヒド溶液により室温で 20 分間処理することにより固定し、0.1% triton-X100 溶液にて室温で 5 分間処理した。次に 10% BSA 含 PBS にて室温で 30 分間処理することによりブロッキングを行った。一次抗体を 1%BSA 含 PBS に最適濃度で希釈した溶液を調製して 4℃ でオーバーナイト反応させた。翌日、細胞を PBS にて 3 回洗浄した後に、二次抗体を 1%BSA 含 PBS に最適濃度で希釈した溶液を調製して室温で 30 分間反応させた後に蛍光顕微鏡を用いて観察した。使用した一次抗体は anti-Tuj1 抗体、anti-MAP2 抗体、anti-TH 抗体及び anti-GFAP 抗体である(何れも Chemicon 社製)。

C. 結果

神経幹細胞はニューロン、アストロサイト及びオリゴデンドロサイトへと分化及びその特性を維持したまま自己増殖が可能な細胞であることが知られている。今回、ヒト ES 細胞由来の Neurosphere 状凝集塊から増殖させた神経幹細胞は Nestin を発現しており (図 1 A)、また我々の研究室で開発した神経分化誘導法を用いて分化誘導させた結果、Tuj1 (図 1 B) 及び MAP2 (図 1 C) といった神経細胞マーカーの発現を確認することができ、TH 陽性の神経終末分化した細胞も存在することが確認できた (図 1 D)。また、分化した細胞の中にはアストロサイト特異的マーカーである GFAP を発現する細胞も確認出来た (図 1 E)。更に、誘導した神経幹細胞は十数回の継代培養でもその特性を維持することに成功した。

D. 考察

今回の実験結果から、我々が開発した神経細胞への分化誘導法はサル ES 細胞だけでなくヒト ES 細胞からも神経細胞へ分化誘導を可能にする方法であることを証明した。

E. 結論

ES 細胞を用いた研究は様々な研究施設で行

われているが、新規薬剤の開発に使用されている例は殆どない。新規薬剤の開発における毒性試験、安全性試験は試験期間が長期に渡る場合が多く、コストもそれに伴い多額になる。

ES 細胞から分化誘導した細胞を用いて候補薬剤を網羅的に薬効及び副作用を簡便に短時間でスクリーニングすることが出来れば上記の問題点も大きく改善できるものと考えられる。また、動物等を用いた試験の代替法として用いられたならば動物福祉の観点からも大いに喜ばしいことである。

本年度で得られた結果は、ES 細胞を用いた新しいタイプの高効率な薬剤スクリーニング構築の足がかりとなりえると考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

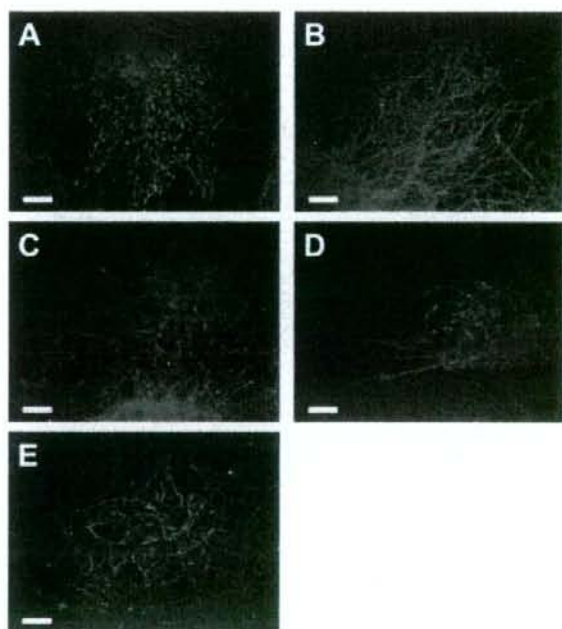


図 1. 免疫組織学的解析

A. 抗 Nestin 抗体, B. 抗 Tuj1 抗体, C. 抗 MAP2 抗体, D. 抗 TH 抗体, E. 抗 GFAP 抗体

研究成果の刊行に関する一覧表

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|--|----------------------------|-----|-----------|------|
| Mitsuishi M, Miyashita K, Muraki A, Itoh H. | Angiotensin II Reduces Mitochondrial Content in Skeletal Muscle and Affects Glycemic Control. | Diabetes. | 58 | 710-711 | 2009 |
| Ishiguro K, Hayashi K, Sasamura H, Sakamaki Y, Itoh H. | "Pulse" treatment with high-dose angiotensin blocker reverses renal arteriolar hypertrophy and regresses hypertension. | Hypertension. | 53 | 83-89 | 2009 |
| Iigaya K, Kumagai H, Nabika T, Harada Y, Onimaru H, Oshima N, Takimoto C, Kamayachi T, Saruta T, Itoh H. | Relation of blood pressure quantitative trait locus on rat chromosome 1 to hyperactivity of rostral ventrolateral medulla. | Hypertension. | 53 | 42-48 | 2009 |
| Oyamada N, Sone M, Miyashita K, Park K, Taura D, Inuzuka M, Sonoyama T, Tsujimoto H, Fukunaga Y, Tamura N, Itoh H, Nakao K. | The role of mineralocorticoid receptor expression in brain remodeling after cerebral ischemia. | Endocrinology. | 149 | 3764-3777 | 2008 |
| Mitsuishi M, Miyashita K, Itoh H. | cGMP rescues mitochondrial dysfunction induced by glucose and insulin in myocytes. | Biochem Biophys Res Commun | 367 | 840-845 | 2008 |
| Park K, Itoh H, Yamahara K, Sone M, Miyashita K, Oyamada N, Sawada N, Taura D, Inuzuka M, Sonoyama T, Tsujimoto H, Fukunaga Y, Tamura N, Nakao K. | Therapeutic potential of atrial natriuretic peptide administration on peripheral arterial diseases. | Endocrinology | 149 | 483-491 | 2008 |
| Yamahara K, Sone M, H. Itoh, Yamashita J, Yurugi-Kobayashi T, Homma K, Ting-Hsing Chao, Miyashita K, Kwijun Park, Oyamada N, Sawada N, Taura D, Fukunaga Y, Tamura N, Nakao K. | Augmentation of Neovascularization in Hindlimb Ischemia by Combined Transplantation of Human Embryonic Stem Cells-derived Endothelial and Mural Cells. | PLoS ONE | 3 | e1666 | 2008 |
| Yamamoto Y, Ihara M, Oakley AE, Roger L, Slade JY, Polvikoski TM, Moss T, Kalaria RN. | Neuropathological Correlates of Temporal Pole White Matter Hyperintensities in CADASIL | Stroke | | in Press | 2009 |
| Tomimoto H, Ihara M, Takahashi R, Fukuyama H. | Functional imaging in Binswanger's disease | Rinsho Shinkeigaku. | 48 | 947-950 | 2008 |
| Okada S, Makino H, Nagumo A, Sugisawa T, Fujimoto M, Kishimoto I, Miyamoto Y, Kikuchi-Taura Akie, Soma T, Taguchi A, Yoshimasa Y | Circulating CD34-Positive Cell Number Is Associated With Brain Natriuretic Peptide level in Type 2 Diabetic Patients | Diabetes Care | 31 | 157-158 | 2008 |
| Kokubo Y, Okamura T, Yoshimasa Y, Miyamoto Y, Kawanishi K, Kotani Y, Okayama A, Tomoike H. | Impact of Metabolic Syndrome Components on the Incidence of Cardiovascular Disease in a General Urban Japanese Population: The Suita Study. | Hypertens Res | 31 | 2027-2035 | 2008 |

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|---|--------------------------|-----|----------|------|
| Okamura T, Kokubo Y, Watanabe M, Higashiyama A, Miyamoto Y, Yoshimasa Y, Okayama A. | Low-density lipoprotein cholesterol and non-high-density lipoprotein cholesterol and the incidence of cardiovascular disease in an urban Japanese cohort study: The Suita study | Atherosclerosis | | in press | 2008 |
| Makino H, Okada S, Nagumo A, Sugisawa T, Miyamoto Y, Kishimoto I, Akie TK, Soma T, Taguchi A, Yoshimasa Y | Pioglitazone treatment stimulates circulating CD34-positive cells in type 2 diabetes patients. | Diabetes Res Clin Pract | 81 | 327-330 | 2008 |
| Makino H, Doi K, Hiuge A, Nagumo A, Okada S, Miyamoto Y, Suzuki M, Yoshimasa Y. | Impaired flow-mediated vasodilatation and insulin resistance in type 2 diabetic patients with albuminuria. | Diabetes Res Clin Pract. | 79 | 177 | 2008 |
| Jin D, Harada K, Ohnishi S, Yamahara K, Kangawa K, Nagaya N. | Adrenomedullin induces lymph-angiogenesis and ameliorates secondary lymphoedema. | Cardiovasc Res. | 80 | 339-345 | 2008 |
| K. Saeki, Y. Yoghishi, M. Nakahara, S. Matsuyama, A. Koyanagi, H. Yagita, M. Koyanagi, Y. Kondo, A. You. | Highly efficient and feeder-free production of subculturable vascular endothelial cell from primate embryonic Stem cells | J. Cell Physiol. | 217 | 261-280 | 2008 |
| H. Michibata, T. Okuno, N. Konishi, K. Wakimoto, K. Kyono, K. Aoki, Y. Kondo, K. Takata, Y. Kitamura, T. Taniguchi | Inhibition of mouse GPM6A expression leads to decreased differentiation of neurons derived from mouse embryonic stem cells | Stem Cell Development | 4 | 641-651 | 2008 |

Angiotensin II Reduces Mitochondrial Content in Skeletal Muscle and Affects Glycemic Control

Masanori Mitsuishi, Kazutoshi Miyashita, Ayako Muraki, and Hiroshi Itoh

OBJECTIVE—Blockade of angiotensin (Ang) II has been shown to prevent new-onset type 2 diabetes. We focused on the effects of AngII on muscle mitochondria, especially on their biogenesis, as an underlying mechanism of type 2 diabetes.

RESEARCH DESIGN AND METHODS—C2C12 cells and C57bl/6 mice were used to examine roles for AngII in the regulation of muscle mitochondria and to explore whether the effect was mediated by type 1 AngII receptor (AT1R) or type 2 receptor (AT2R).

RESULTS—C2C12 cells treated with 10^{-8} – 10^{-6} mol/l AngII reduced the mitochondrial content associated with downregulation of the genes involved in mitochondrial biogenesis. The action of AngII was diminished by blockade of AT2R but not AT1R, whereas overexpression of AT2R augmented the effect. AngII increased mitochondrial ROS and decreased mitochondrial membrane potential, and these effects of AngII were significantly suppressed by blockade of either AT1R or AT2R. Chronic AngII infusion in mice also reduced muscle mitochondrial content in association with increased intramuscular triglyceride and deteriorated glycemic control. The AngII-induced reduction in muscle mitochondria in mice was partially, but significantly, reversed by blockade of either AT1R or AT2R, associated with increased fat oxidation, decreased muscle triglyceride, and improved glucose tolerance. Genes involved in mitochondrial biogenesis were decreased via AT2R but not AT1R under these *in vivo* conditions.

CONCLUSIONS—Taken together, these findings imply the novel roles for AngII in the regulation of muscle mitochondria and lipid metabolism. AngII reduces mitochondrial content possibly through AT1R-dependent augmentation of their degradation and AT2R-dependent direct suppression of their biogenesis. *Diabetes* 58:710–717, 2009

Recent studies have shown that mitochondrial content and function are significantly reduced in the skeletal muscle of patients with type 2 diabetes (1,2). Percutaneous biopsy of vastus lateralis muscle has revealed that subsarcolemmal mitochondria, which are believed to be crucial for glucose transport and fatty acid oxidation, were decreased in type 2 diabetic patients, compared with body weight–matched nondiabetic patients (2). Moreover, reduced mitochondrial content and function in muscle have been also observed in pre-diabetic subjects with a family history of type 2

diabetes (3). Recent microarray analyses have revealed that expression of genes involved in mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation is coordinately decreased in the skeletal muscle of patients with type 2 diabetes (4,5), for example, peroxisome proliferator-activator receptor γ co-activator 1 α (PGC1 α), a representative transcriptional cofactor for the determination of mitochondrial content and function, and nuclear respiratory factor 1 (NRF1). Furthermore, it has been demonstrated that mitochondrial function evaluated by the rate of ATP synthesis is diminished in the skeletal muscle of diabetic patients and family history–positive pre-diabetic patients (6,7). These findings imply that reduced mitochondrial content in the skeletal muscle is likely to contribute to the development of insulin resistance and type 2 diabetes (8,9).

Angiotensin (Ang) II, which is composed of eight amino acids, is one of the most important molecules in the renin-angiotensin system. It provokes sodium reabsorption, vasoconstriction, and elevation of blood pressure and also plays a critical role in the physiological regulation of electrolytes and water homeostasis. However, an excess of AngII may lead to tissue damage, such as atherosclerosis, cardiomegaly, and heart and renal failure. AngII is known to exert its biological effects via two functional receptors, type 1 and type 2 angiotensin II receptors (AT1R and AT2R, respectively). To date, most of the known cardiovascular effects of AngII are believed to be attributable to AT1R (10). Recent large-scale clinical trials, including HOPE (Heart Outcomes Prevention Evaluation), LIFE (Losartan Intervention for Endpoint), CHARM (Candesartan in Heart Failure—Assessment of Mortality and Morbidity), and VALUE (Valsartan Antihypertensive Long-term Use Evaluation), have demonstrated that ACE inhibitors or angiotensin II receptor blockers (ARB) prevent new onset of type 2 diabetes via their ability to attenuate AngII signaling (11). As a result of these findings, the significance of AngII for the development of insulin resistance and regulation of energy metabolism has been attracting considerable attention (12–14).

It has been demonstrated that AngII provokes insulin resistance in the skeletal muscle through multiple mechanisms. AngII treatment was found to augment reactive oxygen species (ROS) production by stimulating NADPH oxidase in cultured skeletal muscle cells, thus activating multiple redox-sensitive signaling including nuclear factor- κ B (NF- κ B) and increasing proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), which impair insulin action (15,16). Inhibition of insulin signaling by AngII at multiple levels including insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and phosphatidylinositol 3-kinase has been demonstrated in aortic smooth muscle cells (17). Stimulation of primary cultured human preadipocytes by AngII was found to inhibit differentiation to mature adipocytes, suggesting that the effect of AngII on adipose tissue

From the Department of Internal Medicine, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan.

Corresponding author: Kazutoshi Miyashita, miyazkz@sc.itc.keio.ac.jp.

Received 15 July 2008 and accepted 2 December 2008.

Published ahead of print at <http://diabetes.diabetesjournals.org> on 15 December 2008. DOI: 10.2337/db08-0949.

© 2009 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/> for details.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked 'advertisement' in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

may influence glycemic control (18). Furthermore, AngII is known to affect other hormones that are related to the regulation of blood pressure, for example, by promoting the release of aldosterone and vasopressin. It has been suggested that changes in catecholamine production by genetic disruption of AT1R in mice may affect glycemic control (19). Diminished tissue perfusion and lowered blood potassium concentration caused by AngII may also be involved in the development of insulin resistance. These findings indicate that various mechanisms are likely to be involved in AngII-induced insulin resistance. However, the effect of AngII on muscle mitochondrial content and subsequent influence on glycemic control has not yet been elucidated.

In a previous study, we showed that cGMP was involved in the regulation of mitochondrial content and function of cultured C2C12 myotubular cells by altering the expressions of the genes related to mitochondrial biogenesis and the antioxidant system (20). Interestingly, cGMP is an intracellular second messenger of the vasodilating substances, natriuretic peptides and nitric oxide, both of which exert antagonistic effects to AngII actions. In the current study, we therefore focused on the effects of AngII on muscle mitochondria, especially on the regulation of their biogenesis, and their relationship with the pathogenesis of glucose intolerance.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Cell culture. C2C12 cells (RIKEN BioResource Center, Tsukuba, Japan) were grown in a low-glucose (100 mg/dl) medium, as described previously (20). Cells were fully differentiated, grown to overconfluence, and treated in a 24-well dish with or without 10^{-6} – 10^{-8} mol/l AngII (Sigma, St. Louis, MO); an AT1R blocker, RNH270 (Olmesartan, 10^{-5} mol/l, a gift from Daiichi-Sankyo, Tokyo, Japan); or an AT2R blocker, PD123319 (10^{-5} mol/l, Sigma). Unless indicated otherwise, total DNA, RNA, and proteins were extracted from the cells after 48 h of treatment.

Transient overexpression of angiotensin receptors in vitro and RNA interference. We constructed angiotensin receptor overexpressing vectors by fusing the chicken β -actin promoter-driven vector, pCAGGS (21) (a gift from Dr. J. Miyazaki, Osaka University, Japan) with cDNA of mouse AT1R (GenBank accession no. NM_177322) or AT2R (NM_007429). C2C12 cells were transiently transfected with these vectors (0.1 μ g/well) using the Lipofectamine LTX Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. We then generated small interfering RNAs (siRNAs) for genetic blockade of AT1R and AT2R. C2C12 cells were transfected with these siRNAs, or scrambled RNA as negative control (Stealth RNAi Negative Control, Invitrogen), by means of a Lipofectamine RNAi Max Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

Quantification of mitochondrial DNA copy number and gene expressions by real-time PCR. Quantitative PCR analysis was performed by standard methods. Details of the methods used are provided in the supplemental materials (available in an online-only appendix at <http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/content/full/d08-0949>).

Quantification of mitochondrial mass, ROS production, and membrane potential and ATP content. Mitochondrial mass, mitochondrial ROS production, and membrane potential of the C2C12 cells were determined, respectively, with the aid of the fluorescent dyes: MitoTracker Green FM, MitoSOX Red, and JC-1 (Molecular Probes, Eugene, OR), following the same procedures as described previously (20). The fluorescent intensity was estimated by a multi-plate reader (Wallac ARVO SX; Perkin Elmer, Wellesley, MA). ATP content of the cells was determined with the chemiluminescence method (ATP bioluminescence Assay Kit HS II; Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). For microscopic analysis, C2C12 cells were stained with the fluorescent probes and observed with a confocal microscope (LSM 510; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Quantification of protein levels by Western blotting. Western blotting was performed by standard methods. Details of the methods used are provided in the supplemental materials.

Animal experiments. All animal experiments were performed in accordance with the animal care and use guidelines of Keio University. Male C57Bl/6 mice (Nihon Clea, Tokyo, Japan) were maintained under specific pathogen-free conditions, and exogenous AngII was infused at a dose of 0.1 μ g/kg body

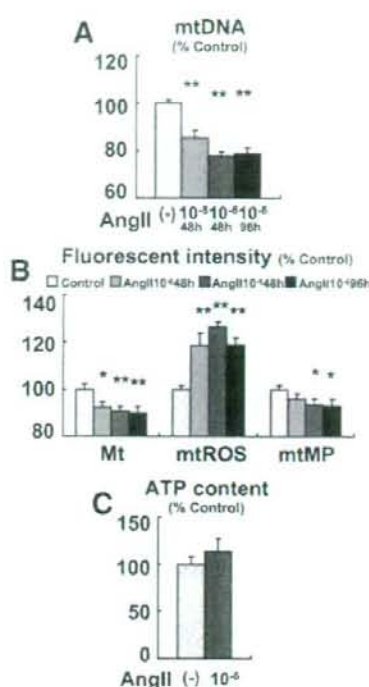


FIG. 1. AngII reduces mitochondrial content in association with an increase in mitochondrial ROS production in C2C12 cells. C2C12 cells were incubated with or without AngII (at the concentrations indicated: 10^{-6} or 10^{-8} mol/l) for 48 or 96 h. **A:** Mitochondrial DNA copy number (mtDNA) estimated by quantitative PCR analysis ($n = 12$ per group). **B:** Mitochondrial density (Mt), mitochondrial ROS production (mtROS), and mitochondrial membrane potential (mtMP) estimated with the aid of fluorescent probes ($n = 12$). **C:** ATP content determined with the chemiluminescence method ($n = 12$). The values were standardized to those for the control (no AngII treatment). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control.

wt/day, which is recognized as a suppressor dose that does not influence blood pressure (22). The infusion was carried out via an osmotic mini-pump (Alzet model 1002; Durect, Cupertino, CA) subcutaneously implanted when the mice were 8 weeks old. The AngII-infused mice were treated with or without the AT1R blocker CS-806 (Olmesartan medoxomil, a precursor of olmesartan with a longer effect in vivo than olmesartan, and a gift from Daiichi-Sankyo) or the AT2R blocker PD-123319, four times per week by oral administration (10 mg/kg body wt) with a stomach sonde. On day 10, the mice were killed for tissue harvest.

Glucose tolerance test, indirect calorimetry, and quantification of serum insulin concentration, muscle triglyceride, and enzyme activity of mitochondria. For the glucose tolerance test, the mice were fasted for 8 h and intraperitoneally injected with glucose at 2.0 g/kg body weight. Blood samples were collected from the tail vein, and the blood glucose level was promptly determined with the glucose dehydrogenase method (ACCU-CHEK Aviva, Roche Diagnostics). Oxygen consumption and fat oxidation at mice were determined by means of indirect calorimetry, which was performed for 24 h from 2000 until the next day (ARCO-2000; Arco Systems, Kashiwa, Japan). Serum insulin concentration was determined with an enzyme-linked immunosorbent assay kit (Ultra-Sensitive Mouse Insulin ELISA kit, 200716; Morinaga, Yokohama, Japan). Lipids in quadriceps were extracted with the Folch method (23), and the triglyceride level was determined with a commercially available kit (Triglyceride E-test; Wako, Osaka, Japan). We performed Oil-red-O staining of the muscle, and the method is provided in the supplemental materials. Enzyme activity of the mitochondrial proteins: cytochrome C oxidase (COX) and β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (β -HAD), was determined in the skeletal muscle by a commercially available assay kit (Mitochondria Activity Assay Kit, Bio Chain, Hayward, CA) and a standard method (24), respectively.

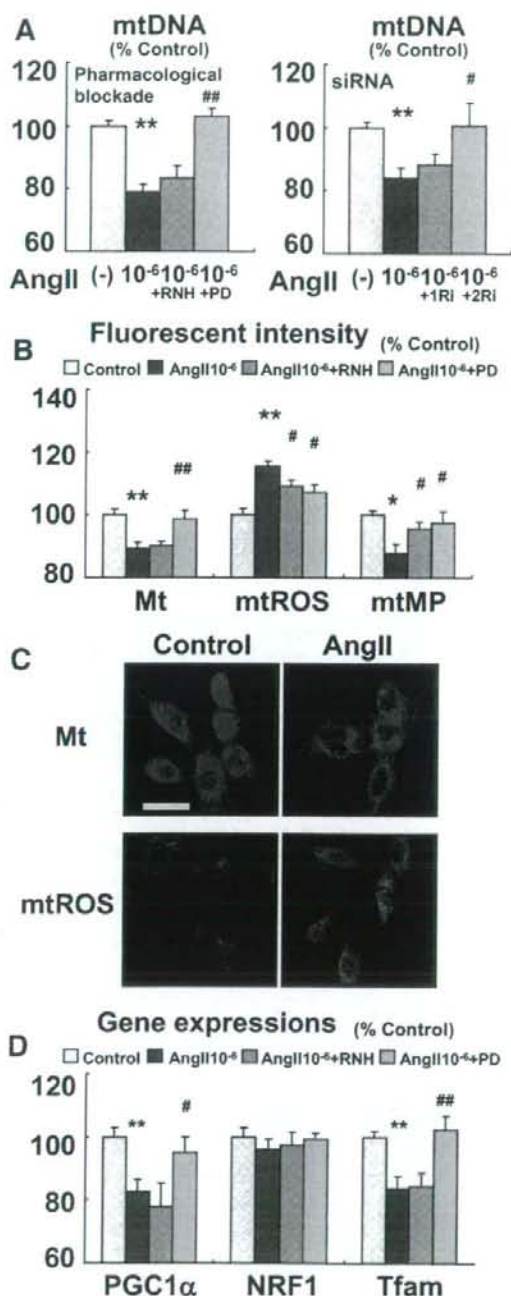


FIG. 2. Pharmacological blockade or targeted silencing of AT2R but not AT1R in C2C12 cells recovers mitochondrial biogenesis reduced by AngII. The AT1R blocker, RNH-6270 (RNH, 10⁻⁵ mol/l), or the AT2R blocker, PD-123319 (PD, 10⁻⁵ mol/l), was added to C2C12 cells previous to the treatment with AngII (10⁻⁶ mol/l) for 48 h (A–D). Targeted disruption of AT1R (1R1) or AT2R (2R1) by small interfering RNA (siRNA) was also performed (A). A: Mitochondrial DNA copy number (mtDNA) estimated by quantitative PCR analysis ($n = 12$ per group). B: Mitochondrial density (Mt), mitochondrial ROS production (mtROS), and mitochondrial membrane potential (mtMP) estimated

Microarray analysis. Microarray analysis of the skeletal muscle of AngII-infused mice was performed. Details of the methods used are provided in the supplemental materials.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed by standard methods. Details of the methods used are provided in the supplemental materials.

RESULTS

AngII reduces mitochondrial content in association with increased mitochondrial ROS production and lowers mitochondrial membrane potential in C2C12 cells. To investigate the effect of AngII on mitochondrial content, ROS production, membrane potential, and ATP production, we treated C2C12 myotubular cells with or without 10⁻⁵–10⁻⁶ mol/l AngII for 48–96 h. Mitochondrial DNA copy number, which is considered to be a surrogate marker of mitochondrial content, showed a dose-dependent reduction (22% reduction at 10⁻⁶ mol/l, $n = 12$, $P < 0.01$, Fig. 1A) in the AngII-treated groups. The magnitude of reduction was similar for 48 and 96 h of incubation with AngII. Mitochondrial mass, estimated by means of fluorescent staining, also decreased as a result of AngII treatment (9% reduction at 10⁻⁶ mol/l, Fig. 1B), in association with a significant increase in mitochondrial ROS (mtROS) (27% increase, Fig. 1B). Mitochondrial membrane potential (mtMP) was lowered (6% decrease, Fig. 1B) by AngII, whereas cellular ATP content was not significantly changed (Fig. 1C).

Blockade of AT2R but not AT1R reverses mitochondrial reduction in C2C12 cells caused by AngII, whereas blockade of either AT1R or AT2R suppresses AngII-induced changes in mtROS and mtMP. To determine the receptor responsible for the effects of AngII on mitochondria, C2C12 cells were subjected to pharmacological and genetic blockade of their receptors. Pharmacological blockade of AngII by the AT1R blocker RNH-6270 (10⁻⁵ mol/l) or AT2R blocker PD-123319 (10⁻⁵ mol/l) revealed that the decline in mitochondrial content was completely reversed by blockade of AT2R (Fig. 2A and B). Consistent results were obtained by genetic blockade of these receptors by siRNA in that the silencing of AT2R completely reversed the decrease in mitochondrial content, whereas that of AT1R did not affect it (Fig. 2A). We confirmed that the siRNAs achieved >80% reduction in the expression and protein levels of the receptors by using quantitative PCR and Western blotting (data not shown). On the other hand, the increase in mtROS and the decrease in mtMP induced by AngII were partially, but significantly, suppressed by blockade of either AT1R or AT2R (Fig. 2B). Using a confocal microscope, we were able to confirm that the fluorescent probes were distributed specifically in mitochondria (Fig. 2C).

We also examined the expressions of genes involved in mitochondrial biogenesis (PGC1 α , NRF1, and mitochondrial transcription factor A [Tfam]) and found that both PGC1 α and Tfam were decreased in the AngII-treated group (18% and 16% decrease, respectively, $n = 12$, $P < 0.01$, Fig. 2D); however, expression of NRF1 was not affected by AngII. Consistent with its effects on mitochon-

with the aid of fluorescent probes ($n = 12$). C: Microscopic analysis of the cells. C2C12 cells were stained with MitoTracker Green (green, a probe for mitochondria) or MitoSOX Red (red, a probe for mitochondria-derived ROS) and observed with a confocal microscope. Scale bar: 100 μ m. D: Expression of genes involved in mitochondrial biogenesis ($n = 12$). The values were standardized to those for the control. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. the AngII-treated group. (Please see <http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/content/full/0808-0949> for a high-quality digital representation of this figure.)

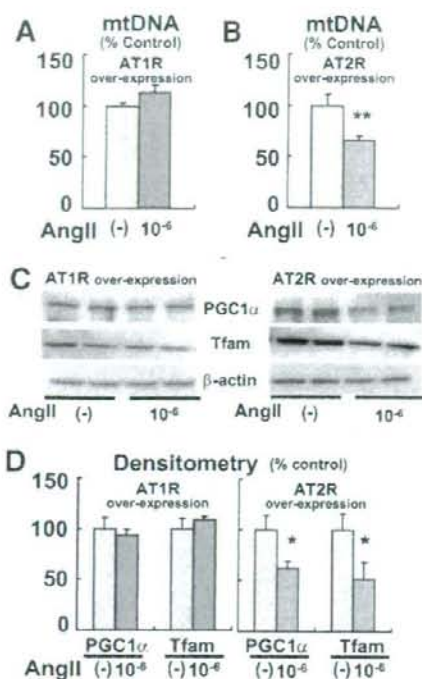


FIG. 3. Overexpression of AT2R in C2C12 cells augments AngII-induced reduction in mitochondrial biogenesis. Angiotensin II receptors (AT1R or AT2R) were overexpressed in C2C12 cells by CAG promoter-driven expression vectors previous to the treatment with AngII (10^{-6} mol/l) for 48 h (A–D). Mitochondrial DNA copy number (mtDNA) estimated by quantitative PCR analysis in C2C12 cells overexpressing AT1R (A) or AT2R (B) ($n = 12$ per group). C: Western blots of proteins that are related to mitochondrial biogenesis (PGC1 α and Tfam). D: Densitometry of the Western blots. The density of the blots for PGC1 α and Tfam was normalized by that for the internal control (β -actin) ($n = 8$). The values were standardized to those for the control. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control.

drial content (Fig. 2A and B), AT2R blockade by PD-123319 completely reversed the AngII-induced decrease in PGC1 α and Tfam, but AT1R blockade by RNH-6270 did not affect their expressions (Fig. 2D).

These results indicate that, under the present experimental condition using C2C12 cells, AT1R-dependent signal pathways have effects on mtROS and mtMP without any change in mitochondrial content, whereas AT2R-dependent pathways influence mitochondrial biogenesis, mtROS, and mtMP. The expression levels of the receptors can thus be expected to determine the effect of AngII on mitochondria.

Overexpression of AT2R in C2C12 cells augments AngII-induced reduction in mitochondrial biogenesis. Next, we performed overexpression of the receptors by using the CAG promoter-driven expression vectors in C2C12 cells (Fig. 3A–D). In the AT1R overexpression group, mtDNA was not significantly changed as a result of treatment with AngII (Fig. 3A); however, in the AT2R overexpression group, mtDNA showed a major decrease as the result of treatment with AngII (44% decrease, $n = 12$, $P < 0.01$, Fig. 3B). Western blot analysis confirmed that PGC1 α and Tfam protein levels in the AT2R overexpression group were significantly diminished by AngII (Fig. 3C and D). These results were also compatible with those for

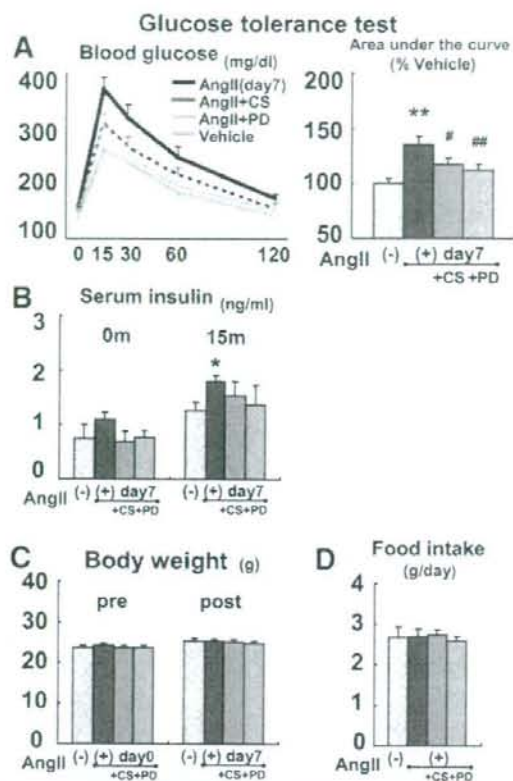


FIG. 4. Exogenous administration of AngII in mice for 1 week provokes glucose intolerance without changes in body weight or food intake. The 8-week-old male C57bl/6 mice were treated with a suppressor dose (0.1 μ g/kg body wt/day) of AngII or PBS (vehicle) by means of a subcutaneously implanted osmotic pump. The AT1R blocker, CS-866 (CS), or the AT2R blocker, PD-123319 (PD), was orally administered (A–D). A: Blood glucose levels (mg/dl) at 0, 15, 30, 60, and 120 min after intraperitoneal injection of 2.0 g/kg body wt glucose and area under the curve of the glucose level (% vehicle) ($n = 18$ per group). B: Serum insulin levels during glucose tolerance test at 0 and 15 min (0m, 15m). C: Body weight of mice before and 1 week after the implantation of osmotic pumps (pre, post). D: Food intake of mice during the experiment. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. the AngII-treated group.

their gene expressions under pharmacological blockades (Fig. 2D).

Exogenous administration of AngII in mice for 1 week provokes glucose intolerance without changes in body weight or food intake. To explore the effects of AngII on muscle mitochondria and glycemic control in vivo, C57bl/6 mice were subjected to chronic infusion of AngII by means of an osmotic pump, combined with the pharmacological blockade of AT1R by CS-866 or of AT2R by PD-123319. We compared the effect on the four groups: control (vehicle implanted), AngII infusion, AngII infusion with AT1R blockade, and AngII infusion with AT2R blockade. In the AngII-treated groups, glucose levels after the glucose challenge were significantly higher than in the control (33% elevation in area under the curve of the glucose level, $n = 18$, $P < 0.01$; Fig. 4A), and the AngII-induced change in glycemic control was significantly suppressed by blockade of either AT1R or AT2R (13% or 17% suppression, $n = 18$, $P < 0.05$ and 0.01, respectively; Fig.

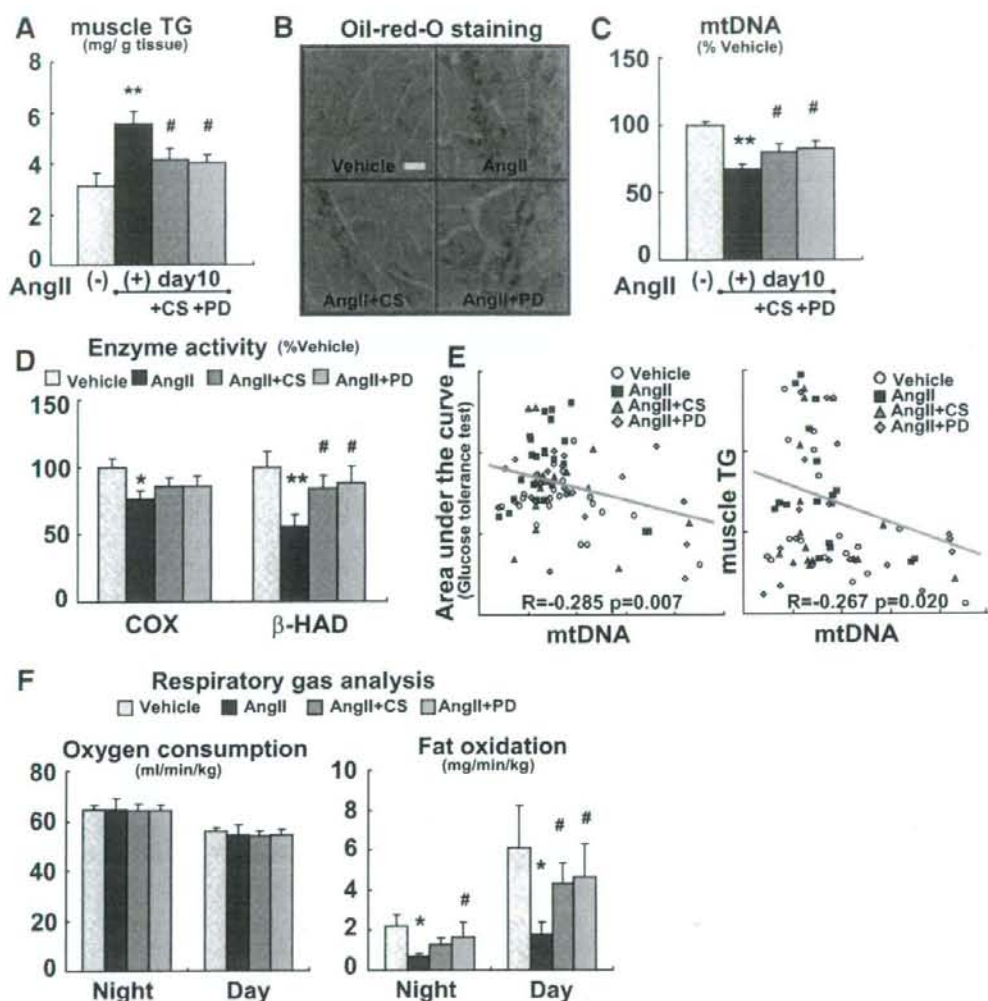


FIG. 5. AngII reduces mitochondrial content and increases triglyceride (TG) content in the skeletal muscle in both AT1R- and AT2R-dependent manners. **A:** Muscle triglyceride content (muscle triglyceride) measured in the quadriceps ($n = 8$ per group). **B:** Histological analysis of AngII-induced lipid accumulation in muscle by Oil-red-O staining. Neutral lipids were stained in red. Scale bar: 100 μm . **C:** mtDNA of the quadriceps estimated by quantitative PCR analysis ($n = 12$). **D:** Enzyme activity in the muscle of the mitochondrial proteins, cytochrome C oxidase (COX), and β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (β -HAD) ($n = 12$). **E:** The relationship between area under the curve of the glucose levels in the glucose tolerance test and mtDNA, or between muscle triglyceride and mtDNA. Symbols were distinguished according to the treatment. **F:** Oxygen consumption and fat oxidation analyzed by indirect calorimetry. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control; # $P < 0.05$ vs. the AngII-treated group. (Please see <http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/content/full/db08-0949> for a high-quality digital representation of this figure.)

4A). In the AngII-infused groups, the serum insulin concentrations at 0 and 15 m of the glucose challenge showed a parallel increase with glucose levels (Fig. 4B). There were no significant changes in body weight or food intake in any of the four groups (Fig. 4C and D).

AngII reduces mitochondrial content and increases triglycerides in the skeletal muscle in both AT1R- and AT2R-dependent manners. We then examined the muscle triglyceride level in the quadriceps of the mice and found that they were higher in the AngII group (78% increase, $n = 8$, $P < 0.01$, Fig. 5A) than in the control group. Pharmacological blockade of either AT1R or AT2R caused a significant reduction in the muscle triglyceride level compared with that in the AngII group (26% or 28%

reduction, respectively, $n = 8$, $P < 0.05$, Fig. 5A). To confirm that lipids were accumulated in the intramyocellular region, we performed Oil-red-O staining and found that AngII infusion increased intramyocellular lipids, and the increase was suppressed by blockade of either AT1R or AT2R (Fig. 5B). We also found that the ceramide content in the muscle was parallel to the triglyceride level (data not shown). The copy number of muscle mitochondrial DNA was reduced in the AngII group, and this change was also significantly diminished by blockade of either AT1R or AT2R (Fig. 5C). Furthermore, COX and β -HAD activities in the muscle, which represent electron transport and β -oxidative function of mitochondria, respectively, were significantly reduced in the AngII group, and

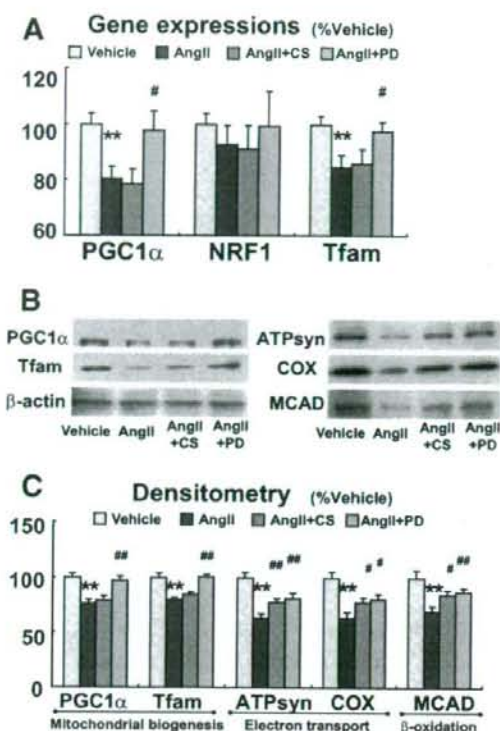


FIG. 6. Blockade of AT2R but not AT1R in AngII-infused mice reverses reduction in expression and protein levels of molecules involved in mitochondrial biogenesis. **A:** Expression of genes involved in mitochondrial biogenesis in the skeletal muscle of the mice ($n = 12$ per group). **B:** Western blots of proteins that are related to mitochondrial biogenesis (PGC1 α and Tfam), electron transport (ATPsyn and COX), and β -oxidation (MCAD). **C:** Densitometry of the Western blots. The density of the blot was normalized by that for the internal control (β -actin) ($n = 8$). The values were standardized to those for the control. ** $P < 0.01$ vs. control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. the AngII-treated group.

this change was diminished by blockade of either AT1R or AT2R, in a manner that was parallel to the mitochondrial content (Fig. 5D). These experiments also showed that mtDNA correlated significantly with the area under the curve of the glucose tolerance test ($R = -0.285$, $n = 72$, $P < 0.01$) and muscle triglyceride ($R = -0.267$, $n = 72$, $P < 0.05$) in the quadriceps (Fig. 5E). Respiratory gas analysis was used to estimate oxygen consumption and fat oxidation. Although oxygen consumption measured over 24 h showed no significant changes in the four groups (Fig. 5F), a dramatic decrease in fat oxidation was observed in the AngII-infused group (69% at night and 70% during the day, $n = 8$, $P < 0.05$, Fig. 5F), and this change was abrogated by blockade of either AT1R or AT2R and to a greater extent by the AT2R blockade (41% or 46% recovery at night, respectively, $n = 8$, $P < 0.05$, Fig. 5F). **Blockade of AT2R but not AT1R in AngII-infused mice reverses reduction in expression and protein levels of molecules involved in mitochondrial biogenesis.** Consistent with the result for C2C12 cells (Fig. 2D), AT2R blockade by PD-123191 in AngII-infused mice reversed the reduction in the expression in PGC1 α and Tfam, but blockade of AT1R by CS-866 did not affect their expressions (Fig. 6A). Western blot analysis and densitom-

etry of the blots confirmed this result (Fig. 6B and C). On the other hand, the AngII-induced reduction in mitochondrial proteins involved in electron transport or fatty acid oxidation (ATP synthase [ATPsyn], COX, and medium-chain fatty acyl-CoA dehydrogenase [MCAD]) were all suppressed by blockade of either AT1R or AT2R (Fig. 6B and C), and the manner of changes in the protein levels was parallel to that seen in mtDNA (Fig. 5B).

These results indicate that the AngII-induced reduction in muscle mitochondrial content in mice is caused by AT2R-dependent suppression of mitochondrial biogenesis and also by AT1R-dependent mechanisms that are not directly related to their biogenesis.

Microarray analysis of the skeletal muscle of AngII-infused mice. Detailed results of microarray analysis are presented in the supplemental materials.

DISCUSSION

In the study reported here, we found that AngII reduced mitochondrial content in cultured myotubular cells and skeletal muscle of mice. In addition, the AngII-infused mice showed a decrease in fat oxidation that was associated with an increase in intramuscular triglyceride content and impaired glucose tolerance. These findings imply that the cardiovascular hormone AngII, which has been thought previously to act mainly on the cardiovascular system, may have novel roles in the regulation of mitochondria and lipid metabolism in the skeletal muscle.

To determine the receptor responsible for the effects of AngII on mitochondrial content, we used pharmacological blockade and RNA interference of the receptors in C2C12 myotubes, which exhibited substantial expressions of both AT1R and AT2R. We found that the decrease in mitochondrial content induced by treatment with AngII for 48 h could be reversed by the pharmacological and genetic blockades of AT2R but not by those of AT1R. Consistent with this finding, AngII decreased the expression levels of PGC1 α and Tfam, which positively regulate mitochondrial biogenesis, in an AT2R-dependent manner. We further confirmed that this reduction was attributable to AT2R but not to AT1R, by means of overexpression of the receptors in C2C12 cells. In the skeletal muscle of AngII-infused mice, on the other hand, the pharmacological blockade of either AT1R or AT2R partially but significantly reversed the AngII-induced reduction in mitochondrial content. The change in muscle mitochondrial content was parallel to the mitochondrial protein levels of ATPsyn, COX, and MCAD and the enzyme activity of COX and β -HAD. While still in this *in vivo* situation, the AngII-induced decrease in expression and protein levels of PGC1 α and Tfam was prevented by the pharmacological blockade of AT2R but not by that of AT1R. Therefore, the difference in the protein levels under the AT1R blockade was observed between PGC1 α /Tfam and ATPsyn/COX/MCAD.

These results imply that the *in vitro* and *in vivo* regulation of mitochondria by AngII was somewhat different under the present experimental conditions. AngII reduced mitochondrial content predominantly via an AT2R-dependent direct suppression of mitochondrial biogenesis in the cultured myocytes. On the other hand, mitochondrial content in the skeletal muscle in mice appeared to be determined by a complex combination of factors. Cytokines and hormones released from other tissues, ROS production, and nutritional availability are all known to influence mitochondrial DNA copy number *in vivo* (25).

For example, the plasma level of the insulin-sensitizing hormone adiponectin from adipose tissue has been reported to be decreased by AngII infusion via AT1R (26). Because adiponectin has been shown to increase mitochondrial number (27), decreased adiponectin levels via AT1R might affect mitochondria in the in vivo condition. These kinds of mechanisms can explain the difference, which we found in the present study, between the results for AT1R blockade under the in vitro and in vivo experimental conditions.

The finding that the expression and protein levels of molecules involved in mitochondrial biogenesis in skeletal muscle of AngII-infused mice were not modulated by AT1R suggests that AT1R-dependent pathways reduce mitochondrial content by a way other than via the reduction of mitochondrial biogenesis. Therefore, we propose that mitochondrial degradation was involved in the regulation of mitochondrial content in the present study. Mitochondria are degraded in lysosomes by a process known as "mitophagy" (28). Previous studies have shown that AT1R-dependent pathways augment ROS production, which is known to promote mitophagy and reduce mitochondrial content in rat kidney (29,30). Moreover, in our experiments, an AT1R-dependent increase in lysosomes has been observed in AngII-treated C2C12 cells (data not shown). These findings together suggest that the AngII-induced ROS production via AT1R would augment muscle mitophagy and that an AT1R blockade can be expected to protect muscle mitochondria from various insults that lead to mitophagy.

Chronic AngII infusion in rodents has been shown to reduce glucose uptake in muscle and provoke insulin resistance (31). Consistent with this finding, our study demonstrated that 1-week exogenous administration of a subpressor dose of AngII with a subcutaneously implanted osmotic pump exacerbated glycemic control in C57b1/6 mice without causing changes in food intake or suppression in insulin secretion. The AngII-induced glucose intolerance in mice was accompanied by a reduction in mitochondrial content and an increase in triglyceride levels in the skeletal muscle. Previous studies have shown a strong relationship between accumulation of intramuscular triglycerides and insulin resistance (32,33). Although triglycerides themselves are thought to be biologically inactive, accumulating muscle triglyceride levels lead to an increase in intramuscular fatty acids, which has been shown to inhibit insulin signaling via phosphorylation of serine residues in insulin receptor substrate 1 (34). Other lipid metabolites, such as long-chain fatty acyl coenzyme A, diacylglycerols, and ceramides, have also been shown to impair muscle insulin signal directly (35).

Muscle triglycerides are believed to increase in association with a reduction in fat oxidation; indeed, a significant relationship between reduced fat oxidation and increased triglyceride levels has been demonstrated by means of percutaneous biopsy of the vastus lateralis muscle in insulin-resistant subjects (36). Moreover, reduced muscle mitochondrial content has been shown to correlate with decreased fat oxidation and insulin resistance in nondiabetic subjects with a family history of type 2 diabetes (37). The fact that PGC1 α -dependent pathways shift fuel substrates for oxidation from carbohydrates to lipids, in addition to promoting mitochondrial biogenesis, can explain the relationship between mitochondrial content and fat oxidation in muscle (38). These studies point to the importance of mitochondrial content in skeletal muscle as

an upstream element in the pathogenesis of intramuscular lipids and insulin resistance.

The findings in the present study lead us to hypothesize that administration of AngII in mice causes glucose intolerance at least partly by reducing the mitochondrial content in skeletal muscle, which results in reduced fat oxidation and subsequent accumulation of intramuscular lipids. In support of this notion, we identified significant relationships among mitochondrial content in quadriceps on the one hand, and intramuscular triglyceride and the index of glucose intolerance, expressed as area under the curve of glucose levels after glucose challenge, on the other. The results of the in vivo energy expenditure, which showed that the AngII infusion in mice did not change the oxygen consumption, indicate that the reduction in muscle mitochondrial content by AngII was not mediated through changes in chronic physical activity. However, it is possible that AngII first impairs glycemic control and subsequently reduces mitochondrial content, because hyperglycemia itself has been known to decrease mitochondrial content (39,40). Future studies should specifically focus on the time course of the AngII-induced decrease in mitochondrial content and deterioration of glycemic control, as well as their causal relationship.

To summarize, we have demonstrated that AngII causes a reduction in mitochondrial content in cultured myotubular cells and the skeletal muscle in mice. Exogenous administration of AngII with an osmotic pump in mice provoked glucose intolerance, which is associated with reduced mitochondrial content, decreased fat oxidation, and increased intramuscular triglyceride levels. Putting these findings together suggests that the cardiovascular hormone AngII, which has been thought to act mainly on the cardiovascular system, can also regulate mitochondrial content and lipid metabolism in the skeletal muscle, and thus affect glycemic control. AngII-infused mice are likely to reduce muscle mitochondrial content through both AT1R and AT2R by different mechanisms: through AT1R-dependent augmentation of mitochondrial degradation and AT2R-dependent direct suppression of their biogenesis.

ACKNOWLEDGMENTS

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

REFERENCES

- Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB: Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 51:2944-2950, 2002
- Ritov VB, Menshikova EV, He J, Ferrell RE, Goodpaster BH, Kelley DE: Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 54:8-14, 2005
- Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI: Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 350:664-671, 2004
- Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, Cusi K, Berria R, Kashyap S, Miyazaki Y, Kohane I, Costello M, Saccone R, Landaker EJ, Goldfine AB, Mun E, DeFronzo R, Finlayson J, Kahn CR, Mandarino LJ: Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8466-8471, 2003
- Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstråle M, Laurila E, Houtis N, Daly MJ, Patterson N, Mesirov JP, Golub TR, Tamayo P, Spiegelman B, Lander ES, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop LC: PGC1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34:267-273, 2003
- Morino K, Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Frattini J, Stutzkes N, Neschen S, White MF, Bilz S, Sono S, Pypaert M, Shulman GI: Reduced