

令和元年5月27日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09801

研究課題名(和文) アディポネクチンの新たな作用機序およびイメージング手法による生理動態解明

研究課題名(英文) Novel effects of adiponectin and its in vivo dynamics

研究代表者

前田 法一 (Maeda, Norikazu)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：30506308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンは、細胞膜上のT-カドヘリンを介して、動脈硬化の進展を抑制していることを明らかにした。また、アディポネクチンとT-カドヘリンが結合する分子機構を明らかにし、アディポネクチンは高い親和性でT-カドヘリンに結合することが分かった。アディポネクチンの多彩な臓器保護作用を一元的に説明しうるメカニズムとして、アディポネクチンがT-カドヘリンを介してエクソソーム分泌を有意に上昇させることを明らかにした。GPI-アンカー切断酵素であるGPI-PLDが、糖尿病状態で特に肝臓で上昇することを明らかにし、GPI-PLD阻害薬は新規糖尿病治療薬になりうる事を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アディポネクチンがT-カドヘリンを介して動脈硬化はじめ様々な臓器に対して保護作用を発揮する機序を本研究により明らかに出来たことで、新たな治療薬の開発に繋がる可能性が導かれた。GPI-PLDは酵素であるため、その阻害薬の開発は比較的容易であり、本研究により新たな糖尿病治療展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：A series of our studies find out the following novel mechanism. Adiponectin, an adipocyte-specific secretory circulating protein, suppresses the development of atherosclerosis through T-cadherin, a GPI-anchored cell surface protein. Adiponectin binds to specific domain of T-cadherin with high affinity. We also discover the novel mechanism explaining the variety of organ protective role of adiponectin. Adiponectin significantly enhances the exosome production via T-cadherin. We furthermore demonstrate that GPI-PLD, a GPI-anchor cleavage enzyme, is significantly increased especially in liver, and GPI-PLD knockout mice escape from diet-induced diabetes, suggesting that GPI-PLD inhibitors will be useful for novel therapeutic tools against diabetes.

研究分野：糖尿病・内分泌・代謝学

キーワード：アディポネクチン T-カドヘリン GPI-PLD メタボリックシンドローム 動脈硬化 糖尿病 肥満

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「メタボリックシンドローム」の病態基盤として、内臓脂肪の過剰蓄積を上流として、アディポサイトカイン分泌異常を介し、インスリン抵抗性・動脈硬化症など様々な病態が生じることが明らかになってきた。申請者は、アディポネクチン欠損マウスを樹立し、アディポネクチンがメタボリックシンドローム発症・進展に関わる重要な分子であることを示してきた(Nat Med 2002, Circulation 2004, ATVB 2007a, ATVB 2011 など)。とくに、アディポネクチンの抗糖尿病作用の標的臓器として骨格筋が重要であることを示した(Nat Med 2002)。さらに、本分子は臓器保護作用(ATVB 2007b, ATVB 2008, AJRCCM 2011, BBRC 2014 など)を有し、傷害組織にアディポネクチンが集積していることを見出した(ATVB 2007b, ATVB 2008)。実際、脂肪細胞シート治療を施した急性心筋梗塞モデルマウスにおいて、アディポネクチン欠損マウス由来脂肪細胞シート治療群では、野生型マウス由来脂肪細胞シート治療群に比して、梗塞面積の拡大・心機能の顕著な低下を呈した(Circulation 2011)。

アディポネクチン蛋白は健常マウスでは動脈内皮細胞に集積していた(PLoS One 2013)が、動脈硬化病変部位では、内皮細胞のみならず合成型平滑筋細胞や内皮に接着した単球表面にもアディポネクチンが存在することを明らかにした(Sci Rep 2014)。脂肪細胞以外にはアディポネクチン遺伝子発現は全く無いことより、流血中のアディポネクチンが組織へ集積すること、そして病態に応じてその集積部位が変化することが想定されるが、その意義・分子基盤は明らかではない。

これまで、申請者はアディポネクチンの治療応用として、血中濃度を上昇させる手段を提示してきた(Diabetes 2001, 2003, ATVB 2007a, 2011)。一方、上述のごとく、組織に集積するアディポネクチンを増加させることは多臓器障害発症・進展に対してより直接的かつ効果的な治療法となる。アディポネクチンの組織集積には、T-cadherin が必須の分子であることを報告した(Endocrinology 2015)。T-cadherin は大動脈、心臓、骨格筋に高発現しており、T-cadherin の局在に一致して、アディポネクチン蛋白も存在していた。T-cadherin 欠損マウスでは、これら組織におけるアディポネクチン蛋白もほとんど消失している一方、血中アディポネクチン濃度は約4倍に増加していた。他の cadherin と異なり T-cadherin は GPI-アンカー型蛋白である。GPI-アンカー切断酵素をマウスに投与すると、数時間で血中アディポネクチン濃度が上昇し、アディポネクチンは T-cadherin を介して組織集積することを明らかにした。しかしながら、T-cadherin を介したアディポネクチンの組織集積が、動脈硬化や糖尿病に及ぼす影響は不明である。

さらに、申請者はアディポネクチン欠損マウスにおいて T-cadherin 蛋白が著明に減少、アディポネクチン補充により T-cadherin 蛋白が回復することを見いだした(アディポネクチン・T-cadherin の positive feedback loop)。この現象は、古典的なりガンドとレセプターの関係からは説明できず、ここに介在する分子として内因性の GPI-アンカー切断酵素 GPI-PLD の存在を想定した。アディポネクチン欠損マウスにおいて血中 GPI-PLD が上昇しており、アディポネクチン補充にて上昇していた血中 GPI-PLD は有意に低下した。すなわち、アディポネクチンは GPI-PLD を負に制御することで、T-cadherin を安定化させ、組織に集積する可能性がある。GPI-PLD の発現制御の解明は、臓器保護因子としてのアディポネクチンの治療応用に繋がるものと考えられる。

2. 研究の目的

アディポネクチンは脂肪細胞から特異的に分泌されるにもかかわらず、肥満ではその血中濃度が低下しており、メタボリックシンドロームの発症・進展に深く関わっている。本研究では、アディポネクチンの組織集積に必須の分子である T-cadherin に着目し、アディポネクチンの新たな臓器保護作用基点を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(3-1) アディポネクチンの T-cadherin を介する抗動脈硬化作用・抗糖尿病作用の解明と生理動態解析

アポリポ蛋白 E 欠損(ApoE-KO)マウスと T-cadherin 欠損(Tcad-KO)マウスとを交配し、ApoE&Tcad-ダブル KO(ApoE&Tcad-DKO)マウスを作製し高コレステロール食負荷や頸動脈結紮モデル(Noma K et al. JCI 2008)を作製し、動脈硬化進展に関して検討する。培養血管内皮細胞や血管平滑筋細胞を用いて、TNF-alpha など動脈硬化を模倣するような刺激による T-cadherin の発現変化ならびにこれら細胞へのアディポネクチンの集積を検討する。また、siRNA を用いて T-cadherin をノックダウンした際に、アディポネクチンの作用がどのように変化するかを検討する。申請者が樹立した脂肪組織生体イメージング手法(PNAS 2015)を利用して、アディポネクチンの in vivo および in vitro における動態を可視化することでアディポネクチンの組織・細胞への集積に関し検討する。

(3-2) GPI-PLD を介するアディポネクチン蛋白の組織および血中レベルでの調節機構とその生理的意義

db/db マウス、高脂肪高蔗糖食負荷、STZ 投与マウスにおける GPI-PLD の発現変化の有無を、アディポネクチンおよび T-cadherin と併せて検討する。GPI-PLD 欠損(GP-KO)マウス

を作製し解析を行う。ヒト臨床血液検体を用いて、血中 GPI-PLD を測定し、血中 GPI-PLD 濃度を規定する因子を臨床的に探索する。

4. 研究成果

(4-1) アディポネクチンの T-cadherin を介する抗動脈硬化作用・抗糖尿病作用の解明と生理動態解析

高コレステロール食を負荷した ApoE-KO マウスの動脈硬化部位において、T-cadherin とアディポネクチンは、内皮細胞及び合成型平滑筋細胞に共局在していた。ApoE-KO マウスと T-cadherin 欠損 (Tcad-KO) マウスとの交配により、Tcad&ApoE-ダブル KO (Tcad&ApoE-DKO) マウスを作製し高コレステロール食を負荷した。Tcad&ApoE-DKO マウスは、ApoE-KO マウスに比して有意に動脈硬化が進展していた。頸動脈結紮モデルでも、Tcad&ApoE-DKO マウスは、ApoE-KO マウスに比して内膜・中膜比が有意に増加していた。

培養血管平滑筋細胞において、T-cadherin は収縮型平滑筋細胞 (cSMC) には発現していなかったが、合成型平滑筋細胞 (sSMC) には発現するようになり、さらに sSMC にはアディポネクチンの集積を認めた。sSMC への TNF- α 刺激により、MCP-1 など炎症性変化が惹起されたが、アディポネクチン添加で有意に低下した。そして、このようなアディポネクチンの作用は T-cadherin ノックダウンにより消失した。以上、アディポネクチンは T-cadherin を介して抗動脈硬化作用を発揮することを *in vivo* および *in vitro* において初めて明らかにした (FASEB J. 2017)。

さらに、アディポネクチンと T-cadherin の結合に関して詳細に検討を加えた。T-cadherin の細胞外ドメイン 1~5 をそれぞれ欠失させた変異を作製し、BIAcore を用いて検討した結果、細胞外ドメイン 1 及び 2 がアディポネクチンとの結合に必須のドメインであることを示した。そして、アディポネクチンと T-cadherin の結合解離定数 K_D 値は 1.0 nM であり、T-cadherin と結合する血清中タンパクとしてはアディポネクチンのみであることを明らかにした (JBC. 2017)。

これまで示されてきたアディポネクチンの多彩な細胞・臓器保護作用を一元的に説明しうるメカニズムとして、アディポネクチンが T-cadherin を介して、細胞からのエクソソーム分泌を有意に上昇させ、血中エクソソームを増加させる作用を有することを明らかにした (JCI Insight. 2018)。また、アディポネクチンが T-cadherin を介して骨格筋の再生維持に寄与していることを最近明らかにし、本分子の抗糖尿病作用の一端を担っている可能性が示唆された (Sci Rep. 2019)。

アディポネクチンを蛍光標識したアデノウイルス (Ad-tdTomato-Adipo) を作製し、マウスに投与し生体イメージングを実施し、血管内にアディポネクチンを検出することが可能となり、現在血管内皮細胞との連関を生体イメージングの観点から検討している。

(4-2) GPI-PLD を介するアディポネクチン蛋白の組織および血中レベルでの調節機構とその生理的意義

糖尿病モデルである *db/db* マウス及び STZ 投与マウスにおける GPI-PLD の発現を検討したところ、両マウスともに血中 GPI-PLD がコントロールに比して有意に上昇しており、また主な産生臓器である肝臓において GPI-PLD mRNA レベルも増加していた。

GPI-PLD 欠損マウスを樹立しその生理的意義を検討したところ、GPI-PLD 欠損マウスは、耐糖能が良好であり、また脂肪肝が軽度に留まっていた。その機序として、肝細胞内ジアシルグリセロール (DAG) 含量が GPI-PLD 欠損により少なくなっている事を明らかにした (AJP. 2019)。以上の結果、糖尿病状態では肝臓 GPI-PLD が上昇して病態に関与している可能性があり、GPI-PLD 阻害薬は新規糖尿病治療薬になりうる可能性を示した。また、ヒト臨床検体での解析において、血中 GPI-PLD 濃度の特立した規定因子として、TG と ALT が挙げられ、また、NAFLD 疑い症例においては血中 GPI-PLD 濃度が有意に高値であることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Masuda S, Fujishima Y, Maeda N, Tsugawa-Shimizu Y, Nakamura Y, Tanaka Y, Obata Y, Fukuda S, Nagao H, Kita S, Nishizawa H, Shimomura I. Impact of glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D on hepatic diacylglycerol accumulation, steatosis, and insulin resistance in diet-induced obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2019;316:E239-E250. 査読有 doi: 10.1152/ajpendo.00319.2018.

Tanaka Y, Kita S, Nishizawa H, Fukuda S, Fujishima Y, Obata Y, Nagao H, Masuda S, Nakamura Y, Shimizu Y, Mineo R, Natsukawa T, Funahashi T, Ranscht B, Fukuda S, Maeda N, Shimomura I. Adiponectin promotes muscle regeneration through binding to

T-cadherin. *Scientific Reports*. 2019;9:16 査読有 doi: 10.1038/s41598-018-37115-3

Obata Y, Kita S, Koyama Y, Fukuda S, Takeda H, Takahashi M, Fujishima Y, Nagao H, Masuda S, Tanaka Y, Nakamura Y, Nishizawa H, Funahashi T, Ranscht B, Izumi Y, Bamba T, Fukusaki E, Hanayama R, Shimada S, Maeda N, Shimomura I. Adiponectin/T-cadherin system enhances exosome biogenesis and decreases cellular ceramides by exosomal release. *JCI Insight*. 2018;3:e99680 査読有 doi: 10.1172/jci.insight. 99680

Fukuda S, Kita S, Obata Y, Fujishima Y, Nagao H, Masuda S, Tanaka Y, Nishizawa H, Funahashi T, Takagi J, Maeda N, Shimomura I. The unique prodomain of T-cadherin plays a key role in adiponectin binding with the essential extracellular cadherin repeats 1 and 2. *J Biol Chem*. 2017;292:7840-7849 査読有 doi: 10.1074/jbc.M117.780734

Fujishima Y, Maeda N, Matsuda K, Masuda S, Mori T, Fukuda S, Sekimoto R, Yamaoka M, Obata Y, Kita S, Nishizawa H, Funahashi T, Ranscht B, Shimomura I. Adiponectin association with T-cadherin protects against neointima proliferation and atherosclerosis. *FASEB J*. 2017; 31:1571-1583 査読有 doi: 10.1096/fj.201601064R

〔学会発表〕(計 32 件)

福田士郎、喜多俊文、小幡佳也、藤島裕也、長尾博文、増田重樹、田中紀實、西澤 均、船橋 徹、前田法一、下村伊一郎：T-カドヘリンに特有のプロドメインはアディポネクチンとの結合において重要な役割を持つ：第 39 回日本肥満学会 2018

喜多俊文、前田法一、下村伊一郎：シンポジウム「State-of-Art Cardio Metabolic Syndrome」Exosome biogenesis mediated vascular protection by adiponectin/ T-cadherin system：第 66 回日本心臓病学会学術集会 2018

田中紀實、喜多俊文、深田宗一郎、西澤 均、中村勇斗、清水有理、嶺尾良平、増田重樹、小幡佳也、長尾博文、福田士郎、藤島裕也、前田法一、下村伊一郎：骨格筋再生におけるアディポネクチン・T-カドヘリンの役割についての検討：第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会 2018

小幡佳也、福田士郎、喜多俊文、前田法一、下村伊一郎：シンポジウム「Adipobiology 研究の最前線」アディポネクチンの T-カドヘリンを介した新たな臓器保護作用メカニズム：第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会 2018

増田重樹、藤島裕也、喜多俊文、西澤 均、前田法一、下村伊一郎：肝臓における GPI アンカー切断酵素 GPI-PLD の機能解析：第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会 2018

藤島裕也、前田法一、下村伊一郎：シンポジウム「メタボリックシンドロームと心血管病～新たな分子病態基盤と治療ターゲットの探索～」心血管系におけるアディポネクチン/T-cadherin の生理病態学的意義：第 38 回日本肥満学会 2017

前田法一：ランチョンセミナー「アディポネクチン～発見から 20 年を超えて～」：第 22 回アディポサイエンス・シンポジウム 2017

藤島裕也、増田重樹、喜多俊文、西澤 均、前田法一、下村伊一郎：GPI アンカー切断酵素 GPI-PLD が、糖・脂質代謝に与える影響：第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会 2017

Norikazu Maeda, Ichiro Shimomura : Significance of adiponectin accumulation in vasculature : 11th IDF-WPR Congress 2016 & 8th AASD Scientific Meeting Joint

Symposium of Asia-Pacific Diabetes and Obesity Study Group 2016

藤島裕也、増田重樹、山岡正弥、喜多俊文、西澤 均、前田法一、船橋 徹、下村伊一郎：
T-cadherin を介したアディポネクチンの組織集積と、その血管保護作用：第 37 回日本肥
満学会 2016

前田法一、下村伊一郎：シンポジウム「肥満糖尿病の病態解明と治療法の開発ー」病態と
臓器障害・合併症の観点からー 肥満合併糖尿病の臓器障害とアディポネクチン/T-カドヘ
リン保護機構：第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会 2016

〔図書〕(計 1 件)

前田法一、下村伊一郎：株式会社杏林舎 糖尿病：2016 726-729

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ (<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/endmet/www/home/lab03.html>)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：西澤 均

ローマ字氏名：Nishizawa, Hitoshi

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学系研究科

職名：講師

研究者番号 (8 桁)：20379259

研究分担者氏名：喜多 俊文

ローマ字氏名：Kita, Shunbun

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学系研究科

職名：寄附講座講師

研究者番号 (8 桁)：10746572

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。