

平成 21 年 5 月 5 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590077
 研究課題名（和文）アンジオテンシン IV によるインスリン感受性亢進作用の解明
 研究課題名（英文） Studies on insulin-sensitive regulation by Ang IV
 研究代表者
 戸部 敬(TOBE TAKASHI)
 昭和大学・薬学部・教授
 研究者番号：90102368

研究成果の概要：本研究は血圧制御に關与するアンジオテンシン II(Ang II)の代謝産物である Ang III の新規機能解明を行い、Ang III が脂肪細胞において主に Angiotensin II type 2 receptor (AT2R)に作用し、抗糖尿病、抗動脈硬化、抗炎症作用を有するアディポネクチン分泌を上昇させること、また、グルコース取り込みを上昇させることを明らかにした。上記結果は AT2R からの活性化シグナルがメタボリックシンドロームの改善に重要な役割を担っている可能性を示唆している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：アンジオテンシン III、アディポネクチン、PPAR gamma、グルコース代謝、Angiotensin II type 2 receptor、GLUT1

1. 研究開始当初の背景

(1) レニン-アンジオテンシン系の産生物であるアンジオテンシン II(Ang II)は、腎機能、血圧、体液コントロールの中心的役割を担っている。この Ang II は生体内において、様々なペプチダーゼの作用により順次分解され、Ang III、Ang IV を、カルボキシペプチダーゼの作用により Ang 1-7 を産生する。実際、これらの各種ペプチドは生物活性を有することがいくつか報告されているものの、不明な点も多い。

(2) 当研究室で見出したアディポネクチンは、抗糖尿病、抗動脈硬化、抗炎症作用を有するアディポサイトカインの一種であり、様々な分子量の分子が血中に存在している。なかでも、高分子量アディポネクチンは活性型として知られており、疾患との関連が示唆され非常に重要な分子として位置づけられている。

(3) 高血圧、糖尿病、心疾患、腎疾患などの治療において AT1R blocker (ARB) は非常に有用であることが知られている。現在、AT1R が阻害された状態では、血漿中の Ang およ

び AT2R が上昇することが報告されており、このような状況下では AT1R 受容体に結合できない Ang あるいはその代謝産物である Ang が AT2R に結合しうる可能性、あるいは、AT2R からの活性化シグナルが ARB の効果に寄与しうる可能性が考えられる。しかしながら、この点に関しては不明な点が多く依然としてブラックボックスのままである。

(4) 近年、脂肪細胞は種々のアディポサイトカインを産生する内分泌器官として注目され、なかでも「脂肪細胞における Ang の生物学的意義」に関する研究はホットスポットの1つであり、多くの成果が報告されている。しかしながら、その大半は AngII を標的としたものであり、AngIII や AngIV などのペプチドに関する報告はない。そこで、申請者は脂肪細胞における各種ペプチドの生理機能解明という新視点からの研究に着目した。

2. 研究の目的

申請者は「脂肪細胞における Ang の生物学的意義」に関する研究の過程で各種 An ペプチドのうち Ang が最も顕著にアディポネクチン分泌を上昇させる作用を有することを見出した。このことから、申請者は脂肪細胞における AngII 代謝物の機能について、特にアディポネクチンとの関わりを中心に分子、細胞、固体レベルで詳細に検討することで、生体内における新たな機能の一端を具体的に明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス 3T3-L1 細胞を用いた脂肪細胞分化の系を用いて AngIII によるアディポネクチン分泌能をウエスタンブロッティング法にて確認した。また、Ang III が作用すると考えられている AT1 および AT2 受容体のどちらを介した反応であるのかを検討した。具体的には AT1 および AT2 受容体の阻害剤 (Irbesartan および PD123319) を前処理した後に AngIII の刺激することでその効果を解析した。また、アディポネクチン分泌は転写因子である PPAR- の活性化が重要であることが知られていることから、PPAR- の阻害剤 (GW9662) を用いて Ang III 誘導アディポネクチン分泌上昇における関与を検討した。PPAR- 活性の測定には、PPAR- の結合配列を 3 回繰り返し配列を一過性レポーター遺伝子 (pGL3-basic) に挿入し、pGL3-PPREx3 を構築後、脂肪細胞に導入することで転写活性を測定した (ルシフェラーゼアッセイ)。PPAR- の標的遺伝子の変動についてはリアルタイム PCR により定量した。

(2) マウス 3T3-L1 細胞を用いた脂肪細胞分化の系を用いて AngIII によるグルコース取り込み能の変化を 2-deoxy- $[^3\text{H}]$ -glucose 処理して測定した。また、(1) と同様の方法によりどちらの受容体が関与しているかについて各種阻害剤を用いて検討した。脂肪細胞において糖取り込みを担っている分子群 (GLUT1 および GLUT4) についてリアルタイム PCR 法にて遺伝子発現を、分画法によりタンパク質発現を検討した。また、Ang III 刺激による GLUT 発現における PPAR- の関与については (1) 同様に阻害剤を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) Ang III 刺激した脂肪細胞ではアディポネクチン分泌が刺激時間依存的に上昇した。このアディポネクチン分泌上昇は、AT2 受容体阻害剤 PD123319 の前処理により顕著に抑制した。一方で脂肪細胞を AT1 受容体阻害剤 Irbesartan で単独刺激した場合、報告のあるようにアディポネクチン分泌は上昇し、さらに Irbesartan/Ang III 共存下においてアディポネクチン分泌は相加的に上昇した。これらの結果から Ang III は AT2 受容体を介してアディポネクチン分泌を上昇させることが明らかになった。

(2) Ang III 刺激によるアディポネクチン分泌上昇に PPAR- が関与するか否かについて検討した。その結果、Ang III 誘導アディポネクチン分泌上昇は PPAR- 阻害剤である GW9662 前処理により顕著に抑制した。また、PPAR- 活性をルシフェラーゼアッセイにより測定した結果、Ang III 刺激により細胞内の PPAR- 活性が約 2.5 倍上昇することを見出した。さらに PPAR- 活性能を調べるために PPAR- 標的遺伝子として知られる aP2 およびアディポネクチン遺伝子についてリアルタイム PCR で測定した結果、両遺伝子は Ang III 刺激 12 時間以降に顕著に上昇した。これらのことから Ang III は PPAR- を活性化し、アディポネクチン分泌を上昇させていると可能性が考えられた。

(3) 次に Ang III がグルコース代謝に及ぼす効果をグルコース取り込みアッセイにより検討した。その結果、Ang III 刺激によりグルコース取り込み能は時間依存的に上昇し、刺激 12 時間後におよそ 3 倍上昇した。この反応が AT1 および AT2 受容体どちらの受容体を介した反応であるのか阻害剤を用いて検討した結果、Ang III 誘導グルコース取り込み上昇は AT2 受容体阻害剤 PD123319 の前処理により顕著に抑制した。一方で、AT1 受容体阻害剤 Irbesartan で前処理した場合、Ang III 誘導グルコース取り込み上昇に変化は認

められなかった。一方で、Ang II 刺激についても検討した結果、脂肪細胞においてグルコース取り込みは上昇した。この Ang II によるグルコース取り込み上昇は Irbesartan あるいは PD123319 を前処理しても効果が認められなかった。これらの結果は、Ang III は AT2 受容体を介してグルコース取り込みを上昇させ、一方、Ang II はどちらの受容体にも作用し、グルコース取り込みを上昇させることが考えられた。

(4) Ang III 刺激によるグルコース取り込み上昇に関わる分子について解析した。その結果、Ang III 刺激 12 時間後に GLUT1 mRNA の発現が約 4 倍上昇することを見出した。一方、GLUT4 mRNA の発現量は Ang III 刺激により上昇傾向は示すものの有意差は認められなかった。また、分画法により各 GLUT の発現量を検討した結果、Ang III 刺激により膜画分の GLUT1 発現が上昇し、この発現は PD123319 前処理により顕著に抑制した。また、Ang III 刺激による GLUT1 mRNA 発現上昇は、GW9662 前処理により一部抑制した。

(5) 現在、AT1R が循環器系の組織に高発現し、血管収縮や血管内皮障害など有害な反応を担い、一方で、AT2R は反作用を有する制御分子として、血管拡張、組織再生など有益な反応を担っていることが知られている。さらに、AT2R の重要性を支持する知見として、抗炎症作用、心保護作用、神経保護などが見出されている。これらのことより、本研究結果は生体内における Ang III-AT2R-PPAR シグナルの重要性を支持する結果であると考えらる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Inoue M, Nakano Y(4), Tobe T(5) et al. (5 名), High-molecular-weight adiponectin and leptin levels in cord blood are associated with anthropometric measurements at birth., *Horm Res.*, 70(5), 268-272, 2008, 査読有

Yamada M, Tanioka T(4), Nakano Y(5), Tobe T(6) et al. (7 名), Prgl1 is regulated by the basic helix-loop-helix transcription factor Math2., *J Neurochem.*, 106(6), 2375-2384, 2008, 査読有

Tomita T, Nakano Y(8), Tobe T(9) et al. (10 名), Use of Sample hematocrit value to correct blood tacrolimus concentration

derived by microparticle enzyme immunoassay., *Biol Pharm Bull.*, 31(6), 1250-1253, 2008, 査読有

Shinmura K, Nakano Y(4), Tobe T(5) et al. (6 名), The Cardioprotective Effects of Short-term Caloric Restriction are Mediated by Adiponectin via Activation of AMP-Activated Protein Kinase., *Circulation*, 116, 2809-2817, 2007, 査読有

Ban Y, Nakano Y(4), Tobe T(5) et al. (9 名), Impact of increased plasma serotonin levels and carotid atherosclerosis on vascular dementia., *Atherosclerosis*, 195, 153-159, 2007, 査読有

Ban Y, Tobe T(3) et al. (7 名), The regulatory T cell gene FOXP3 and genetic susceptibility to thyroid autoimmunity: an association analysis in Caucasian and Japanese cohorts., *Journal of Autoimmunity*, 28, 201-207, 2007, 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

1) 谷岡 利裕、アンジオテンシン III によるグルコース代謝調節機構、BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)、2008.12.11、神戸ポートアイランド (神戸)

2) 谷岡 利裕、脂肪細胞におけるアンジオテンシン III の生理作用、第 3 1 回 日本高血圧学会総会、2008.10.11、ロイトン札幌 (札幌)

3) 谷岡 利裕、脂肪細胞におけるアンジオテンシン III の新規機能、第 1 3 回 アディポサイエンス研究会、2008.8.22、千里阪急ホテル 仙寿の間 (大阪)

4) 谷岡 利裕、脂肪細胞におけるアンジオテンシン III の生理的意義、第 9 回 Pharmac-Hematology シンポジウム、2008.6.21、日本薬学会長井記念ホール (東京)

5) 志田 美子、抗うつ薬の作用メカニズムに関わる転写因子 ADRG701 が制御する下流遺伝子の探索、第 8 0 回日本生化学 / 第 3 0 回日本分子生物学会年会大会 合同大会 (BMB2007)、2007.12、パシフィコ横浜 (神奈川)

6) Toshihiro Tanioka、Angiotensin III

increases adiponectin secretion via AT2 receptor、第80回日本生化学/第30回日本分子生物学会年会大会 合同大会 (BMB2007)、2007,12、パシフィコ横浜(神奈川県)

7) 山本 佳樹、小児気管支喘息患児末梢血中のTh17細胞とTregの検討、第57回日本アレルギー学会秋季学術大会、2007,11、パシフィコ横浜(神奈川県)

8) 谷岡利裕、Angiotensin IIIによるAdiponectin分泌制御機構、第51回日本薬学会関東支部大会、2007,10、星薬科大学(東京)

9) Yasuko Nakano、High-molecular weight (HMW) adiponectin and hexamer adiponectin, but globular adiponectin, suppress differentiation of bone marrow macrophage into osteoclast、16th International symposium on molecular cell biology of macrophages、2007,5、GRANSHIP(静岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸部 敬 (TOBE TAKASHI)

昭和大学・薬学部・教授

研究者番号:90102358

(2) 研究分担者

中野 泰子 (NAKANO YASUKO)

昭和大学・薬学部・教授

研究者番号:20155790

谷岡 利裕 (TANIOKA TOSHIHIRO)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号:80360585

(3) 連携研究者