

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790626
 研究課題名(和文) 抗糖尿病因子アディポネクチンの高活性型フォーム同定と
 制御機構解明による治療応用
 研究課題名(英文) The identification of High Molecular Weight form of Adiponectin
 as anti-diabetic factor, and its use for treatment
 研究代表者
 羽田 裕亮 (HADA YUSUKE)
 東京大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号 20436463

研究成果の概要：

われわれはアディポネクチンの 3 量体、6 量体、高分子量それぞれのフォームを別々に精製する技術を確立した。さらに、3 量体アディポネクチンは血清中でアルブミンと結合している事を見出した。またこれらの各フォームの AMP キナーゼの活性化の比較を行ったところ高分子量型がもっとも AMPK の活性化を行う事を見出した。チアゾリジン誘導体で認められた脂肪細胞の肥満に伴う機能・活性の障害への回復能がアンジオテンシン受容体拮抗薬でも部分的ながら認められる事を見出した。更に動脈硬化巣に対する治療・予防効果も期待される結果を見出しつつあると考えている。球状 3 量体アディポネクチンの切断部位を特定し、その切断活性の強さや制御機構の検討を進めている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,000,000	0	2,000,000
20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：糖尿病・脂肪細胞・アディポネクチン

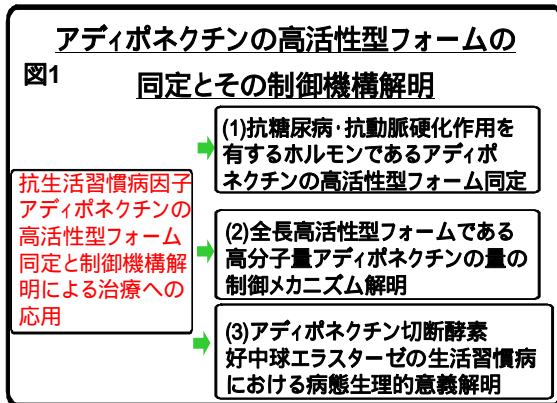
1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでアディポネクチンがインスリン感受性ホルモンであることを確立し(Nat.Med.7:941,2001;Nat.Genet.30:221,2002;Nat.Med.8:1288,2002)、その受容体をクローニングした(Nature 423:762,2003)。肥満ではアディポネクチンの血中レベル及び受容体の発現レベルが低下しているのに加え(J. Biol. Chem. 278:40352, 2003)、予備実験で我々が全長アディポネクチンの中で

高活性型であることを見出した全長高分子量アディポネクチンが低下していることが明らかとなってきている(J. Biol. Chem. 278:40352, 2003; Diabetes 54:3358, 2005; Diabetes Care 29:1357, 2006)。

このアディポネクチン作用の低下が肥満に伴う生活習慣病であるインスリン抵抗性、糖尿病、高脂血症、高血圧といったメタボリックシンドロームの主要な原因となっている。従って本研究による高活性型アディポネク

チンの同定とその制御機構の解明、そしてそれらに基づいたアディポネクチン作用の増加剤開発は、国内外の関連する研究の中で最も重要で最先端の研究である。(図1)



2. 研究の目的

(1)抗糖尿病・抗動脈硬化作用を有するホルモンであるアディポネクチンの高活性型フォームを同定する。

予備実験により全長アディポネクチンの中では高分子量多量体がアディポネクチンによる抗糖尿病作用に重要な AMP キナーゼを最も強く活性化することを見出している。さらにこの高分子量多量体がアディポネクチンによる抗糖尿病・抗動脈硬化作用に重要な抗炎症作用を最も強く発揮することも見出している。(図2)

(2)全長高活性型フォームである高分子量アディポネクチンの量の制御メカニズムを解明する。

これまでにチアゾリジン誘導体が高分子量アディポネクチンを増加させることを報告した(Diabetes 54:3358, 2005)。予備実験で降圧薬であるアンジオテンシン受容体拮抗薬も高分子量アディポネクチンを増加させること、さらに ER ストレス消去に重要かつ SS 結合を誘導する候補分子をチアゾリジン誘導体及びアンジオテンシン受容体拮抗薬が増加させることを見出している。

(3)アディポネクチン切断酵素好中球エラスターゼのメタボリックシンドローム・動脈硬化における病態生理的意義を解明する。

我々はこれまでに in vitro において好中球エラスターゼが全長アディポネクチンを切断して高活性型の球状 3 量体(gAd)に変換する事を報告している。インスリン抵抗性状態の脂肪組織や動脈硬化巣には、種々の分化段階のモノサイトやマクロファージの浸潤が認められ、病態の形成に重要な役割を果たすことが明らかとなってきている。

3. 研究の方法

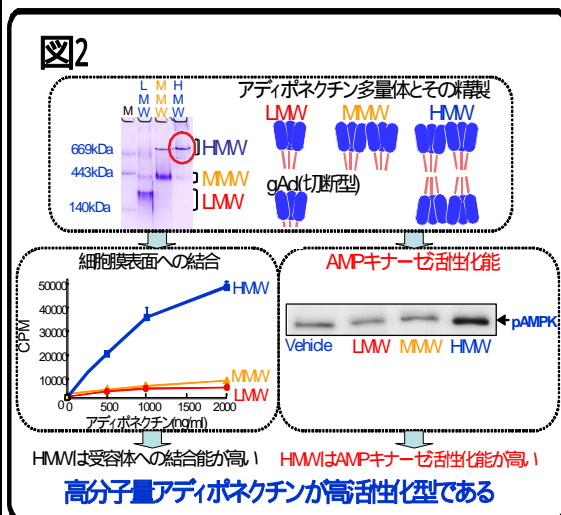
(1)抗糖尿病・抗動脈硬化作用を有するホルモンであるアディポネクチンの高活性型フォーム同定

脂肪細胞に特異的に発現して分泌される抗糖尿病・抗メタボリックシンドローム・抗動脈硬化ホルモンであるアディポネクチンは多くは全長アディポネクチンの形で血中に存在している。そしてこれまで、3 量体、6 量体、高分子量の少なくとも3つのフォームで血中に存在することが知られていた。

我々は先ず、コラーゲンドメイン内に変異があつて、高分子量アディポネクチンだけを特異的に形成出来なくなるヒトがインスリン抵抗性・糖尿病を呈することを見出した(J. Biol. Chem. 278:40352, 2003)。

このことから、3 量体、6 量体、高分子量アディポネクチンの活性、あるいは役割が違う可能性が示唆された。そこで、本研究では、先ず、3 量体、6 量体、高分子量それぞれのフォームを別々に精製し、その活性を比較した。

C2C12 骨格筋細胞や Fao 肝細胞に添加し、アディポネクチンによる代謝作用に重要な役割を果たす AMP キナーゼの活性化を比較した。さらに THP-1 マクロファージに添加し、炎症惹起時の TNF 産生抑制能などを検討した。これまでの予備検討で、3 量体、6 量体、高分子量に加えて、アルブミンに結合した3量体が存在すること、高分子量多量体が AMP キナーゼを最も強く活性化することを見出している(図2)。さらにこの高分子量多量体が抗炎症作用を最も強く発揮することも見出している(図3)。



(2)全長高活性型フォームである高分子量アディポネクチンの量の制御メカニズム解明

これまでの検討で、高分子量アディポネクチンが既に脂肪細胞内で形成され、凡そ、その存在比を変化させることなく細胞外へ分泌されることを見出している(J. Biol. Chem.

278:40352, 2003)。

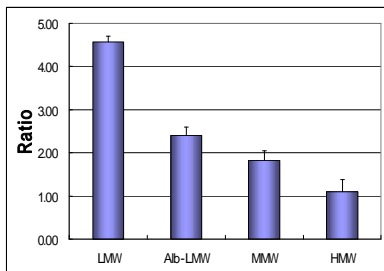
そこで我々は、高分子量多量体が形成される“場”として、高次構造を有するタンパクの折りたたみに関わる小胞体(ER)に着目した。ERは肥満や糖尿病状態などでERストレスにさらされるとその本来の役割であるタンパクの高次構造の構築に異常を来し、そのことによって病態においては高分子量アディポネクチンが低下しているのではないかと仮説をたてた。

我々は以前にチアゾリジン誘導体が高分子量アディポネクチンを増加させることを報告している(Diabetes 54:3358, 2005)。

さらに予備実験で降圧薬であるアンジオテンシン受容体拮抗薬も高分子量アディポネクチンを増加させることを見出した。そこでさらに本研究では、肥満に伴う脂肪細胞肥大によってその機能・活性が障害され、チアゾリジン誘導体やアンジオテンシン受容体拮抗薬で機能・活性が回復する候補分子を探索した。

予備検討でERストレス除去に重要かつSS結合を誘導する候補分子をチアゾリジン誘導体及びアンジオテンシン受容体拮抗薬が増加させることを見出している(図4)。

図3 HMWはLPSによるTNFのmRNA発現をより強く抑制した



各アディポネクチン多量体をそれぞれ10 µg/mlの濃度で作用させた際に、炎症惹起因子であるTNFのmRNA発現はHMWでもっとも強く抑制されている

(3) アディポネクチン切断酵素好中球エラスターゼのメタボリックシンドローム・動脈硬化における病態生理的意義解明

in vitroの単球系のモデル培養細胞から全長アディポネクチンを切断して球状3量体アディポネクチンを産生する酵素が好中球エラスターゼであることを同定した(Endocrinology 146:790, 2005)。

球状3量体アディポネクチンは全長アディポネクチンと比較して数十分の1低い濃度で同等の抗糖尿病作用(Nat. Med. 7:941,2001)や抗動脈硬化作用(J. Biol. Chem. 278:2461,2003)を発揮する高活性型であることをこれまで報告してきた(図5)。

In vitroで見つかったこの酵素によるアディポネクチン切断のin vivoにおける意義を

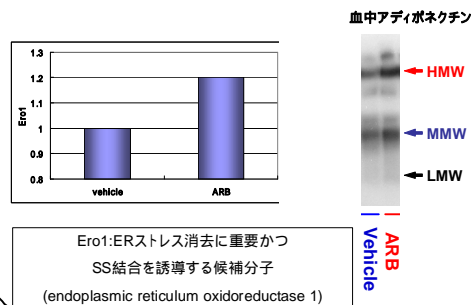
明らかにする目的に先ず、骨格筋や脂肪組織、動脈硬化巣、糖尿病性網膜症や腎症などの組織において実際に球状3量体アディポネクチンが産生されているかどうかを詳細に検討した。

インスリン抵抗性状態の脂肪組織や動脈硬化巣には、種々の分化段階のモノサイトやマクロファージの浸潤が認められ、病態の形成に重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。FACSなどを用いて、種々の分化段階、状態の分画の単球における好中球エラスターゼ発現量の多寡を明らかにした。

実際にin vivoで切断されていることが確認出来たため、好中球エラスターゼ阻害剤を用いて、in vitroにおいてこの酵素がアディポネクチンの活性に与える影響を検討した。

図4

ARBはEro1の発現量を増加させHMWの発現量も増加させた



Ero1:ERストレス除去に重要かつSS結合を誘導する候補分子(endoplasmic reticulum oxidoreductase 1)

4. 研究成果

アディポネクチンは血中において少なくとも3つのフォームで存在しているが、我々はその3量体、6量体、高分子量それぞれのフォームを、ゲルろ過方式を用いて別々に精製する技術を確立した。

さらに、3量体アディポネクチンは血清中でアルブミンと結合している事を見出した。従来の精製においては6量体とアルブミン結合3量体のピークが近く分離できないでいたが、この新しい手法を用いることによりアルブミン結合3量体を同定し、さらに両者を分離することが可能となった。

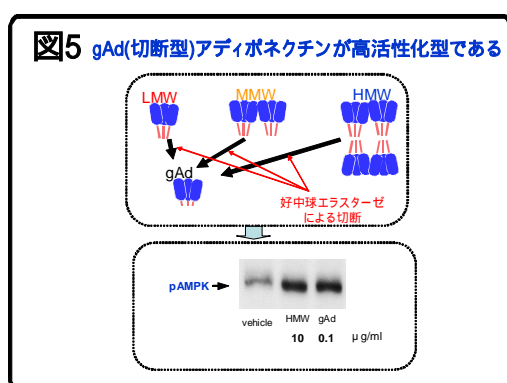
アルブミンと結合していることの病態生理的意義についてはまだ明らかとなっていないが、現在のところ血中での安定性、半減期への影響などが考えられている。

また、これらの各フォームのAMPキナーゼの活性化の比較を行ったところ高分子量型がもっともAMPKの活性化を行う事を見出した。

チアゾリジン誘導体は高分子量アディポネクチンを増加させることを以前報告している。脂肪細胞の機能・活性は肥満に伴い障害され、チアゾリジン誘導体で回復する事が知られているが、さらにアンジオテンシン受容体拮抗薬でも部分的ながら似たような回復

能が認められる事を見出した。
この機能について分子生物学的な制御機構
についての検討を行い、更に動脈硬化薬へ対
する治療・予防効果も期待される結果を見出
しつつある。

球状3量体アディポネクチンは高活性型であ
ることが知られているが、血中での濃度はア
ディポネクチンの1/1000程度であり、その
切断活性は炎症部位において比較的局所
において起こっていることが示唆されている。
我々はコラーゲン領域での切断部位を既に
特定しており、その切断がどこでどのよう
に行われているのかについても活性部位など
の検討により大まかな候補を見出しており、
切断活性の強さや制御機構を検討している
ところである。



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1件)

1. Ebinuma H, Miida T, Yamauchi T,
Hada Y, Hara K, Kubota N, Kadowaki T.

Improved ELISA for selective
measurement of adiponectin multimers
and identification of adiponectin in human
cerebrospinal fluid.

Clinical Chemistry

査読あり、53巻、2007年、1541-1544

2. 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.

Biochemical and Biophysical Research

Communications.

査読あり、356巻、2007年、487-493

[学会発表](計8件)

1. 羽田裕亮 他
AdipoRの病態生理的意義の解明
第2回 FANTASY
2009年2月5日 東京

2. 羽田裕亮 他
脂肪萎縮性糖尿病 A-ZIP Tg マウスにおける
MCP-1の欠損はインスリン抵抗性を改善する
第29回日本肥満学会
2008年10月17日 大分

3. 羽田裕亮 他
過食や高脂肪食等による肥満・糖尿病は転写
共役因子 CBPの脂肪組織での部分的抑制によ
り改善させうる
第51回日本糖尿病学会
2008年5月23日 東京

4. 羽田裕亮 他
ヒト血中アディポネクチンの多量体の分離
精製と各フォームの活性検討
第1回 FANTASY
2008年2月6日 東京

5. Y.Hada et al
Selective purification of adiponectin
multimers from human plasma and CSF
Keystone Symposium of Metabolic Disease
2008年1月17日
アメリカ キーストン

6. 羽田裕亮 他
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
第11回日本病態栄養学会
2008年1月12日 京都

7. 羽田裕亮 他
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
第28回日本肥満学会
2007年10月19日 東京

8. 羽田裕亮 他
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
第50回日本糖尿病学会
2007年5月22日 仙台

[図書](計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

6．研究組織

(1)研究代表者

羽田 裕亮 (HADA YUSUKE)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20436463

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし