

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009-2011

課題番号：21591154

研究課題名（和文）アディポネクチンの寿命延長作用の機序に関する研究

研究課題名（英文）Study on the mechanism of longevity effect by adiponectin

## 研究代表者

山田 研太郎 (YAMADA KENTARO)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：10191305

## 研究成果の概要（和文）：

遺伝子導入による高アディポネクチン血症は、メタボリックシンドロームモデルマウスの寿命短縮を、体重および摂餌量に影響することなく改善した。その効果は悪性腫瘍や血管病変の抑制あるいは Sirtuin 遺伝子発現の変化に帰することはできず、AKT シグナルの抑制による慢性炎症改善によることが示唆された。一方、Klotho マウスの寿命短縮はアディポネクチン遺伝子導入で改善しなかった。

## 研究成果の概要（英文）：

Hyperadiponectinemia induced by transgenic expression of adiponectin prevented the premature death of metabolic syndrome model mice without affecting body weight or food ingestion. The longevity effect was not attributable to the suppression of malignant tumors or vascular events, or the augmentation of Sirt1. Anti-inflammatory action through the inhibition of AKT signaling may be involved in the beneficial effect of adiponectin. On the other hand, adiponectin did not prevent the premature death of Klotho mice.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：メタボリックシンドローム・アディポネクチン・寿命・老化・KK/Ta マウス  
・慢性炎症・Klotho マウス

## 1. 研究開始当初の背景

私どもは肝においてヒトアディポネクチン遺伝子を発現する3系統のトランスジェニックマウスを作製し、そのうち高アディポネクチン血症を呈する2系統の寿命が延長していることを報告した。さらに、脂肪細胞特異的 nSREBP-1c トランスジェニックマウスが、非アルコール性脂肪性肝炎 (non-alcoholic

steatohepatitis, NASH) を自然発症することを見だし、肝細胞のバルーニング、炎症性細胞浸潤、線維化等の NASH 様病変がヒトアディポネクチン遺伝子導入により抑制されることを明らかにした。アディポネクチンの寿命延長作用にも、代謝異常に伴う慢性炎症の抑制が関わるものと推定されたが、その作用機序は不明であった。

## 2. 研究の目的

(1) 肥満・耐糖能異常・高インスリン血症・高脂血症等を呈しメタボリックシンドロームの疾患モデルとされる KK/Ta マウスにアディポネクチン遺伝子を導入し、メタボリックシンドロームの代謝異常と寿命短縮を高アディポネクチン血症が防ぎえるかどうかを明らかにする。

(2) アディポネクチンによる KK/Ta マウスの寿命延長が認められたら、KK/Ta マウスが早期に死亡する原因を明らかにし、アディポネクチンが腫瘍発生や腎障害を抑制する可能性を検討する。

(3) 長寿遺伝子とされる Sirtuin の各臓器における発現を KK/Ta マウスと正常マウスと比較し、アディポネクチンが Sirtuin の増加を介して寿命を延長させる可能性を検討する。

(4) 早発性老化症候群モデル動物である Klotho マウスにアディポネクチン遺伝子を導入し、血管、骨、皮膚、性腺などの各臓器の老化関連病変と、生殖能力への効果を観察する。また、 $\alpha$ -Klotho 遺伝子発現へのアディポネクチンの影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) アディポネクチン遺伝子導入 KK/Ta マウスの作製

KK/Ta マウスのメタボリックシンドローム様表現型は多因子遺伝であるので、高アディポネクチン血症トランスジェニックマウスに KK/Ta マウスを 10 世代バッククロスすることにより、遺伝背景を KK/Ta マウスに置き換えた高アディポネクチン血症 KK/Ta マウスを作製した。

(2) KK/Ta マウスの死因の検索

マウスが衰弱し摂食不能となった時点で解剖し、肉眼的観察の後、脳を含む各臓器をホルマリン固定した。切片を HE 染色し、死因となった可能性のある病変を検索した。また、40 週齢において KK/Ta マウスの脳、心、大動脈、肝、腎、脾を切除し、HE、Elastica van Gieson、および Congo-red 染色を用いて組織学的検討を行った。

(3) Sirtuin の関与の検討

肝、骨格筋および脂肪組織における *Sirt1* 遺伝子発現を定量 RT-PCR 法で検討した。また、肝組織の Sirt1 蛋白量を Western blot 法で比較した。

(4) 慢性炎症への作用の検討

肝における *Cpr* 遺伝子発現を定量 PCR で、血中 CPR 濃度を ELISA 法で測定した。また、血中 TNF- $\alpha$  および IL-6 濃度、尿中 8-OHdG 排泄量を測定した。肝組織の総 AMPK、リン酸化 AMPK、総 AKT、リン酸化 AKT を Western blot 法で検討した。

(5) Klotho マウスを用いた検討

遺伝的背景を一致させるため、アディポネ

クチントランスジェニックマウスに Klotho マウスを 10 世代バッククロスし、アディポネクチン高発現 Klotho マウスを作製した。寿命および  $\alpha$ -Klotho 蛋白発現へのアディポネクチンの影響を観察した。

## 4. 研究成果

KK/Ta マウスは C57BL/6N マウスより体重が重く、摂餌量も多かった。アディポネクチン遺伝子導入 KK/Ta (Tg-KK/Ta) マウスも同様に肥満を呈し、体重および摂餌量は通常の KK/Ta マウスと差がなかった (図 1 a, b)。

10 週齢雄性 KK/Ta マウスの血中アディポネクチン濃度は同週齢の C57BL/6 マウスより低値であった。Tg-KK/Ta マウスにおいては血中ヒトアディポネクチン濃度が高いだけでなく、脂肪細胞の小型化と内因性マウスアディポネクチン濃度の上昇がみられた (図 1c)。

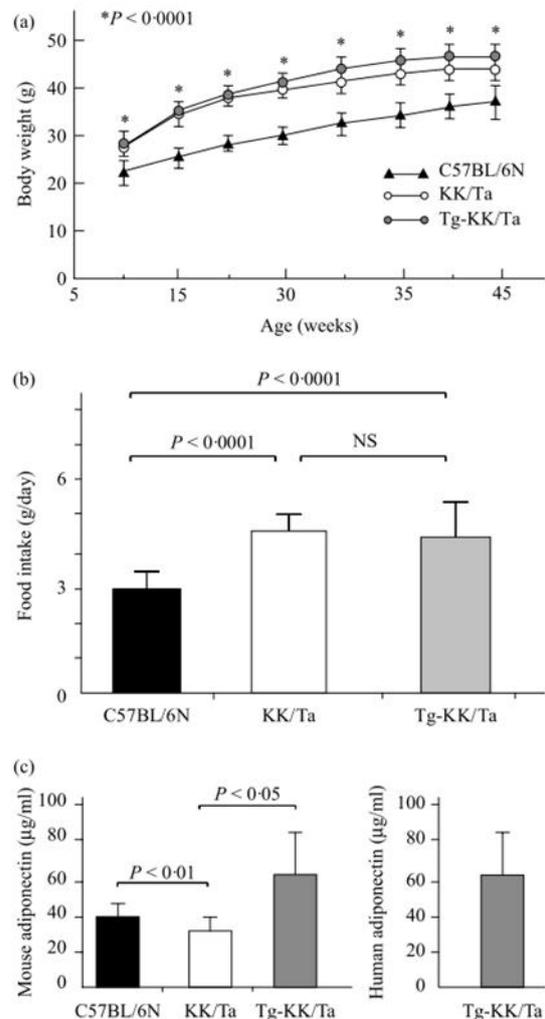


図 1. C57BL/6N マウス, KK/Ta マウス, アディポネクチン遺伝子導入 KK/Ta マウスの体重 (a), 摂餌量 (b), 血中アディポネクチン濃度 (c)。

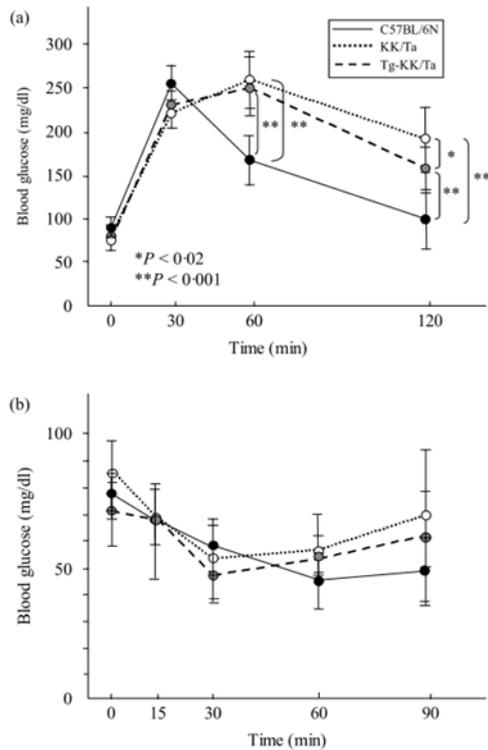


図2. 20週齢における2g/kg腹腔内グルコース負荷試験(a)および15週齢におけ0.75U/kg腹腔内インスリン負荷試験(b)。

KK/Taマウスの空腹時血糖値は対照マウスと差が無かったが、負荷後60分、90分血糖は有意に高値であった(図2a)。Tg-KK/Taマウスでは120分値がKK/Taマウスより低値を示した。インスリン負荷試験では3群間で有意差はみられなかった(図2b)。

KK/Taマウスの平均寿命はC57BL/6マウスと比較して顕著に短縮していた(57.6 ± 13.9 vs. 106.5 ± 18.3週, p < 0.0001)。しかし、アディポネクチン遺伝子導入を行うと有意の寿命延長が認められた(73.6 ± 16.6週, p < 0.001, 図3)。

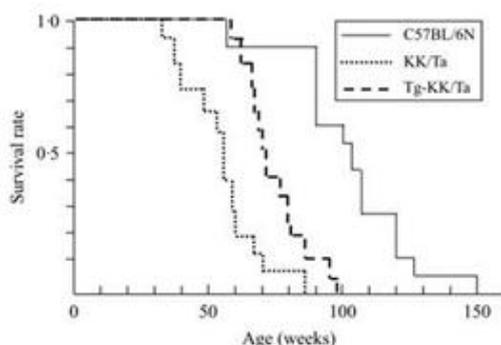


図3. C57BL/6Nマウス, KK/Taマウス, アディポネクチン遺伝子導入KK/Taマウスの寿命の比較。

KK/Taマウスの病理学的死因検索で腫瘍性病変が認められたのは悪性リンパ腫2匹と肝血管腫様腫瘍1匹の計3匹のみであった。感染症および腎不全の所見はみられず、大動脈および大動脈弁のElastica van Gieson染色で動脈硬化性病変は認められなかった。また、各臓器のCongo-red染色でアミロイド沈着は検出されなかった。顕著な高血糖はみられず、高血糖昏睡や脱水による死亡は否定的である。したがって、高アディポネクチン血症が特定の原因による死亡を抑制したかどうかは明らかではなかった。

KK/Taマウスにおいては、*Sirt1*遺伝子mRNAは肝、骨格筋、脂肪組織のいずれにおいてもC57BL/6マウスより増加していた(図4a)。そこで、*Sirt1*が蛋白レベルでも増加しているかどうかをWestern blotting法で検討した。その結果、KK/Taマウスの肝では*Sirt1*蛋白が有意に増加しており、アディポネクチン遺伝子導入により発現量の有意の変化を示さないことが明らかになった(図4b)。*Sirt1*酵素活性は未測定であるが、アディポネクチンが*Sirt1*の活性化を介してKK/Taマウスの寿命を延長した可能性は低い。

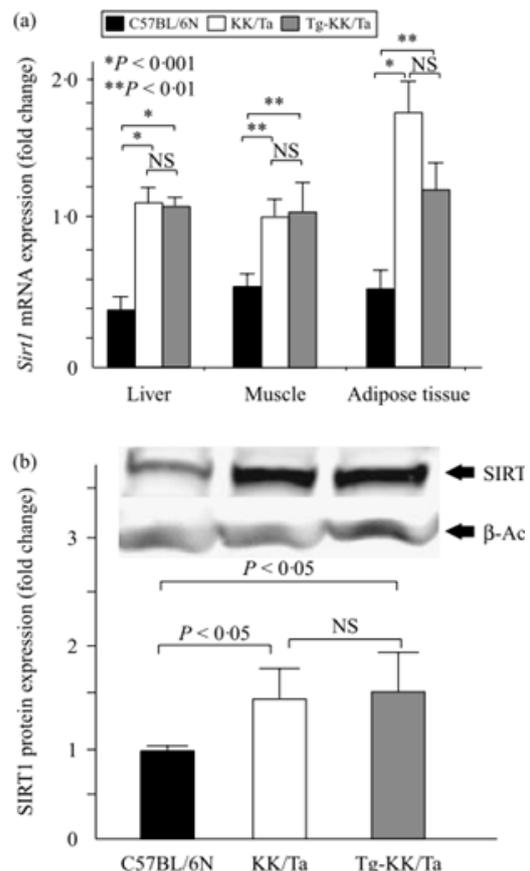


図4. *Sirt1*のmRNA(a)および蛋白量(b)。

一方、KK/Taマウスの肝においては*Crp*遺伝子発現が有意に高く、アディポネクチンにより発現の抑制がみられた(図5)。血中高感度CRP濃度もKK/Taマウスで上昇傾向を示し、アディポネクチン遺伝子導入によりC57BL/6マウスと同レベルに抑制された。

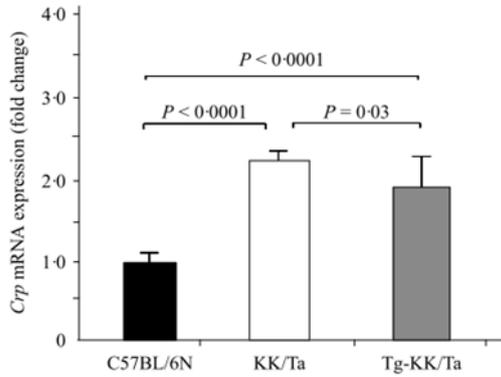


図5. 肝における*Crp*遺伝子発現。

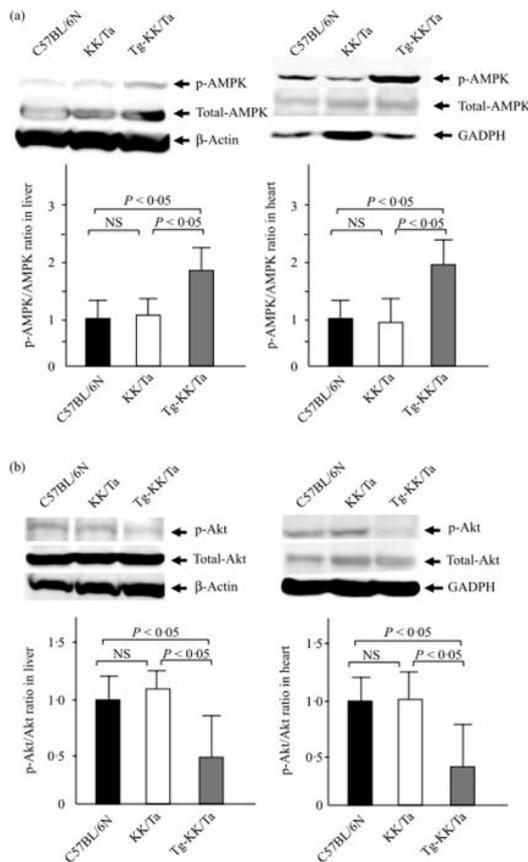


図6. 肝および心におけるAMPK活性(a)とAkt活性(c)。

炎症反応に関与する*Nfkb*および*Tnf*, *Il6*遺伝子の肝における発現はKK/Taマウスで高く、アディポネクチンTg KK/Taマウスで抑制される傾向を示した。尿中8-OHdGも同様の傾向であった。また、リン酸化Akt/総Akt比はKK/Taマウスと対照マウスとでは差が無かったが、Tg-KK/Taマウスでは有意に低値であった(図6)。Aktは細胞増殖およびアポトーシスを制御するとともに、炎症関連遺伝子の転写に関与する。したがって、アディポネクチンの寿命延長効果にはAktシグナルの抑制が関与すると考えられる。

Klothoマウスは常染色体劣性のカルシウム代謝異常を有し、大部分が8~9週齢で死亡する短寿命マウスであり、成因的には異なるものの、ヒトに類似した多発性の老化性表現型を呈する。しかし、アディポネクチン遺伝子導入Klothoマウスの平均寿命は遺伝子導入なしのKlothoマウスと有意差がなく、体重および随時血糖値にも差を認めなかった。また、Klotho蛋白の発現量にも変化はみられなかった。したがって、アディポネクチンはKlothoマウスにおけるCa代謝異常を伴う老化促進表現形には有意の影響を与えないと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① Otabe S, Wada N, Hashinaga T, Yuan X, Shimokawa I, Fukutani T, Tanaka K, Ohki T, Kakino S, Kurita Y, Nakayama H, Tajiri Y, Yamada K. Hyperadiponectinemia protects against premature death in metabolic syndrome model mice by inhibiting Akt signaling and chronic inflammation. *Journal of Endocrinology*. 213: 67-76, 2012  
査読あり, DOI: 10.1530/JOE-11-0329

[学会発表] (計4件)

- ① 山田研太郎. 日本人の体質と健康寿命を延ばす食習慣. 第2回健康生きがい学会. 2011年11月23日, 東京
- ② Otabe S, Hashinaga T, Yuan X, Fukutani T, Ohki T, Kakino S, Wada N, Kurita Y, Nakayama H, Tajiri Y, Yamada K. Effects of adiponectin on the life span of Klotho mice: From the generation of Klotho mice over-expressing adiponectin gene. 71st Scientific Sessions of American Diabetes Association. 2011年6月24-

28日, 米国サンディエゴ

- ③ Otabe S, Hashinaga T, Yuan X, Fukutani T, Ohki T, Kakino S, Wada N, Kurita Y, Nakayama H, Tajiri Y, Shimokawa Y, Yamada K. Adiponectin Possesses Preventive Effect on Premature Death from the Metabolic Syndrome. 70th Scientific Sessions, American Diabetes Association. 2010年6月25-29日, 米国オーランド
- ④ 小田邊修一, 橋永俊彦, 原暁紅, 福谷知香, 大木剛, 柿野聡美, 和田暢彦, 栗田弥生, 中山ひとみ, 田尻祐司, 下川功, 山田研太郎. アディポネクチンはメタボリックシンドロームによる短命化を防ぎうる—高アディポネクチン血症・KK/Taマウスの作製から—. 第53回日本糖尿病学会, 2010年5月29日, 岡山

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山田 研太郎 (YAMADA KENTARO)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：10191305

##### (2) 研究分担者

小田邊 修一 (OTABE SHUICHI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：70194553

中山 ひとみ (NAKAYAMA HITOMI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：20368955