

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590474

研究課題名(和文)低アディポネクチン血症における病態生理

研究課題名(英文)The pathophysiology in hypo adiponectinemia

研究代表者

中野 泰子 (Nakano, Yasuko)

昭和大学・薬学部・教授

研究者番号：20155790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：アディポネクチンは炎症を抑制し糖尿病や動脈硬化などを防止する、脂肪細胞が血液中に放出するタンパク質である。糖尿病などの生活習慣病の人ではその血中濃度が低いことが分かっている。

マクロファージ系細胞を高濃度と低濃度のアディポネクチンで48時間処理したところ、劇的な差は無いが免疫や炎症などに関わる多くの遺伝子の発現量が異なっていた。また、遺伝子操作により血中アディポネクチン濃度を低くしたマウスのマクロファージでは炎症を抑えるタンパク質IL-10が15分の1に減っていることや、脂肪組織が炎症を起こしやすいことが分かった。今後はこの状態の改善に既存の医薬品が使えないか検討していく予定である。

研究成果の概要(英文)： Adiponectin is a protein which is secreted to blood from adipose tissue and has anti-inflammatory, anti-diabetes and anti-atherosclerosis functions. Decreased plasma adiponectin levels are well associated with components of the metabolic syndrome like diabetes.

When macrophage cell line RAW264.7 cells were treated for 48 hours with low or high concentration of adiponectin and gene expressions were compared, there was no dramatic difference, but the expression level of many genes involved in inflammation and immune system were different. Using genetically engineered mice with low blood adiponectin concentration, we found that expression of IL-10 in macrophages, which suppresses the inflammation, decreased to 1/15 and the adipose tissue is prone to inflammation compared to wild type mice. We are planning to search medicines to ameliorate this easy-to-inflame condition under low adiponectin concentration.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：炎症 アディポネクチン マクロファージ 高分子量アディポネクチン 易炎症性 低アディポネクチン血症

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

アディポネクチンは抗炎症作用、抗糖尿病作用、抗動脈硬化作用などを有する脂肪細胞から血中に分泌されるアディポサイトカインである。申請者はこれまでにアディポネクチンの生理活性に重要な分子である高分子量アディポネクチン (HMW, high molecular weight adiponectin,) 特異的 ELISA 系を開発し、生活習慣病ではその濃度が低いこと、心不全や腎不全、SLE や血管性痴呆などではかなり高濃度を示すことなどを報告している。また、アディポネクチンが炎症性の刺激を抑制すること、血中アディポネクチン濃度の低いアディポネクチンアンチセンストランスジェニックマウス (AsTg) は易炎症性であることなども報告してきた。この際、アディポネクチンは濃度依存的に抗炎症活性を示すが、炎症性刺激の前にアディポネクチンで処理しておく時間に依存して抗炎症活性が強くなることも判明している。しかし、これまでに血中アディポネクチンが恒常的に受容体を介して細胞にどのように作用しているかを検討した報告はない。

2. 研究の目的

本研究では、1) 恒常的に種々の濃度のアディポネクチンにさらされた細胞がどのような状態にあるかを解明し、2) 抗炎症状態の誘導に働くアディポネクチンの細胞内シグナルや関与因子の解明、3) 細胞内シグナルや関与因子に作用する医薬品や試薬により同様の状態を再現できるかの検討を行う。これらの検討によりアディポネクチン低値の集団の生活習慣病予防や炎症性疾患患者の治療に有用な情報を提供し、医薬品開発や治療戦略に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

当研究室ではヒト血漿より簡便に HMW を精製する方法を確立、報告している。この方法により HMW を大量に精製する。

各種濃度の HMW で 48 時間マクロファージ系の細胞株である RAW264.7 細胞を処理し、発現している遺伝子の違いを GeneChip アッセイや PCR などにより解析する。

RAW264.7 細胞を対象に、炎症刺激として LPS などを用い、種々の濃度の HMW にさらされた細胞の遺伝子発現レベルを比較する。得られた違いがどのような抗炎症性変化をもたらしているか、遺伝子発現や RNAi による抑制、各種因子の活性化剤、阻害剤などを用いて検討する。また、細胞内シグナル伝達に關与するタンパクのリン酸化状態や、cAMP や Ca 流入などのセカンドメッセンジャー測定などを行う。

血中アディポネクチン濃度の低い AsTg マ

ウスと野生型 (wt) マウスを用いて、低アディポネクチン血症による個体レベルや各種臓器、細胞の変化を解析する。

更に、アディポネクチンは AMPK リン酸化、PPAR- α 活性化、cAMP を増加させこれにより PKA を活性化するが AMPK のリン酸化を誘導するメトホルミン、PPAR- α を活性化するフィブラート、cAMP を増やすためには非選択的な PDE 阻害薬カフェイン、テオフィリン、その他選択的 PDE 阻害薬などにより恒常的なアディポネクチン作用の再現ができないか RAW264.7 細胞や AsTg マウスを用いて検討する。

4. 研究成果

まず、低濃度のアディポネクチンにさらされている細胞がどのような状態にあるために易炎症になっているかを解明することを目的として検討を行った。ヒト血中 HMW は我々の検討では男性で約 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、女性で約 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度であった。また、マウス骨髄マクロファージの RANKL 処理による破骨細胞への分化を HMW は 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度でも抑制できる。易炎症惹起状態を呈する低アディポネクチン血症の病態を RAW264.7 細胞で再現するための条件検討を、HMW 前処理により LPS による IL-1 の誘導が阻害されることを利用して行った。検討の過程で細胞密度が大きく影響することが再現性良く認められ、細胞密度が低い条件では HMW が 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でも抗炎症効果が認められるが密度が高い状態だとこの抗炎症効果が減弱した。一方、平行して行ったトランスジェニックマウスを用いた炎症モデルの検討では、全身でアディポネクチンの発現を抑制した AsTg マウスでは血中濃度が wt の 8 割程度と若干の低下にもかかわらず炎症を起こしやすく、また、酸刺激による Ca 流入が起こりやすい、すなわち炎症性応答を起こしやすい状態にマクロファージがなっており、その原因となる遺伝子変化が基底状態ですでに起こっていることが判明した ()

低アディポネクチン血症すなわち易炎症病態を再現するためには、単純に低濃度の HMW で長期間処理するだけでは十分ではなく、細胞密度がかなり重要なファクターとなることより、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の HMW 前処理により LPS による IL-1 の誘導阻害効果がかろうじて認められる細胞密度条件で検討を進めることにした。すなわち、HMW 処理 48 時間後総 RNA 回収時点で細胞密度が約 60% になるように系を調整して 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HMW 処理を行い、10% FCS 入り培地のみのもを最も低アディポネクチンにさらされたコントロールとして GeneChip 解析を実施し、遺伝子発現の違いについて解析した。ある程度発現している

遺伝子で、コントロールに比べて半分以下や2倍以上と大きな差が認められる遺伝子はそれぞれ20個および8個と非常に少なく、HMW単独での48時間処理は細胞に大きな変化を起こさないことが分かった。一方、種々のタンパクで弱い発現誘導や抑制が認められ、パスウェイ解析でもケモカインレセプターやIL-1などからのシグナル系やMAPカインース、PLD4やAlox5など炎症性物質産生に関与する遺伝子の発現低下や、CHOPなどの転写を阻害する遺伝子、metallothionein 1や2、solute carrier family、IFNにより誘導される種々のタンパクの弱い発現誘導など多くの因子の発現が変化していた。これらの結果はON/OFFではなく多くの因子やパスウェイが量的にコントロールされていることを示しており、それぞれの関係などまだ検討することは多い。

また、遺伝子変化以外にアディポネクチンで報告されているAMPKの活性化やcAMP増加についても細胞密度が約60%のRAW264.7細胞を用いて確認したところHMW処理によりAMPKのリン酸化であれば5分、cAMP増加では20分をピークとした反応が起こることが確認できた。しかし、48時間処理といった慢性刺激下でのこれらの状態の検討では、AMPKでは培地交換なしでこの時間培養するだけでAMPKのリン酸化が増加し、また新鮮培地に交換することで減少した。cAMPの測定でも同様に基質を取り込ませる前処理で状態が変化してしまい、48時間慢性的に高濃度のHMWにさらされた状態を現す結果として採用できるデータは得られなかった。

上記の検討以外に*in vivo*での状態を確認するために、血中アディポネクチン濃度が低いAsTgマウスとwtマウスのマクロファージでも検討を行った()。両群のマウスより常在性腹腔マクロファージ(無刺激、定常状態)を回収して解析したところ、AsTgマウスのマクロファージではIL-6、TNF- α の発現にはwtマウスと差が認められなかったが、抑制性サイトカインであるIL-10が1/15と低値を示していた。また、このマクロファージを10% FCS入りの培地で一晚培養したところこの表現型は消失し、IL-10の発現がwtマウスと同程度に増加して同様の表現型に回復した。これらの結果は低HMW濃度だけで易炎症性になっているのではなく、アディポネクチン低値の環境下で炎症応答に傾いた表現型を獲得していることを示している。更に、炎症モデルとして0.7%酢酸を腹腔内に100 μ L/10g投与し、その約2時間後に脂肪組織、肝臓、腸を回収してIL-6、TNF- α 、IL-10の発現を解析したところ、wtマウスと比べ肝臓や腸では有意な変化や差は認められなかったが、脂肪組織ではAsTgでのみ炎症誘導後にIL-6、TNF- α の有意な誘導が認められ、常

在性腹腔マクロファージのみならずAsTgの脂肪組織でも炎症応答が容易に起こる易炎症性状態となっていることが示された。

これらのことは血中アディポネクチン濃度が低い状態が組織常在性のマクロファージや脂肪組織に炎症を起こしやすい変化をもたらしていることを示している。今後はマクロファージの易炎症性変化を抑制あるいは回復させるHMWの作用機構の解明を行い、また、AsTgマウスの脂肪組織を中心に各組織のGeneChip解析を行いAsTgの易炎症状態をもたらしている遺伝子発現変化について解析し、この状態の改善に既存の医薬品が使えないか検討していく予定である。

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7件)

Negoro T, Kin M, Takuma A, Saito K, Shimizu S, Nakano Y, Potentiated macrophage activation by acid sensing under low adiponectin levels、Mol Immunol、査読有、vol.57、2014、141-150、DOI: 10.1016/j.molimm.2013.08.015

Shimura K, Negoro T, Shimizu S, Roncador G, Hirano T, Nakano Y, Metformin modulates GLP-1- and GIP-mediated intracellular signaling under normoglycemic conditions、Open J Endocri Metab Dis、査読有、vol.3、2013、263-270、DOI: 10.4236/ojemd.2013

Nobe K, Fujii A, Saito K, Negoro T, Ogawa Y, Nakano Y, Hashimoto T, Honda K, Adiponectin enhances calcium-dependency of mouse bladder contraction mediated by protein kinase C expression、J Pharmacol Exp Ther、査読有、vol.345、2013、62-68 DOI: 10.1124/jpet.112.202028

Hiroi T, Wajima T, Negoro T, Ishii M, Yasuko Nakano, Kiuchi K, Mori Y, and Shimizu S, Neutrophil TRPM2 channels are implicated in the exacerbation of myocardial ischaemia/reperfusion injury、Cardiovasc Res、査読有、vol.97、2013、271-281 DOI: 10.1093/cvr/cvs332

Ban Y, Tozaki T, Taniyama M, Skrabanek

L, Nakano Y, Ban Y, Hirano T, Multiple SNPs in Intron 41 of Thyroglobulin Gene Are Associated with Autoimmune Thyroid Disease in the Japanese Population, PLoS ONE, 査読有, vol.7, 2012, e37501 DOI: 10.1371/journal.pone.0037501

Yamamoto Y, Negoro T, Hoshi A, Wakagi A, Shimizu S, Banham A H, Ishii M, Akiyama H, Kiuchi K, Sunaga S, Tobe T, Roncador G, Itabashi K, and Nakano Y, Impaired Ca²⁺ regulation of CD4+CD25+ regulatory T cells from pediatric asthma, Int Arch Allergy Immunol, 査読有, vol.156, 2011, 148-158 DOI: 10.1159/000322845

Ishihara T, Haraguchi G, Konishi M, Ohigashi H, Saito K, Nakano Y, and Isoke M, The effect of adiponectin on the cardiac allograft vasculopathy, Circ J, 査読有, vol.75, 2011, 2005 - 2012 DOI: 10.1253/circj.CJ-10-0879

[学会発表](計 12 件)

谷岡利裕, 舩長義直, 山田倫世, 根来孝治, 中野泰子, アディポネクチンによる抗炎症作用の解析, 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013 年 12 月 3~6 日

Shinmura K, Negoro T, Nakano Y, Hirano T, Modulation of incretin actions in pancreatic β -cells by metformin, 49th Annual meeting of the European association for the study of diabetes, スペイン, 2013 年 9 月 23~27 日

新村京子, 根来孝治, 中野泰子, 平野勉, メトホルミンによる膵細胞のインクレチン刺激細胞内シグナル制御機構の検討, 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会, 熊本, 2013 年 5 月 16~18 日

谷岡利裕, 石直南, 杉原希美, 平川琴美, 石原伸恵, 根来孝治, 中野泰子, アディポネクチンにより誘導される IRF-7 が破骨細胞分化を制御する, 第 85 回日本生化学会大会, 福岡, 2012 年 12 月 14~16 日

秋山晴代, 嶋田紘也, 齊藤清美, 根来孝治, 中野泰子, 関節リウマチにおけるア

ディポネクチンの生理的機能解明, 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2012 年 12 月 11~14 日

The 64th Fujihara Seminar International Symposium on Adiponectin Biology and Medicine, 苫小牧, 2012 年 8 月 4~7 日 Nakano Y (Invited speaker), Molecular Structure and Function of High-Molecular-Weight Adiponectin Negoro T, Akiyama H, Tanioka T, Saito K, Shimizu S, and Nakano Y, Potentiated macrophage activation by acid sensing under low adiponectin levels Saito K, Negoro T, Sato H, Nakano Y, Effect of Lower adiponectin concentration exert a harmful influence

Abe Y, Fuke T, Hibino S, Mikawa T, Saito T, Watanabe S, Hisano M, Murayama J, Nakano Y and Itabashi K, Individual optimization of mizoribine dose to child-onset glomerular disease, The 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology, 福岡, 2011 年 6 月 2~4 日

Negoro T, Shimizu S, Narushima M, Endo A, Tanioka T, Nakano Y, Effect of RACK1 on impaired functions of CD4+CD25+ regulatory T cells from asthma subjects, 第 40 回 日本免疫学会学術集会, 幕張, 2011 年 11 月 27~29 日

石直 南, 谷岡 利裕, 平川 琴美, 根来孝治, 中野泰子, アディポネクチンによる破骨細胞分化抑制機構の解明, 第 55 回日本薬学会関東支部大会, 千葉, 平成 23 年 10 月 8 日

Tanioka T, Tamura Y, Mao J, Kitamura T, Negoro T, Nakano Y, Kaneki M, iNOS Promotes Proteasome-Dependent Degradation of IRS-2 by Activating GSK-3 in Pancreatic β -cells, 第 84 回日本生化学会, 京都, 平成 23 年 9 月 21~24 日

[図書](計 2 件)

(分担執筆) 中野泰子 他 22 名, 「バイオ医薬品 開発の基礎から次世代医薬品まで」26 章 テーラーメイドゲノム創薬:

245-262、西島正弘・川崎ナナ編、2013年8月15日第1版第1刷発行、(株)化学同人

Negoro T, Yamamoto Y, Shimizu S, Banham AH, Roncador G, Wakabayashi H, Osabe T, Yanai T, Akiyama H, Itabashi K, Nakano Y、Bronchial asthma-Emerging therapeutic strategies, chapter 4 Immune mechanisms of childhood asthma、Editor; Elizabeth Sapey、ISBN; 978-953-51-0140-6260 pages, February, 2012、Publisher; InTech

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.showa-u.ac.jp/sch/pharm/major/medinfo/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中野 泰子 (NAKANO, Yasuko)
昭和大学・薬学部、薬学研究科・教授
研究者番号：20155790

(2)研究分担者

根来 孝治 (NEGORO, Takaharu)
昭和大学・薬学部、薬学研究科・講師
研究者番号：70218270

(3)連携研究者

谷岡 利裕 (TANIOKA, Toshihiro)
昭和大学・薬学部、薬学研究科・助教
研究者番号：80360585