

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461386

研究課題名(和文) アディポネクチンの結合蛋白を介する生理作用の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Investigation in the physiological effect of adiponectin through its binding protein

研究代表者

前田 法一 (Maeda, Norikazu)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：アディポネクチンは脂肪細胞から特異的に分泌され血液中に存在する蛋白である。アディポネクチンがある特定の組織・細胞に集積し、臓器保護作用を発揮することを明らかにした。アディポネクチンはT-カドヘリンに結合し、T-カドヘリンが高発現している大動脈・心臓・骨格筋に集積していた。特に、大動脈において詳細な検討を行った。定常状態でアディポネクチンはすでに血管内皮細胞に集積していた。動脈硬化部位では、アディポネクチンは内皮細胞のみならず、内膜に遊走してきた合成型平滑筋細胞や内皮に接着した単球表面にもその集積を認めた。アディポネクチン/T-カドヘリンは生体内の恒常性維持に必要なシステムと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Adiponectin, an adipose-specific secretory protein, abundantly exists in bloodstream. Here, we showed that adiponectin accumulates onto specific tissues or cells and thus exhibits organ protective effects. Adiponectin binds to T-cadherin and accumulates onto aorta, heart, and skeletal muscle in which T-cadherin is highly expressed. Present study focused on the accumulation of adiponectin in aorta, because adiponectin has been shown to possess anti-atherosclerotic property. Adiponectin resides on aortic endothelial cells under steady condition. Interestingly, in atherosclerotic plaque lesion, adiponectin exists not only in endothelial cells but also on the surface of smooth muscle cells with synthetic phenotype and monocytes attaching to endothelial cells. Data shown here indicates that adiponectin/T-cadherin system plays a crucial role in maintaining homeostasis in vivo.

研究分野：内分泌代謝内科学

キーワード：内分泌学 メタボリックシンドローム

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、脂肪蓄積とくに内臓脂肪過剰蓄積を上流に、インスリン抵抗性・アディポサイトカイン分泌異常を介して動脈硬化症をはじめ様々な全身性の合併症を生じる。しかしながら、メタボリックシンドロームの発症・進展における分子的病態基盤は完全には明らかにされていない。報告者はアディポネクチン欠損マウスを樹立し、細胞実験も併せた機能解析により、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, Hypertension 2006 など)。さらに、アディポネクチンが臓器保護作用・抗線維化作用を有し、傷害を受けた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(Gastroenterology 2002, ATVB 2007b, ATVB 2008, AJRCCM 2011 など)。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、梗塞面積の拡大・心機能の顕著な低下を呈した(Circulation 2011)。すなわち、アディポネクチンの持続的局所投与が組織リモデリングを抑制する可能性がある。しかし、アディポネクチンの組織集積機構およびリモデリング抑制作用に関する分子メカニズムはほとんど分かっていない。

アディポネクチン受容体として AdipoR1/2 が報告されている(Yamauchi T et al Nature 2003)が、アディポネクチンの生理作用発揮には AdipoR1/2 を介さないという報告(Takemura Y et al JCI 2007)やアディポネクチンの結合蛋白として T-cadherin が報告されている(Hug C et al PNAS 2004, Denzel MS et al JCI 2010)。また、当教室ではアディポネクチンが補体 C1q と血中で複合体を形成していることを見出した(Metabolism 2012)。C1q-Wnt/beta-catenin シグナルは線維化を促進する一方でアディポネクチンは抗線維化作用を有していること、アディポネクチンと C1q は複合体を形成していることより、アディポネクチンの臓器保護作用に C1q が関与している可能性があるが、明らかにされていない。

2. 研究の目的

以上より、本研究ではアディポネクチンの結合蛋白を介する臓器保護作用を分子レベルで明らかにすることを主要な目的とし、本研究を通じてメタボリックシンドロームと心血管病・老化の分子基盤の解明および治療応用に繋げたい。

3. 研究の方法

アディポネクチン(Adipo)の組織保護作用を Adipo 結合蛋白の観点から分子的に明らかにすることを目的とする。Adipo 結合蛋白としての C1q および T-cadherin(Tcad)の欠損マウスを用いながら、Adipo 欠損および過剰発現系を駆使して、Adipo-C1q および Adipo-Tcad 経路が Adipo の生理作用に与える影響を明らかにしていく。また、形態学的手法を積極的に取り入れて、組織に存在する Adipo 蛋白の局在を明らかにしていく。

ウスを用いながら、Adipo 欠損および過剰発現系を駆使して、Adipo-C1q および Adipo-Tcad 経路が Adipo の生理作用に与える影響を明らかにしていく。また、形態学的手法を積極的に取り入れて、組織に存在する Adipo 蛋白の局在を明らかにしていく。

4. 研究成果

(4-1) アディポネクチンと T-cadherin

T-cadherin(Tcad)蛋白は大動脈・心臓・筋肉に高発現しており、アディポネクチン(Adipo)も同様の組織分布を示していた。Tcad 欠損(Tcad-KO)マウスの大動脈・心臓・筋肉においては、Adipo 蛋白は著減していた。

Tcad は GPI-アンカー蛋白の1つであり、GPI-アンカー蛋白切断酵素である PI-PLC や GPI-PLD によって切断されることが知られている。実際、PI-PLC を野生型(WT)マウスに投与すると、血中 Adipo は上昇し数時間でピークに達し、48 時間後にはベースラインに復した。また、PI-PLC 用量依存性に血中 Adipo は上昇したが、Tcad-KO マウスではこのような現象は観察されなかった。Invitro 血管内皮細胞において、Adipo の細胞集積が形態学的にも認められ、Tcad ノックダウンや PI-PLC 投与により、このような Adipo の集積は著減した。

興味深いことに、Adipo 欠損(Adipo-KO)マウスでは、血中 GPI-PLD レベルが有意に上昇しており、外因的な Adipo 補充により血中 GPI-PLD レベルは低下した。

血管内皮細胞において、Adipo は TNF-alpha 誘導性の ICAM-1 mRNA 上昇を有意に抑制したが、Tcad をノックダウンすると、細胞への Adipo の集積が著明に減少するとともに、Adipo による ICAM-1 mRNA 低下作用は消失した。すなわち、Adipo は Tcad を介して組織・細胞に集積し、保護作用を発揮することが示された。また、Adipo は GPI-PLD を抑制することで Tcad を安定化し、効率良く組織・細胞に集積する性質があることが示唆された。

以前の研究において、アディポネクチンは単球やマクロファージに結合する可能性が示されている。しかしながら、このような免疫細胞へのアディポネクチンの集積が生体内においてどのように行われているかは不明である。そこで、生体内におけるアディポネクチンと免疫細胞との動的相互作用を明らかにするため、その第一歩として脂肪組織マクロファージの生体イメージングを試み、その手法を確立した。本解析により、超短期間での過栄養負荷により脂肪組織マクロファージが動的に活性化されること、その initial trigger として新たな脂肪細胞分泌因子 S100A8 を同定した。興味深いことに、血中の S100A8 とアディポネクチンとは逆相関を示していた。

(4-2) アディポネクチンと C1q

まず、WT マウスと C1q 欠損(C1q-KO)マウス

スの血清を解析した。両マウス間で血中 Adipo 濃度及び多量体形成パターンに明らかな差は見られなかった。次に、WT マウス及び Adipo-KO マウスにアンジオテンシン II を持続投与し、心筋線維化モデルを作製した。WT マウスに比して、Adipo-KO マウスは線維化の程度が強く、心筋 C1q mRNA が有意に上昇しており、また beta-catenin 蛋白量も有意に高値を呈した。これらの変化は外因的な Adipo の補充により改善した。以上より、Adipo は心筋組織において直接的あるいは間接的に C1q-Wnt/beta-catenin シグナルを負に制御することで、アンジオテンシン II による線維化を抑制する可能性が示唆された。

(4-3) 組織アディポネクチン蛋白の局在
共焦点レーザー顕微鏡及び免疫電子顕微鏡法を用いて、WT マウス及び動脈硬化モデルであるアポ E 欠損 (ApoE-KO) マウスの大動脈における Adipo 蛋白の局在を検討した。

WT マウスでは、血管内皮細胞に一致して Adipo が存在し、Tcad と共局在していた。Adipo は、血管内皮細胞表面のみならず細胞内の early endosome にも認められ、細胞内に取り込まれている可能性が考えられた。ApoE-KO マウスの動脈硬化部位での検討では、Adipo は血管内皮細胞のみならず、内膜に遊走してきた合成型血管平滑筋細胞表面にも認められた。さらに血管内皮に接着した単球表面にも Adipo のシグナルが多数検出された。

血中 Adipo 濃度に影響を及ぼさない程度の LPS 投与により、WT マウスに比して Adipo-KO マウスでは血管内皮の ICAM-1 などの細胞接着因子の発現上昇が観察された。

以上より、定常状態において、Adipo は血管内皮細胞を覆っており血管の恒常性を保持している可能性が考えられた。また、動脈硬化病変部位においては、内皮のみならず合成型血管平滑筋細胞や単球にも Adipo が集積することで、抗動脈硬化作用を発揮する可能性が示唆された。

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)

Sekimoto R, Fukuda S, Maeda N, Tsushima Y, Matsuda K, Mori T, Nakatsuji H, Nishizawa H, Kishida K, Kikuta J, Maijima Y, Funahashi T, Ishii M, Shimomura I. Visualized macrophage dynamics and significance of S100A8 in obese fat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (査読有) 2015 Apr 21;112(16):E2058-66.
doi: 10.1073/pnas.1409480112.

Matsuda K, Fujishima Y, Maeda N, Mori T, Hirata A, Sekimoto R, Tsushima Y, Masuda S, Yamaoka M, Inoue K,

Nishizawa H, Kita S, Ranscht B, Funahashi T, Shimomura I. Positive feedback regulation between adiponectin and T-cadherin impacts adiponectin levels in tissue and plasma of male mice. *Endocrinology*. (査読有) 2015 Mar;156(3):934-46.
doi: 10.1210/en.2014-1618.

Kamata S, Miyagawa S, Fukushima S, Imanishi Y, Saito A, Maeda N, Shimomura I, Sawa Y. Targeted delivery of adipocytokines into the heart by induced adipocyte cell-sheet transplantation yields immune tolerance and functional recovery in autoimmune-associated myocarditis in rats. *Circ J*. (査読有) 2015;79(1):169-79.
doi: 10.1253/circj.CJ-14-0840.

Mori T, Koyama Y, Maeda N, Nakamura Y, Fujishima Y, Matsuda K, Funahashi T, Shimada S, Shimomura I. Ultrastructural localization of adiponectin protein in vasculature of normal and atherosclerotic mice. *Sci Rep*. (査読有) 2014 May 8;4:4895.
doi: 10.1038/srep04895.

Fujishima Y, Maeda N, Matsuda K, Komura N, Hirata A, Mori T, Sekimoto R, Tsushima Y, Nishizawa H, Funahashi T, Shimomura I. Effect of adiponectin on cardiac -catenin signaling pathway under angiotensin II infusion. *Biochem Biophys Res Commun*. (査読有) 2014 Feb 7;444(2):224-9.
doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.043.

Komura N, Maeda N, Mori T, Kihara S, Nakatsuji H, Hirata A, Tochino Y, Funahashi T, Shimomura I. Adiponectin protein exists in aortic endothelial cells. *PLoS One*. (査読有) 2013 Aug 13;8(8):e71271.
doi: 10.1371/journal.pone.0071271.

Yamaoka M, Maeda N, Nakamura S, Mori T, Inoue K, Matsuda K, Sekimoto R, Kashine S, Nakagawa Y, Tsushima Y, Fujishima Y, Komura N, Hirata A, Nishizawa H, Matsuzawa Y, Matsubara K, Funahashi T, Shimomura I. Gene expression levels of S100 protein family in blood cells are associated with insulin resistance and inflammation (Peripheral blood S100 mRNAs and metabolic syndrome). *Biochem Biophys Res Commun*. (査読有)

2013 Apr 19;433(4):450-5.
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.02.096.

〔学会発表〕(計7件)

前田法一

“Adiponectin, fat-derived abundant secretory factor, accumulates in vasculature and exhibits vascular protective action, via T-cadherin” Keystone Symposia, Obesity and Adipose Tissue Biology 2016年2月17日 バンフ(カナダ)

前田法一

“T-cadherin-mediated accumulation of adiponectin protein in cardiovascular system and its physiological and pathological significance” Keystone Symposia, Diabetes: New Insights into Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies 2015年10月27日 ウェスティン都ホテル(京都市)

前田法一

「脂肪組織慢性炎症の initial trigger としての S100A8 の意義」第36回日本肥満学会 2015年10月3日 名古屋国際会議場(名古屋市)

前田法一

シンポジウム12「肥満の病態と治療戦略の最前線 - 現代人はなぜ太る? -」メタボリックシンドロームにおけるアディポネクチンと S100A8 の意義 第58回日本糖尿病学会年次学術集会 2015年5月22日 シーモールパレス(山口県下関市)

前田法一

「アディポネクチン蛋白の動脈における局在変化の解析」第88回日本内分泌学会学術総会 2015年4月23日 ホテルニューオータニ(東京都千代田区)

前田法一

“Cardiovascular accumulation of Adiponectin protein and its positive feedback regulation through T-cadherin” 2015 Seoul Symposium on Obesity & Diabetes 2015年3月28日 ソウル(韓国)

前田法一

「肥満の成因と治療; New insight into pathophysiology-based clinical application of metabolic syndrome」第56回日本糖尿病学会年次学術集会 2013年5月16日 熊日生涯学習プラザ(熊本市)

〔図書〕(計2件)

前田法一、下村伊一郎 医歯薬出版 医学のあゆみ250巻9号 723-729頁 2014

前田法一、下村伊一郎 日本臨床社 日本臨床 2014年72巻増刊号4「最新肥満症学」 236-240頁

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田法一(Maeda Norikazu)

大阪大学大学院 医学(系)研究科 寄附講座准教授

研究者番号: 30506308

(2) 研究分担者

船橋 徹(Funahashi Tohru)

大阪大学大学院 医学(系)研究科 寄附講座教授

研究者番号: 60243234

(3) 連携研究者

なし