

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19780070

研究課題名（和文） 新規エネルギー代謝制御系・APJ 受容体シグナルの生理機能解析

研究課題名（英文） Regulatory roles for APJ on energy metabolism

研究代表者

石田 純治（ISHIDA JUNJI）

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・研究員

研究者番号：30323257

研究成果の概要：APJ 欠損マウスでは体温の上昇が観察され、高脂肪食負荷による脂肪組織重量の増加やインスリン感受性の低下、また耐糖能異常が、野生型マウスと比較して軽減することが判明し、APJ 欠損マウスではエネルギー消費が亢進していることが示唆された。また、脂肪細胞特異的 APJ 受容体過剰発現マウスにおいては、野生型マウスと比較して脂肪組織量の減少や、アディポサイトカインである Leptin の血中濃度の低下、また耐糖能の亢進などが観察され、脂肪組織の APJ シグナルが全身の代謝機能に大きく寄与することが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：情報伝達、エネルギー代謝制御、APJ、Apelin、遺伝子操作マウス

## 1. 研究開始当初の背景

生体が機能的な活動を営むためには体内環境の安定化、すなわち、恒常性の維持が必要不可欠であり、これは糖代謝・脂質代謝・血圧制御など様々な代謝調節系との複雑な相互作用により成り立っている。それらの破綻は糖尿病・高脂血症・高血圧といった生活習慣病の発症へとつながり、動脈硬化症や肥満などの合併症は相互破綻の行き着く先として捉えることができる。

近年、心血管系疾患、また、代謝性疾患において三量体G蛋白質と共役している7回膜貫通型受容体からのシグナルが、そ

の病態の進行や抑制に重要であることが判明しつつある。申請者は最近、7回膜貫通型である新規受容体 APJ (putative receptor protein related to the angiotensin receptor AT1) をクローニングした。APJ 受容体は同定された当初はリガンドが未同定のオーファン受容体であったが、その後、内在性のリガンとして apelin が他のグループから報告されている。申請者がマウス APJ 受容体の発現解析を行った結果、血圧制御に関連する心臓や腎臓、糖・脂質代謝に重要である脂肪組織や消化管、骨格筋に強く発現することが明らかとなり、APJ 受容体は血

圧制御や糖代謝、脂質代謝における新しい制御系である可能性が考えられた。しかしながら、APJ 受容体に対する特異的阻害剤や動物個体モデルが存在しないことから、APJ 受容体の生理機能解析は困難であった。

そこで申請者は APJ 受容体欠損 (APJ-KO) マウスを世界に先駆けて開発し、まず血圧制御に対する APJ 受容体の生理機能を検証し、1) APJ 受容体は生体内において血圧降下作用を有する新しい血圧制御系であること、2) そのメカニズムは APJ 受容体シグナルによる eNOS の活性化を介すること、3) APJ 受容体は血圧上昇作用に対して拮抗する役割をもつことを明らかにした (*J. Biol. Chem.* 2004)。

最近、APJ 受容体が膵臓ランゲルハンス島に発現しエネルギー代謝の中核的なインスリンの分泌を抑制することが Wei らにより報告されるなど (*Regul. Pept.*, 2005)、APJ 受容体は循環器系以外の制御系にも深く関与する可能性が考えられている。APJ 受容体の発現解析の結果も考慮し申請者は糖代謝、脂質代謝における APJ 受容体を介する新規制御系の存在を考えた。APJ-KO マウスを用いた先行解析により、APJ-KO マウスでは野生型 (WT) マウスと比較し、高脂肪食負荷に伴う体重増加が軽減されていること、体内の脂肪組織重量が減少していることが判明し、APJ 受容体シグナルが生体内におけるエネルギー代謝に大きく関わっていることが示唆された。

また近年、エネルギー代謝において脂肪組織は余剰エネルギーの貯蔵に加え、種々のアディポカインを分泌する活発な内分泌器官として全身の代謝に大きく関与することが判明している。この脂肪組織において APJ 受容体は高発現しており、最近 Boucher らにより肥満に伴い血中 apelin 濃度が上昇すること、また、インスリンが脂肪組織からの apelin 分泌を促進することが報告され (*Endocrinol.*, 2005)、申請者は、apelin 自身が新規アディポカインである可能性に加え、脂肪組織からの APJ 受容体を介する全身性の代謝ネットワーク制御機構が存在すると考えた。脂肪組織の機能破綻は、代謝障害を伴う生活習慣病へと発展することからも、脂肪組織における代謝ネットワークの解明とその責任因子の同定は急務である。

## 2. 研究の目的

新規エネルギー代謝制御系としての APJ 受容体シグナルの生理機能解明のため、以下の2つに焦点を絞り研究を行うこととする。

(1) APJ 受容体シグナルの標的因子の同定も含め、APJ 受容体欠損マウスで認められた抗肥満作用の分子メカニズムの解明。

(2) 脂肪組織特異的 APJ 受容体過剰発現マウスを新たに開発することによる、脂肪組織からの APJ 受容体を介する全身性の代謝ネットワーク制御機構の解明

本研究は、APJ 受容体系を生体内における新規エネルギー代謝制御系としてとらえたこと、また、その責任組織として脂肪組織に着目した点が特徴である。また、本研究を遂行するのにあたり、APJ 受容体を基盤とした aP2-APJ マウス、APJ-KO マウス、および WT マウスを活用することにより、正常状態、また、肥満惹起状態における APJ 受容体シグナルの「増強」、「正常」、「消失」という状況を作り出し、その影響を個体レベルにて直接検証する。これにより、APJ 受容体の担うエネルギー代謝制御システムを体系的、また、網羅的に評価することが可能となる。現在、生活習慣病の発症メカニズムが徐々に判明しつつある一方、そのイベントの複雑さ故に有効な薬剤は少なく分子基盤に根差したより副作用の少ない治療薬の開発が望まれている中、APJ-KO マウスは発生分化に異常が認められないことから、APJ 受容体阻害による治療への応用が期待される。

## 3. 研究の方法

エネルギー代謝制御における APJ 受容体の機能解析を行う際の問題点は、APJ 受容体に対する特異的阻害剤が存在しないことである。そのため単一な機能分子としての APJ 受容体を基盤とした APJ 受容体欠損マウス (KO) とともに、脂肪細胞特異的遺伝子導入マウス (Tg) を新たに作製し、これら遺伝子操作マウスを最大限活用することが特に有効であると考えた。

(1) APJ 受容体欠損マウスにおける抗肥満作用の分子メカニズムの解明

① マウス系統に対して通常食および高脂肪食負荷 (成長変化の著しい生後 40 日目から 8 週間: 肥満惹起状態) を行いその影響を検討する。

② APJ-KO マウスにおける生理的な表現型の検討 (各主要臓器の組織病理学的解析に加え、摂食量・体脂肪率など)

③ APJ-KO マウスにおける表現型の分子メカニズムの解明 (代謝変化を反映した組織および血中パラメーターの定量による責任分子の絞り込み)

④ APJ 受容体シグナルの病態の発症・進展に関わる分子基盤の解明 (APJ-KO マウスにおける表現型の責任分子と APJ 受容体シグナルとの因果関係を検証)

(2) 脂肪組織からの APJ 受容体を介する全身性代謝ネットワーク制御機構の解明

① 脂肪組織特異的 APJ 受容体過剰発現マウスの作製 (aP2-APJ マウス)

② 体重変化や主要臓器重量、組織構造や細胞形態の変化などを形態学的、組織・病理学的に観察。体脂肪量は X 線透過装置を用いて立体的に定量する。

③ 耐糖能やインスリン感受性テストなど、全身性の代謝状況の把握

④ 糖代謝、脂質代謝に関与する血液中の生化学的パラメーターの測定

⑤ 脂肪組織における APJ 受容体シグナルネットワークの解明のため、網羅的遺伝子発現解析として、aP2-APJ マウスの白色脂肪組織を用いたアレイ解析

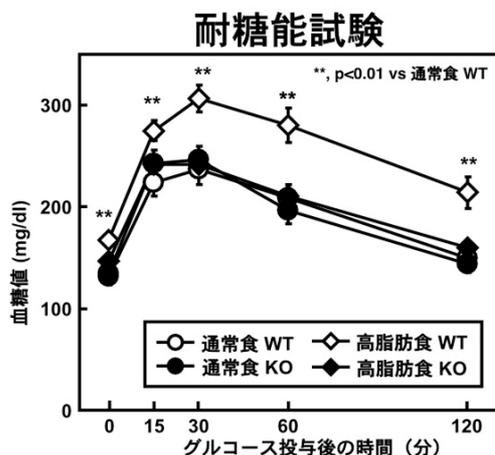
#### 4. 研究成果

(1) APJ 受容体欠損マウスにおける抗肥満作用の分子メカニズムの解明

① 食事負荷による体重の変化を観察した結果、通常食、高脂肪食ともに APJ-KO マウスは WT マウスと比較して平均体重が軽いものの有意な差は認められないことが判明した。また、カロリー摂取の指標である摂食量に関しては、通常食、高脂肪食ともに WT マウスと APJ-KO マウスとの間で差は認められなかった。

② 基礎代謝の指標となる体温については、通常食、高脂肪食ともに WT マウスと比較して APJ-KO マウスで高いことが示された。

③ 高脂肪食の負荷によって WT マウスでは顕著な耐糖能異常やインスリン抵抗性が生じるのに対し、APJ-KO マウスではそれらの所見が認められないことが明らかとなった(下図)。



④ 高脂肪食負荷時において、WT マウスと比較して、APJ-KO マウスでは脂肪組織の重量および白色脂肪細胞のサイズが小さく、血中アディポネクチン濃度が高値であった。

⑤ 高脂肪食負荷により、WT マウスでは顕著な炎症性サイトカインの発現上昇が認められたのに対して、APJ-KO マウスではこの変化が大きく軽減されていた。

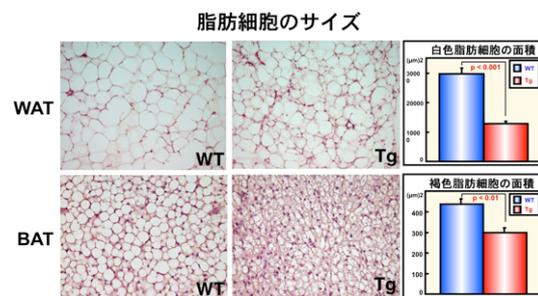
これらの結果から、APJ-KO マウスでは高脂肪食時にインスリン感受性抑制作用が軽減されることで末梢における糖取り込み、及び消費亢進が引き起こされていることが示唆され、APJ 受容体がエネルギー代謝調節を担う新たな制御システムの 1 つであることが示された。

(2) 脂肪組織からの APJ 受容体を介する全身性代謝ネットワーク制御機構の解明

① 脂肪組織特異的に機能する aP2 遺伝子プロモータの下流に APJ 受容体遺伝子の翻訳領域を接続した融合遺伝子を構築し、マウス受精卵へ顕微注入することによりトランスジェニックマウスを作製した (aP2-APJ マウス)

② aP2-APJ マウスは、WT マウスと比較して、体重変化、摂食量、飲水量に差は認められないことが判明した。

③ aP2-APJ マウスでは、脂肪重量および脂肪細胞のサイズが WT マウスと比較して減少していた (下図)。また、血中レプチン濃度の減少が確認された。



④ aP2-APJ マウスは WT マウスと比較して、グルコース投与時の全身性の耐糖能の亢進が認められた。

⑤ 白色脂肪細胞を用いたマイクロアレイ解析から、aP2-APJ マウスでは、脂肪の蓄積に関わるトリグリセリド合成系酵素遺伝子群の発現が低下するとともに、トリグリセリド分解系酵素遺伝子群の発現が上昇している可能性が示された。

これら結果から、脂肪組織における APJ 受容体は、脂肪の蓄積と分解を制御することにより全身へのエネルギー源の収支を調整する新たなエネルギー代謝システムである可能性が示された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Furuya, M., Ishida, J., Aoki, I., and Fukamizu, A. "Pathophysiology of placentation abnormalities in pregnancy-induced hypertension" *Vasc. Health. Risk Manag.* 4, 1301-1313 (2009) Review (査読有)
2. Sakairi, A., Ishida, J. (他 6 名、2 番目)

- “Angiotensin type 1 receptor blockade prevents cardiac remodeling in mice with pregnancy-associated hypertension.” *Hypertension Res.* 31, 2165-2175 (2008) (査読有)
3. Hirota, K., Sakamaki, J-i, Ishida, J. (他 7 名、3 番目) “A combination of HNF-4 and Foxo1 is required for reciprocal transcriptional regulation of glucokinase and glucose-6-phosphatase genes in response to fasting and feeding.” *J. Biol. Chem.* 283, 32432-32441 (2008) (査読有)
  4. Hamada, J., Kimura, J., Ishida, J., Kohda, T., Morishita, S., Ichihara, S., and Fukamizu, A. “Evaluation of novel cyclic analogues of apelin.” *Int. J. Mol. Med.* 22, 547-552 (2008) (査読有)
  5. Furuya, M., Ishida, J., Inaba, S., Kasuya, Y., Kimura, S., Nemori, R., and Fukamizu, A. “Impaired placental neovascularization in mice with pregnancy-associated hypertension.” *Lab. Invest.* 88, 416-429 (2008) (査読有)
  6. Kato, H., Ishida, J. (他 9 名、2 番目) “Deterioration of atherosclerosis in mice lacking angiotensin II type 1A receptor in bone marrow-derived cells.” *Lab. Invest.* 88, 731-739 (2008) (査読有)
  7. Hashimoto, T., Kihara, M., Imai, N., Yoshida, SI, Shimoyamada, H., Yasuzaki, H., Ishida, J. (他 7 名、7 番目) “Requirement of apelin-apelin receptor system for oxidative stress-linked atherosclerosis.” *Am. J. Pathol.* 171, 1705-1712 (2007) (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

1. 石田純治、古屋充子、稲葉早希、粕谷善俊、木村定雄、根守良一、深水昭吉「妊娠高血圧症モデルマウスにおける胎盤血管の障害」第 12 回 日本心血管内分泌代謝学会、2008 年 11 月 28 日、熊本県、熊本
2. 石田純治、橋本泰美、村尾命、木村健二郎、粕谷善俊、杉山文博、八神健一、深水昭吉「血管内皮細胞における APJ 受容体の血圧調節機能に関する研究」第 31 回 日本高血圧学会、2008 年 10 月 10 日、北海道、札幌
3. 石田純治、橋本泰美、村尾命、木村健二郎、粕谷善俊、杉山文博、八神健一、深水昭吉「血圧調節における APJ 受容体の内皮機能制御に関する研究」第 12 回 Molecular Cardiovascular Conference、2008 年 9 月 6 日、北海道、小樽
4. 石田純治、橋本泰美、村尾命、粕谷善俊、杉山文博、八神健一、深水昭吉「血圧調節における APJ 受容体の内皮細胞機能制御に関する研究」第 11 回 日本心血管内分泌代謝学会、東京都、2007 年 11 月 16 日、

東京都、品川

5. 橋本達夫、木原実、石田純治、今井のぞみ、吉田伸一郎、野村幸一郎、押川仁、池谷裕子、宮本研、柳麻衣、吉田衝未、田村功一、石上友章、平和伸仁、戸谷義幸、北村均、深水昭吉、梅村敏「apelin-APJ 系の血管平滑筋における機能解析」第 30 回 日本高血圧学会、2007 年 10 月 25 日、沖縄県、那覇
6. 石田純治、橋本泰美、村尾命、粕谷善俊、杉山文博、八神健一、深水昭吉「血管内皮細胞における APJ 受容体の血圧制御機能に関する研究」第 24 回 日本疾患モデル学会、2007 年 9 月 1 日、茨城県、つくば
7. 廣田恵子、石田純治、深水昭吉「In vivo LUC assay を用いた糖代謝制御遺伝子発現調節機構の解析」第 24 回 日本疾患モデル学会、2007 年 9 月 1 日、茨城県、つくば
8. 加藤秀樹、南学正臣、石田純治、深水昭吉、藤田敏郎「骨髄由来細胞上 Angiotensin II type 1 受容体の臓器別障害作用」第 50 回 日本腎臓学会、2007 年 5 月 26 日、静岡県

[図書] (計 4 件)

1. 石田純治、深水昭吉：医歯薬出版株式会社「赤血球造血とレニン・アンジオテンシン系：レニン・アンジオテンシン系のすべて」医学のあゆみ (2009) 228, 523-528 頁
2. 石田純治、深水昭吉：先端医学社「RAS 活性化による赤血球造血の増強作用」Angiotensin Research (2008) 5, 62-66 頁
3. 古屋充子、石田純治、深水昭吉：メディカルレビュー社「妊娠高血圧症候群モデルマウスにおける胎盤血管の異常」血管医学 (2007) 8, 73-80 頁
4. 石田純治、橋本達夫、橋本泰美、菅谷健、塩田直孝、梅村敏、粕谷善俊、望月直樹、深水昭吉：日本心臓血管作動物質学会「血管作動物質受容体 APJ の血圧降下作用に関する研究」血管 (2007) 30, 49-54 頁

[その他]

ホームページ等

<http://akif2.tara.tsukuba.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

石田 純治 (ISHIDA JUNJI)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・研究員

研究者番号：30323257

##### (2) 研究分担者

無し

##### (3) 連携研究者

無し