

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 31 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592142

研究課題名（和文）

閉経後のメタボリック症候群病態形成におけるアディポネクチンとレジスチンの役割

研究課題名（英文）

The role of adiponectin and resistin in the pathogenesis of postmenopausal metabolic syndrome

研究代表者

佐藤 博亮（SATO HIROAKI）

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20323595

研究成果の概要（和文）：

エストロゲン欠乏モデルとして、両側卵巣摘出術を施行したラットを用いてインスリン感受性を検討した。その結果、エストロゲン欠乏により、体重増加、インスリン抵抗性を引き起こした。しかし、アディポネクチンにより、そのインスリン抵抗性は改善した。しかし、レジスチンによりインスリン抵抗性はさらに増悪した。その機序として、肝臓や筋肉での AMPK が関与している事を明らかにした。以上の結果は、閉経期以降に増加する糖尿病の発症にインスリン抵抗性が深く関与している事が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To investigate the physiological role of Adipo and Res in the postmenopausal, estrogen-deficient state, we studied the chronic in vivo effect of Adipo and Res on insulin sensitivity in young ovariectomized female Wistar rats. Estrogen-deficient state had significantly increased body weight and decreased insulin sensitivity. Adiponectin improves the estrogen deficiency induced insulin resistance, whereas resistin exacerbates the estrogen deficiency induced insulin resistance. Furthermore, we found that AMPK is a key molecule player in muscle and liver.

These results that the insulin resistance has been involved in the incidence of diabetes increases as women age, especially after menopause.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：更年期医学，インスリン抵抗性，アディポサイトカイン

1. 研究開始当初の背景

心血管疾患や脳血管疾患などの動脈硬化性疾患の罹病率は、男性の場合、加齢に伴い増加するが、女性の場合、閉経年齢以降に急増することが数多くの疫学研究より明らかになっている。この要因として、エストロゲンが深く関与していると考えられていた。

しかしながら、最近発表された大規模臨床試験の結果において、エストロゲンの補充療法は、有意に心血管疾患を抑制できないことが明らかになった。更に、3T3-L1 脂肪細胞において、低濃度のエストロゲンがインスリン抵抗性を増悪させるばかりでなく、高濃度のエストロゲンもインスリン抵抗性を増悪させることが証明され、インスリン感受性という観点において、エストロゲンの至的濃度が存在することが示唆された。また、閉経期以降、アディポネクチンが低下するという報告もあり、アディポカインのプロファイルが変化することが推測された。

以上、これらの知見を含めて総合的に推測すると、閉経期以降における動脈硬化性疾患の発症進展には、インスリン抵抗性という病態が深く関連していると考えられた。そこで、今後ますます重要と考えられるインスリン抵抗性の治療薬の開発において、閉経によるインスリン抵抗性の発症機序を解明し、レジスチンやアディポネクチンとの関連を解明することは重要と考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、以下の課題を明らかにすることを目的とした。

1) 閉経後における肥満・インスリン抵抗性の病態生理を明らかにし、インスリン抵抗性に相反する作用を及ぼす2つの代表的なアディポカインであるアディポネクチンとレジスチンがこのインスリン感受性に及ぼす影響について検討した。以上より、閉経後におけるインスリン抵抗性の病態生理を解明した。

2) 閉経後によるインスリン抵抗性の分子機序を解明した。

3. 研究の方法

1) 閉経後における肥満・インスリン抵抗性の病態生理を明らかにするために、卵巣摘出ラットを用いて、インスリン抵抗性の評価法としてGolden standard である正常血糖・高インスリン・クランプ検査法によりインスリン

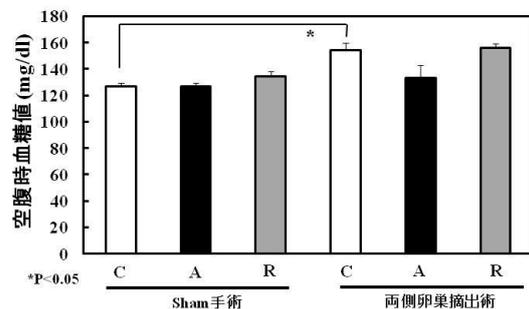
抵抗性の有無を検討した。さらに、このモデル動物を用いて、アディポネクチンとレジスチンがこのインスリン感受性に及ぼす影響について正常血糖・高インスリン・クランプ検査法にて検討した。

2) 閉経後によるインスリン抵抗性の分子機序を解明するために、糖代謝におけるインスリン標的臓器である肝臓・骨格筋・脂肪組織におけるインスリンの細胞内情報伝達系を検討した。

4. 研究成果

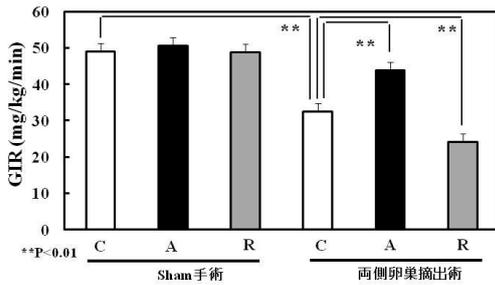
Sham 手術もしくは両側卵巣を摘出術を施行した雌 Wistar ラットを通常餌にて、8週間飼育し、正常血糖・高インスリンクランプ検査にてインスリン感受性を評価した。正常血糖・高インスリンクランプ検査施行7日前に右総頸静脈と内頸動脈へカテーテル挿入術を施行し、lacZ, アディポネクチン, レジスチン蛋白を過剰発現するアディノウイルスベクターを内頸動脈カテーテルより投与した。正常血糖・高インスリンクランプ検査前の体重は、Sham 手術施行の lacZ(コントロール(C)) 投与群, アディポネクチン(A)投与群, レジスチン(R)投与群において有意な差は認められなかった。また、両側卵巣摘出術施行の C 群, A 群, R 群において有意な差は認められなかった。しかし、両側卵巣摘出術施行により、体重が約 40%有意に増加した(p<0.05)。この結果より、エストロゲン欠乏は体重増加を来す事が示唆された。

【図1】



次に空腹時血糖値に関しては、Sham 手術施行の C 群, A 群, R 群において有意な差は認められなかった。両側卵巣摘出術施行の C 群, A 投与群, R 群において有意な差は認められなかった。しかし、両側卵巣摘出術施行により、空腹時血糖値が有意に増加した(図 1: p<0.05)。この結果より、エストロゲン欠乏は糖代謝を障害することが示唆された。

【図2】



糖代謝異常の重要な病態のひとつとしてインスリン抵抗性が挙げられる。そこで、正常血糖・高インスリンクランプ検査にて、インスリン感受性を評価した。全身のインスリン感受性の指標となる Glucose Infusion Rate (GIR)は、図2に示すように、Sham手術施行のC群、A群、R群において有意な差は認められなかった。しかし、両側卵巣摘出術により、C群において、約34%有意に減少し、エストロゲン欠乏により全身のインスリン抵抗性が惹起された。両側卵巣摘出術を施行した群において、C群と比較してA群は約35%有意にGIRが増加し、C群と比較してR群は約25%有意にGIRが減少した。これらの結果は、エストロゲン欠乏によるインスリン抵抗性は、アディポネクチンの増加により改善し、レジスチンの増加によりさらに増悪することが示唆された。

次に、このインスリン感受性の変化がどのインスリン標的臓器で起きているかを検討した。まず、おもに筋肉でのインスリン感受性を示す Insulin stimulated-glucose disposal rate (IS-GDR=GDR-basal HGO)を検討した。

【図3】

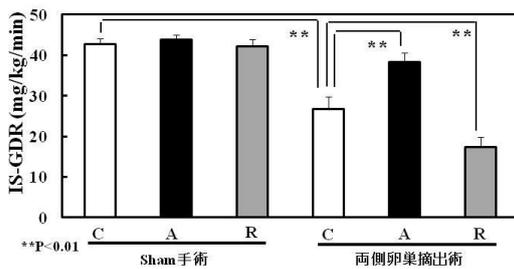


図3に示すように、IS-GDRはSham手術施行のC群、A群、R群において有意な差は認められなかった。しかし、両側卵巣摘出術により、C群において、約37%有意にIS-GDRが減少し、エストロゲン欠乏により筋肉組織でのインスリン抵抗性が惹起された。両側卵巣摘出術を施行した群において、C群と比較してA群は約43%有意にIS-GDRが増加し、C群と比較してR群は約35%有意にIS-GDRが

減少した。これらの結果は、エストロゲン欠乏による筋肉組織でのインスリン抵抗性は、アディポネクチンの増加により改善し、レジスチンの増加によりさらに増悪することが示唆された。

次に、肝臓でのインスリン感受性を示す Hepatic glucose output (HGO)について検討した。

【図4】

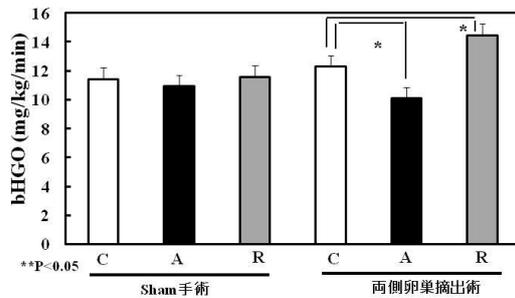


図4に示すように、basal (b) HGOはSham手術施行のC群、A群、R群において有意な差は認められなかった。両側卵巣摘出術により、C群において、統計学的有意差は認めなかったが、約7%、bHGOは増加傾向を示した。両側卵巣摘出術を施行した群において、C群と比較してA群は約17%有意にbHGOが減少し、C群と比較してR群は約17%有意にbHGOが増加した。さらに、特に肝臓でのインスリン感受性の指標となる clamp (c) HGOを検討した。

【図5】

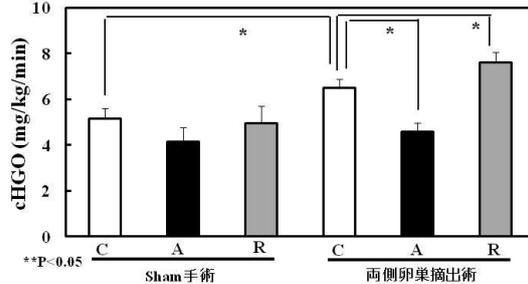


図5に示すように、cHGOはSham手術施行のC群、A群、R群において有意な差は認められなかった。しかし、両側卵巣摘出術により、C群において、約26%有意にcHGOが増加し、エストロゲン欠乏により肝臓でのインスリン抵抗性が惹起された。両側卵巣摘出術を施行した群において、C群と比較してA群は約30%有意にcHGOが減少し、C群と比較してR群は約17%有意にcHGOが増加した。これらの結果は、エストロゲン欠乏による肝臓組織でのインスリン抵抗性は、アディポネクチ

ンの増加により改善し、レジスチンの増加によりさらに増悪することが示唆された。

次に、筋肉や肝臓での分子機序について検討した。インスリンシグナルの重要な因子である Akt のリン酸化(Ser473)について、ウエスタンブロット解析にて検討した。肝臓組織と筋肉組織の両方ともに、Akt のリン酸化(Ser473)は Sham 手術施行の C 群, A 群, R 群において有意な差は認められなかった。しかし、両側卵巣摘出術により、C 群において、正常血糖・高インスリンランプ検査の結果と一致して、Akt のリン酸化(Ser473)が減弱していた。この結果は、エストロゲン欠乏によるインスリン抵抗性は、Akt のリン酸化(Ser473)が関与している可能性が示唆された。両側卵巣摘出術を施行した群において、C 群と比較して A 群は Akt のリン酸化(Ser473)が増強し、C 群と比較して R 群は Akt のリン酸化(Ser473)が減弱した。

次にアディポネクチンやレジスチンのシグナルに重要な因子である AMPK のリン酸化(Thr172)について、ウエスタンブロット解析にて検討した。肝臓組織と筋肉組織の両方ともに、AMPK のリン酸化(Thr172)は Sham 手術施行の C 群, A 群, R 群において有意な差は認められなかった。しかし、両側卵巣摘出術により、C 群において、正常血糖・高インスリンランプ検査の結果と一致して、AMPK のリン酸化(Thr172)が減弱していた。この結果は、エストロゲン欠乏によるインスリン抵抗性は AMPK のリン酸化(Thr172)が関与している可能性が示唆された。両側卵巣摘出術を施行した群において、C 群と比較して A 群は AMPK のリン酸化(Thr172)が増強し、C 群と比較して R 群は AMPK のリン酸化(Thr172)が減弱した。

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 5 件)

(1) Kudoh A, Satoh H, Hirai H, Watanabe T: Pioglitazone upregulates adiponectin receptor 2 in 3T3-L1 adipocytes. *Life Sci* 88:1055-1062, 2011. 査読有

(2). Nakamaki S, Satoh H, Kudoh A, Hayashi Y, Hirai H, Watanabe T: Adiponectin reduces proteinuria in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 236:614-620, 2011. 査読有

(3) 緑川早苗, 片上秀喜, 渡辺聡子, 待井典剛, 平井裕之, 工藤明宏, 長谷川浩司, 佐藤博亮, 渡辺毅. “MEN 1 型に合併した内分泌腫瘍からの異所性 GHRH 産生による先端巨大症とその

治療経験 (原著論文/症例報告) 日本内分泌学会雑誌 87(Suppl):69-71,2011. 査読有.

(4) 緑川早苗, 佐藤博亮, 渡辺毅. “2 型糖尿病合併高血圧患者に対する他の ARB からアバプロ® (イルベサルタン) への切り替え効果～アバプロ®のドラッグエフェクトを示唆する知見” (臨床研究)、血圧 *Journal of Blood Pressure* 17(11):954-960, 2010. 査読有.

(5) 本間美優樹, 緑川早苗, 菅谷芳幸, 平井裕之, 工藤明宏, 長谷川浩司, 藤原淳, 中嶋真一, 佐藤博亮, 渡辺毅. “内頸動脈瘤により視床下部性汎下垂体機能低下症をきたした 1 例(原著論文/症例報告)” 日本内分泌学会雑誌 85 (Suppl): 33-35, 2009. 査読有

佐藤博亮, 平井裕之, 工藤明宏, 長谷川浩司, 藤原淳, 緑川早苗, 渡辺毅. “糖尿病を合併する高血圧に対するバルサルタン高用量の降圧効果” (臨床研究)、血圧 *Journal of Blood Pressure*. 16(9):797-800, 2009. 査読有

[学会発表] (計 10 件)

(1) Satoh H, Sugaya Y, Kudoh A, Yamazaki S, Machii N, Watanabe S, Hirai H, Hasegawa K, Nakajima S, Midorikawa S, Watanabe T. The High Potassium Intake Improves High Fat Diet Induced Insulin Resistance in Male Wistar Rats. (1712-P) 71st American Diabetes Association Scientific Sessions. (2011.06.24- 28 in San Diego, CA)

(2) Kudoh A, Satoh H, Hirai H, Yamazaki S, Sugaya Y, Machii N, Hasegawa K, Watanabe S, Nakajima S, Midorikawa S, Watanabe T. "Impairment of insulin sensitivity via reactive oxygen species in muscle cells" 第 42 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 (2010.07.15-16、岐阜県岐阜市)

(2) 佐藤博亮, 渡辺毅. シンポジウム 2 「DM 合併症の管理を考える」“糖尿病性慢性合併症の発症進展とインスリン抵抗性” 第 37 回 東北腎不全研究会 (2010. 08. 28-29, 新潟市)

(3) Satoh H, Kudoh A, Hirai H, Hasegawa K, Fujiwara M, Watanabe T. The Mechanisms by Which Two Kinds of PPAR gamma Agonists Improve Insulin Sensitivity and Increases Body Weight in Type 2 Diabetic Patients. (88-LB) 70th American Diabetes Association Scientific Sessions. (2010.06.25- 29 in Orlando, FL)

(4) Watanabe S, Midorikawa S, Sugaya Y, Honma M, Machii N, Hirai H, Kudoh A, Hasegawa K, Fujiwara F, Nakajima N, Satoh H, Watanabe T. Amenorrhea resulting from polycystic ovary syndrome (PCOS) secondary to growth hormone (GH) producing pituitary adenoma (P7-12-3) 14th International Congress of Endocrinology (ICE2010). (2010.03.26-30 in Kyoto)

(5) **Satoh H.**, Kudoh K, Hirai H, Yamazaki S, Hasegawa K, Fujiwara F, Watanabe S, Sugaya Y, Machii N, Honma M, Nakajima S, **Midorikawa S.**, **Watanabe T.** Comparison two kinds of PPAR γ agonist, pioglitazone or telmisartan, on circulating total adiponectin and its multimer distribution in patients with type 2 diabetes. (P1-2-5) 14th International Congress of Endocrinology (ICE2010). (2010.03.26-30 in Kyoto, JAPAN)

(6) **佐藤博亮**, 平井裕之、工藤明宏、中牧慎太郎、長谷川浩司、藤原淳、本間美優樹、中嶋真一、**緑川早苗**、**渡辺毅**. “アディポネクチンの STZ 糖尿病ラットにおける蛋白病減少効果とその機序の検討” 第 13 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 (2009. 10. 23-24、さいたま市)

(7) Hirai H, **Satoh H.**, Kudoh A, Hasegawa K, Yamazaki S, Sugaya Y, Fujiwara M, Honma M, Nakajima S, **Midorikawa S.**, **Watanabe T.** The Mechanisms by which Pioglitazone Improves Insulin Sensitivity and Increases Body Weight in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. (1385-P) 69th American Diabetes Association Scientific Sessions. (2009.06.05- 09 in New Orleans, LA),

(8) **Satoh H.**, Nakamaki S, Kudoh A, Hirai H, Yamazaki S, Sugaya Y, Hasegawa K, Fujiwara M, Honma M, Nakajima S, **Midorikawa S.**, **Watanabe T.** Adenovirus-mediated chronic expression of adiponectin improves early stage diabetic nephropathy in STZ induced diabetic Wistar rats. (784-P) 69th American Diabetes Association Scientific Sessions. (2009.06.05- 09 in New Orleans, LA)

(9) 工藤明宏、**佐藤博亮**、平井裕之、菅谷芳幸、長谷川浩司、藤原淳、本間美優樹、中嶋真一、**緑川早苗**、**渡辺毅**. “エンドセリン - 1 の 3T3-L1 脂肪細胞からレジスチン分泌に及ぼす影響とその作用機序” 第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2009. 05. 21-24、大阪)

(10) **佐藤博亮**、工藤明宏、長谷川浩司、平井裕之、藤原淳、菅谷芳幸、本間美優樹、中嶋真一、**緑川早苗**、**渡辺毅**. “2 型糖尿病患者におけるヤーコンの糖・脂質代謝に及ぼす影響についての検討” 第 82 回内分泌学会学術総会 (2009. 04. 23-24、群馬県前橋市)

研究者番号：10325962

渡辺 毅 (WATANABE TSUYOSHI)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：80158641

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 博亮 (SATOHIHIROAKI)

福島医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20323595

(2) 研究分担者

緑川 早苗 (MIDORIKAWASANAE)

福島県立医科大学・医学部・講師