

## 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 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590979

研究課題名（和文） アディポネクチンの組織集積作用と発現調節因子の解明

研究課題名（英文） Analysis of tissue accumulation and regulation of adiponectin

研究代表者

前田 法一（MAEDA NORIKAZU）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30506308

研究成果の概要（和文）：アディポネクチン欠損マウスへ外因的に投与したアディポネクチンは心臓に集積し、心保護作用を発揮した。マイクロアレイ解析の結果、マウス白色脂肪組織にて新たなアディポサイトカインとして S100A8 を同定した。アディポネクチンの発現調節に関わる因子として、グルココルチコイドを新たに同定し、その調節機序を明らかにした。

研究成果の概要（英文）： Adenovirus-mediated supplement of adiponectin to adiponectin-deficient mice demonstrated that adiponectin was accumulated in the heart tissue and exhibited cardio-protective role. S100A8 was identified as a novel adipocytokine from mice white adipose tissue by cDNA microarray analysis. Glucocorticoid was one of regulators for adiponectin expression and its regulatory mechanism was clarified in present study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：内科、糖尿病、蛋白質

### 1. 研究開始当初の背景

「メタボリックシンドローム」の発症要因は、脂肪蓄積とくに内臓脂肪の過剰な蓄積であり、基本的には減量によりその病態は改善される。しかしながら、減量が困難な症例や糖尿病や動脈硬化症をはじめとする合併症が進展した症例においては、しばしば内服薬などによる治療を余儀なくされるケースが多い。そして、最終的に動脈硬化症に至るメタボリックシンドロームの発症および進展における分子的機序は完全には明らかにされていないのが現状である。申請者はアディポネクチンがメタボリックシンドロームの発

症・進展に重要な役割を果たしていることを示してきた。しかし、アディポネクチンの生理作用発揮に関わる分子基盤ならびに発現制御機構は完全には解明されていない。

### 2. 研究の目的

アディポネクチンの組織集積作用および発現調節因子を明らかにすること。

### 3. 研究の方法

- (1) アディポネクチンの組織集積作用  
アンジオテンシン II を負荷したアディポネクチン欠損マウスに様々な変異を有す

るアディポネクチン・アデノウイルスを投与し、心筋への集積および心筋の機能を検討する。

- (2) アディポネクチンの発現調節因子  
アディポネクチンの発現調節因子に関しては、アディポネクチン・エンハンサーとしての化合物 X を利用してアディポネクチン分泌機構に関わる分子を同定しその機能を解析する。

#### 4. 研究成果

- (1) アディポネクチンの組織集積作用  
Site-directed mutagenesis kit を用いて、野生型アディポネクチンおよび多量体形成不全を起こすアディポネクチン(C39S変異)を作製し、pAd/CMV/V5-DEST アデノウイルスベクターに組み込み、それぞれアディポネクチン・アデノウイルスを作製・精製した(Ad-WT-Adipo-Flag および Ad-C39S-Adipo-Flag)。Ad-WT-Adipo-Flag および Ad-C39S-Adipo-Flag をアディポネクチン欠損マウスに経静脈的に投与し、血中アディポネクチン濃度の上昇を確認したところ、Ad-C39S-Adipo-Flag 由来の変異型アディポネクチンの血中クリアランスが速い可能性が示唆される結果であった。  
次に、予想通り発現に成功した Ad-WT-Adipo-Flag を、アンジオテンシン II 負荷アディポネクチン欠損マウスに投与した結果、心臓においてアディポネクチンの集積を免疫染色およびウエスタンブロット法にて確認することが出来た。免疫染色では、外因性のアディポネクチンは心筋周囲に染色されるデータが得られた。また、アンジオテンシン II で上昇した線維化マーカーであるコラーゲンや TGF-beta はアディポネクチン投与で有意に改善されていた。

- (2) アディポネクチンの発現調節因子  
①肥満モデルマウス ob/ob マウスとそのコントロールマウスに化合物 X あるいは vehicle を投与し、これらのマウスから白色脂肪組織を摘出し、total RNA 抽出を行い、Gene Chip (Affymetrix 社)による遺伝子発現パターンを Gene Spring にて解析した。化合物 X 投与群で著明に変化する遺伝子をスクリーニングした結果、S100 蛋白ファミリーに属する S100A8 が ob/ob マウスの白色脂肪組織で著増しており、その上昇は化合物 X にて完全にコントロールマウスにおける発現レベルにまで是正されていた。RT-PCR にても同様の結果が得られたため、さらに解析を進めた。C57BL6J マウスでの S100A8 の遺伝子発現は、脾臓、肺臓について白色脂肪組織にて高発現を認めた。肥満モデルマウスでは主に成熟脂

肪細胞分画にて S100A8 遺伝子発現が上昇していた。3T3-L1 脂肪細胞では、化合物 X にて有意に S100A8 発現は抑制された。

②アディポネクチンの発現調節因子の新たな因子として、グルココルチコイドがアディポネクチンを負に制御することを見いだした。3T3-L1 脂肪細胞にて、グルココルチコイドはアディポネクチン遺伝子発現を低下させ、その低下はグルココルチコイド受容体 (GR) 阻害薬 (RU486) では変化しなかったが、ミネラルコルチコイド受容体 (MR) 阻害薬 (Eplerenone) で有意に改善された。すなわち、グルココルチコイドは GR よりも主には MR を介してアディポネクチンを負に制御することが明らかになった。また、グルココルチコイドにより脂肪細胞内酸化ストレスが上昇すること、その上昇は RU486 では是正されなかったが、Eplerenone で有意に改善された。実際、肥満モデルマウスの白色脂肪組織では、MR およびそのターゲット遺伝子 Sgk1 が上昇していたが、GR およびそのターゲット遺伝子 REDD1 は変化がみられなかった。さらには、不活性型グルココルチコイドを活性型グルココルチコイドに変換する 11beta-HSD1 の発現が肥満脂肪組織で顕著に上昇していることも確認した。最後に、ヒト手術症例での検体において、MR 発現は肥満度ともに主に内臓脂肪で増加する一方、GR 発現は肥満度とは無関係であった。さらに、アディポネクチンは肥満度ともに発現が低下したが、その低下の度合いは内臓脂肪においてより顕著であった。

#### 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 17 件)

- ① Shiota A, Shimabukuro M, Fukuda D, Soeki T, Sato H, Uematsu E, Hirata Y, Kurobe H, Maeda N, Sakaue H, Masuzaki H, Shimomura I, Sata M. Telmisartan ameliorates insulin sensitivity by activating the AMPK/SIRT1 pathway in skeletal muscle of obese db/db mice. (査読有) Cardiovasc Diabetol. 2012 Nov 8;11:139. DOI: 10.1186/1475-2840-11-139.
- ② Hirata A, Maeda N, Nakatsuji H, Hiuge-Shimizu A, Okada T, Funahashi T, Shimomura I. Contribution of glucocorticoid-mineralocorticoid receptor pathway on the obesity-related adipocyte

- dysfunction. (査読有)  
 Biochem Biophys Res Commun.  
 2012 Mar 9;419(2):182-187.  
 DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.01.139.
- ③ Katakami N, Kaneto H, Matsuoka TA, Takahara M, Maeda N, Shimizu I, Ohno K, Osonoi T, Kawai K, Ishibashi F, Imamura K, Kashiwagi A, Kawamori R, Matsuhisa M, Funahashi T, Yamasaki Y, Shimomura I. Adiponectin G276T gene polymorphism is associated with cardiovascular disease in Japanese patients with type 2 diabetes. (査読有) *Atherosclerosis*. 2012 Feb;220(2):437-442. DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2011.11.010.
- ④ Inoue K, Maeda N, Kashine S, Fujishima Y, Kozawa J, Hiuge-Shimizu A, Okita K, Imagawa A, Funahashi T, Shimomura I. Short-term effects of liraglutide on visceral fat adiposity, appetite, and food preference: a pilot study of obese Japanese patients with type 2 diabetes. (査読有) *Cardiovasc Diabetol*. 2011 Dec 1;10:109. DOI: 10.1186/1475-2840-10-109.
- ⑤ Imanishi Y, Miyagawa S, Maeda N, Fukushima S, Kitagawa-Sakakida S, Daimon T, Hirata A, Shimizu T, Okano T, Shimomura I, Sawa Y. Induced adipocyte cell-sheet ameliorates cardiac dysfunction in a mouse myocardial infarction model: a novel drug delivery system for heart failure. (査読有) *Circulation*. 2011 Sep 13;124(11 Suppl):S10-17. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.009993.
- ⑥ Nakanishi K, Takeda Y, Tetsumoto S, Iwasaki T, Tsujino K, Kuhara H, Jin Y, Nagatomo I, Kida H, Goya S, Kijima T, Maeda N, Funahashi T, Shimomura I, Tachibana I, Kawase I. Involvement of endothelial apoptosis underlying chronic obstructive pulmonary disease-like phenotype in adiponectin-null mice: implications for therapy. (査読有) *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 May 1;183(9):1164-1175. DOI: 10.1164/rccm.201007-10910C.
- ⑦ Hiuge-Shimizu A, Maeda N, Hirata A, Nakatsuji H, Nakamura K, Okuno A, Kihara S, Funahashi T, Shimomura I. Dynamic changes of adiponectin and S100A8 levels by the selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rivoglitazone. (査読有) *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 Apr;31(4):792-799. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.221747.
- ⑧ Jortay J, Senou M, Delaigle A, Noel L, Funahashi T, Maeda N, Many MC, Brichard SM. Local induction of adiponectin reduces lipopolysaccharide-triggered skeletal muscle damage. (査読有) *Endocrinology*. 2010 Oct;151(10):4840-4851. DOI: 10.1210/en.2009-1462.
- ⑨ Komura N, Kihara S, Sonoda M, Maeda N, Tochino Y, Funahashi T, Shimomura I. Increment and impairment of adiponectin in renal failure. (査読有) *Cardiovasc Res*. 2010 Jun 1;86(3):471-477. DOI: 10.1093/cvr/cvp415.
- [学会発表] (計 37 件)
- ① 前田法一、船橋 徹、下村伊一郎：Adiponectin と Adipomedicine、第 33 回日本肥満学会、2012. 10. 12、ホテルグランヴィア京都 (京都市、京都)
- ② 前田法一、船橋 徹、下村伊一郎：アディポサイトカインと動脈硬化、第 44 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2012. 7. 20、ヒルトン福岡シーホーク (福岡市、福岡)
- ③ 前田法一、日生下垂紀、平田 歩、中辻秀朗、木原進士、船橋 徹、下村伊一郎：PPARgamma アゴニスト・リボグリタゾンによるアディポネクチンおよび S100A8 への効果、第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、2012. 5. 17、パシフィコ横浜 (横浜市、神奈川)
- ④ 前田法一：メタボリックシンドローム発症・進展に関わる分子基盤の解明、第 85 回日本内分泌学会学術総会、2012. 4. 21、名古屋国際会議場 (名古屋市、愛知)
- ⑤ 平田歩、前田法一、中辻秀朗、清水亜紀、船橋 徹、下村伊一郎：肥満における脂

- 脂肪細胞ミネラルコルチコイド受容体の病態意義の検討、2012. 4. 20、名古屋国際会議場（名古屋市、愛知）
- ⑥ 前田法一、船橋 徹、下村伊一郎：アディポサイトカインと慢性炎症、第32回日本肥満学会、2011. 9. 24、淡路夢舞台国際会議場（淡路市、兵庫）
- ⑦ 前田法一、日生下亜紀、平田 歩、中辻秀朗、木原進士、船橋 徹、下村伊一郎：リボグリタゾンの動脈硬化、アディポネクチン、S100A8 に及ぼす影響、第32回日本肥満学会、2011. 9. 23、淡路夢舞台国際会議場（淡路市、兵庫）
- ⑧ 平田 歩、前田法一、中辻秀朗、清水亜紀、船橋 徹、下村伊一郎：肥満における脂肪細胞ミネラルコルチコイド受容体の病態意義の検討（Young Investigator Award プレゼンテーション）、第32回日本肥満学会、2011. 9. 23、淡路夢舞台国際会議場（淡路市、兵庫）
- ⑨ 前田法一、船橋 徹、下村伊一郎：内臓脂肪研究から治療応用へ、The 16th Adiposcience Symposium、2011. 8. 20 千里阪急ホテル（豊中市、大阪）
- ⑩ Yukiko Imanishi, Shigeru Miyagawa, Norikazu Maeda, Ichiro Shimomura, Yoshiki Sawa : Constitutive Adiponectin Administration Using Adipocyte Sheet-based Drug Delivery System Ameliorates Cardiac Dysfunction in Mouse Myocardial Infarction Model、The American Heart Association's Scientific Sessions 2010. 11. 13、Chicago, USA
- ⑪ 小村徳幸、木原進士、前田法一、船橋 徹、下村伊一郎：腎不全におけるアディポネクチン濃度上昇と機能障害機序、第31回日本肥満学会、2010. 10. 2、前橋テルサ（前橋市、群馬）
- ⑫ 平田 歩、前田法一、中辻秀朗、日生下亜紀、木原進士、船橋 徹、下村伊一郎：グルココルチコイドが脂肪細胞コルチコイド受容体に及ぼす影響、第31回日本肥満学会、2010. 10. 1、前橋テルサ（前橋市、群馬）
- ⑬ 平田 歩、前田法一、中辻秀朗、清水亜紀、木原進士、船橋 徹、下村伊一郎：The impact of glucocorticoid on mineralocorticoid receptor in adipocytes、The 15th Adiposcience Symposium、2010. 8. 21 千里阪急ホテル（豊中市、大阪）
- ⑭ 小村徳幸、木原進士、前田法一、船橋 徹、下村伊一郎：腎不全におけるアディポネクチン濃度上昇と機能障害機序、The 15th Adiposcience Symposium、2010. 8. 21 千里阪急ホテル（豊中市、大阪）
- ⑮ Ayumu Hirata, Norikazu Maeda, Aki Hiuge, Toshiyuki Hibuse, Koichi Fujita, Takuya Okada, Shinji Kihara, Tohru Funahashi, Ichiro Shimomura : Blockade of mineralocorticoid receptor reverses adipocyte dysfunction and insulin resistance in obese mice、11th International Congress on Obesity、2010. 7. 12、Stockholm, Sweden
- ⑯ Noriyuki Komura, Shinji Kihara, Norikazu Maeda, Tohru Funahashi, Ichiro Shimomura : Impaired adiponectin clearance and function in renal failure model、11th International Congress on Obesity、2010. 7. 12、Stockholm, Sweden
- ⑰ 日生下亜紀、前田法一、木原進士、船橋 徹、下村伊一郎：新規チアゾリジン誘導体リボグリタゾンのアディポネクチンに与える影響、第53回日本糖尿病学会年次学術集会、2010. 5. 29、岡山コンベンションセンター（岡山市、岡山）
- ⑱ 平田 歩、前田法一、中辻秀朗、日生下亜紀、船橋 徹、下村伊一郎：グルココルチコイドによる脂肪細胞ミネラルコルチコイド受容体活性化の意義、第53回日本糖尿病学会年次学術集会、2010. 5. 27、岡山コンベンションセンター（岡山市、岡山）
- ⑲ Norikazu Maeda : Is adiponectin a key player in cardiovascular disease?、XXth World Congress of the International Society for Heart Research (ISHR)、2010. 5. 16、国立京都国際会館（京都市、京都）
- ⑳ Yukiko Imanishi, Shigeru Miyagawa, Norikazu Maeda, Ichiro Shimomura, Yoshiki Sawa : Adiponectin continuous delivery system by adipocyte sheet implantation attenuates cardiac

dysfunction after acute myocardial infarction, XXth World Congress of the International Society for Heart Research (ISHR)、2010.5.13、国立京都国際会館（京都市、京都）

〔図書〕（計2件）

- ① 前田法一、下村伊一郎：日本臨床社、糖尿病の検査・診断法「アディポサイトカイン」、最新臨床糖尿病学日本臨床増刊号 2012; Vol 70, Supple 3, 4 ページ (486-489)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前田 法一 (MAEDA NORIKAZU)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：30506308

### (2) 研究分担者

船橋 徹 (FUNAHASHI TOHRU)  
大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授  
研究者番号：60243234