

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26253058

研究課題名(和文) アディポカインによる腸内細菌叢制御の生活習慣病における病態生理的意義の解明

研究課題名(英文) Pathophysiological roles of adipokines in the regulation of gut microbiota in life-style related diseases

研究代表者

山内 敏正 (YAMAUCHI, TOSHIMASA)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：40372370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,900,000円

研究成果の概要(和文)：高脂肪食により生活習慣病が発症するメカニズムを免疫細胞と実質細胞の相互作用レベル、さらに腸内細菌叢、腸内代謝産物にも着目して、解明することを試みた。高脂肪食、アディポネクチンとその受容体AdipoRの低下、AdipoRの活性化、AdipoR欠損マウスの腸内細菌叢の無菌マウスへの移植等の影響の解析を行った。AdipoRの低下で炎症、酸化ストレス等が増加し、腸内細菌叢、腸内代謝産物を変化させ、脂肪肝、NASH、動脈硬化が増悪、逆にAdipoRの活性化で抑制出来る可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：We tried to clarify the mechanisms by which high-fat diet results in life-style related diseases, especially we studied interactions between immune cells and metabolism cells as well as gut microbiota and enteral metabolites. We analyzed the effects of high-fat diet, reduction in adiponectin/AdipoR actions, AdipoR activation, and transplantation of gut microbiota from AdipoR deficient mice into germfree mice. Our results raised the possibility that reduction in AdipoR actions could result in increased inflammation and oxidative stress and so on, leading to dysregulation of gut microbiota and enteral metabolites, which could worsen fatty liver, NASH, atherosclerosis, conversely AdipoR activation could ameliorate them.

研究分野：代謝学

キーワード：糖尿病 細菌 シグナル伝達 脂質 食品

1. 研究開始当初の背景

我が国では、糖尿病とその合併症の患者数は増加の一途をたどり、平成 24 年の国民健康・栄養調査によると糖尿病が強く疑われる人と予備群が計 2,050 万にのぼる。そのため、より一層効果的な糖尿病・生活習慣病対策が必要であり、より根本的な治療に向けての研究の推進が必須であると考えられ、国民の期待も大きい。そのような時代背景の中、我々は、肥満(脂肪細胞の肥大化)に伴って、脂肪細胞から分泌される生理活性物質アディポネクチンが低下することが、メタボリックシンドローム、2 型糖尿病、脂肪肝、心血管疾患等の増加の主因になっていること、一方でこのアディポネクチンを補充することがこれら病態の治療法になり得ることを研究成果として示してきた (**Nature Med.**7:941,2001; **Nature Med.**8:1288,2002)。さらに培養細胞を用いて、アディポネクチン受容体 AdipoR1・AdipoR2 を世界ではじめて同定し(**Nature** 423:762,2003)、野菜に含まれるオスモチンが AdipoR に結合して活性化することを示した(**Mol Cell** 17:171,2005)。これら一連の研究に引き続き、我々は AdipoR が個体レベルにおいてアディポネクチンの結合・作用に必須の受容体であることを証明し、実際に AdipoR が生体内において、インスリン感受性、糖・脂質・エネルギー代謝、炎症や酸化ストレスを制御するなど、過栄養に対する恒常性維持作用を有する事を明らかにした(**Nature Med.**13:332,2007)。さらにその研究成果を進展させ、代謝に重要な各組織での AdipoR の生理的・病態生理的意義を解明するために、各組織特異的 AdipoR 欠損マウスを作製し、その機能解析を行っている。その成果の一つとして、骨格筋特異的 AdipoR1 欠損マウスを用いた解析により、アディポネクチンが AdipoR1 を介し“細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させること”と“AMP キナーゼ (AMPK)/長寿遺伝子 SIRT1 を活性化すること”を発見した(**Nature** 464:1313,2010)。実際に、AdipoR 欠損マウスは短命であることが分かり、さらに過栄養の状態では恒常的代償性応答の破綻により、このマウスはより寿命が短くなることが明らかになった(**Nature** 503:493,2013)。さらに、我々は AdipoR 活性化低分子化合物の取得に成功しており、極めて重要なことに、AdipoR 活性化低分子化合物は、過栄養に対する代償作用を強く発揮し、生活習慣病モデルマウスの短くなった寿命を回復することも明らかにしていた (**Nature** 503:493,2013)。

2. 研究の目的

過栄養の時代を迎え、この過栄養が全身での長期にわたる免疫反応を基盤とした生活習慣病を引き起こし、その結果、心血管疾患が現代人の死亡原因の主因となり、寿命を短縮している。この栄養摂取バランスの崩れによる個体での恒常性維持機構の破綻は、長期に

わたるストレス応答のために、免疫細胞と実質細胞の相互作用が遷延化し、適応の破綻により代謝機能をはじめ細胞機能が変容し、最終的には臓器連関含め臓器の機能不全に至った状態と考えられる。このことから過栄養に対する個体での恒常性維持機構の破綻メカニズムを紐解くためには、細胞レベルでの代償期から非代償期に向かう過程での時間的变化と、臓器レベルでの恒常性の破綻を臓器連関不全の結果として空間的に解析することが極めて重要である。“栄養に対する代償システム”の破綻メカニズムの一部として、栄養摂取バランスの崩れに伴って、脂肪細胞から分泌される生理活性物質アディポネクチンの低下、さらに全身の各組織におけるアディポネクチン受容体 (AdipoR) の発現量の低下が、メタボリックシンドローム・2 型糖尿病激増の主因になっていることが国内外の研究より明らかになっている。さらに、我々はアディポネクチン/AdipoR が、カロリー制限や運動により活性化される健康長寿シグナル (AMP キナーゼ (AMPK)/長寿遺伝子 SIRT1/PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) 経路等) を介して代謝作用を高めると共に、細胞内ストレスを低減させるなど、過栄養に対する恒常性維持機構を有することを明らかにし、報告してきた (**Nature Med.**13:332, 2007; **Nature** 464:1313, 2010)。最近、肥満や高脂肪食に伴う腸内細菌叢と腸内代謝産物の変化が糖・脂質代謝異常、脂肪肝、心血管疾患等の発症に重要な役割を果たす可能性が示されて来ている。本研究では、これらの研究結果を基にして、高脂肪食により生活習慣病が発症するメカニズムを免疫細胞-実質細胞相互作用レベル、臓器連関レベルで、特に代謝と免疫の両方の制御に重要なアディポネクチンとその受容体 AdipoR、ならびに腸内細菌叢、腸内代謝産物に着目して、解明することを目的とした。

3. 研究の方法

インフラマソームは、細胞質に存在するタンパク質複合体であり、プロテアーゼの一種であるカスパーゼ-1 の活性化と炎症性サイトカイン (IL (interleukin)-1、IL-18) の成熟および分泌を引き起こす。過栄養に対し恒常性維持機構が保たれた代償期においては、インフラマソーム活性は抑制されているが、恒常性維持機構が崩れ始める非代償期の初期の頃からインフラマソームは活性化することから、過栄養ストレス信号のセンサーとして非常に注目を浴びている。本研究においても、AdipoR やその細胞内シグナル伝達に関わる AMPK/SIRT1/PPAR 経路に加えて、酸化ストレスやインフラマソームの制御に関わる経路、炎症、最終的な脂肪肝、NASH (Nonalcoholic Steatohepatitis)、心血管疾患の発症・増悪に関して、解析を行った。

(1) 高脂肪食、AdipoR 欠損、組織特異的 AdipoR 欠損、AdipoR アゴニスト(野菜に含まれるが

消化・吸収され難いオスモチン、血中にのみ存在するアディポネクチン、内服によっても血中濃度が十分に上昇する低分子量 AdipoR 活性化化合物)による腸内細菌叢と腸内代謝産物の変化を明らかにし、

(2)その変化における免疫細胞、上皮細胞、脂肪細胞等とそこに発現している AdipoR の役割・意義を明らかにし、

(3)脂肪肝、NASH、心血管疾患の発症メカニズムを解明し、予防・治療法を確立することを試みた。

4. 研究成果

(1)高脂肪食、AdipoR 欠損、合成・天然 AdipoR アゴニストによる腸内細菌叢と腸内代謝産物の変化の解明：高脂肪食を負荷したマウス、AdipoR 欠損マウス、AdipoR 欠損マウスの骨髄を移植したマウス、組織特異的 AdipoR 欠損マウス、アディポネクチン欠損マウス、野菜に含まれるが消化・吸収され難いオスモチンを経口投与したマウス、内服によっても血中濃度が十分に上昇する低分子量 AdipoR 活性化化合物を経口投与したマウスにおいて、腸内細菌叢と腸内代謝産物を網羅的に解析し、変化するものを見出した。

(2)免疫細胞、上皮細胞、脂肪細胞等における AdipoR の病態生理的意義の解明：高脂肪食を負荷したマウス、AdipoR 欠損マウス、AdipoR 欠損マウスの骨髄を移植したマウス、組織特異的 AdipoR 欠損マウス、アディポネクチン欠損マウス、オスモチンを経口投与したマウス、AdipoR 活性化化合物を経口投与したマウスの、免疫細胞、上皮細胞、脂肪細胞等において、AdipoR やその細胞内シグナル伝達に関わる AMPK/SIRT1/PPAR 経路に加えて、酸化ストレスやインフラマソームの制御に関わる経路、炎症、さらには脂肪肝、NASH、心血管疾患の発症・増悪に関して、解析を行った。AdipoR の活性化が、AMPK/SIRT1/PPAR 経路を活性化し、マクロファージ等では炎症を抑制し、血管内皮細胞等では酸化ストレス等を抑制し、脂肪肝、NASH、心血管疾患を改善させる可能性を見出した。

(3)脂肪肝、NASH、心血管疾患の発症機構の解明：AdipoR 欠損マウスの腸内細菌叢を移植された無菌マウスの、免疫細胞、上皮細胞、脂肪細胞等において、AdipoR やその細胞内シグナル伝達に関わる AMPK/SIRT1/PPAR 経路に加えて、酸化ストレスやインフラマソームの制御に関わる経路、炎症、さらには脂肪肝、NASH、心血管疾患の発症・増悪に関して、解析を行った。AdipoR 欠損マウスの腸内細菌叢を移植された無菌マウスでは、野生型マウスの腸内細菌叢を移植された無菌マウスよりも、耐糖能障害、脂質代謝異常、肝内異所性脂肪蓄積が、より増悪しているのが認められた。

AdipoR の低下で AMPK/SIRT1/PPAR 経路の活性が低下し、炎症、酸化ストレス等が増加し、腸内細菌叢、腸内代謝産物を変化させ、脂肪

肝、NASH、動脈硬化が増悪、逆に AdipoR の活性化で抑制出来る可能性を見出した。

糖尿病が強く疑われる人と予備群が計 2,050 万人(平成 24 年国民健康・栄養調査(最新))にのぼり、医療費の面からも、糖尿病、脂肪肝、NASH、心血管疾患等の生活習慣病の克服は、活力ある高齢化社会の実現に向けて、行政上極めて重要な課題である。本研究課題の成果は、分野の垣根を越えて全世界の研究に学術上のインパクトを与えるだけでなく、これまでにない新規メタボリックシンドローム・糖尿病・脂肪肝・NASH・心血管疾患等の予防・治療薬の開発の道を切り開き、医療・経済的にも貢献をもたらす。

AdipoR は、G タンパク質共役受容体 (GPCR) とは逆向きのトポロジーを持つ 7 回膜貫通型受容体であり、新規の受容体ファミリーを形成していると考えられている。アディポネクチンおよび AdipoR の発見以降、関連論文数は年々増加の一途をたどり、学術的にもアディポネクチン研究の世界的関心の高さを伺い知ることができるが、それでも新規の受容体ファミリーであるがゆえに、分子レベルでの活性制御メカニズム等、未知の部分も大きく、本研究の成果は細胞膜受容体研究の発展に貢献をもたらすものと思われる。

さらに、生活習慣病は、慢性炎症と代謝異常の観点が重要であることは以前から知られ、腸内細菌叢や腸内代謝産物が重要であることを示す実験結果も蓄積しつつあるが、肥満に伴う変化を説明する分子メカニズムが不明であった。肥満に伴って低下する AdipoR は、免疫と代謝両方の制御に重要であること、免疫細胞、上皮細胞、脂肪細胞等、全身の多くの細胞・組織に発現して重要な役割を果たしている事、血中のアディポネクチンによって活性化されるのみならず、野菜に含まれるオスモチンによっても活性化されること等から、本研究成果は当該分野の発展への寄与が期待出来る。

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 8 件)

- (1) Okada-Iwabu M, Iwabu M, Ueki K, Yamauchi T, Kadowaki T, Perspective of Small-Molecule AdipoR Agonist for Type 2 Diabetes and Short Life in Obesity, **Diabetes Metab. J.**, 査読有, Vol. 39, No. 5, 2015, pp363-372, DOI:10.4093/dmj.2015.39.5.363
- (2) Shibata S, Tada Y, Hau CS, Mitsui A, Kamata M, Asano Y, Sugaya M, Kadono T, Masamoto Y, Kurokawa M, Yamauchi T, Kubota N, Kadowaki T, Sato S, Adiponectin regulates psoriasiform skin

- inflammation by suppressing IL-17 production from $\gamma\delta$ -T cells, **Nat Commun**, 査読有, 6:7687, 2015
DOI: 10.1038/ncomms8687
- (3) Shiomi Y, Yamauchi T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Nakayama R, Orikawa Y, Yoshioka Y, Tanaka K, Ueki K, Kadowaki T, A Novel Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) α Agonist and PPAR γ Antagonist, Z-551, Ameliorates High-fat Diet-induced Obesity and Metabolic Disorders in Mice, **J Biol Chem**, 査読有, Vol. 290, No. 23, 2015, pp14567-14581, DOI: 10.1074/jbc.M114.622191
- (4) Tanabe H, Fujii Y, Okada-Iwabu M, Iwabu M, Nakamura Y, Hosaka T, Motoyama K, Ikeda M, Wakiyama M, Terada T, Ohsawa N, Hato M, Ogasawara S, Hino T, Murata T, Iwata S, Hirata K, Kawano Y, Yamamoto M, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Yamauchi T, Kadowaki T, Yokoyama S, Crystal structures of the human adiponectin receptors. **Nature**, 査読有, Vol. 520, No. 7547, 2015, pp312-316, DOI: 10.1038/nature14301
- (5) Tanabe H, Motoyama K, Ikeda M, Wakiyama M, Terada T, Ohsawa N, Hosaka T, Hato M, Fujii Y, Nakamura Y, Ogasawara S, Hino T, Murata T, Iwata S, Okada-Iwabu M, Iwabu M, Hirata K, Kawano Y, Yamamoto M, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Yamauchi T, Kadowaki T, Yokoyama S, Expression, purification, crystallization, and preliminary X-ray crystallographic studies of the human adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2, **J. Struct. Funct. Genomics**, 査読有, Vol. 16, No. 1, 2015, pp11-23, DOI: 10.1007/s10969-014-9192-z
- (6) Iwabu M, Okada-Iwabu M, Yamauchi T, Kadowaki T, Adiponectin/adiponectin receptor in disease and aging, **npj Aging and Mechanisms of Disease**, 査読有, 1:15013, 2015
- (7) Kadowaki T, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, Iwabu M, Adiponectin and its receptors: implications for obesity-associated diseases and longevity, **Lancet Diabetes Endocrinol**, 査読有 Vol. 2, No. 1, 2014, pp8-9, DOI:10.1016/S2213-8587(13)70120-7
- (8) Yamauchi T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kadowaki T, Adiponectin receptors: A review of their structure, function and how they work, **Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab**, 査読有 Vol. 28, No. 1, 2014, pp15-23, DOI: 10.1016/j.beem.2013.09.003
- [学会発表](計 20 件)
- (1) 第 16 回日本抗加齢医学会総会 (2016 年 6 月 横浜国際会議場 (神奈川県・横浜市)) 山内敏正: AdipoRon
- (2) KSBMB International Conference 2016 (Seoul, Korea, 2016.05) Toshimasa Yamauchi: Development of a small-molecule AdipoRagonist AdipoRon as exercise mimetics
- (3) 第 53 回日本臨床分子医学会学術集会 (2016 年 4 月 東京国際フォーラム (東京都・千代田区)) 山内敏正: 2 型糖尿病の分子メカニズムと治療戦略
- (4) 第 89 回日本内分泌学会学術総会 (2016 年 4 月 国立京都国際会館 (京都府・京都市)) 山内敏正, 岩部美紀, 岩部真人, 門脇孝: アディポネクチン・AdipoR の肥満症における病態生理的意義
- (5) 2015 年度 金沢大学医薬保健研究域附属 脳・肝インターフェースメディシン研究センター 生体統御部門 外部評価シンポジウム (2016 年 3 月 8 日 金沢大学 (石川県・金沢市)) 山内敏正: 糖代謝からみた見た老化機構 - 健康長寿薬開発への挑戦 -
- (6) The 46th NIPS international Symposium (Nagoya, Japan, 2015.10) Toshimasa Yamauchi: Pathophysiological roles of adipokine and epigenome dysregulation in obesity.
- (7) 75th Scientific Sessions of the American Diabetes Association (Boston, USA, 2015.6) · Toshimasa Yamauchi, Miki Okada-Iwabu, Masato Iwabu, Takashi Kadowaki: Mutational Analyses Based on Crystal Structures of AdipoRs Facilitate understanding of Nobel Structure-Function Relationships Including Adiponectin Binding and intracellular Signal Transduction.
- (8) 第 88 回日本内分泌学会学術総会 (2015 年 4 月 ホテルニューオータニ (東京都・千代田区)) 山内敏正: アディポネクチン受容体の病態生理学的意義
- (9) 第 49 回糖尿病学の進歩 (2015 年 2 月 岡山コンベンションセンター (岡山県・岡山市)) 山内敏正: アディポネクチン up to date

- (10) 第 2 回薬食国際カンファレンス (ICPF2014) (2014 年 11 月 日本平ホテル (静岡県・静岡市)) 山内敏正: アディポネクチン受容体の標的分子の探索と薬・食への活用
- (11) 第 87 回日本生化学会大会 (2014 年 10 月 国立京都国際会館 (京都府・京都市)) 山内敏正: アディポネクチン受容体 AdipoR の骨格筋における生理的・病態生理的意義の解明と治療への応用
- (12) 第 35 回日本肥満学会 (2014 年 10 月 シーガイアコンベンションセンター (宮城県・宮崎市)) 山内敏正: 肥満症治療新規薬物-AdipoRon を中心に-
- (13) 第 19 回アディポサイエンス・シンポジウム (2014 年 8 月 千里ライフセンター (大阪府・豊中市)) 山内敏正: アディポネクチン受容体を標的にした健康長寿薬開発への挑戦
- (14) American Diabetes Association 74th Scientific Sessions (San Francisco, USA, 2014.6) Toshimasa Yamauchi, Miki Okada-Iwabu, Masato Iwabu and Takashi Kadowaki: Activation of AdipoR1 in Hematopoietic Dells Leading to Anti-Inflammation and R2 in Endothelial Cells Leading to Reduced Oxidative Stress Prevent Cardiovascular Diseases.
- (15) 第 14 回日本抗加齢医学会総会 (2014 年 6 月 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)) 山内敏正: アディポネクチンとアンチエイジング
- (16) APD02014 (Seoul, Korea, 2014.5) Toshimasa Yamauchi: Development of a small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity.
- (17) 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2014 年 5 月 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)) 山内敏正、門脇孝: Adiponectin/AdipoR とインスリン抵抗性
- (18) 第 68 回日本栄養・食糧学会大会 (2014 年 5 月 北海道大学学術交流会館 (北海道・札幌市)) 山内敏正: 糖転移ヘスペリジンのインスリン抵抗性改善作用
- (19) 第 87 回内分泌学会学術総会 (2014 年 4 月 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)) 山内敏正: アディポネクチン受容体を標的にした健康長寿薬開発への挑戦
- (20) 第 87 回内分泌学会学術総会 (2014 年 4 月 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)) 山内敏正、岩部美紀、岩部真人、門脇孝: 代謝に重要な各組織におけるアディポネクチン受容体を介した細胞内情報伝達の解析と生活習慣病治療への

応用

〔その他〕
ホームページ等
<http://dm301k.umin.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 敏正 (YAMAUCHI Toshimasa)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 40372370

(3) 連携研究者

岩部 真人 (IWABU Masato)
東京大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号: 30557236

岩部 美紀 (IWABU Miki)
東京大学・医学部附属病院・特任講師
研究者番号: 70392529

門脇 孝 (KADOWAKI Takashi)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号: 30185889