

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：32723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460494

研究課題名(和文)低アディポネクチン血症における病態生理

研究課題名(英文)The pathophysiology in hypoadiponectinemia

研究代表者

中野 泰子 (NAKANO, Yasuko)

横浜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20155790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アディポネクチンは脂肪細胞が血液中に放出するタンパク質で、炎症を抑制し糖尿病や動脈硬化などを防止する。我々が作成したアンチセンストランスジェニックマウスは野生型マウスと比べてアディポネクチンの血中濃度に有意な差は無く、通常の飼育下では異常は認められないが、炎症を誘導すると易炎症性で重症化や遷延化がみられる。そこでアンチセンストランスジェニックマウスのこの未病状態を網羅的に解析した。その結果、代謝系やエネルギー源の蓄積に関わる遺伝子群の発現が低下しており、エネルギー産生ができない状態が易炎症性や重症化をもたらしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Adiponectin secreted from adipocyte has anti-inflammatory function and inhibits diabetes, atherogenic disease and so on. Adiponectin anti-sense transgenic mouse which we produced shows no difference with wild type mouse in plasma adiponectin concentration and under normal conditions, there is no abnormality. On the other hand, once inflammation was induced, inflammation became severer and prolonged. These suggest anti-sense transgenic mouse is in predisease condition and we have carried out comprehensive analysis. As a result, in anti-sense transgenic mouse, genes of metabolic process and energy storage were down regulated and these changes and resulted low energy production are suggested to be the cause of easy induction of inflammation and resulted severer inflammation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：炎症 アディポネクチン 生活習慣病 未病状態 マクロファージ アディポネクチントランスジェニックマウス 低アディポネクチン血症 易炎症性

1. 研究開始当初の背景

当研究室では 1996 年に現在は高分子量 (HMW) アディポネクチンと呼ばれているタンパクをヒト血中より発見し、Gelatin-binding protein of 28 kDa (GBP28) として報告して以来、一貫してその生理的意義についての検討を行っている。その間、アディポネクチンの遺伝子構造やプロモーター解析、寒冷暴露による発現誘導、抗糖尿病作用、抗炎症作用、更に HMW アディポネクチン測定系を開発し病態と血中濃度の関係、炎症性疾患で高値となること、炎症部位で異所発現が誘導される現象なども世界に先駆けて発見・報告している。また、アディポネクチンのアンチセンス及びセンストランスジェニックマウスを作製している (図 1)。

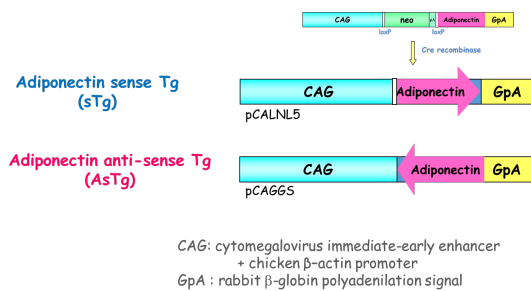


図 1 トランスジーン

これらのマウスを用いて、体温の維持やエネルギー産生、減量による HMW アディポネクチン増加の虚血再還流による心筋壊死抑制、ドキシソルピシンによる心筋症や心移植時の脈管障害の抑制など報告してきた。しかし、炎症を誘導した時のみ反応が見られ無処理のアンチセンストランスジェニックマウスを観察しても、培養細胞にアディポネクチンだけを処理しても特に大きな変化は起こらず、生体内にかなりの濃度で存在するアディポネクチンが細胞や臓器に対してどのように作用しているのか常に疑問を抱いてきた。これはアディポネクチンノックアウトマウスでも同様で、ただ育てるだけでは何も異常は認められず、高カロリー食を負荷して初めて糖尿病を発症することが報告されている。しかし、ヒトにおいてもアディポネクチンアンチセンストランスジェニックマウスを用いた動物実験においてもアディポネクチンが低濃度であることは糖尿病や動脈硬化など生活習慣病のリスクを上げ、また、*in vitro* 実験でも炎症刺激と同時では効果が無いが、アディポネクチンで細胞を前処理するとその濃度が濃いほど、前処理時間が長いほど抗炎症作用が強く現れる。これらのことより恒常的にある濃度以上のアディポネクチンにさらされることにより組織や細胞になんらかの変化が起こっている可能性が高いと考え、また、これまでにこのような報告が無いことより本研究の構想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、アディポネクチンアンチセンストランスジェニックマウス、センストランスジェニックマウス、野生型マウスの表現型や遺伝子発現状態の網羅的解析を行い、易炎症性や抗炎症性をもたらしている違いを見つけ、アディポネクチン低値の集団の生活習慣病予防や炎症性疾患患者の治療に有用な情報を提供し、医薬品開発や治療戦略に貢献することを目的とした。

3. 研究の方法

アンチセンストランスジェニックマウスのこの未病状態を網羅的に解析することを目的に、アンチセンストランスジェニックマウス、センストランスジェニックマウス、野生型マウスの 8 週令と 15 週令の血漿、脂肪、肝臓、骨格筋のアミノ酸解析、血漿のサイトカイン解析、8 週令の肝臓と脂肪、15 週令の骨格筋で発現している遺伝子の GeneChip による解析、26 週令までの表現型解析として血算や尿検査、血清の生化学検査、ブドウ糖負荷試験、骨密度・体脂肪測定、脾臓細胞の FACS、26 週での剖検を行った。また、組織切片の HE 染色による形態や細胞サイズ、グリコーゲン染色や組織マクロファージなどの免疫染色による解析を行っている。

4. 研究成果

まず、アディポネクチン遺伝子とトランスジーン発現状況を確認した (図 2)。

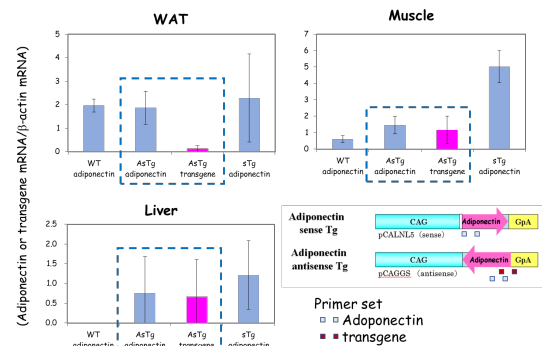


図 2 アディポネクチン遺伝子およびトランスジーン発現解析

もともとアディポネクチン遺伝子の発現量が多い脂肪組織では大きな違いが認められないが、肝臓や骨格筋ではトランスジーン発現が大きく影響し、センストランスジェニックマウスでは肝臓や骨格筋でのアディポネクチン発現が大きく増加していた。一方、アンチセンストランスジェニックマウスでは肝臓と骨格筋でトランスジーンのみが発現する状態になっており、特に骨格筋では野生型マウスで発現しているアディポネクチンをトランスジーンがほぼ完全に抑制していることが示唆される結果となった。

次に、各マウスの血中アディポネクチン濃度を測定したところ、図 3 に示すようにいずれのマウスでもメスはオスより血中濃度が

高く、予想通りセンストランスジェニックマウスはアンチセンストランスジェニックマウスや野生型マウスと比べて有意に血中濃度は高かった。一方、予想に反してアンチセンストランスジェニックマウスと野生型マウスの間に濃度の差は認められなかった。

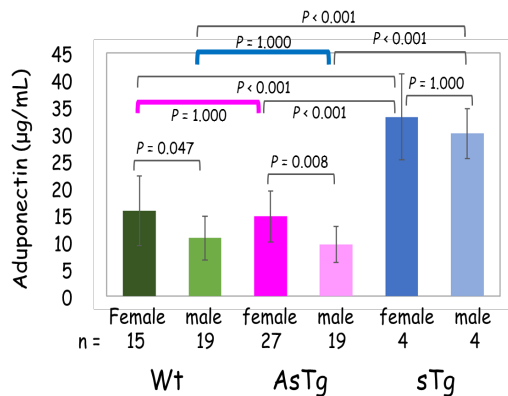


図3 血中アディポネクチン濃度

炎症モデルとして抗コラーゲン抗体を用いて関節リウマチを惹起したところ、図4に示すように、センストランスジェニックマウスでは炎症が重症化せず、野生型マウスでは炎症が収束してくるのに対してアンチセンストランスジェニックマウスでは炎症が遷延化することが分かった。このように野生型マウスとアンチセンストランスジェニックマウスでは炎症への応答が異なっており、血中濃度だけでは説明できない変化がアンチセンストランスジェニックマウスには起きていることが示唆された。

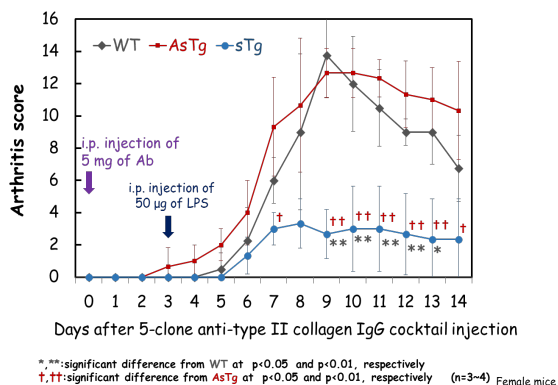


図4 関節リウマチモデルによる検討

恒常的に十分なアディポネクチン濃度下にある細胞の状況を把握するために、RAW264.5細胞を10µg/mL HMWアディポネクチン有り無しで48時間処理後のGeneChipアッセイを行った。HMW処理で劇的な変化は認められなかったが、ケモカインレセプターやIL-1などからのシグナル系、PLD4やAlox5など炎症性物質産生に関与する遺伝子の発現低下、CHOPなど転写を阻害する遺伝子、metallothionein 1や2、solute carrier family、IFNにより誘導される種々のタンパク、NosやPG合成系のPla2やPtgs、cAMPに

応答するCreb3やAtf3、NFkBの活性化を抑制するHSPなどが増加していた。これらの変化を踏まえて、ヒト血漿から精製したHMWアディポネクチンや、ヒトやマウスのCHO細胞での組換えアディポネクチン、球状ドメインのみのグロブリンアディポネクチンを用いて、前処理での変化、その後のLPS処理への応答について解析を行った。その結果、前処理無しではLPSに対する応答を抑制しないが、前処理4時間以上でLPSによるIL-1の発現を抑制すること、一方、これまで報告されているようなTNF-αの発現抑制は起こらないことが全てのアディポネクチン種で確認できた。アディポネクチンによる効果は、AKTのリン酸化(活性化)阻害によりAKTがGSK3をリン酸化(不活性化)できず、GSK3がC/EBPをリン酸化してC/EBPの核移行を阻害することにより、IL-1の発現が抑制されることによることが分かった。更に、AMPKをAICARで活性化してもこの抑制効果は認められないことや、PI3K阻害剤で抑制効果が認められること、アディポネクチン前処理でHSPが誘導されているにも関わらずNFkBの活性化阻害は起こらず、結果としてTNFの発現抑制は起こらないなど、アディポネクチン48時間処理による変化やこれまで報告されているAMPK経路、PI3K/PIP3経路では説明できないことが分かった。

そこで、当初の目的のアディポネクチンアンチセンストランスジェニックマウス、センストランスジェニックマウス、野生型マウスの表現型や遺伝子発現状態の網羅的解析を行うことにした。8週令と15週令の血漿、脂肪、肝臓、骨格筋のアミノ酸解析、血漿のサイトカイン解析、8週令の肝臓と脂肪、15週令の骨格筋で発現している遺伝子のGeneChipによる解析、26週令までの表現型解析として血液学的検査や尿検査、血清の生化学検査、ブドウ糖負荷試験、骨密度・体脂肪測定、脾臓細胞のFACS、26週での剖検を行った。脾臓細胞のFACS解析では、野生型マウスに比べてアンチセンストランスジェニックマウスではNKT細胞、CD4・CD8ダブルネガティブNKT、CD4・CD8ダブルネガティブT細胞が有意に多く、マージナルゾーンのB細胞が有意に少ないなど、各解析で違いが認められた。血液学的検査や尿検査、血中のアミノ酸やサイトカイン、生化学検査については数値的には差が有るように見えるものも有るが統計的に有意差が認められるものは極僅かであった。また、糖負荷試験や心電図、各種アディポカイン濃度にも差は認められなかった。一方、体脂肪測定では、アンチセンストランスジェニックマウスのメスでは組織周囲の脂肪量に違いは認められないが全身の脂肪重量や体重当たりの脂肪重量、脂肪率が高く、骨量が少ないことが分かった。一方、オスは体重当たりの筋肉量が少ない傾向(p=0.051)などがみられたがそれ以外は特に有意な違いは認められなかった。しかし、

遺伝子発現に関しては脂肪組織と骨格筋で大きな違いが認められた(図5)。センストランスジェニックマウスの脂肪組織でメス、オス共通に発現が2倍以上増えている遺伝子は303個あり、その内代謝に関わる遺伝子が49個、酸化還元に関わる遺伝子は38個、コレステロールに関わる遺伝子27個、TGやリポタンパク質関連が15個と一連の関連遺伝子がグループで増加していた。一方、共通で0.5倍未満に低下している遺伝子は34個で、細胞接着に関与する遺伝子が3個低下しているがグループでの動きは認められなかった。骨格筋でも多くの動きが認められているが、15週例のアンチセンストランスジェニックマウスオスで多くの大きな発現低下をしている遺伝子が認められた。オス、メス共通で0.5倍未満に低下している遺伝子は脂質の代謝や合成、酸化関連の遺伝子5個以外は関連のない遺伝子26個だったが、0.67倍未満に低下している遺伝子だと209個存在し、その内24個は代謝系、10個はグルコースの代謝や恒常性維持がらみの遺伝子グループだった。また、サーチン1も低下していた。KEGGパスウェイ解析ではPPARシグナル系としてPPARと糖新生や不飽和脂肪酸合成、酸化に関与する遺伝子が、また、接着分子系が5個低下していた。

多くの遺伝子の発現変動があり詳細な解析はまだだが、個々の遺伝子を解析してみると、15w令の骨格筋では短鎖脂肪酸の結合により炎症収束に働くFFAR2発現が低下していた。また、8w令のセンストランスジェニックマウス脂肪組織ではその発現の増加により脂肪蓄積が減少することが最近報告されたST6GAL1遺伝子の発現が増加しており、アンチセンストランスジェニックマウスでは低下していること、更に15w令のアンチセンストランスジェニックマウスの骨格筋でも減少しており、特にオスで大きく減少していることなど興味深い変化が起こっている。また、カロリー制限によりアンチセンストランスジェニックマウスの心筋でグリコーゲン量が有意に減ることを報告しているが、15w令のアンチセンストランスジェニックマウスではオス、メスともにグリコーゲンホスホリラーゼの発現は変化していないが、グリコーゲンシンターゼの発現が低下しており、グリコーゲン蓄積能が低いことが示唆された。これについては、今後各組織のグリコーゲン染色を行う予定である。

組織の解析など、まだ実施していない解析を行う必要が有るが、野生型と比較して同等の血中アディポネクチンが存在しているアンチセンストランスジェニックマウスは正常に見えても易炎症状態で、この未病状態では、代謝が低下していて、グリコーゲンなどのエネルギー物質の蓄積にも問題があり、必要な時にATPなどの産生ができない状態であることが示唆された。

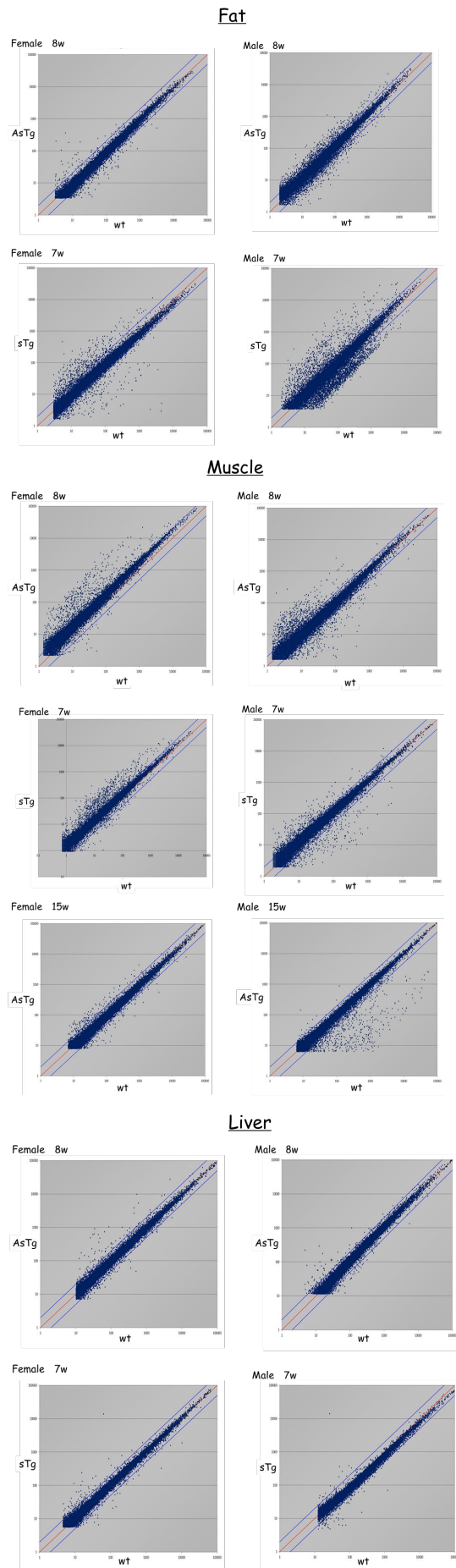


図5 脂肪組織、骨格筋、肝臓の遺伝子発現

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)

Omori Y, Suzuki H, Saito K, Shoji M, Iso Y, Negoro T, Koba S, Nakano Y, Kobayashi Y, Higher Adiponectin Expression Suppresses Neointimal Hyperplasia by Attenuating the Inflammatory Response Following Acceleration of Endothelialization in Damaged Areas in Adiponectin Transgenic Mice, *Showa Univ J Med Sci*, 査読有、2017;29 (2):107-117 DOI: 10.15369/sujms.29.107

吉澤徹、山田浩樹、堀内健太郎、中原正雄、谷将之、高山悠子、岩波明、加藤進昌、蜂須貢、山本俊憲、三村将、中野泰子、非定型抗精神病薬による肥満および糖尿病発症リスクの特定、予測に関する研究、*昭和学術誌*、査読有、第76巻第4号 450-468、2016

<http://doi.org/10.14930/jshowaunivsoc.76.459>

Hiromura M, Mori Y, Kohashi K, Terasaki M, Shinmura K, Negoro T, Kawashima H, Kogure M, Wachi T, Watanabe R, Sato K, Kushima H, Tomoyasu M, Nakano Y, Yamada Y, Watanabe T, Tsutomu T, Suppressive Effects of Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide on Cardiac Hypertrophy and Fibrosis in Angiotensin II-Infused Mouse Models, *Circ J*, 査読有、2016; 80(9):1988-97 DOI: 10.1253/circj.CJ-16-0152.

中野泰子、平野勉、芳野原、菅沼理恵、土岐彰、都島基夫、バイオマーカーとしてのアディポネクチン、*昭和学術誌*、査読有、2015 75(3) 256-265 総説 <https://doi.org/10.14930/jshowaunivsoc.75.256>

Negoro T, Shimizu S, Narushima M, Banham AH, Wakabayashi H, Takayanagi R, Hagiwara T, Roncador G, Osabe T, Yanai T, Kin M, Ikeda K, Endo A, Akiyama H, Nakano Y, Elevated receptor for activated C kinase 1 expression is involved in intracellular Ca²⁺ influx and potentially associated with compromised regulatory T cell function in patients with asthma, *Clin Exp Allergy*, 査読、2014;44 (9): 1154-1169 DOI: 10.1111/cea.12375

〔学会発表〕(計5件)

中野泰子、秋山晴代、目加田和之、若菜茂晴、齋藤清美、巖本三壽、吉木淳、根来孝治、アディポネクチンアンチセンス、センストランスジェニックマウスの表現型解析、第89回日本生化学会大会、2016年9月25-27日仙台

秋山晴代、長部隆広、根来孝治、荒木真由美、瀬戸山央、青木信義、渡邊裕子、甲斐茂美、中野泰子、宮澤真紀、易炎症性マウスを用いた未病に關与するターゲット因子の探索、日本薬学会第136年会、2016年3月26-29日横浜

Toshihiro Tanioka, Yoshinao Tainaga, Michiyo Yamada, Yuuri Kamimura, Mariko Suzuki, Saori Takatori, Masahiro Tateno, Mami Matsumoto, Yasuko Nakano, HMW Adiponectin Suppresses LPS-Induced IL-1b Expression through Inhibiting Akt-C/EBPb Inflammatory Signaling in RAW 264.7 Macrophage, The 12th World Congress on Inflammation, Boston, Massachusetts, USA, August 8-12, 2015

谷岡利裕、躰長義直、山田倫世、根来孝治、中野泰子、アディポネクチンによる炎症性サイトカイン抑制作用の解析、第35回日本炎症・再生医学会、沖縄 2014年7月1-4日

Tanioka T, Tainaga Y, Yamada Y, Negoro T, Nakano Y, Adiponectin preferentially inhibit LPS-induced IL-1b expression on macrophage, The 22nd International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages, Kobe, Japan, June 1-3, 2014

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.hamayaku.jp/teacher/te_183.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

中野 泰子 (NAKANO, Yasuko)
横浜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：20155790

(2)研究分担者

根来 孝治 (NEGORO, Takaharu)
帝京平成大学・薬学部・教授
研究者番号：70218270

(3)連携研究者

谷岡 利裕 (TANIOKA, Toshihiro)
昭和大学・薬学部・助教*
研究者番号：80360585

*連携研究者だった期間は助教だったが、
平成 28 年度より講師、平成 30 年度より准
教授。

(4)研究協力者