

「生物の発生・分化・再生」
平成13年度採択研究代表者

門脇 孝

(東京大学大学院医学系研究科 糖尿病・代謝内科 助教授)

「脂肪細胞の分化・形質転換とその制御」

1. 研究実施の概要

本研究のねらいは、脂肪細胞の分化、肥大化・形質転換の分子メカニズムを明らかにし、それを制御する方法を開発することである。これまで、脂肪細胞特異的蛋白であるアディポネクチンが主に骨格筋において脂肪酸燃焼に関わる遺伝子の発現を上昇させることによりインスリン抵抗性を改善することを明らかにした。更にアディポネクチンはインスリン抵抗性を改善するのみならず、動脈硬化を直接抑制し、アディポネクチンの作用を増強する薬剤は抗糖尿病・抗動脈硬化の根本的治療法となり得ることを個体レベルで初めて明らかにした。脂肪細胞形質転換のメカニズムとしてはCBP欠損マウスの解析により、脂肪細胞の肥大化にはPPAR γ に依存した経路とPPAR γ に依存しない経路の2つの経路があることを明らかにした。今後は本研究を更に進展させて脂肪細胞の分化・形質転換のメカニズムの全体像を解明し、それを制御することによる根本的な治療法を開発し、活力ある長寿社会の実現に貢献したい。既に骨格筋および肝臓に高発現するアディポネクチンの受容体を2種類同定しており、今後はアディポネクチン受容体の単離同定、アディポネクチンの細胞内情報伝達機構の解明、アディポネクチンの転写制御機構、分泌機構、プロセッシング機構などを明らかにして、脂肪細胞の形質転換の分子メカニズムの全体像を解明していきたい。

2. 研究実施内容

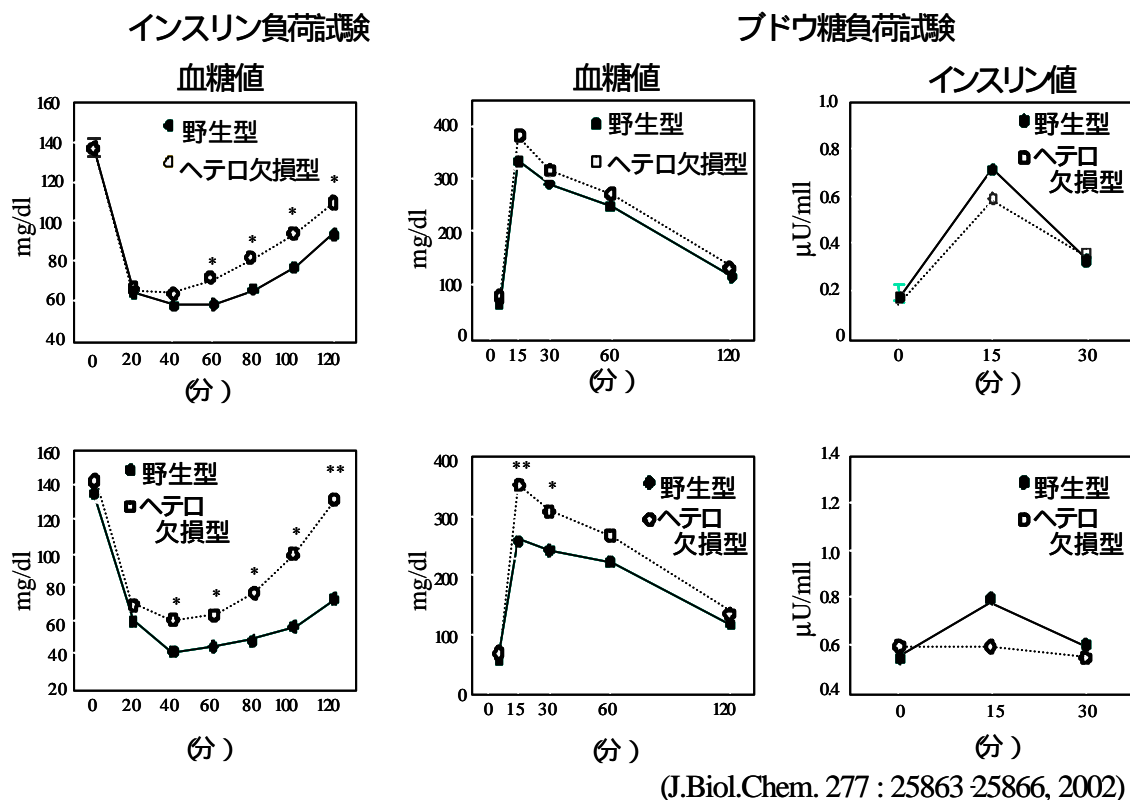
① 脂肪細胞肥大化・形質転換のメカニズム解明

(1) 脂肪細胞肥大化・形質転換の新規経路の探索

脂肪細胞肥大化・形質転換の新規経路を同定するために種々の転写因子の共役因子CBP(cAMP response element binding protein (CREB) binding protein)ヘテロ欠損マウスの表現型を詳細に解析した。抗肥満・抗糖尿病の表現型が先に作製した高脂肪食による脂肪細胞肥大化の程度が抑制されインスリン抵抗性が軽度であったPPAR γ ヘテロ欠損マウスと比較しても強く認められたことから、高脂肪食による脂肪細胞肥大化・インスリン抵抗性の惹起にはPPAR γ 依存性・非依存性の両方の情報伝達経路が存在することを明らかにした(*Nature Genetics* 30:221-226, 2002; 特許出願中)。

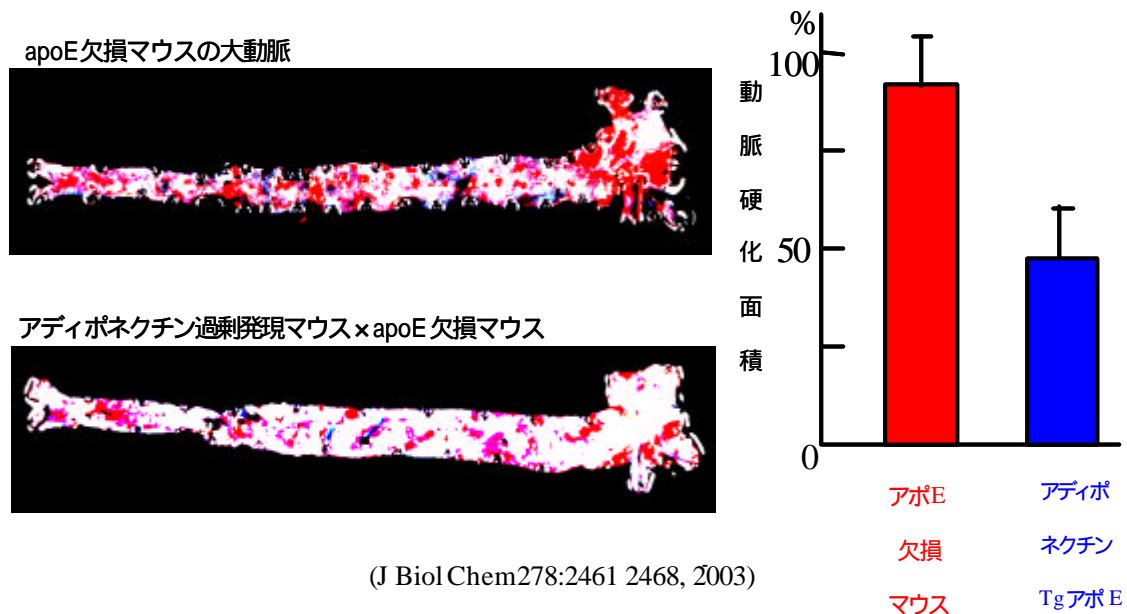
(2) 個体レベルでのアディポネクチン作用の解明

アディポネクチンの機能を個体レベルで解明するために、発生工学的手法を用いてアディポネクチン欠損マウスを作製・解析した。アディポネクチンヘテロ欠損マウスは軽度のインスリン抵抗性をホモ欠損マウスは中等度のインスリン抵抗性と耐糖能障害を呈したことから、アディポネクチンが実際にインスリン感受性ホルモンであることを個体レベルで実証した(*J. Biol. Chem.* 277: 25863-25866, 2002) (図1)。



(*J. Biol. Chem.* 277 : 25863-25866, 2002)

(図1) アディポネクチン欠損マウスはインスリン抵抗性を呈する。



(図2) アディポネクチンは直接抗動脈硬化作用を有する。

(3) アディポネクチンの作用メカニズムの解明

アディポネクチンの細胞内情報伝達経路を解明するために、アディポネクチンを糖尿病のモデル動物に投与し、各臓器毎にどのような遺伝子発現の変化を来たすかを詳細に検討した。アディポネクチンは運動によるエネルギー消費促進を媒介するAMPキナーゼを活性化して作用することを初めて明らかにした (*Nature Medicine* 8: 1288-1295, 2002)。

(4) アディポネクチンによる直接的抗動脈硬化作用の発見

アディポネクチンの抗動脈硬化作用がインスリン抵抗性改善作用によってほぼ説明可能であるのか、それとも直接的な作用があるのかを解明するために、アディポネクチン過剰発現マウスと動脈硬化モデル動物ApoE欠損マウスの交配動物を作製しアディポネクチンが動脈硬化に与える影響を個体レベルで検討した。アディポネクチンが直接あるいは間接的に抗動脈硬化作用を有することをはじめて個体レベルで明らかにした (*J. Biol. Chem.* 278: 2461-2468, 2003) (図2)。

(5) アディポネクチン受容体の単離同定

発現クローニングによってアディポネクチンと細胞膜で特異的に結合し骨格筋、肝臓、マクロファージで高発現している2種類のアディポネクチン受容体を同定した (*Nature*, in press, 2003)。蛋白の構造上7回膜貫通ドメインを持っているが通常のG蛋白共役型受容体とトポロジーが逆で、新規の受容体ファミリーである可能性がある。

② 脂肪細胞分化のメカニズム解明

(1) 脂肪細胞分化においてIRS-1/IRS-2によって活性化されるPI3キナーゼの下流のエフェクター分子Akt, PKC λ は脂肪細胞分化に対しては両方重要な役割を果たすが、アディポネクチンの発現・分泌調節作用においてはAktだけが重要な役割を果たすことを用いて明らかにした。

- (2) 脂肪細胞分化においては脂肪合成等に重要な役割を果たすSREBPの活性化酵素S1Pが重要な役割を果たすことを特異的な阻害剤を開発して明らかにした。

3. 研究実施体制

門脇グループ

- ① 研究分担グループ長：門脇 孝（東京大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝内科、助教授）
- ② 研究項目：
 1. 脂肪細胞肥大化・形質転換のメカニズム解明
 - (1) アディポネクチン分泌・活性化機構の解明
アディポネクチンを切断し活性化型であるglobular型アディポネクチンが産生されるメカニズムを解明する。
 - (2) 脂肪細胞由来のインスリン感受性ホルモン・インスリン抵抗性惹起因子探索
脂肪細胞肥大化・形質転換のモデル動物のDNAチップ解析を行い、脂肪細胞肥大化・形質転換に関与する新規の遺伝子・情報伝達経路を網羅的に同定する。機能について順次発生工学的手法を用いた遺伝子改変動物の作製によって検討し、遺伝子組み換え蛋白を用いた投与実験を行って新規インスリン感受性ホルモン及びインスリン抵抗性惹起因子を同定する。
 - (3) 脂肪細胞形質転換のメカニズム解明（PPAR γ 非依存性の脂肪蓄積・インスリン感受性制御パスウェイの探索）CBPヘテロ欠損マウス、PPAR γ ヘテロ欠損マウス及び野生型マウスの骨格筋や肝臓、脂肪組織におけるDNAチップを用いた遺伝子発現パターンの網羅的解析により、PPAR γ 非依存性の新規の脂肪蓄積、インスリン感受性調節経路の探索を行う。
 2. 脂肪細胞分化のメカニズム解明（PPAR γ ホモ欠損マウスを用いた新規転写カスケードの探索）
PPAR γ ホモ欠損細胞と野生型マウス由来の細胞の脂肪細胞への分化誘導後の遺伝子の発現パターンの違いを経時的にDNAチップを用いて比較検討することにより、脂肪細胞分化の転写カスケードにおいてPPAR γ より上流に位置する遺伝子群、PPAR γ 発現誘導以降に発現してくるPPAR γ 依存性、及び非依存性の遺伝子群を系統的網羅的に明らかにする。

福山グループ

- ① 研究分担グループ長：福山 透（東京大学大学院薬学系研究科天然物合成化学、教授）
- ② 研究項目：脂肪細胞分化のメカニズム解明：in vivoにおいて最も脂肪細胞分化が活発に行われていると思われる生後数日以内のマウスより、脂肪細胞肥大を惹起しない内因性リガンドを精製し、High MSによる分子量の決定、MS/MSによる構造の推定を行う。

岩倉グループ

- ① 研究分担グループ長：岩倉 洋一郎（東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター・細胞機能研究分野、教授）
- ② 研究項目：脂肪細胞肥大化・形質転換のメカニズム解明：時間的・空間的特異的遺伝子欠損システムを用いたPPAR γ 依存性の脂肪細胞形質転換のメカニズム解明：脂肪組織特異的にPPAR γ を欠損させて、脂肪細胞形質転換抑制の表現型を解析すると共に、DNAチップを用いて系統的・網羅的にメカニズムを明らかにする。

赤沼グループ

- ① 研究分担グループ長：（財）朝日生命糖尿病研究所、所長
- ② 研究項目：脂肪細胞肥大化・形質転換のメカニズム解明：肥満によってアディポネクチンの転写が抑制されるメカニズムを、アディポネクチン遺伝子プロモーター領域に結合しアディポネクチンの転写を調節する転写因子を同定することによって明らかにする。

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

- Kadowaki T, Hara K, Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Yamauchi T, Eto K, Kadowaki H, Noda M, Hagura R, Akanuma Y: The role of PPAR γ in high-fat diet-induced obesity and insulin resistance.
J Diabetes Complications 16: 41-45, 2002
- Eto K, Yamashita T, Tsubamoto Y, Terauchi Y, Hirose K, Kubota N, Yamashita S, Taka J, Satoh S, Sekihara H, Tobe K, Iino M, Noda M, Kimura S, Kadowaki T: Phosphatidylinositol 3-kinase suppresses glucose-stimulated insulin secretion by affecting post-cytosolic [Ca²⁺] elevation signals.
Diabetes 51: 87-97, 2002
- Kuzuya T, Nakagawa S, Satoh J, Kanazawa Y, Iwamoto Y, Kobayashi M, Nanjo K, Sasaki A, Seino Y, Ito C, Shima K, Nonaka K, Kadowaki T: Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. The committee of Japan Diabetes Society on the diagnostic criteria of diabetes mellitus.
Diabetes Res. Clin. Pract. 55: 65-85, 2002
- Takahashi N, Nemoto T, Kimura R, Tachikawa A, Miwa A, Okado H, Miyashita Y, Iino M, Kadowaki T, Kasai H: Two-photon excitation imaging of pancreatic islet with various fluorescent probes.
Diabetes 51 (Suppl 1) : S25-S28, 2002
- Yamauchi T, Oike Y, Kamon J, Waki H, Komeda K, Tsuchida A, Date Y, Li MX, Miki H, Akanuma Y, Nagai R, Kimura S, Saheki T, Nakazato M, Naitoh T,

Yamamura K, Kadowaki T: Increased insulin sensitivity despite lipodystrophy in Crebbp heterozygous mice.

Nature Genetics 30: 221-226, 2002

- Hara K, Boutin P, Mori Y, Tobe K, Dina C, Yasuda K, Yamauchi T, Otabe S, Okada T, Eto K, Kadowaki H, Hagura R, Akanuma Y, Yazaki Y, Nagai R, Taniyama M, Matsubara K, Yoda M, Nakano Y, Tomita M, Kimura S, Ito C, Froguel P, Kadowaki T: Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population.

Diabetes 51: 536-540, 2002

- Mori Y, Otabe S, Dina C, Yasuda K, Populaire C, Lecoœur C, Vatin V, Durand E, Hara K, Okada T, Tobe K, Boutin P, Kadowaki T, Froguel P: Genome-wide search for type 2 diabetes in Japanese affected sib-pairs confirms susceptibility genes on 3q, 15q, and 20q and identifies two new candidate loci on 7p and 11p.

Diabetes 51: 1247-1255, 2002

- Asakawa M, Takano H, Nagai T, Uozumi H, Hasegawa H, Kunota N, Saito T, Masuda Y, Kadowaki T, Komuro I: PPAR γ plays a critical role in inhibition of cardiac hypertrophy in vitro and in vivo.

Circulation 105: 1240-1246, 2002

- Fukao T, Yamada T, Tanabe M, Terauchi Y, Ota T, Takayama T, Asano T, Takeuchi T, Kadowaki T, Hata J, Koyasu S: Selective loss of gastrointestinal mast cells and impaired immunity to intestinal parasites in PI3K-deficient mice.

Nature Immunology 3: 295-304, 2002

- Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M, Matsui J, Eto K, Yamashita T, Kamon J, Satoh H, Yano W, Froguel P, Nagai R, Kimura S, Kadowaki T, Noda T: Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation.

J. Biol. Chem. 277: 25863-25866, 2002

- 11. Hara K, Tobe K, Okada T, Kadowaki H, Akanuma Y, Ito C, Kimura S, Kadowaki T: A genetic variation in the *PGC-1* gene could confer insulin resistance and susceptibility to Type II diabetes.

Diabetologia 45: 740-743, 2002

- 12. Terauchi Y, Kadowaki T: Insights into molecular pathogenesis of type 2 diabetes from knockout mouse models.

Endocrine J. 49: 247-263, 2002

- Shindo T, Manabe I, Fukushima Y, Tobe K, Aizawa K, Miyamoto S, Kawai-Kowase K, Moriyama N, Imai Y, Kawakami H, Nishimatsu H, Ishikawa T, Suzuki T, Morita H, Maemura K, Sata M, Hirata Y, Komukai M, Kagechika H, Kadowaki T, Kurabayashi

M, Nagai R: Krüppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling.

Nature Medicine 8: 856–863, 2002

- Takahashi N, Kishimoto T, Nemoto T, Kadowaki T, Kasai H: Fusion pore dynamics and insulin granule exocytosis in the pancreatic islet.

Science 297: 1349–1352, 2002

- Saubermann L J, Nakajima A, Wada K, Zhao S, Terauchi Y, Kadowaki T, Aburatani H, Matsushashi N, Nagai R, Blumberg RS: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist ligands stimulate a Th2 cytokine response and prevent acute colitis.

Inflamm. Bowel Dis. 8: 330–339, 2002

- Vasseur F, Helbecque N, Dina C, Lobbens S, Delannoy V, Gaget S, Boutin P, Vaxillaire M, Leprêtre F, Dupont S, Hara K, Clément K, Bihain B, Kadowaki T, Froguel P: Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the *APM1* gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians.

Hum. Mol. Genet. 11: 2607–2614, 2002

- Eto K, Yamashita T, Matsui J, Terauchi Y, Noda M, Kadowaki T: Genetic manipulations of fatty acid metabolism in β -cells are associated with dysregulated insulin secretion.

Diabetes 51: S414–S420, 2002

- Yamakoshi Y, Fukasawa H, Yamauchi T, Waki H, Kadowaki T, Shudo K, Kagechika H: Determination of endogenous levels of retinoic acid isomers in type II diabetes mellitus patients. Possible correlation with HbA1c values.

Biol. Pharm. Bull. 25: 1268–1271, 2002

- Colombo C, Cutson JJ, Yamauchi T, Vinson C, Kadowaki T, Gavrilova O, Reitman ML: Transplantation of adipose tissue lacking leptin is unable to reverse the metabolic abnormalities associated with lipoatrophy.

Diabetes 51: 2727–2733, 2002

- Noda M, Yamashita S, Takahashi N, Eto K, Shen LM, Izumi K, Daniel S, Tsubamoto Y, Nemoto T, Iino M, Kasai H, Sharp G, Kadowaki T: Switch to anaerobic glucose metabolism with NADH accumulation in the β -cell model of mitochondrial diabetes. Characteristics of β -HC9 cells deficient in mitochondrial DNA transcription.

J. Biol. Chem. 277: 41817–41826, 2002

- Fukao T, Tanabe M, Terauchi Y, Ota T, Matsuda S, Asano T, Kadowaki T, Takeuchi T, Koyasu S: PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs.
Nature Immunology 3: 875-881, 2002
- Shiojiri T, Wada K, Nakajima A, Katayama K, Shibuya A, Kudo C, Kadowaki T, Mayumi T, Yura Y, Kamisaki Y: PPAR γ ligands inhibit nitrotyrosine formation and inflammatory mediator expressions in adjuvant-induced rheumatoid arthritis mice.
Eur. J. Pharmacol. 448: 231-238, 2002
- Shibuya A, Wada K, Nakajima A, Saeki M, Katayama K, Mayumi T, Kadowaki T, Niwa H, Kamisaki Y: Nitration of PPAR γ inhibits ligand-dependent translocation into nucleus in a macrophage-like cell line, RAW 264.
FEBS Lett. 525: 43-47, 2002
- Hara K, Noda M, Waki H, Tobe K, Yamauchi T, Kadowaki H, Satou H, Tsukamoto K, Nagamatsu S, Yamagata K, Matsuzawa Y, Akanuma Y, Kimura S, Kadowaki T: Maturity-onset diabetes of the young resulting from a novel mutation in the HNF-4 α gene.
Intern. Med. 41: 848-852, 2002
- Hasegawa M, Yan Tang, Osawa H, Onuma H, Nishimiya T, Ochi M, Terauchi Y, Kadowaki T, Makino H: Differential regulation of gene expression and insulin-induced activation of phosphodiesterase 3B in adipocytes of lean insulin-resistant IRS-1 (-/-) mice.
Diab. Res. Clin. Pract. 58: 79-85, 2002
- Nakano K, Takeo T, Sato T, Suga S, Eto K, Kadowaki T, Wakui M: Role of mitochondrial NADH shuttle system in acute amylase secretion by acetylcholine from mouse pancreatic acinar cells.
Tohoku J. Exp. Med. 198: 151-162, 2002
- Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T: Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase.
Nature Medicine 8: 1288-1295, 2002
- Akune T, Ogata N, Hoshi K, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Takagi H, Azuma Y, Kadowaki T, Nakamura K, Kawaguchi H: Insulin receptor substrate-2 maintains predominance of anabolic function over catabolic function of osteoblasts.
J. Cell Biol. 159 : 147-156, 2002

- Kaburagi Y, Satoh S, Yamamoto-Honda R, Itoh Y, Akanuma Y, Sekihara H, Yasuda K, Sasazuki T, Kadowaki T, Yazaki Y: Protection of insulin receptor substrate-3 from staurosporine-induced apoptosis.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 300:371-377, 2003
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimozawa N, Hioki K, Uchida S, Ito Y, Matsui J, Eto K, Komeda K, Tsunoda M, Murakami K, Ohnishi Y, Yamamura K, Ueyama Y, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T: Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and apoE deficient mice from atherosclerosis.
J. Biol. Chem. 278: 2461-2468, 2003
- Tobe K, Asai S, Matsuoka K, Yamamoto T, Chida K, Kaburagi Y, Akanuma Y, Kuroki T, Takenawa T, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T: Cytoskeletal reorganization induced by insulin: involvement of Grb2/Ash, Ras and phosphatidylinositol 3-kinase signalling.
Gene to Cells 8: 29-40, 2003
- Terauchi Y, Matsui J, Suzuki R, Kubota N, Komeda K, Aizawa S, Eto K, Kimura S, Nagai R, Tobe K, Lienhard GE, Kadowaki T: Impact of genetic background and ablation of insulin receptor substrate (IRS)-3 on IRS-2 knock-out mice.
J. Biol. Chem. 278: 14284-14290, 2003
- Isogawa A, Noda M, Takahashi Y, Kadowaki T, Tsugane S: Correspondence to "Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus."
Lancet 361: 702-704, 2003
- Suzawa M, Takada I, Yanagisawa J, Ohtake F, Ogawa S, Yamauchi T, Kadowaki T, Takeuchi Y, Shibuya H, Gotoh Y, Matsumoto K, Kato S: Suppressive cytokine actions in adipogenesis and PPAR α function through the TAK1/TAB1-NIK cascade.
Nature Cell Biology 5: 224-230, 2003
- Suzuki H, Matsuda S, Terauchi Y, Fujiwara M, Ohteki T, Asano T, Behrens TW, Kouro T, Takatsu K, Kadowaki T, Koyasu S: PI3K and Btk differentially regulate B cell antigen receptor-mediated signal transduction.
Nature Immunology 4:280-286, 2003
- Suzuki S, Oka Y, Kadowaki T, Kanatsuka A, Kuzuya T, Kobayashi M, Sanke T, Seino Y, Nanjo K: Clinical characteristics of diabetes mellitus with mitochondrial DNA 3243 (A-G) mutations in Japan: Nationwide cross-sectional case-finding study.
Diab. Res. Clin. Pract. 59:2207-217, 2003
- Populaire C, Mori Y, Dina C, Vasseur M, Vaxillaire T, Kadowaki T, Froguel P: Does the - 11377 promoter variant of APM1 gene contribute to the genetic risk

for Type 2 diabetes mellitus in Japanese families?

Diabetologia 46: 443-445, 2003

- Ogura T, Osawa H, Tang Y, Onuma H, Ochi M, Nishimiya T, Kubota N, Terauchi Y, Kadowaki T, Makino H: Reduction of phosphodiesterase 3B gene expression in peroxisome proliferator-activated receptor gamma (+/-) mice independent of adipocyte size.

FEBS Lett. 542: 65-68, 2003

- Katayama K, Wada K, Nakajima A, Yoshida S, Mizuguchi H, Hayakawa T, Nakagawa S, Kadowaki T, Nagai R, Kamisaki Y, Blumberg RS, Mayumi T: A novel PPAR α -gene therapy to control inflammation associated with inflammatory bowel disease in a murine model.

Gastroenterology 124:1315-1324, 2003

- Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T: Molecular cloning of adiponectin / Acrp30 receptors that mediate antidiabetic metabolic effects.

Nature, in press, 2003

(2) 特許出願

平成14年度特許出願件数 6件 (研究期間累積件数 7件)