

「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 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

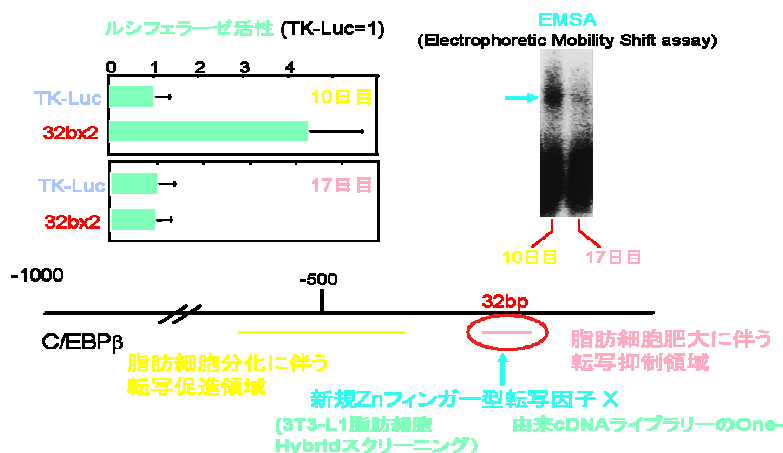
脂肪細胞由来のホルモンでインスリン感受性物質であるアディポネクチンの特異的な受容体を世界で初めて単離・同定することに成功した。画こと、脂肪酸燃焼に関わる遺伝子の発現を上昇させることによりインスリン抵抗性を改善することを明らかにした。本研究のねらいは、脂肪細胞の分化、肥大化・形質転換の分子メカニズムを明らかにし、それを制御する方法を開発することである。我々は肥満に伴って脂肪細胞由来のホルモン、アディポネクチンの発現・分泌が低下することが糖尿病や心血管病の根本的な原因であることを明らかにしてきた。本年度の研究によって、この抗糖尿病・抗動脈硬化ホルモンであるアディポネクチンの特異的な受容体 (AdipoR1並びにAdipoR2) を世界に先駆けて単離・同定することに成功した。更にAdipoR1, AdipoR2がインスリン→PI3キナーゼ→Foxo1という細胞内情報伝達経路によって調節されていることを明らかにした。また、肥満によるアディポネクチン発現レベルの低下に極めて大きな役割を担っており「脂肪細胞の形質転換の鍵分子」とも言える新規の転写因子を同定することに成功した。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。

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

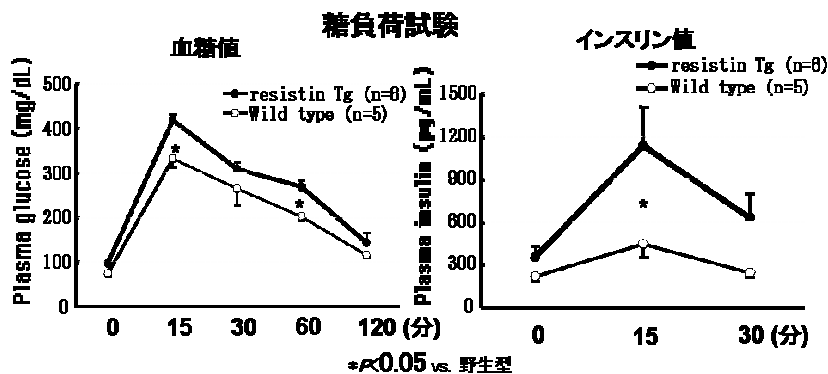
(1) アディポネクチン分泌・活性化機構の解明

肥満で低下するアディプシンと、アディポネクチン遺伝子の肥満による転写抑制に関わるプロモーター領域の共通配列をプローブとしてマウス3T3L1由来のcDNAライブラリーからone hybrid法を利用し、肥満によるアディポネクチン転写抑制に重要な役割を担っている新規のZnフィンガー転写因子Xを単離・同定することに成功した。更にdeletion mutantの転写活性化能を解析することにより、肥満においてアディポネクチンの転写を抑制する転写因子結合部位をアディポネクチン遺伝子プロモーター領域にマップすることに成功した (図1)。



(図1) 脂肪細胞肥大に伴うアディポネクチン発現低下と関連する新規 Znフィンガー型転写因子の同定

(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の探索と機能解析：脂肪細胞由来レジスチンの過剰発現マウスを作製・解析したところ、血糖値、インスリン値は下記の様に野生型に比して高く、レジスチンがインスリン抵抗性惹起因子であり生活習慣病発症に重要な役割を担っていることを個体レベルで明らかにした(図2)。

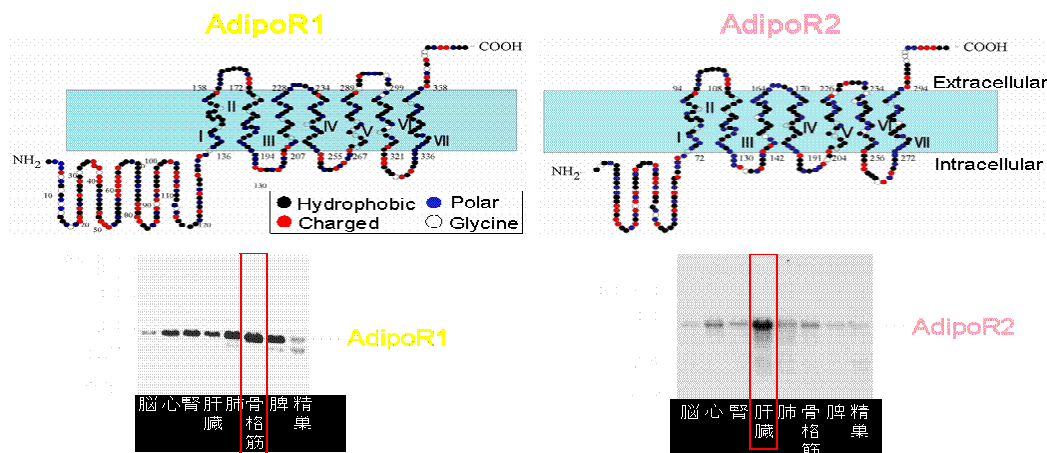


(図2) 脂肪細胞由来レジスチンはインスリン抵抗性物質である

(3) アディポネクチンの作用メカニズムの解明

(a) アディポネクチン受容体の同定：アディポネクチンとの特異的結合を指標にアディポネクチン受容体(AdipoR)1と2をクローニングした(*Nature* 423: 762-769, 2003)。AdipoR1は骨格筋に多く発現が認められたのに対し、AdipoR2は肝臓に多く発現が認められた。AdipoR1と2は7回膜貫通型の構造を有すると考えられるが、既知のGプロテイン共役型受容体ファミリーとは構造的・機能的に異なったファミリーに属するものと考えられた(図3)。AdipoR1もしくはAdipoR2の培養細胞への発現は、globularアディポネクチン及び全長アディポネクチンの特異的結合を増加させ、アディポネクチンによるAMPキナーゼ、及びPPAR αの活性化を増強し、脂肪酸燃焼促進を増強した。逆に

siRNAを用いて内因性AdipoR1もしくはR2の発現レベルを低下させると、globularアディポネクチン及び全長アディポネクチンの特異的結合が減少し、アディポネクチンによる脂肪酸燃焼や糖取り込み促進効果が減弱することを明らかにした。



(図3) アディポネクチン受容体AdipoR1及びAdipoR2はN末側が細胞内に、C末側が細胞外に存在する7回膜貫通型蛋白と予測される (*Nature* 423 : 762-768, 2003)

(b) アディポネクチン受容体の機能解析 : 世界に先駆けて同定したアディポネクチンの受容体 (*Nature* 423: 762-769, 2003) の発現をRNAiを用いて低下させると、globularアディポネクチン及び全長アディポネクチンの特異的結合が減少し、アディポネクチンによる脂肪酸燃焼や糖取り込み促進効果が減弱することを明らかにした。

(c) アディポネクチン受容体の発現解析 : インスリン→PI3キナーゼ→Foxo1の細胞内情報伝達経路によりAdipoR1並びにAdipoR2の発現が減少すること、インスリン抵抗性の状態ではアディポネクチン作用が低下することによって生活習慣病を発症・進展させていることを明らかにした (*J. Biol. Chem.* online Apr 29, 2004) (図4)。

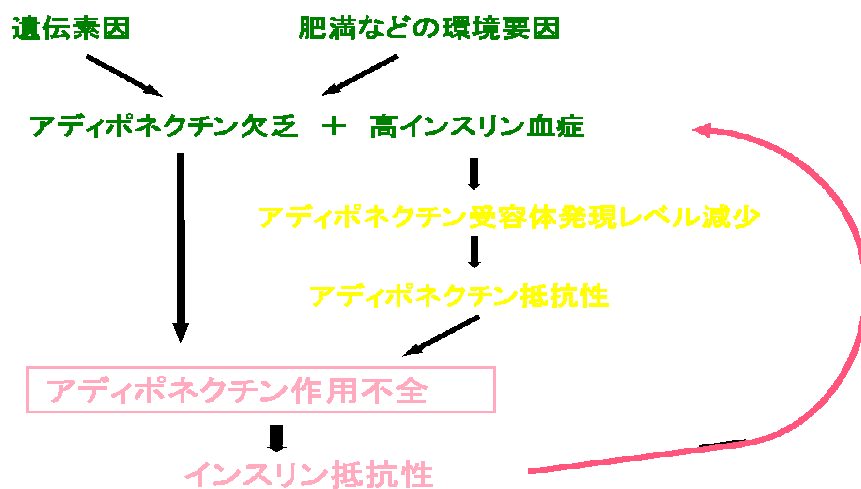


図4. アディポネクチン受容体発現とインスリン抵抗性

(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)。

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

(1) 研究チームの構成

門脇グループ (門脇 孝) 東京大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝内科

研究実施項目：

1. 脂肪細胞肥大化・形質転換のメカニズム解明
2. 脂肪細胞分化のメカニズム解明

概要：

1. 脂肪細胞肥大化・形質転換のメカニズム解明

●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の探索

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。

●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のパスウェイの探索を行う。

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 (福山 透) 東京大学大学院薬学系研究科天然物合成化学

研究実施項目：

2. 脂肪細胞分化のメカニズム解明

概要：

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 (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

研究実施項目：

1. 脂肪細胞肥大化・形質転換のメカニズム解明

概要：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 (赤沼 安夫) (財)朝日生命糖尿病研究所

研究実施項目：

1. 脂肪細胞肥大化・形質転換のメカニズム解明

概要：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

- 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
- 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 γ 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: 207-217, 2003
- Populaire C, Mori Y, Dina C, Vasseur F, Vaxillaire M, 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 γ (+/-) mice independent of adipocyte size. *FEBS Lett.* 545-68, 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 γ -gene therapy to control inflammation associated with inflammatory bowel disease in a murine model. *Gastroenterology* 124:1315-1324, 2003
- Glassford J, Soeiro I, Skarell SM, Banerji L, Holman M, Klaus GGB., Kadowaki T, Koyasu S, Lam EWF: BCR targets cyclin D2 via Btk and the p85 α subunit of PI3-K to induce cell cycle progression in primary mouse β

cells. *Oncogene* 22:2248-29, 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* 423: 762-769, 2003
- Yamauchi T, Kadowaki T: The mechanisms by which adiponectin exerts its biological effects. *Clin. Pediatr. Endocrinol.* 12(Suppl 19): 23-28, 2003
- Abe M, Sata M, Nishimatsu H, Nagata D, Suzuki E, Terauchi Y, Kadowaki T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, Hirata Y, Nagai R: Adrenomedullin augments collateral development in response to acute ischemia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306:10-15, 2003
- Watanabe N, Nakajima H, Suzuki H, Oda A, Matsubara Y, Moroi M, Terauchi Y, Kadowaki T, Suzuki H, Koyasu S, Ikeda Y, Handa M: Functional phenotype of phosphoinositide 3-kinase p85 α null platelets characterized by an impaired response to GP VI stimulation. *Blood* 104:1-548, 2003
- Hara K, Ohe K, Kadowaki T, Kato N, Imai Y, Tokunaga K, Nagai R, Omata M: Establishment of a method of anonymization of DNA samples in genetic research. *J. Hum. Genet.* 48: 327-330, 2003
- Kubota T, Kubota N, Mori M, Terauchi Y, Kobayashi K, Suzuki R, Tobe K, Namiki A, Aizawa S, Nagai R, Kadowaki T, Yamaguchi T: Lack of insulin receptor substrate-2 causes progressive neointima formation in response to vessel injury. *Circulation* 107: 3073-3080, 2003
- Osawa E, Nakajima A, Wada K, Ishimine S, Fujisawa N, Kawamori T, Matsushita N, Kadowaki T, Ochiai M, Sekihara H, Nakagama H: Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands suppress colon carcinogenesis induced by azoxymethane in mice. *Gastroenterology* 124: 361-367, 2003
- Eto K, Yamashita T, Hirose K, Tsubamoto T, Ainscow EK, Rutter GA, Kimura S, Noda M, Iino M, Kadowaki T: Glucose metabolism and glutamate analog acutely alkalinize pH of insulin secretory vesicles of pancreatic β cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285: 2-271, 2003
- Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, Hara K, Hada Y, Vasseur F, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T: Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes: Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J. Biol. Chem.*

278: 40352-40363, 2003

- Suzuki R, Tobe K, Terauchi Y, Komeda K, Kubota N, Eto K, Yamauchi T, Azuma K, Kaneto H, Taguchi T, Koga T, German MS, Watada H, Kawamori R, Wright CV, Kajimoto Y, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T: Pdx1 expression in Irs2 deficient mouse β cells is regulated in a strain-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 278: 43691-43698, 2003
- Minami K, Morita M, Saraya A, Yano H, Terauchi Y, Miki T, Kuriyama T, Kadowaki T, Seino S: ATP-sensitive K⁺ channel-mediated glucose uptake is independent of IRS-1/phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285: E1289-1296, 2003
- Fukao T, Terauchi Y, Kadowaki T, Koyasu S: Role of phosphoinositide 3-kinase signaling in mast cells: new insights from knockout mouse studies. *J. Mol. Med.* 81: 524-535, 2003
- Fujita Y, Yamada Y, Kusama M, Yamauchi T, Kamon J, Kadowaki T, Iga T: Sex differences in the pharmacokinetics of pioglitazone in rats. *Comp. Biochem. Phys.* 136: 85-94, 2003
- Kadowaki T, Hara K, Yamauchi T, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R: Molecular mechanism of insulin resistance and obesity. *Exp. Biol. Med.* 228: 1111-1117, 2003
- Yamauchi T, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Froguel P, Nagai R, Kadowaki T: Dual roles of adiponectin/Acrp30 in vivo as an anti-diabetic and anti-atherogenic adipokine. *Current Drug Targets - Immune, Endocrine & Metabolic Disorders* 3: 243-4, 2003
- Hoshi K, Ogata N, Shimoaka T, Terauchi Y, Kadowaki T, Kenmotsu S, Chung U, Ozawa H, Nakamura K, Kawaguchi H: Deficiency of insulin receptor substrate-1 impairs skeletal growth through early closure of epiphyseal cartilage. *J. Bone Miner. Res.* 19: 214-223, 2004
- Katayama K, Wada K, Miyoshi H, Ohashi K, Tachibana M, Furuki R, Mizuguchi H, Hayakawa T, Nakajima A, Kadowaki T, Tsutsumi Y, Nakagawa S, Kamisaki Y, Mayumi T: RNA interfering approach for clarifying the PPAR γ pathway using lentiviral vector expressing short hairpin RNA. *FEBS Letters* 560:178-182, 2004
- Akune T, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M, Chung U, Kubota N, Terauchi Y, Harada Y, Azuma Y, Nakamura K, Kadowaki T, Kawaguchi H: PPAR- γ insufficiency enhances osteogenesis from bone marrow progenitors. *J. Clin. Invest.* 113: 846-855, 2004
- Kadowaki T, Kubota N: Protective Role of Imatinib in Atherosclerosis.

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 24:801-3, 2004

- Sasaoka T, Wada T, Fukui K, Murakami S, Ishihara H, Suzuki R, Tobe K, Kadowaki T, Kobayashi M: SH2-containing inositol phosphatase 2 predominantly regulates akt2, and not akt1, phosphorylation at the plasma membrane in response to insulin in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 279:14835-43, 2004
- Shimoaka T, Kamekura S, Chikuda H, Hoshi K, Chung U, Akune T, Maruyama Z, Komori T, Matsumoto M, Ogawa W, Terauchi Y, Kadowaki T, Nakamura K, Kawaguchi H: Impairment of bone healing by insulin receptor substrate-1 deficiency. *J. Biol. Chem.*, 279:15314-22, 2004
- Yamashita T, Eto K, Okazaki Y, Yamashita S, Yamauchi T, Sekine N, Nagai R, Noda M, and Kadowaki T: Role of UCP-2 Up-regulation and TG accumulation in Impaired Glucose-stimulated Insulin Secretion in a β -Cell Lipotoxicity Model Overexpressing SREBP-1c. *Endocrinology* published online, April 1, 2004
- Suzuki R, Tobe K, Aoyama M, Yamauchi T, Kamon J, Kubota N, Terauchi Y, Yoshimitsu H, Matsuhisa M, Nagasaka S, Ogata H, Tokuyama K, Nagai R, Kadowaki T: Both insulin signaling defects in the liver and obesity contribute to insulin resistance and cause diabetes in IRS2^{-/-} mice. *J. Biol. Chem.* published online, March 17, 2004
- Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, Hada Y, Maki T, Takekawa S, Kamon J, Kobayashi M, Suzuki R, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Froguel P, Nakae J, Kasuga M, Accili D, Tobe K, Ueki K, Nagai R, Kadowaki T. Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J. Biol. Chem.* published online Apr 29, 2004
- Nomura S, Nakajima A, Ishimine S, Matsuhashi N, Kadowaki T, Kaminishi M: Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ in histologically different human gastric cancer tissues. *J. Clin. Gastroenterol.*, in press, 2004
- Terauchi Y, Matsui J, Kamon J, Yamauchi T, Kubota N, Komeda K, Aizawa S, Akanuma Y, Tomita M, Kadowaki T. Increased serum leptin protects from adiposity despite the increased glucose uptake in white adipose tissue in mice lacking p85alpha PI 3-kinase. *Diabetes*, in press, 2004

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：0件（CREST研究期間累積件数：8件）