「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

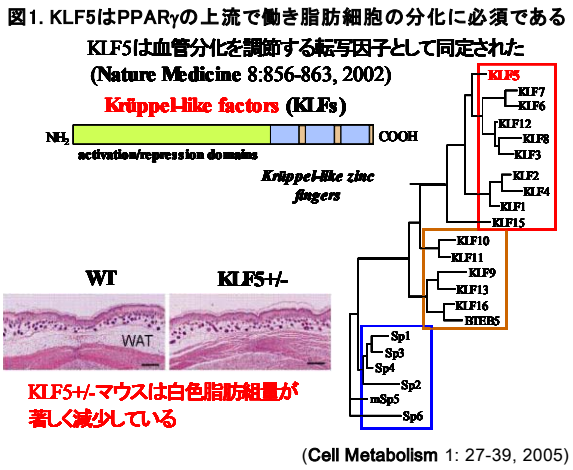
本研究は、脂肪細胞の発生・分化・再生のメカニズムを解明するとともに、その異常としての形質転換の分子機構を明らかにし、これらの情報に立脚して生活習慣病の画期的治療法の開発に資することを目的とする。平成１６年度までの研究によって、肥満に伴って脂肪細胞由来ホルモン、アディポネクチンの発現・分泌が低下することが糖尿病や心血管病の根本的な原因であることを明らかにし、抗糖尿病・抗動脈硬化ホルモンであるアディポネクチンの特異的受容体（AdipoR1並びにAdipoR2）を世界に先駆けて単離・同定することに成功している。平成１６年度には、AdipoR1,AdipoR2の発現がインスリン→PI3キナーゼ→Foxo1という細胞内情報伝達経路によって抑制的に調節されていること、実際肥満に伴う高インスリン血症によりAdipoR1、AdipoR2のダウンレギュレーションが惹起され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する。

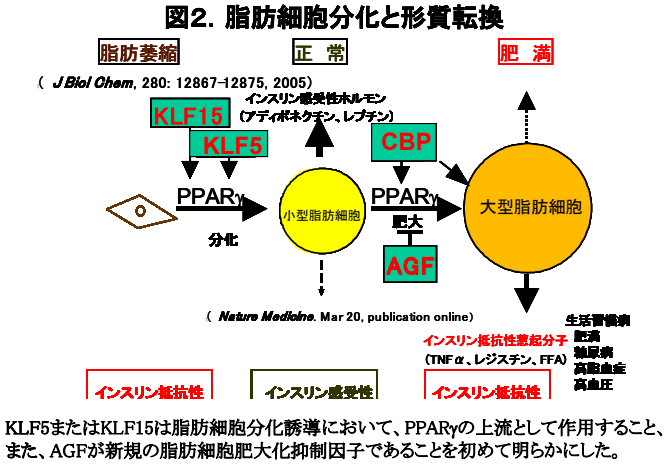
２．研究実施内容

1. 脂肪細胞分化・肥大のメカニズム解明

(1) 脂肪細胞分化のメカニズム解明:脂肪細胞分化に伴って増加してくる遺伝子のうち、PPARγ非依存性に比較的分化初期に増加してくる遺伝子は、PPARγの発現を誘導するPPARγの上流の重要な遺伝子である可能性がある。我々はその候補として、KLF5とKLF15を同定した。KLF5またはKLF15の過剰発現により、PPARγの発現増加を伴って脂肪細胞分化が誘導されるのが認められた。逆に、siRNAを用いて、KLF5またはKLF15の発現を抑制すると、PPARγの発現低下を伴って脂肪細胞分化が抑制されるのが認められた。極めて興味深いことに、我々が作製したPPARγホモ欠損胎児線維芽細胞は、KLF5またはKLF15の過剰発現によっても、脂肪細胞分化が全く起こらず、KLF5またはKLF15は脂肪細胞分化誘導において、PPARγの上流として作用し、PPARγが必要であることが示された(図1、2)（*Cell*

Metabolism 1: 27-39, 2005、 *J. Biol. Chem.* 280:12867-75, 2005）。





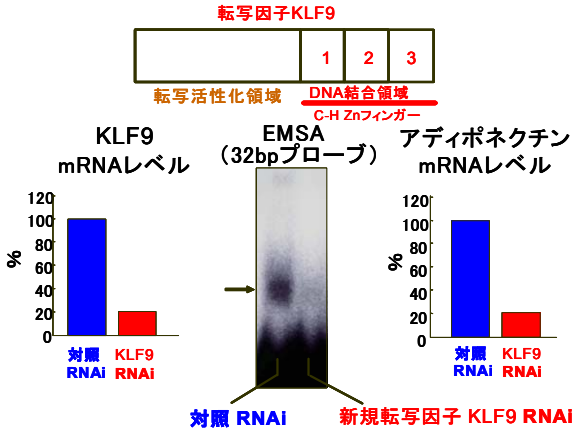
KLF5またはKLF15は脂肪細胞分化誘導において、PPARγの上流として作用すること、また、AGFが新規の脂肪細胞肥大化抑制因子であることを初めて明らかにした。

(2) 脂肪細胞肥大のメカニズム解明: CBPヘテロ欠損マウスとPPARγヘテロ欠損マウスを用いた網羅的な遺伝子発現パターンの解析から、CBPヘテロ欠損マウスの脂肪組織においては、脂肪細胞肥大・インスリン抵抗性の抑制作用を有する膜蛋白であるAdipoR1、AdipoR2の発現が増加していることや、脂肪細胞肥大・インスリン抵抗性の惹起作用を有する分泌蛋白MCP-1の発現が著明に低下していることが認められた。前者はPPARγ非依存性、後者はPPARγ依存性の経路と考えられた。また、Angiopoietin-related growth factor (AGF)遺伝子欠損マウスではエネルギー消費が亢進することによって高脂肪食による脂肪細胞の肥大化・肥満が抑制されインスリン感受性が保たれていたことから、AGFが新規の抗生活習慣病因子であることを初めて明らかにした(*Nature Medicine,* Mar 2005, published online)。

2. 脂肪細胞肥大による形質転換の内容とメカニズム解明

アディポネクチン遺伝子の転写制御領域の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の結合部位をマップすることに成功した。更に、肥満で同様に低下するアディプシン遺伝子と、アディポネクチン遺伝子の肥満による転写抑制領域の共通配列をプローブとしてマウス3T3L1脂肪細胞由来の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Znフィンガー転写因子KLF9を単離・同定することに成功した(図3)(KLF9とKLF5,15との関係については図1参照)。

図3. RNAiによるKLF9の発現抑制はアディポネクチンの転写レベルを著明に低下させた
ー分化誘導後10日目の3T3L1脂肪細胞ー



3. 脂肪細胞の形質転換が生活習慣病を起こすメカニズム解明

(1)個体レベルでのアディポネクチン受容体の機能解析：前年度に単離・同定したアディポネクチン受容体AdipoR1あるいはAdipoR2(*Nature* 423:762-9, 2003)をアデノウイルスを用いて過剰発現あるいはノックダウンしたマウス,あるいはAdipoR1やAdipoR2のノックアウトマウスを用いて, AdipoR1やAdipoR2が、in vivoにおいてアディポネクチン受容体として機能し、それぞれAMPキナーゼ、及びPPARαの情報伝達経路とより強くリンクしていることを明らかにした。

(2)アディポネクチン受容体の発現調節：肥満に伴う高インスリン血症の状態では、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によって、アディポネクチン抵抗性が惹起され、インスリン抵抗性・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.* 279: 30817-30822, 2004)。

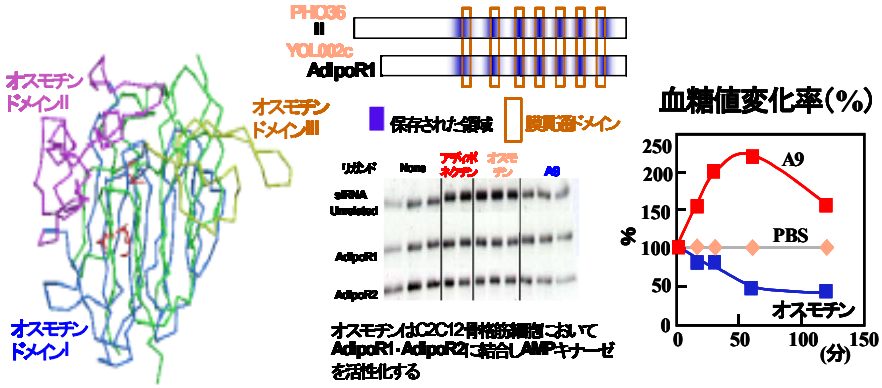
(3)アディポネクチン中枢作用の発見：アディポネクチン欠損マウスは、予測に反して高脂肪食下において肥満が抑制されており、レプチンの細胞内情報伝達が亢進した結果レプチン感受性が亢進しているのが認められた。このことからアディポネクチンは中枢ではレプチン感受性を抑制的に制御していることを世界で初めて明らかにした（submitted for

publication）。

4. 脂肪細胞の形質転換による生活習慣病の制御

アディポネクチンと植物性生体防御ペプチドのオスモチンとが立体構造上のホモロジーを示すことが明らかとなった。更に、オスモチンの酵母における受容体PHO36(YOL002c)がAdipoR1とホモロジーを有するという驚くべき事実が明らかとなった。このオスモチンが哺乳類アディポネクチン受容体を介して糖・脂質代謝に重要なAMPキナーゼを活性化することを見出した(図４)(*Molecular Cell* 17:171-80, 2005)

図4. 植物由来ペプチドと哺乳類アディポネクチンのリガンドおよび受容体の相同性



オスモチンのドメインⅠはアディポネクチンと高い相同性を示した(Molecular Cell 17: 171-80, 2005)

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・代謝内科教授

研究実施項目：

1. 脂肪細胞分化・肥大のメカニズム解明
2. 脂肪細胞肥大による形質転換の内容とメカニズム解明
3. 脂肪細胞の形質転換が生活習慣病を起こすメカニズム解明
4. 脂肪細胞の形質転換による生活習慣病の制御

概要：

1. 脂肪細胞肥大化・形質転換のメカニズム解明
   (1) 脂肪細胞分化のメカニズム解明: PPARγホモ欠損胎児線維芽細胞においてKLF5またはKLF15の過剰発現またはsiRNAを用いたノックダウンによって、KLF5またはKLF15の脂肪細胞分化における役割を解明する。
   (2) 脂肪細胞肥大のメカニズム解明: CBPヘテロ欠損マウスとPPARγヘテロ欠損マウスを用いた網羅的な遺伝子発現パターンの解析を行い、新規の抗生活習慣病因子を同定する。

2. 脂肪細胞肥大による形質転換の内容とメカニズム解明
   アディポネクチン遺伝子の転写制御領域の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の結合部位をマップする。
3. 脂肪細胞の形質転換が生活習慣病を起こすメカニズム解明
   個体レベルでのアディポネクチン受容体の機能解析：前年度に単離・同定したアディポネクチン受容体（AdipoR1,AdipoR2)をアデノウイルスを用いて過剰発現あるいはノックダウンしたマウス,あるいはAdipoR1やAdipoR2のノックアウトマウスを用いて，アディポネクチン受容体AdipoR1やAdipoR2の機能を解明する。アディポネクチン欠損マウスの表現型を詳細に解析することによって、アディポネクチンの中枢における役割を解明する。
4. 脂肪細胞の形質転換による生活習慣病の制御
   アディポネクチンの立体構造解析を行うことによってアディポネクチン受容体のアゴニストの開発を行う。

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　教授

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：

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　教授

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PPARγ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PPARγ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　所長

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

○ Oike Y, Akao M, Yasunaga K, Yamauchi T, Morisada T, Ito Y, Urano .T, Kimura Y, Kubota Y, Maekawa H, Miyamoto T, Miyata K, Matsumoto SI, Sakai J, Nakagata N, Takeya M, Koseki H, Ogawa Y, Kadowaki T, Suda T. Angiopoietin-related growth factor antagonizes obesity and insulin resistance.

Nature Medicine, March 2005, published online

○ Tsuchida A, Yamauchi T, Kadowaki T. Nuclear receptors as targets for drug development: molecular mechanisms for regulation of obesity and insulin resistance by peroxisomeproliferator-activated receptor gamma, CREB-binding protein, and adiponectin.

J.Pharmacol.Sci. 97:164-70, 2005

○ Mori T, Sakaue H, Iguchi H, Gomi H, Okada Y, Takashima Y, Nakamura K, Nakamura T, Yamauchi T, Kubota N, Kadowaki T, Matsuki Y, Ogawa W, Hiramatsu R, Kasuga M. Role of Kruppel-like factor 15 (KLF15) in transcriptional regulation ofadipogenesis.

J.Biol.Chem. 280: 12867-75, 2005

○ Narasimhan ML, Coca MA, Jin J, Yamauchi T, Ito Y, Kadowaki T, Kim KK, Pardo JM, Damsz B, Hasegawa PM, Yun DJ, Bressan RA. Osmotin is a homolog of mammalian adiponectin and controls apoptosis in yeastthrough a homolog of mammalian adiponectin receptor.

Molecular Cell 17:171-80, 2005

○ Suzuki R, Tobe K, Aoyama M, Sakamoto K, Ohsugi M, Kamei N, Nemoto S, Inoue A, Ito Y, Uchida S, Hara K, Yamauchi T, Kubota N, Terauchi Y, Kadowaki T. Expression of DGAT2 in white adipose tissue is regulated by central leptin action.

J.Biol.Chem. 280:3331-7, 2005

○ Kamon J, Yamauchi T, Muto S, Takekawa S, Ito Y, Hada Y, Ogawa W, Itai A, Kasuga M, Tobe K, Kadowaki T. A novel IKKbeta inhibitor stimulates adiponectin levels and ameliorates obesity-linked insulin resistance.

Biochem.Biophys.Res.Commun. 323:242-8, 2004

○ Oishi Y, Manabe I, Tobe K, Tsushima K, Shindo T, Fujiu K, MD; Nishimura, Maemura K, Yamauchi T, Kubota N, Suzuki R, Kitamura T, Akira S, Kadowaki T, Nagai R. Kruppel-like transcription factor KLF5 is a key

regulator of adipocyte differentiation.

Cell Metabolism 1: 27-39, 2005

○ Waki H. Yamauchi T. Kamon J. Kita S. Ito Y. Hada Y. UchidaS. Tsuchida A. Takekawa S. and Kadowaki T.: Generation of Globular Fragment of Adiponectin by Leukocyte Elastase Secreted by Monocytic Cell Line THP-1.

Endocrinology 146: 790-6, 2004.

○ Kamon J. Yamauchi T. Muto S. Takekawa S. Ito Y. Hada Y. Ogawa W. Itai A. Kasuga M. Tobe K. and Kadowaki T.: A novel IKKbeta inhibitor stimulates adiponectin levels and ameliorates obesity-linked insulin resistance.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 323:242-8 2004.

○ Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Yano W, Suzuki R, Ueki K, Takamoto I, Satoh H, Maki T, Kubota T, Moroi M, Okada-Iwabu M, Ezaki O, Naigi R, Ueta Y, Kadowaki T, Noda T. Insulin receptor substrate-2 plays a crucial role in β cells and the hypothalamus.

J. Clin. Invest. 114:917-27, 2004

○ Matsui J, Terauchi Y, Kubota N, Takamoto I, Eto K, Yamashita T, Komeda K, Yamauchi T, Kamon J, Kita S, Noda M, Kadowaki T. Pioglitazone reduces islet triglyceride content and restores impaired glucose-stimulated insulin secretion in heterozygous PPAR_-deficient mice on a high-fat diet.

Diabetes 53: 2844-54, 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 upt ake in white adipose tissue in mice lacking p85alpha PI 3-kinase.

Diabetes 53: 2261-70, 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. 279: 25039-49, 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. 279: 30817-22, 2004

○ 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: 214-23, 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 PPARg pathway using lentiviral vector expressing short hairpin RNA.

FEBS Letters 560:178-82, 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-gamma insufficiency enhances osteogenesis from bone marrow progenitors.

J.Clin.Invest. 113: 846-55, 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 145:3566-77, 2004

（２） 特許出願

Ｈ16年度特許出願件数：3件（ＣＲＥＳＴ研究機関累積件数：17件）