

「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17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動脈硬化症の根本的な原因であることを種々のインスリン抵抗性モデル動物、あるいは肥満モデル動物を用いて明らかにし、さらに抗糖尿病・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。その上 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し、そのさらに上流のメカニズムの解明を試みている。特に平成17年度には、AdipoR1 や AdipoR2 の欠損マウスにおいて実際に耐糖能障害・インスリン抵抗性が認められることを示し、逆にアディポネクチンとその受容体 AdipoR の低下を改善させる治療戦略としては、それぞれ PPAR γ アゴニストと PPAR α アゴニストが有望であることをマウスを用いて個体レベルで示した。また、脂肪萎縮性糖尿病のモデルであり、従ってアディポネクチンが枯渇している A-ZIP マウスを用いることにより、AdipoR1 と AdipoR2 がアディポネクチンと interaction することによって、そのインスリン抵抗性改善作用を発揮していることを示した。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、PPAR γ の発現を誘導する PPAR γ の上流の重要な遺伝子である候補として、これまで KLF5 と KLF15 を同定してきた(図 1、2) (*Cell Metabolism* 1: 27-39, 2005、*J. Biol. Chem.* 280:12867-75, 2005)。平成17年度においては、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

因子が、脂肪細胞分化に伴ってその発現が増加することを見出し、その発現増加が脂肪細胞分化に伴うアディポネクチンの発現誘導にも少なくとも部分的に重要な役割を担っていることを見出した。

(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 PPAR γ 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 PPAR γ 非依存性、後者は PPAR γ 依存性の経路と考えられた。また、Angiopoietin-related growth factor (AGF)過剰発現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*, 11:400-408, 2005)。

図1. KLF5はPPAR γ の上流で働き脂肪細胞の分化に必須である

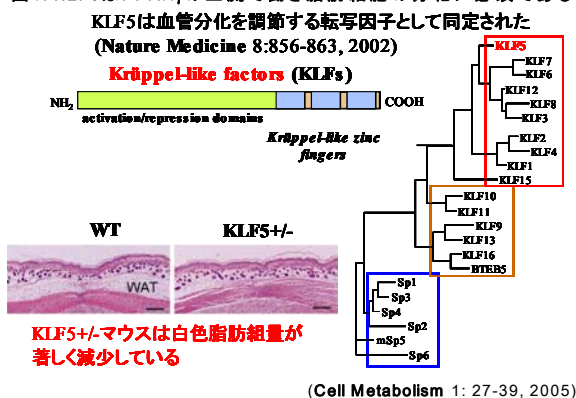
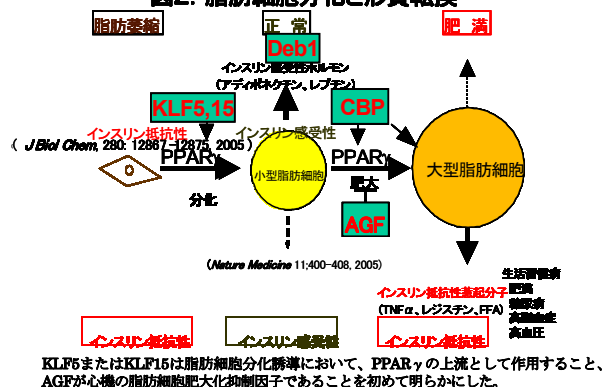


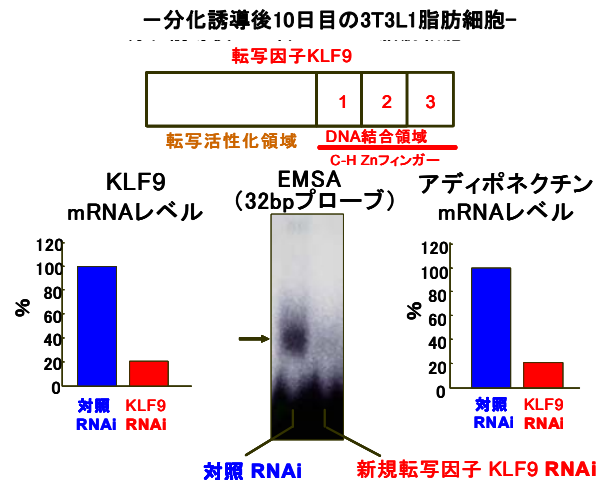
図2. 脂肪細胞分化と形質転換



(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)。さらにその上流のメカニズムの解明を試みている。

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



(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: 2003 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 PPAR α 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。また, 種々の肥満を伴うあるいは伴わないインスリン抵抗性モデル動物, 糖尿病モデル動物, さらには脂肪萎縮性糖尿病のモデルである A-ZIP マウスを用いることにより, 糖尿病・インスリン抵抗性改善作用における AdipoR1・AdipoR2 の役割を明らかにした。

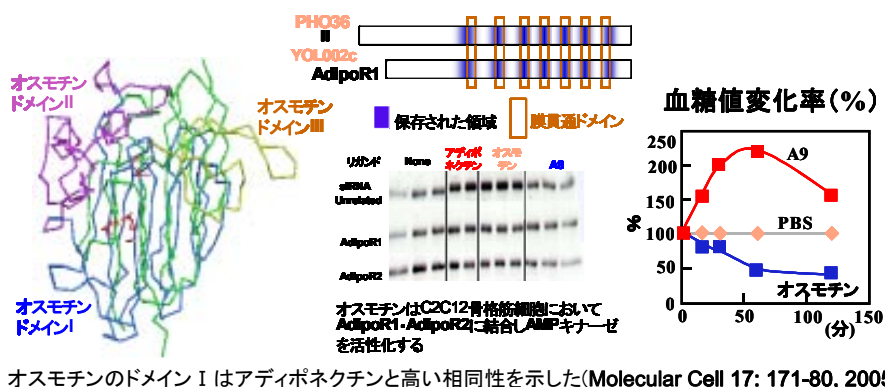
(2) アディポネクチン受容体の発現調節: 肥満に伴う高インスリン血症の状態では, インスリン $\rightarrow$ PI3 キナーゼ $\rightarrow$ Foxo1 の細胞内情報伝達経路により AdipoR1 並びに AdipoR2 の発現が減少することによって, アディポネクチン抵抗性が惹起され, インスリン抵抗性・生活習慣病を発症・進展させていることを明らかにした (*J. Biol. Chem.* 279: 30817-30822, 2004)。逆にアディポネクチンとその受容体 AdipoR の低下を改善させる治療戦略としては, それぞれ PPAR γ アゴニストと PPAR α アゴニストが有望であることをマウスを用いて個体レベルで示した (*Diabetes* 54:3358-3370, 2005.)。

(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) 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)

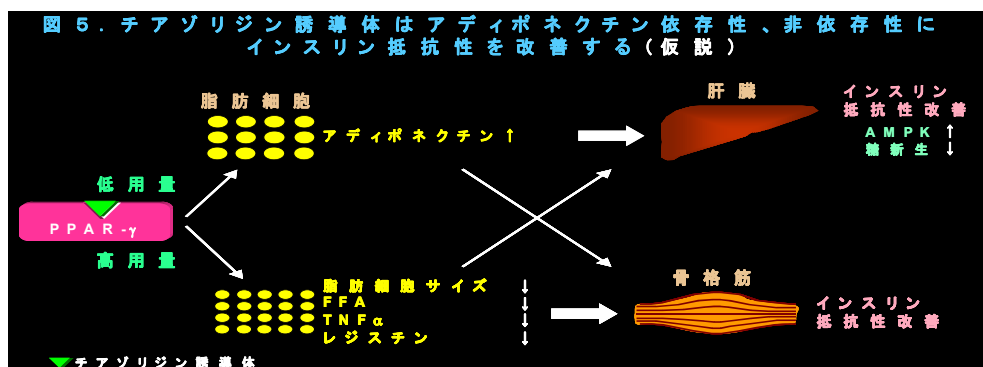
図4. 植物由来ペプチドと哺乳類アディポネクチンのリガンドおよび受容体の相同性



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)

(5) チアゾリジン誘導体の抗糖尿病作用におけるアディポネクチンの役割

チアゾリジン誘導体(TZD)によるアディポネクチン上昇が、どの程度 TZD のインスリン抵抗性改善に寄与しているのかについて検討するため、ob/ob マウスとアディポネクチン欠損(Ad(-/-))ob/ob マウスに対して、2 つの用量の TZD を投与したところ、低容量の TZD にて ob/ob マウスでは肝臓の AMP キナーゼの活性化と糖新生の抑制の結果、インスリン抵抗性の改善が認められたが、Ad(-/-)ob/ob マウスではこのような改善は認められなかった。一方高用量の TZD では、ob/ob マウス、Ad(-/-)ob/ob マウス共に同程度のインスリン抵抗性の改善が認められ、肝臓のインスリン抵抗性改善は ob/ob マウスにしか認められなかったが、両群とも同程度の脂肪細胞の小型化、脂質代謝異常の改善、白色脂肪組織における TNF $\cdot$ 、レジスチンの発現低下が認められ、これらが骨格筋のインスリン抵抗性改善のメカニズムの1つであると考えられた。以上のことより TZD のインスリン抵抗性改善作用にはアディポネクチン依存性と非依存性の2つメカニズムがあることが示唆された(図 5)(*J. Biol. Chem.* 281:8748-8755, 2006)。



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、教授）

②研究項目：

- ・ 脂肪細胞分化・肥大のメカニズム解明
- ・ 脂肪細胞肥大による形質転換の内容とメカニズム解明
- ・ 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
- ・ 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: PPAR γ 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した。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が、脂肪細胞分化に伴ってその発現が増加することを見出し、その発現増加が脂肪細胞分化に伴うアディポネクチンの発現誘導にも少なくとも部分的に重要な役割を担っていることを見出している。遺伝子改変モデルを用いてさらに検討している。

(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 PPAR γ 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。AdipoR1 や AdipoR2、Angiopoietin-related growth factor (AGF)が、抗生活習慣病因子であり、MCP-1 が生活習慣病惹起因子であることが認められ、機能解析を行っている。

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し、同定した。さらにその上流のメカニズムの解明を試みている。

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 の機能を解析している。さらに、種々の肥満を伴うあるいは伴わないインスリン抵抗性モデル動物、糖尿病モデル動物、さらには脂肪萎縮性糖尿病のモデルである A-ZIP マウスを用いて AdipoR1 や AdipoR2 の機能を解析することにより、生体内におけるアディポネクチンの受容体としての役割を示している。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も解明している。

4. 脂肪細胞の形質転換による生活習慣病の制御

アディポネクチン及び AdipoR の構造と機能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。

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

- Kubota N, Terauchi Y, Kubota T, Kumagai H, Itoh S, Satoh H, Yano W, Ogata H, Tokuyama K, Takamoto I, Mineyama T, Ishikawa M, Moroi M, Sugi K, Yamauchi T, Ueki K, Tobe K, Noda T, Nagai R, Kadowaki T.
Pioglitazone ameliorates insulin resistance and diabetes by both adiponectin dependent and independent pathway. *J Biol Chem*. 2006 Jan, published online
- Tsuchida A, Yamauchi T, Takekawa S, Hada Y, Ito Y, Maki T, Kadowaki T.
Peroxisome Proliferator-Activated Receptor(PPAR){alpha}Activation Increases Adiponectin Receptors and Reduces Obesity-Related Inflammation in Adipose Tissue: Comparison of Activation of PPAR{alpha},PPAR{gamma}, and Their Combination. *Diabetes*. 2005 Dec, 54:3358-70
- Takeda R, Nishimatsu H, Suzuki E, Satonaka H, Nagata D, Oba S, Sata M, Takahashi M, Yamamoto Y, Terauchi Y, Kadowaki T, Kangawa K, Kitamura T, Nagai R, Hirata Y. Ghrelin Improves Renal Function in Mice with Ischemic Acute Renal Failure. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Nov, published online
- Ueki K, Kadowaki T, Kahn CR. Role of suppressors of cytokine signaling SOCS-1 and SOCS-3 in hepatic steatosis and the metabolic syndrome. *Hepatol Res*. 2005 Oct, published online.
- Iso-O N, Noto H, Hara M, Togo M, Karasawa K, Ohashi N, Noiri E, Hashimoto Y, Kadowaki T, Kimura S, Watanabe T, Tsukamoto K. Adenovirus-mediated gene transfer and lipoprotein-mediated protein delivery of plasma PAF-AH ameliorates proteinuria in rat model of glomerulosclerosis. *Mol Ther*. 2005 Oct, published online.
- Zhou H, Yamada Y, Tsukiyama K, Miyawaki K, Hosokawa M, Nagashima K, Toyoda K, Naitoh R, Mizunoya W, Fushiki T, Kadowaki T, Seino Y. Gastric inhibitory polypeptide modulates adiposity and fat oxidation under diminished insulin action. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Sep, 335:937-42
- Zheng Y, Yamada H, Sakamoto K, Horita S, Kunimi M, Endo Y, Li Y, Tobe K, Terauchi Y, Kadowaki T, Seki G. Roles of insulin receptor Substrates in insulin-induced stimulation of renal proximal bicarbonate absorption. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Aug, 16:2288-95
- Terauchi Y, Kadowaki T: Peroxisome proliferator-activated receptors and insulin secretion. *Endocrinology* 2005 Aug, 146:3263-3265
- Hara K, Horikoshi M, Kitazato H, Yamauchi T, Ito C, NBoda M, Ohashi J, Froguel P, Tokunaga K Nagai R, Kadowaki T: Absence of an association between the polymorphisms in the genes encoding adiponectin receptors and type 2 diabetes. *Diabetologia* 2005 Jul, 48:1307-1314
- Najima Y, Yahagi N, Takeuchi Y, Matsuzaka T, Sekiya M, Nakagawa Y, Amemiya-Kudo M, Okazaki H, Okazaki S, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Kadowaki T, Ishibashi S, Yamada N, Osuga JI, Shimano H: High mobility group protein-B1

- (HMGB1) interacts with sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) to enhance their DNA binding. *J. Biol. Chem.* 2005 Jul, 280:27523-27532
- Masuda T, Wada K, Nakajima A, Okura M, Kudo C, Kadowaki T, Kogo M, Kamisaki Y. Critical role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma on anoikis and invasion of squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005 Jun, 11:4012-21
 - Lu J, Imamura K, Nomura S, Mafune K, Nakajima A, Kadowaki T, Kubota N, Terauchi Y, Ishii G, Ochiai A, Esumi H, Kaminishi M. Chemopreventive effect of peroxisome proliferators-activated receptor gamma on gastric carcinogenesis in mice. *Cancer Res.* 2005 Jun, 65:4769-74
 - Yamaguchi M, Ogata N, Shinoda Y, Akune T, Kamekura S, terauchi Y, Kadowaki T, Hoshi K, Chung UI, Nakamura K, Kawaguchi H. Insulin receptor substrate-1 is required for bone anabolic function of parathyroid hormone in mice. *Endocrinology.* 2005 Jun, 146:2620-8
 - Yahagi N, Shimano H, Hasegawa K, Ohashi K, Matsuzaka T, Najima Y, Sekiya M, Tomita S, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Nagai R, Ishibashi S, Kadowaki T, Makuuchi M, Ohnishi S, Osuga JI, Yamada N: Co-ordinate activation of lipogenic enzymes in hepatocellular carcinoma. *Eur. J. Cancer* 2005 Jun, 41: 1316-1322
 - Kadowaki T, Yamauchi T: Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr. Rev.* 2005 May, 26: 439-451
 - Vasseur F, Helbecque N, Lobbens S, Vasseur-Delannoy V, Dina C, Clement K, Boutin P, Kadowaki T, Scherer P.E., Froguel P: Hypoadiponectinemia and high risk for type 2 diabetes are associated with adiponectin-encoding (ACDC) gene promoter variants in morbid obesity: evidence for a role for ACDC in diabetes. *Diabetologia* 2005 May, 48: 892-899
 - Hara K, Yamauchi T, Kadowaki T. Adiponectin: an adipokine linking adipocytes and type 2 diabetes in humans. *Curr Diab Rep.* 2005 Apr, 5:136-40
 - 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 S, 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.* 2005 Apr, 11:400-8
 - 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 of adipogenesis. *J Boil Chem.* 2005 Apr, 280:12867-75

(2) 特許出願

H17 年度出願件数：0 件（CREST 研究期間累積件数：7 件）