

博士論文

アディポネクチン様作用を有する分子の探索と
抗糖尿病作用メカニズムの解析

小堀 勤子

目次

要旨	p.3
序論	p.4-11
方法	p.12-19
結果	p.20-44
考察	p.45-52
引用文献	p.53-66
謝辞	p.67

要旨

脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンが肥満に伴って低下することが、生活習慣病の主因の一つと考えられている。

今回、アディポネクチンおよびアディポネクチン受容体欠損マウスの解析により、生体内でアディポネクチン作用を代償する分子が存在する可能性が想定されたため、その探索を行い、C1q TNF α related protein (CTRP) 7がその候補分子として挙げられた。

C2C12 骨格筋細胞において globular CTRP7 は AMPK を活性化し、実際に肥満・2 型糖尿病モデルマウスへの投与により血糖値は改善した。CTRP7 が生体内においてアディポネクチン様作用を有している可能性が明らかになった。

序論

近年、世界中で糖尿病有病者数は増加しており、国際糖尿病連合（IDF）の発表によれば、2013年時点で世界の糖尿病有病者数は、成人人口の8.3%に相当する3億8,200万人に上り、25年以内に5億9,200万人にまで増加することが推定されている^[1]。我が国においても糖尿病有病者数は増加しており、厚生労働省が発表した2012年実施の国民健康・栄養調査では、糖尿病が強く疑われる者（糖尿病有病者）が約950万人、糖尿病の可能性を否定できない者（糖尿病予備群）が約1,100万人と推定され、両者を合わせると約2,050万人で日本の総人口の約16.1%を占めている^[2]（図1）。

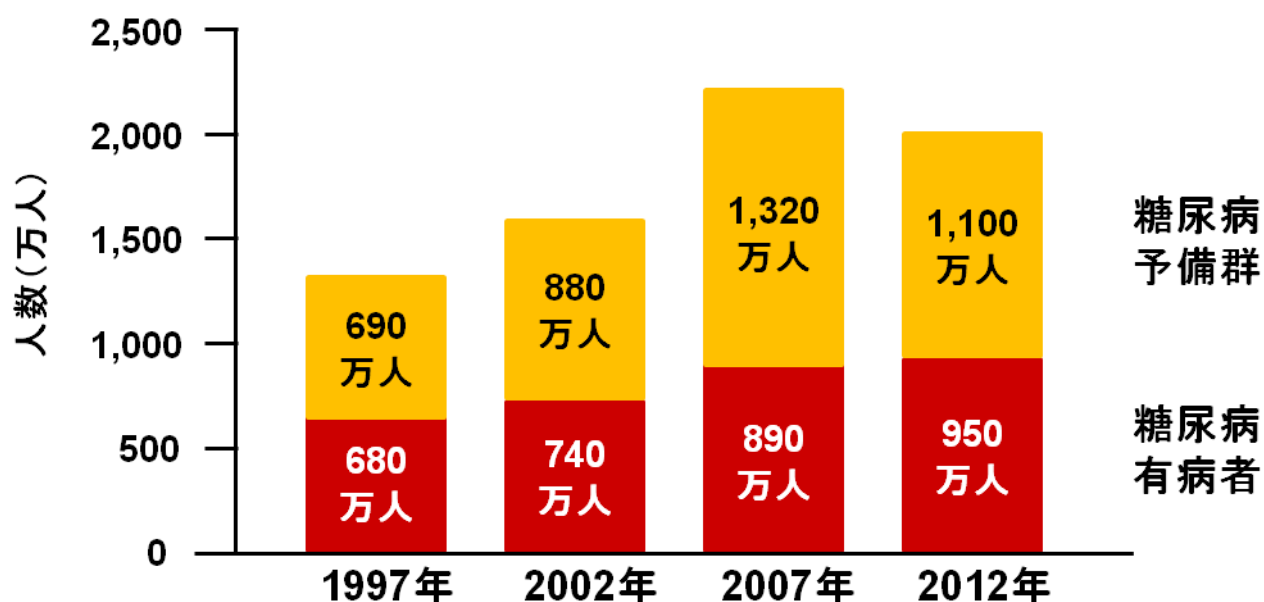


図1. 我が国における糖尿病有病者数・糖尿病予備群数の推移

糖尿病は、神経障害、網膜症、腎症といった三大合併症に代表される細小血管障害のみならず、心筋梗塞や脳血管障害、慢性腎臓病（CKD）といった心血管腎疾患、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）、癌、アルツハイマー病のリスクを増大し、健康寿命の短縮を引き起こす主要な原因の一つであることから、糖尿病の増加は大きな社会問題となっている。本来、糖尿病は遺伝因子と環境因子の相互作用で発症する多因子疾患だが、近年の急増の背景には、戦後の食生活の欧米化に伴う高脂肪食、運動不足といった生活習慣の変化に伴う肥満、特に内臓脂肪蓄積によるインスリン抵抗性の惹起が挙げられる。

脂肪細胞には、主に皮下や内臓に分布して余剰エネルギーを中性脂肪として貯蔵している白色脂肪細胞と、鎖骨下や傍脊柱領域に存在し熱産生・エネルギー消費に関与している褐色脂肪細胞が存在する。ヒトにおいて思春期以降、白色脂肪細胞の数は概ね一定に保たれており、過剰のエネルギーは白色脂肪細胞が肥大化することにより蓄積されるため、肥満の状態は白色脂肪細胞数の増加よりも個々の白色脂肪細胞の肥大化がメインであると考えられている。肥満がインスリン抵抗性を引き起こすメカニズムは、余剰エネルギーを中性脂肪として貯蔵するという脂肪組織の従来から知られていた機能だけでは説明困難であった。しかし、近年、脂肪組織は多くのアディポカインを分泌し、代謝制御において重要な役割を担う内分泌器官であると考えられており¹³⁾、中でも善玉ア

ディポカインであるアディポネクチンの作用の低下が、肥満に伴うインスリン抵抗性悪化を招く要因として重要な役割を果たしていると考えられている（図2）。

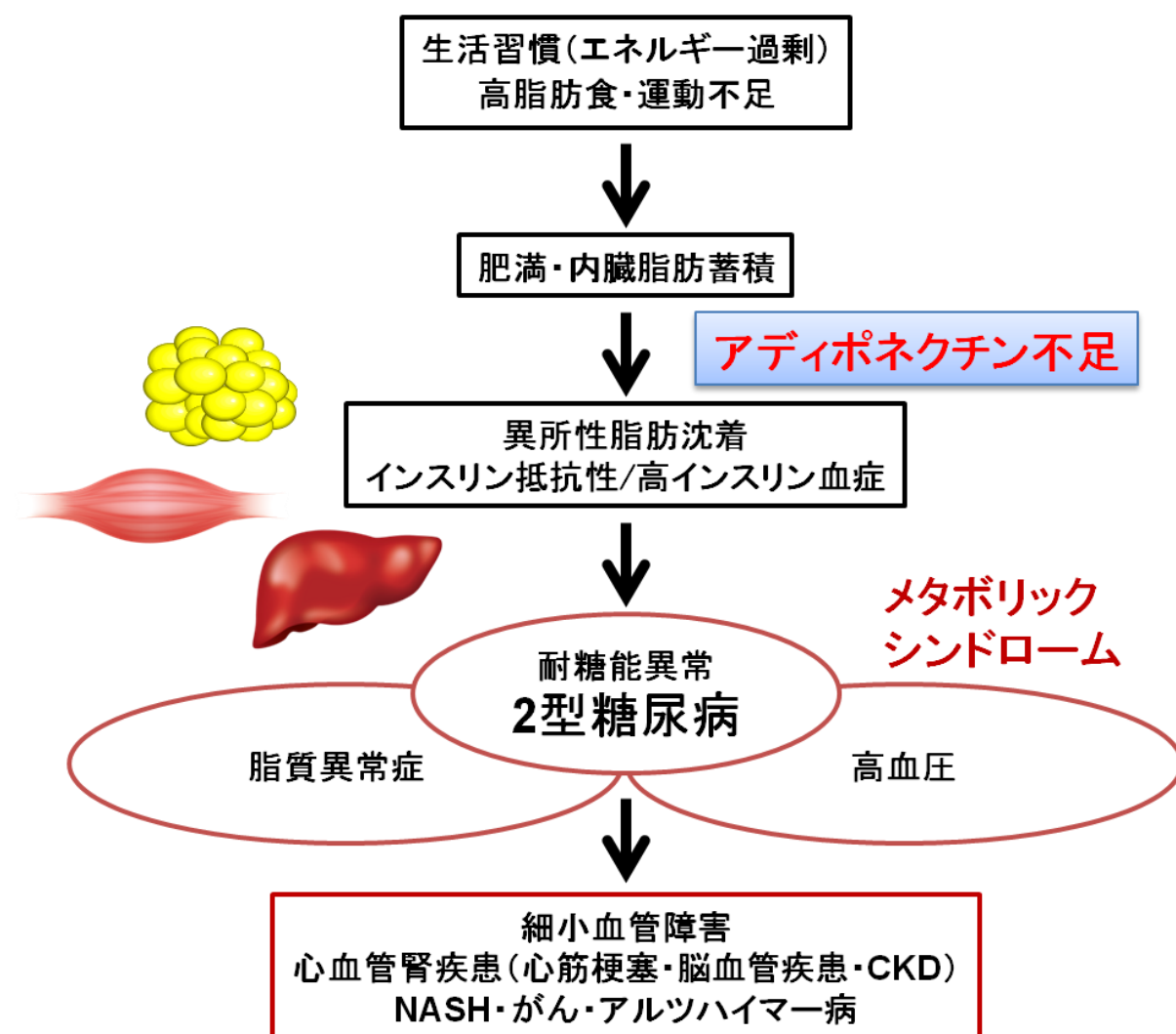


図 2. 2型糖尿病急増の背景

アディポネクチンは、白色脂肪細胞から分泌される液性因子の遺伝子クローニングやタンパク同定の中で、1995年から1996年にかけて、Scherer先生・Lodish先生らのグループ、Spiegelman先生らのグループ、大阪大学の松澤先生らのグループ、昭和大学の富田先生らのグループにより独立に同定・報告された脂肪細胞特異的に発現している分泌タンパク質である^[4-7]。当研究室では、インスリン感受性が良好な小型脂肪細胞ではアディポネクチン遺伝子の発現が亢進している一方、肥満で認められる肥大化脂肪細胞では tumor necrosis factor- α (TNF- α) や interleukin-6 (IL-6)、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) などの悪玉アディポカインの遺伝子発現が増加しているのに対してアディポネクチンはその発現が低下していることを報告してきた^[8]。また、アディポネクチンを欠乏した脂肪萎縮性糖尿病マウスに対する生理的な濃度のリコンビナント全長アディポネクチンの補充により、肝臓・骨格筋における脂肪酸燃焼の促進を介してインスリン抵抗性、高中性脂肪血症が改善したこと^[9, 10]、高脂肪食負荷をした肥満・2型糖尿病モデルマウスにおける血中アディポネクチンレベルの低下とこれに伴うインスリン抵抗性、脂質異常症の惹起、さらにこれに対する生理的な濃度のアディポネクチン補充によりインスリン抵抗性と脂質異常症が改善したことを示してきた^[9]。さらに、アディポネクチン欠損マウスではインスリン抵抗性、耐糖能障害、脂質異常症^[11, 12]、高血圧を認めること^[12]などから、肥満

によるアディポネクチンレベルの低下がインスリン抵抗性やメタボリックシンドローム、2型糖尿病の原因となっており、アディポネクチンの補充がその効果的な治療手段になることが明らかになっている。

その後、当研究室ではこのアディポネクチンの受容体として AdipoR1 と AdipoR2 を同定し、AdipoR1 は AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性化を介して、AdipoR2 は peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) の活性化および TNF α や MCP-1 の低下といった炎症の抑制を介して、インスリン感受性の亢進や脂肪酸燃焼の促進、抗炎症作用を示すことを報告してきた^[13, 14]。

さらに、肥満・インスリン抵抗性のモデル動物において AdipoR1、AdipoR2 の量が低下していること、アディポネクチン存在下に AdipoR1、AdipoR2 を増加させることで生体内におけるインスリン抵抗性が改善することを見出し^[14]、これらから、アディポネクチン/アディポネクチン受容体の低下によるアディポネクチン作用の低下がインスリン抵抗性・糖尿病の主要な要因の一つとなっていると考えている。

当研究室では、アディポネクチン受容体欠損マウスを作製し機能解析を行ってきたが、アディポネクチン欠損マウスの表現型がアディポネクチン受容体欠損マウスの表現型に比べて軽度であったため、生体内にアディポネクチンを代償する分子が存在する可能性を想定し、今回アディポネクチン様作用を有

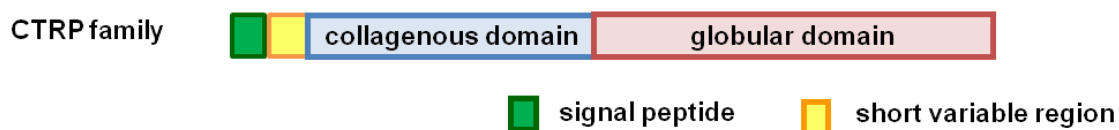
する分子の探索を行うことにした。その候補分子として、まずは、Lodish らによりアディポネクチンのパラログとして報告された C1q TNF α related protein (CTRP) ^[15]に注目した。

CTRP ファミリーは現在までに CTRP1-CTRP15 までの 15 種類が報告されている^[16]。アディポネクチンが脂肪細胞特異的に発現するのに対し^[7]、CTRP の中には脂肪組織に多いものの比較的ユビキタスに発現しているものも報告されており^[15, 17-20]、その構造は、アディポネクチンと同様にアミノ末端からカルボキシル末端に向かって順に、シグナルペプチド、short variable region、コラーゲンドメイン、globular ドメインの 4 つのドメインを有している^[15, 20] (図 3A)。globular ドメインのアミノ酸配列の相同性に関しては、アディポネクチンと比較し 30-50%一致しているが (図 3B)、類似アミノ酸を含めると 50-60%の相同性を有する。また、その基本構造単位として 3 量体を形成する点もアディポネクチンと同様で、さらに CTRP の中にはアミノ末端のシステイン残基のジスルフィド結合を介して多量体を形成するものも存在する^[19, 20]。ヒト・マウスのいずれにおいても、アディポネクチンの血中濃度には性差があり、メス・女性で高いが^[21-23]、CTRP ファミリーのうちいくつかは同様の性差を認めており、CTRP5、CTRP9、CTRP11、CTRP13 についてはメスの方がオスよりも発現量や血中濃度が高いと報告されている^[18-20, 24]。

こうしたアディポネクチンとの類似点を有する CTRP であるが、アディポネクチンは抗糖尿病作用、抗動脈硬化作用、抗炎症作用が明らかになっているものの、一方で CTRP については代謝制御に関する役割について現時点ではまだ不明な点も多い。

そこで今回、アディポネクチン欠損 (*Adipoq*^{-/-}) マウス、db/db アディポネクチン欠損 (*Lepr*^{-/-}*Adipoq*^{-/-}) マウス、およびアディポネクチン受容体 AdipoR1・AdipoR2 ダブル欠損 (*Adipor1*^{-/-}*Adipor2*^{-/-}) マウスの白色脂肪組織において発現が増加する CTRP の探索を定量的 PCR 法を用いて行い、さらにその機能解析を行った。

A



B

	アディポネクチンとの相同性 (%)	
	full-length	globular domain
mCTRP1	23	26
mCTRP2	33	40
mCTRP3	28	31
mCTRP4	22	28
mCTRP5	25	36
mCTRP6	37	26
mCTRP7	37	39
mCTRP9	45	48
mCTRP10	28	35
mCTRP11	29	32
mCTRP12	20	19
mCTRP13	32	35
mCTRP14	32	32
mCTRP15	17	18

(Circulation. 125: 3066-3068, 2012 より改変)

図 3. CTRP ファミリー

A. CTRP ファミリーの構造

B. マウスアディポネクチンとマウス CTRP ファミリーの相同性

方法

RNA 抽出および定量的 RT-PCR

組織は採取後速やかに液体窒素に入れ、凍結した臓器の一部を Isogen (日本ジーン) 液中に浸し、ポリトロンにてホモジナイズを行った。その後、クロロホルムを加えて遠心し、水層を回収した。これにイソプロパノールを加えて遠心し、得られた沈殿に 70%エタノールを加えた上でさらに遠心を行い、沈殿を RNase DNase free 水で溶解した。吸光度による定量の上で RQ1 RNase-free DNase (Promega) により DNase 処理を行い、RNA を抽出した。逆転写反応は、Random Hexamer および MultiScribe Reverse Transcriptase (いずれも Applied Biosystems) によって得られた cDNA を用いて行った。定量的 RT-PCR は Taqman® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) を使用し、50°C2 分、95°C10 分、40 サイクルの 95°C15 秒、60°C1 分の条件で ABI Prism 7900 PCR instrument (Applied Biosystems) にて行った。プライマーは Taqman® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) を用いた。発現量は、内在性コントロールとして Cyclophilin、18S rRNA もしくは 36B4 の発現量により相対補正をした。

Cyclophilin : forward primer, 5' - GGTCCTGGCATCTTGTCAT -3'

reverse primer, 5' - CAGTCTTGGCAGTGCAGATAAAA -3'

probe, 5' - CTGGACCAAACACAAACGGTTCCCA -3'

使用した Taqman probe は以下の通りである。

18S rRNA ; Mm03928990_g1

36B4 ; Mm00725448_s1

Adiponectin ; Mm00456425_m1

CTRP1 ; Mm00480202_m1

CTRP2 ; Mm01289027_m1

CTRP3 ; Mm00473047_m1

CTRP4 ; Mm00470640_m1

CTRP5 ; Mm00461598_m1

CTRP6 ; Mm00511605_m1

CTRP7 ; Mm00615171_m1

CTRP9 ; Mm02392597_m1

CTRP10 ; Mm01295569_gH

CTRP11 ; Mm01307714_m1

CTRP12 ; Mm00482793_m1

CTRP13 ; Mm00655312_m1

CTRP14 ; Mm00657289_m1

CTRP15 ; Mm00557748_m1

リコンビナントアディポネクチンおよび globular CTRP7 の精製

大腸菌の発現系を用いて、アディポネクチンおよび CTRP7 (全長 1~289 アミノ酸残基) の globular ドメインである globular CTRP7 (141~289 アミノ酸残基) を発現させて精製を行った。

マウスアディポネクチンを pQE-30 bacterial expression vector (Qiagen) に導入した。His-Tag を付加して JM-109 に組み込んだアディポネクチンは、isopropyl β -D(-)-thiogalactopyranoside (WAKO) を培地に添加して発現を誘導した。その後遠心を行い集菌後、大腸菌から一般的な方法で抽出を行い、Ni-NTA agarose (Invitrogen) を充填したカラムを用いて imidazole (SIGMA) で溶出した。溶出後 Phosphate buffered saline (PBS) で透析を行い、Centriprep YM-10 (Millipore) で限外濾過を行った後に、PD-10 カラム (GE Healthcare) を用いてゲル濾過を行った。

マウス globular CTRP7 は pET28b vector (Novagen) に導入した。His-Tag を付加して BL21Star(DE3) に組み込んだ globular CTRP7 は、isopropyl β -D(-)-thiogalactopyranoside を培地に添加して発現を誘導した。その後遠心を行い集菌後、大腸菌から一般的な方法で抽出を行い、HIS-Select® Cobalt Affinity Gel (SIGMA) を充填したカラムを用いて imidazole で溶出した。溶出後、アディポネクチンの精製と同様に、PBS で透析を行い、Centriprep YM-10 で限外濾過を

行った後に、PD-10 カラムを用いてゲル濾過を行った。

SDS-PAGE および CBB 染色

15% 均一ポリアクリルアミドゲルを用いて、精製したリコンビナント globular CTRP7 の SDS-PAGE および CBB 染色を、還元条件下で行った。

細胞培養

マウス C2C12 myoblasts は、10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) を含む、90% Dulbecco's modified high glucose Eagle's medium (DMEM) で 37°C にて培養した。細胞が 80% コンフルエントになった時点で、分化維持培地 (98% DMEM, 2.5% (v/v) horse serum) に交換することにより、myoblasts から myotubes への分化誘導を行った。以降、72 時間毎に分化維持培地を交換した。分化誘導 5 日目には、細胞は多核の myotubes へ分化した。分化誘導 7 日後に、血清を含まない 100% DMEM に交換し、37°C 条件下に 8 時間インキュベーションした後、精製した globular CTRP7 を分化した C2C12 細胞へ添加した。

3T3-L1 脂肪細胞は、25 mM glucose と 10% (v/v) FBS を含む DMEM で 37°C にて培養した。細胞がコンフルエントになったところで、25 mM glucose、10% (v/v) FBS、0.25 units/ml insulin、0.25 μM dexamethasone、0.5 mM

isobutyl-1-methylxanthine を含む DMEM に培地を交換し、adipocyte への分化を誘導した。以後 48 時間毎に、25 mM glucose、10% (v/v) FBS、0.025 units/ml insulin を含む DMEM に培地を交換した。

Immunoblotting

分化誘導 7 日後の C2C12 骨格筋細胞に、リコンビナント globular CTRP7 (0、0.5、1、5、10、20、30、40、50 $\mu\text{g/ml}$)、およびリコンビナントアディポネクチン (10、30 $\mu\text{g/ml}$) を添加し、Immunoblotting にて、リン酸化および総 AMPK α (Cell signaling #2535, #2532) を検出した。Immunoblotting は既報の方法を用いて行った^[13, 25, 26]。

3-4 回の独立した実験のうち、代表的な 1 回の結果を提示した。

動物

全ての実験は、東京大学動物実験実施規則、及び東京大学動物実験実施マニュアルに沿って行った。実験時、8-20 週齢のマウスを用いた。マウスは 22°C に管理された部屋で飼育し、12 時間ずつ明暗期を設けた。飼料は普通食 (CE2、日本クレア株式会社) (組成 : 24.9% (重量) タンパク質、4.1% 繊維、6.6% 灰分、51% 炭水化物、4.6% 脂肪、8.9% 水分) もしくは、高脂肪食 (High Fat Diet 32、日本クレア株式会社) (組成 ; 25.5% タンパク質、2.9% 繊維、4.0% 灰分、29.4%

炭水化物、32%脂肪、6.2%水分) を用い、水、飼料ともに自由摂取とした。高脂肪食群では、高脂肪食を2週間負荷した。

8-20週齢の雄の C57BL/6J マウス、および8週齢の db/db (*Lepr^{-/-}*) マウスは日本チャールズ・リバー株式会社より購入した。

アディポネクチン欠損 (*Adipoq^{-/-}*) マウスの作製

当研究室で作製したオリジナルの *Adipoq^{+/-}* マウス (C57BL/6J と 129/Sv の mixed background) ^[11] を C57BL/6J と7回以上交配させた。全実験において、オスの同腹仔を用いた。

db/db アディポネクチン欠損 (*Lepr^{-/-}Adipoq^{-/-}*) マウスの作製とアディポネクチンの投与

当研究室で作製したオリジナルの *Lepr^{+/-}Adipoq^{+/-}* マウスを相互交配し、db/db アディポネクチン欠損 (*Lepr^{-/-}Adipoq^{-/-}*) マウスを作製した。全実験において、オスの同腹仔を用いた^[14]。

PBS に溶解したリコンビナントアディポネクチンを、db/db アディポネクチン欠損マウスに対して 50 µg/day で1週間腹腔内投与した。

アディポネクチン受容体 **AdipoR1**・**AdipoR2** ダブル欠損 (*Adipor1^{-/-}Adipor2^{-/-}*) マウスの作製

当研究室で作製したオリジナルの *Adipor1^{+/-}Adipor2^{+/-}* マウス (C57BL/6J と 129/Sv の mixed background) ^[14] を C57BL/6J と 7 回以上交配させた。全実験において、オスの同腹仔を用いた。

解剖

3 時間絶食後、解剖を行い、採取した組織は直ちに液体窒素に入れて凍結させた。肝臓は、全肝を摘出した後、肝左葉の一部を切離したものを RNA 抽出に用いた。白色脂肪組織は左右の精巣周囲脂肪組織から採取し、片側から採取したものを RNA 抽出に用いた。褐色脂肪組織は肩甲骨間の左右の褐色脂肪組織を採取し、そのうち片側から採取したものを RNA 抽出に用いた。骨格筋は左右の腓腹筋を採取し、そのうち片側を RNA 抽出に用いた。膵臓は一塊に採取し、その全てを RNA 抽出に用いた。

globular CTRP7 感受性試験

4 時間絶食後の db/db マウスに、PBS に溶解したリコンビナント globular CTRP7 をマウス体重 10 g あたり 30 μ g 単回腹腔内投与した。投与前と投与 120

分後に採血を行い、血糖測定器（グルテスト Pro、三和化学株式会社）により血糖値を測定した。0 分値の血糖値を 100%としたときの投与 120 分後の血糖値の割合を算出した。

統計学的解析

結果は平均値±標準誤差で示した。2 群間の比較における有意差は Student の t 検定によって検定し、多群比較における有意差は分散分析 (analysis of variance : ANOVA) を行った上で、Tukey 法にて post hoc 検定を行った。

結果

CTRP1、CTRP2、CTRP3、CTRP6、CTRP7、CTRP9 は白色脂肪組織に多く発現していた

アディポネクチンが脂肪細胞特異的に発現しているのに対し^[7]、アディポネクチンのパラログである CTRP の中には脂肪組織に多いものの比較的ユビキタスに発現しているものも報告されている^[15, 17-20]。そこで脂肪組織以外の代謝に重要な組織を含めて、実際には肝臓、白色脂肪組織、褐色脂肪組織、骨格筋、膵臓における CTRP ファミリーの遺伝子発現を検討した。なお、マウスには CTRP8 は存在しないことが明らかになっているため^[27]、CTRP1-CTRP15のうち CTRP8 以外の遺伝子発現を検討した。

その結果、CTRP1、CTRP6、CTRP12、CTRP13 の mRNA は白色脂肪組織、褐色脂肪組織、骨格筋で発現しており、肝臓、膵臓では検出されなかった。CTRP2、CTRP3、CTRP7 遺伝子は白色脂肪組織と褐色脂肪組織で発現し、肝臓、骨格筋、膵臓では検出されなかった。CTRP5 遺伝子は褐色脂肪組織のみ、CTRP11 遺伝子は肝臓のみ発現していた一方で、CTRP9、CTRP15 遺伝子は膵臓以外の肝臓、白色脂肪組織、褐色脂肪組織、骨格筋と比較的ユビキタスに発現していた。一方、CTRP4、CTRP10、CTRP14 の mRNA は、今回いずれの臓器でも検出されなかった。(図 4-図 10)

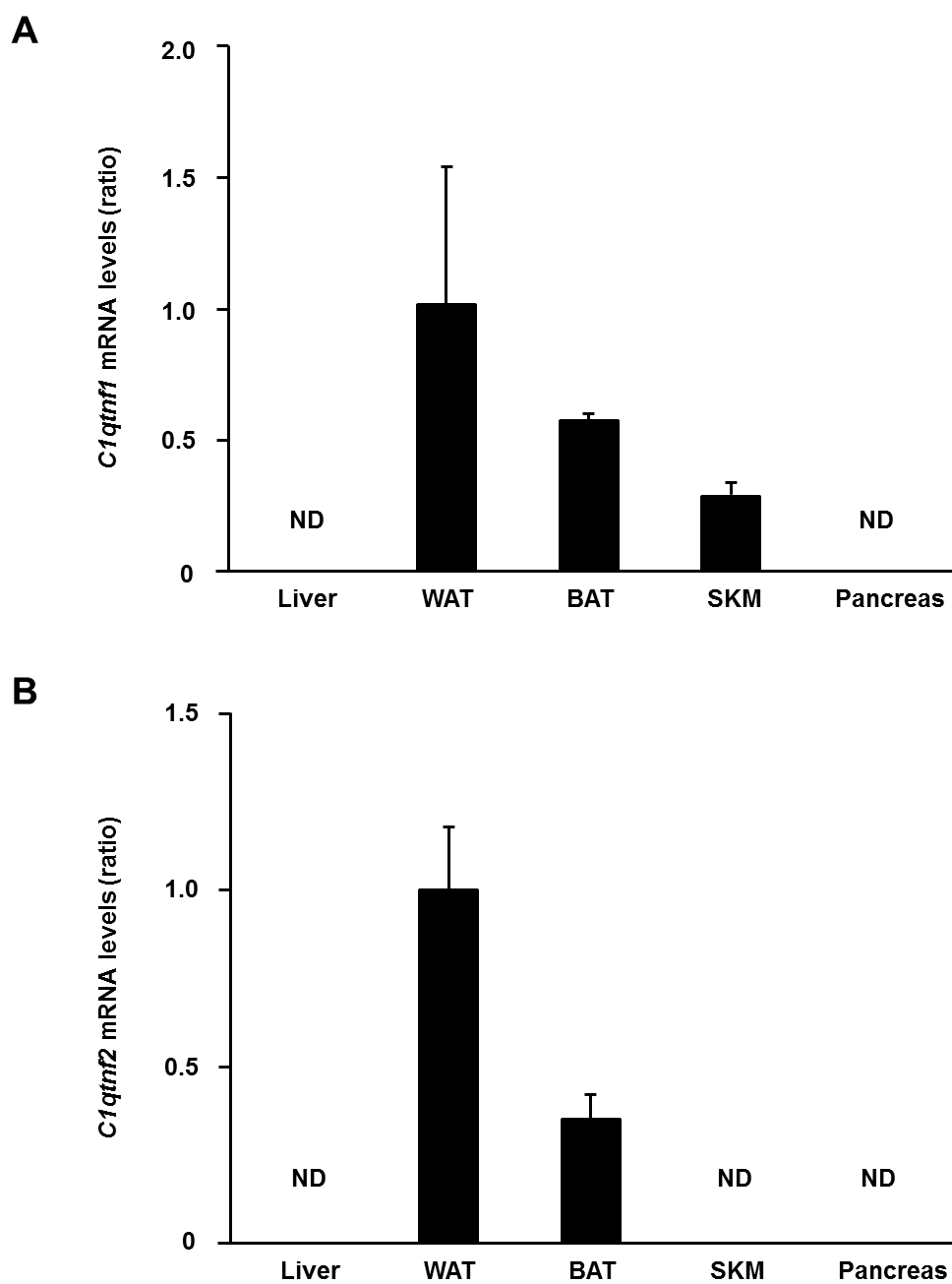


図 4. 肝臓、白色脂肪組織、褐色脂肪組織、骨格筋、膵臓での遺伝子発現

A. CTRP1 (*C1qtnf1*) mRNA

B. CTRP2 (*C1qtnf2*) mRNA

WAT : white adipose tissues, 白色脂肪組織

BAT : brown adipose tissues, 褐色脂肪組織

SKM : skeletal muscles, 骨格筋

ND, Not Detected

肝臓 n = 3、白色脂肪組織 n = 8、褐色脂肪組織 n = 3、骨格筋 n = 8、膵臓 n = 3

18S rRNA (*Rn18s*) で相対補正し最大発現量を 1 とした

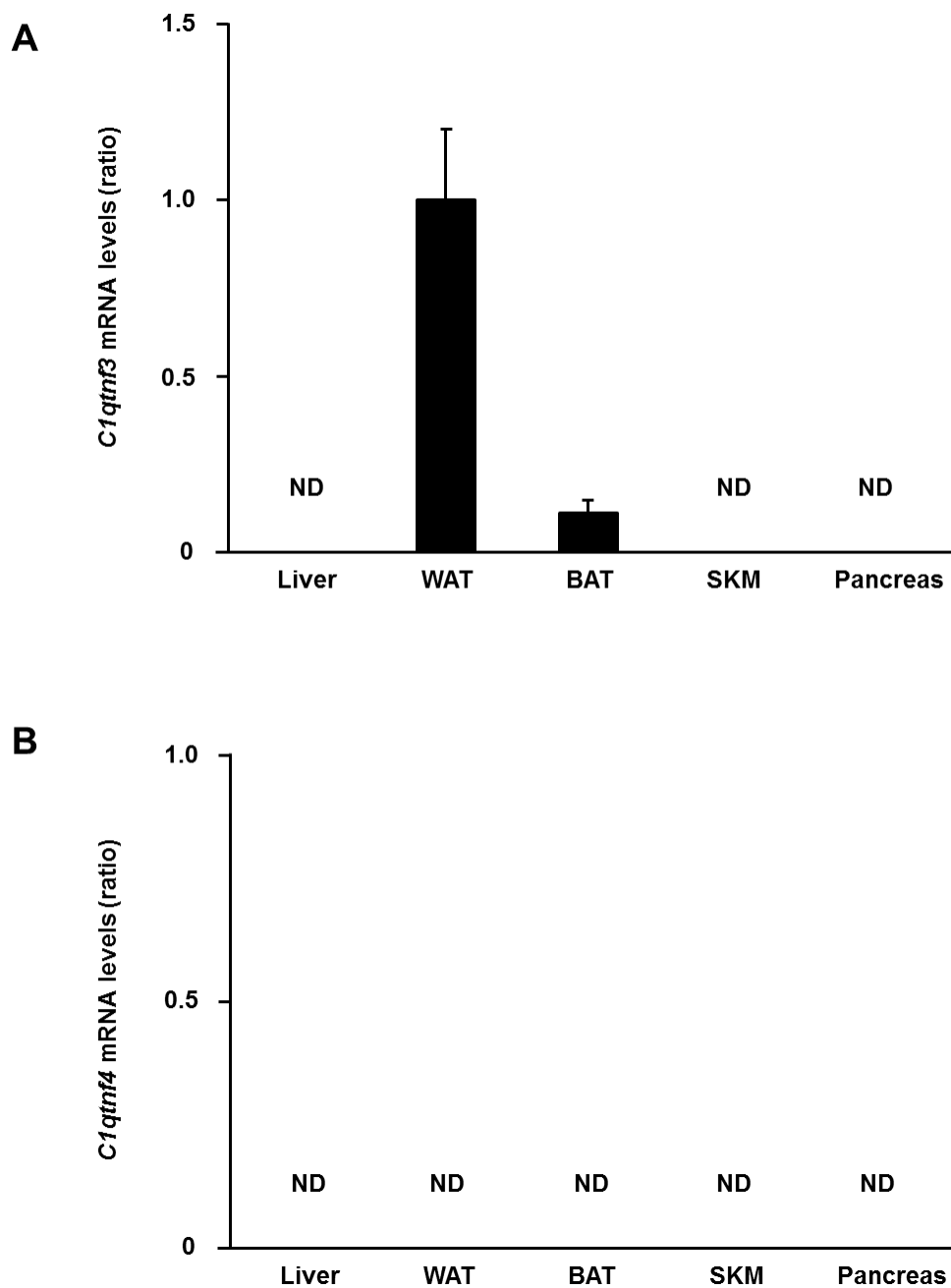


図 5. 肝臓、白色脂肪組織、褐色脂肪組織、骨格筋、膵臓での遺伝子発現

A. CTRP3 (*C1qtnf3*) mRNA

B. CTRP4 (*C1qtnf4*) mRNA

WAT : white adipose tissues, 白色脂肪組織

BAT : brown adipose tissues, 褐色脂肪組織

SKM : skeletal muscles, 骨格筋

ND, Not Detected.

肝臓 n = 3、白色脂肪組織 n = 8、褐色脂肪組織 n = 3、骨格筋 n = 8、膵臓 n = 3

18S rRNA (*Rn18s*) で相対補正し最大発現量を 1 とした

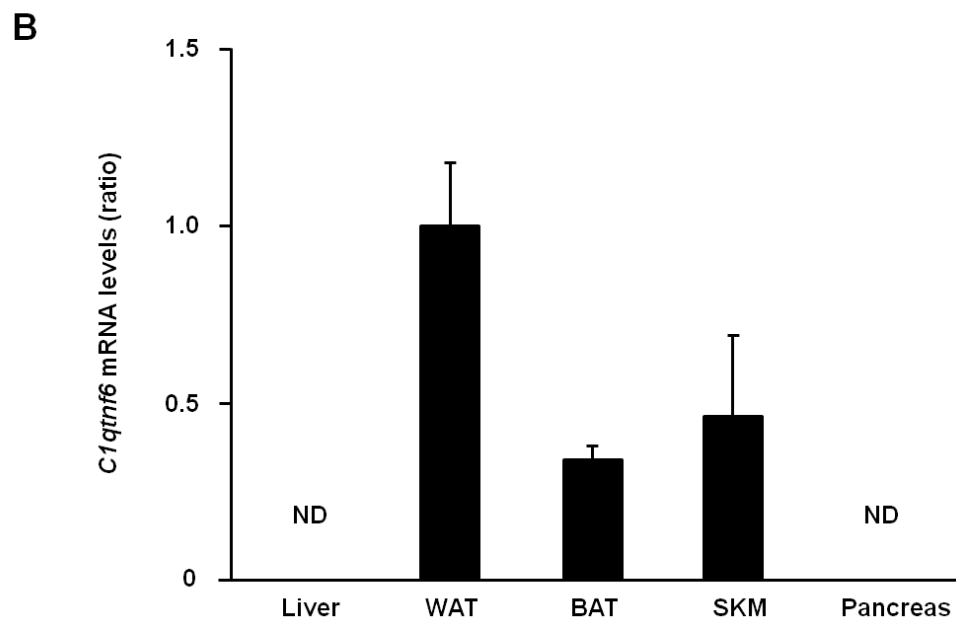
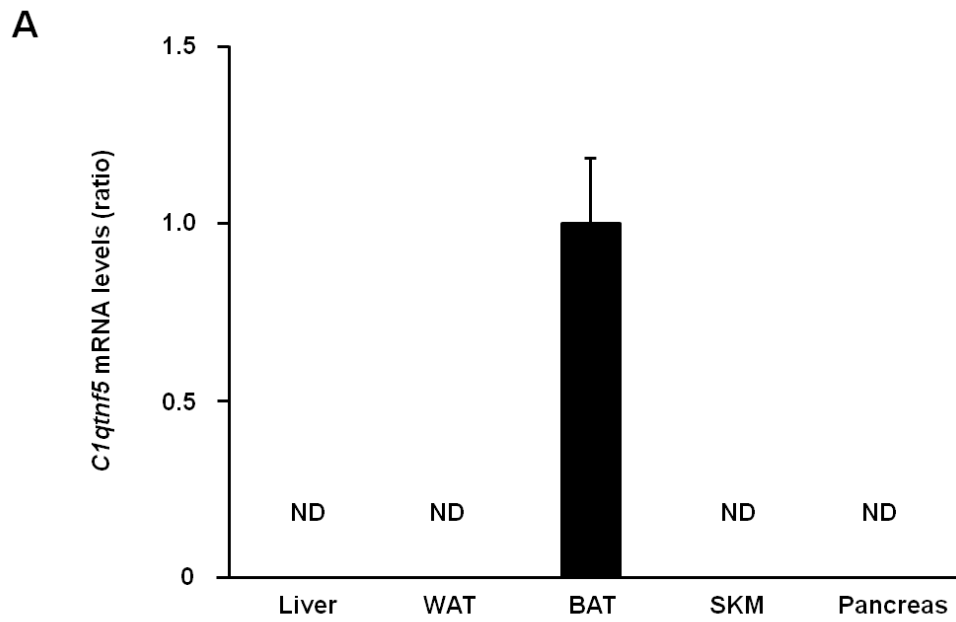


図 6. 肝臓、白色脂肪組織、褐色脂肪組織、骨格筋、膵臓での遺伝子発現

A. CTRP5 (*C1qtnf5*) mRNA

B. CTRP6 (*C1qtnf6*) mRNA

WAT : white adipose tissues, 白色脂肪組織

BAT : brown adipose tissues, 褐色脂肪組織

SKM : skeletal muscles, 骨格筋

ND, Not Detected

肝臓 n = 3、白色脂肪組織 n = 8、褐色脂肪組織 n = 3、骨格筋 n = 8、膵臓 n = 3

18S rRNA (*Rn18s*) で相対補正し最大発現量を 1 とした

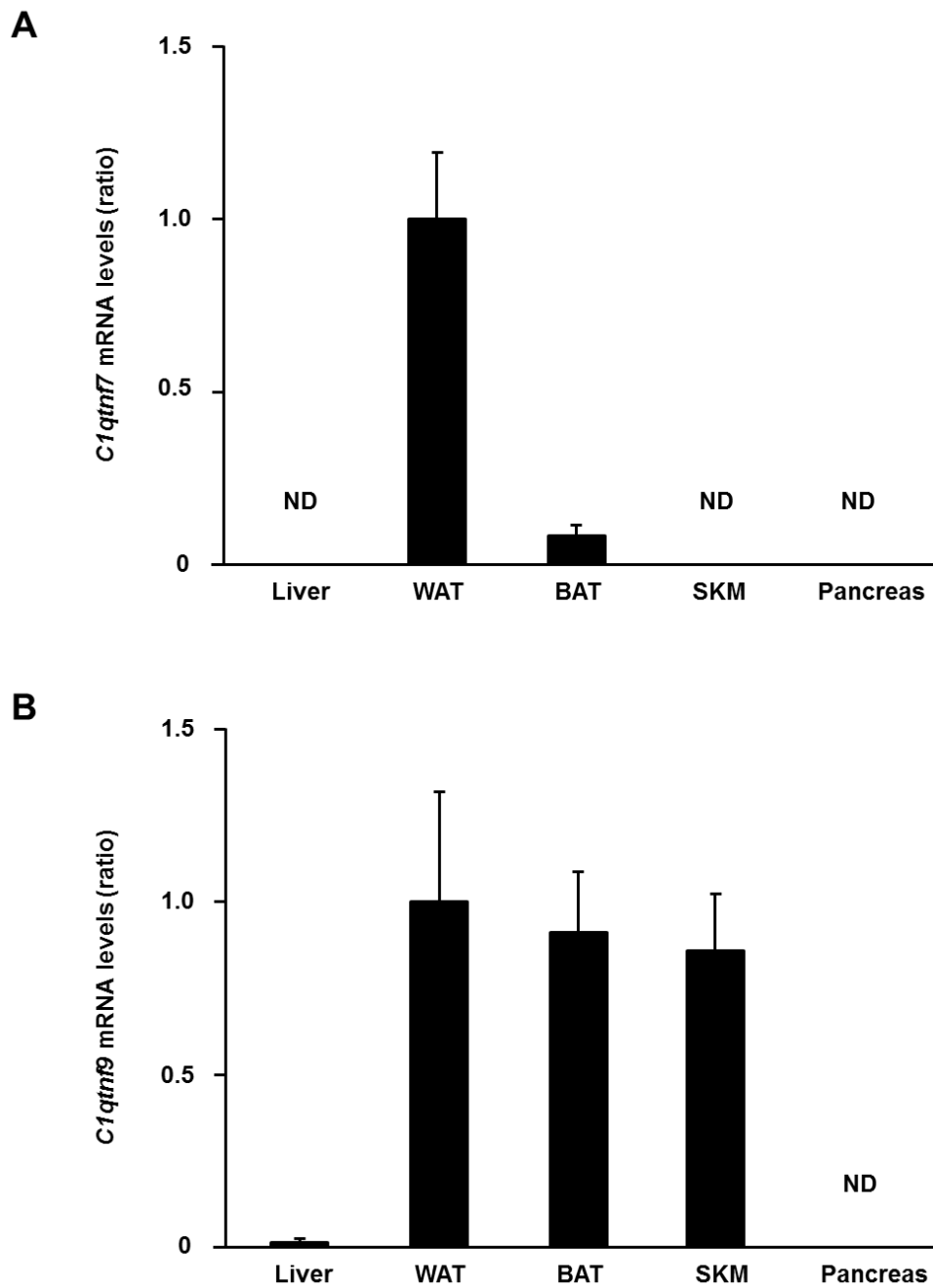


図 7. 肝臓、白色脂肪組織、褐色脂肪組織、骨格筋、膵臓での遺伝子発現

A. CTRP7 (*C1qtnf7*) mRNA

B. CTRP9 (*C1qtnf9*) mRNA

WAT : white adipose tissues, 白色脂肪組織

BAT : brown adipose tissues, 褐色脂肪組織

SKM : skeletal muscles, 骨格筋

ND, Not Detected

肝臓 n = 3、白色脂肪組織 n = 8、褐色脂肪組織 n = 3、骨格筋 n = 8、膵臓 n = 3

18S rRNA (*Rn18s*) で相対補正し最大発現量を 1 とした

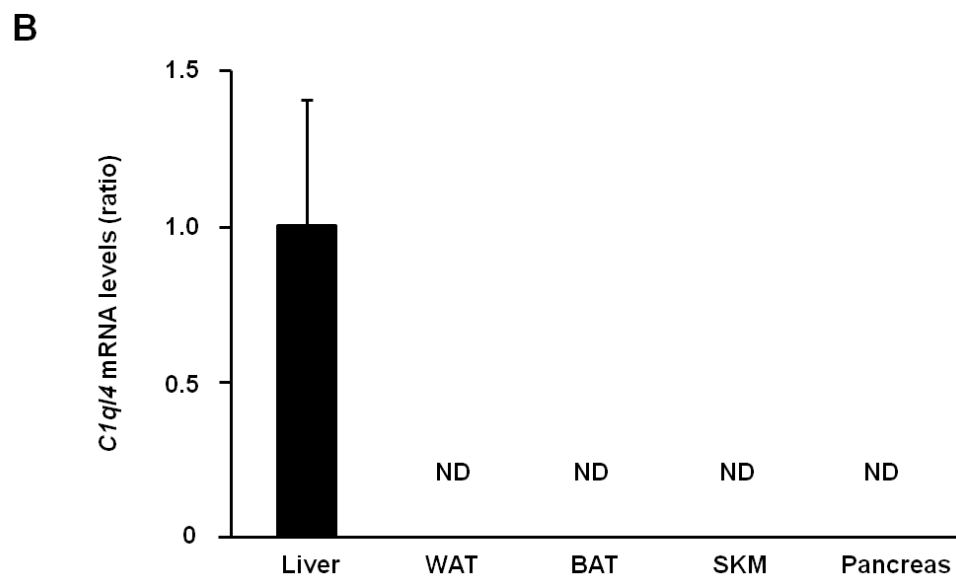
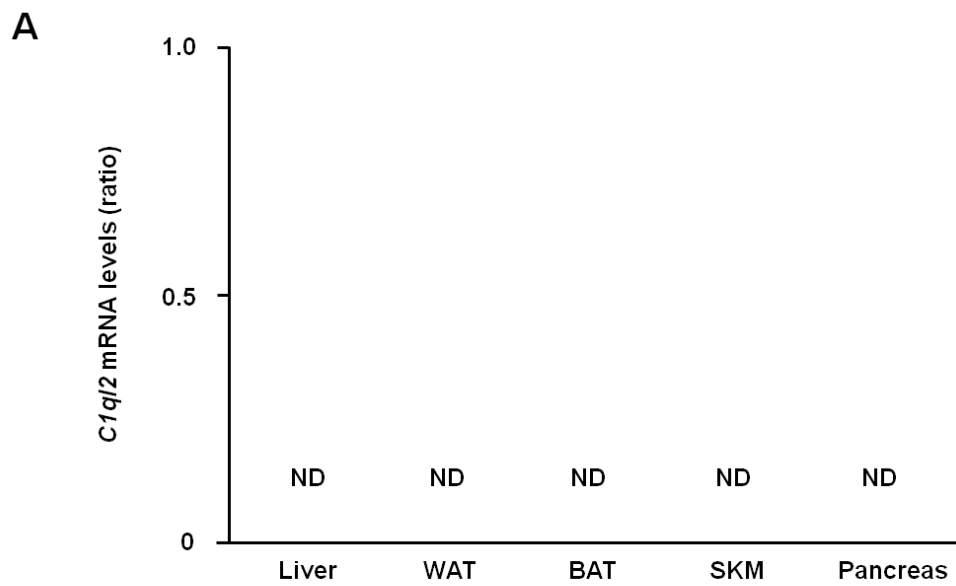


図 8. 肝臓、白色脂肪組織、褐色脂肪組織、骨格筋、膵臓での遺伝子発現

A. CTRP10 (*C1ql2*) mRNA

B. CTRP11 (*C1ql4*) mRNA

WAT : white adipose tissues, 白色脂肪組織

BAT : brown adipose tissues, 褐色脂肪組織

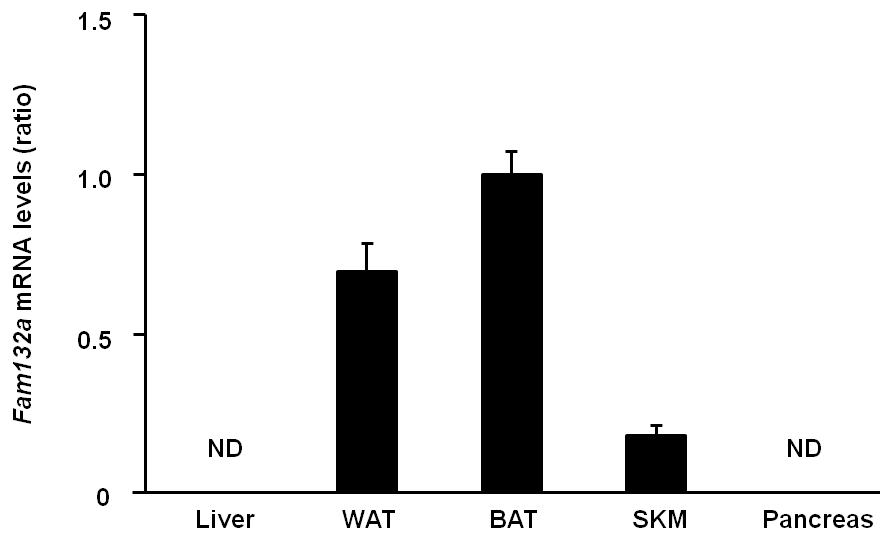
SKM : skeletal muscles, 骨格筋

ND, Not Detected

肝臓 n = 3、白色脂肪組織 n = 8、褐色脂肪組織 n = 3、骨格筋 n = 8、膵臓 n = 3

18S rRNA (*Rn18s*) で相対補正し最大発現量を 1 とした

A



B

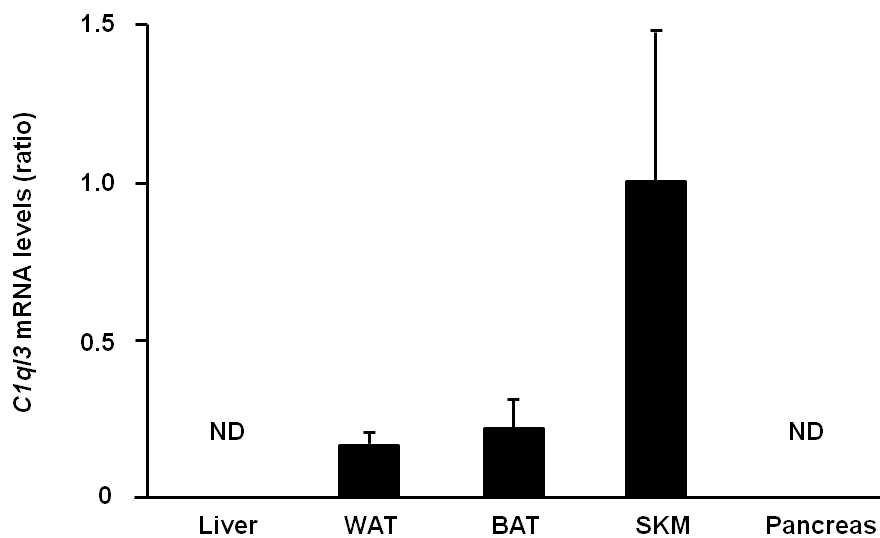


図 9. 肝臓、白色脂肪組織、褐色脂肪組織、骨格筋、膵臓での遺伝子発現

A. CTRP12 (*Fam132a*) mRNA

B. CTRP13 (*C1ql3*) mRNA

WAT : white adipose tissues, 白色脂肪組織

BAT : brown adipose tissues, 褐色脂肪組織

SKM : skeletal muscles, 骨格筋

ND, Not Detected

肝臓 n = 3、白色脂肪組織 n = 8、褐色脂肪組織 n = 3、骨格筋 n = 8、膵臓 n = 3

18S rRNA (*Rn18s*) で相対補正し最大発現量を 1 とした

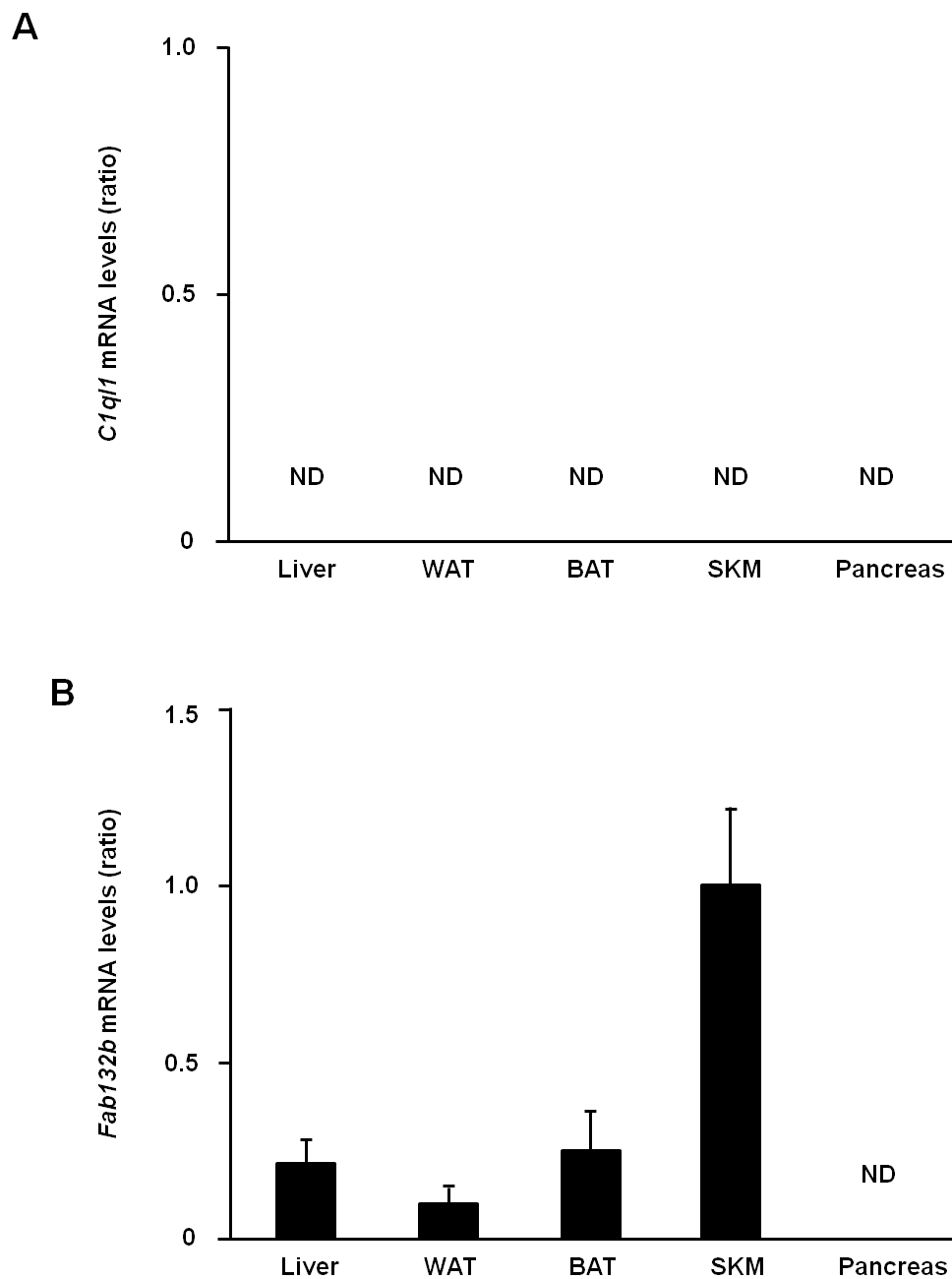


図 10. 肝臓、白色脂肪組織、褐色脂肪組織、骨格筋、膵臓での遺伝子発現

A. CTRP14 (*C1ql1*) mRNA

B. CTRP15 (*Fam132b*) mRNA

WAT : white adipose tissues, 白色脂肪組織

BAT : brown adipose tissues, 褐色脂肪組織

SKM : skeletal muscles, 骨格筋

ND, Not Detected

肝臓 n = 3、白色脂肪組織 n = 8、褐色脂肪組織 n = 3、骨格筋 n = 8、膵臓 n = 3

18S rRNA (*Rn18s*) で相対補正し最大発現量を 1 とした

以上より、CTRP1-CTRP15のうち、CTRP1、CTRP2、CTRP3、CTRP6、CTRP7、CTRP9は比較的白色脂肪組織に多く発現していることが明らかになった。

アディポネクチン欠損マウスの白色脂肪組織において、CTRPs mRNAの発現が増加していた

そこで、アディポネクチン同様に白色脂肪組織に多く発現しているCTRP1、CTRP2、CTRP3、CTRP6、CTRP7、CTRP9に絞って以下実験を進めていくこととした。CTRPがアディポネクチン作用を代償しているという仮説に基づき、アディポネクチンの欠損に伴い発現が増加しているCTRPを探索するため、野生型マウスとアディポネクチン欠損マウスの白色脂肪組織におけるCTRP1、CTRP2、CTRP3、CTRP6、CTRP7、CTRP9の遺伝子発現を定量的RT-PCR法を用いて検討した。大変興味深いことに、アディポネクチン欠損マウスの白色脂肪組織において、野生型マウスと比較し、CTRP1、CTRP3、CTRP6、CTRP7は有意差を持って発現増加を認めた(図11)。

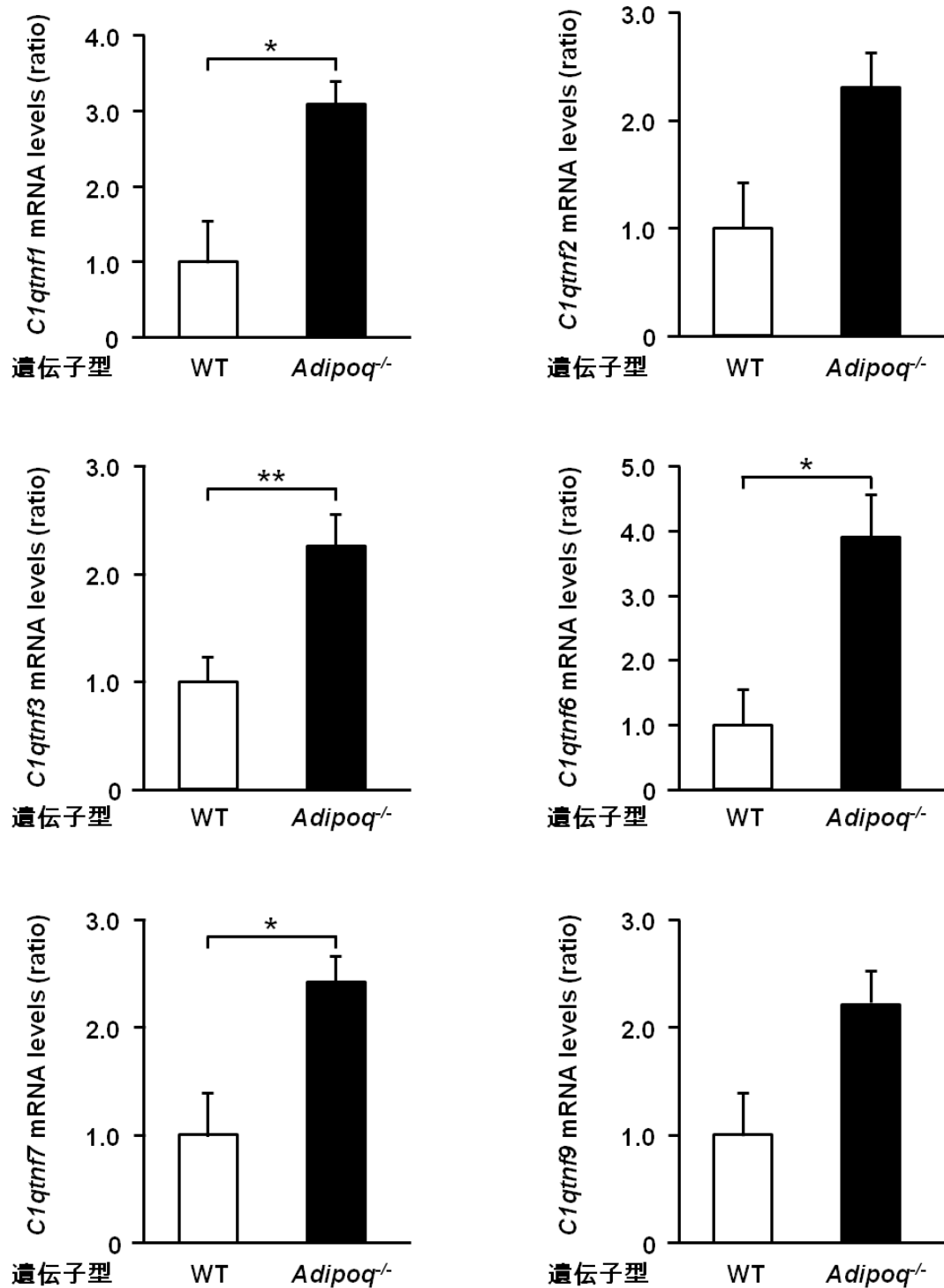


図 11. アディポネクチン欠損マウスの白色脂肪組織における遺伝子発現
 WT, 野生型マウス. *Adipoq*^{-/-}, アディポネクチン欠損マウス.

マウスは WT n = 5、*Adipoq*^{-/-} n = 4

Cyclophilin (*Ppia*) で相対補正

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

アディポネクチン投与により白色脂肪組織における CTRPs mRNA の発現が低下した

アディポネクチン欠損に対する反応として CTRP 遺伝子の発現が増えていたと仮定すると、逆にアディポネクチンを補充すれば CTRP 遺伝子の発現は低下するのではないかと考え、次に、db/db アディポネクチン欠損マウスに、リコンビナントアディポネクチン 50 $\mu\text{g}/\text{day}$ を、1 週間腹腔内投与を行った。その結果、アディポネクチンを補充すると CTRP2、CTRP3、CTRP7、CTRP9 で mRNA の発現は、有意差は認められないものの発現が低下する方向に動いた (図 12)。

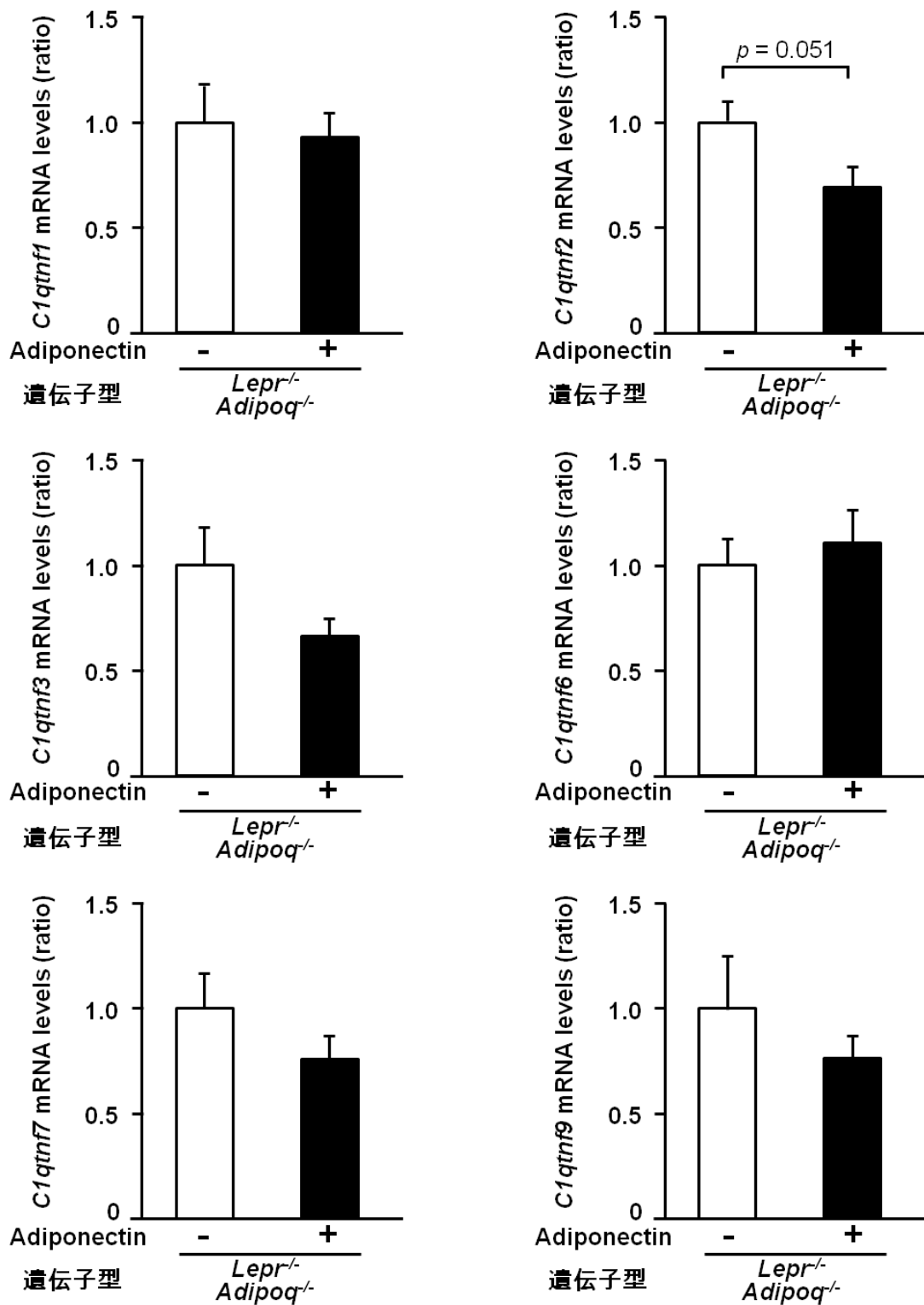


図 12. db/db アディポネクチン欠損マウスの白色脂肪組織における遺伝子発現
Lepr^{-/-} Adipoq^{-/-}, db/db アディポネクチン欠損マウス
 マウスは各群 n = 5
 Cyclophilin (*Ppia*) で相対補正

アディポネクチン受容体 **AdipoR1**・**AdipoR2** ダブル欠損マウスの白色脂肪組織において、**CTRPs mRNA** の発現が増加していた

アディポネクチン欠損マウスの白色脂肪組織において **CTRP** ファミリーの mRNA 発現が上昇し、アディポネクチンの補充でその発現が低下する方向に動いたことから、アディポネクチン/アディポネクチン受容体経路が関与している可能性が考えられたため、次に、野生型マウスとアディポネクチン受容体 **AdipoR1**・**AdipoR2** ダブル欠損マウスの白色脂肪組織における **CTRP** の遺伝子発現量を検討した。その結果、大変興味深いことにアディポネクチン受容体 **AdipoR1**・**AdipoR2** ダブル欠損マウスの白色脂肪組織において **CTRP3**、**CTRP7** の mRNA 発現が有意に増加し、**CTRP1** では発現増加傾向を認めた (図 13)。

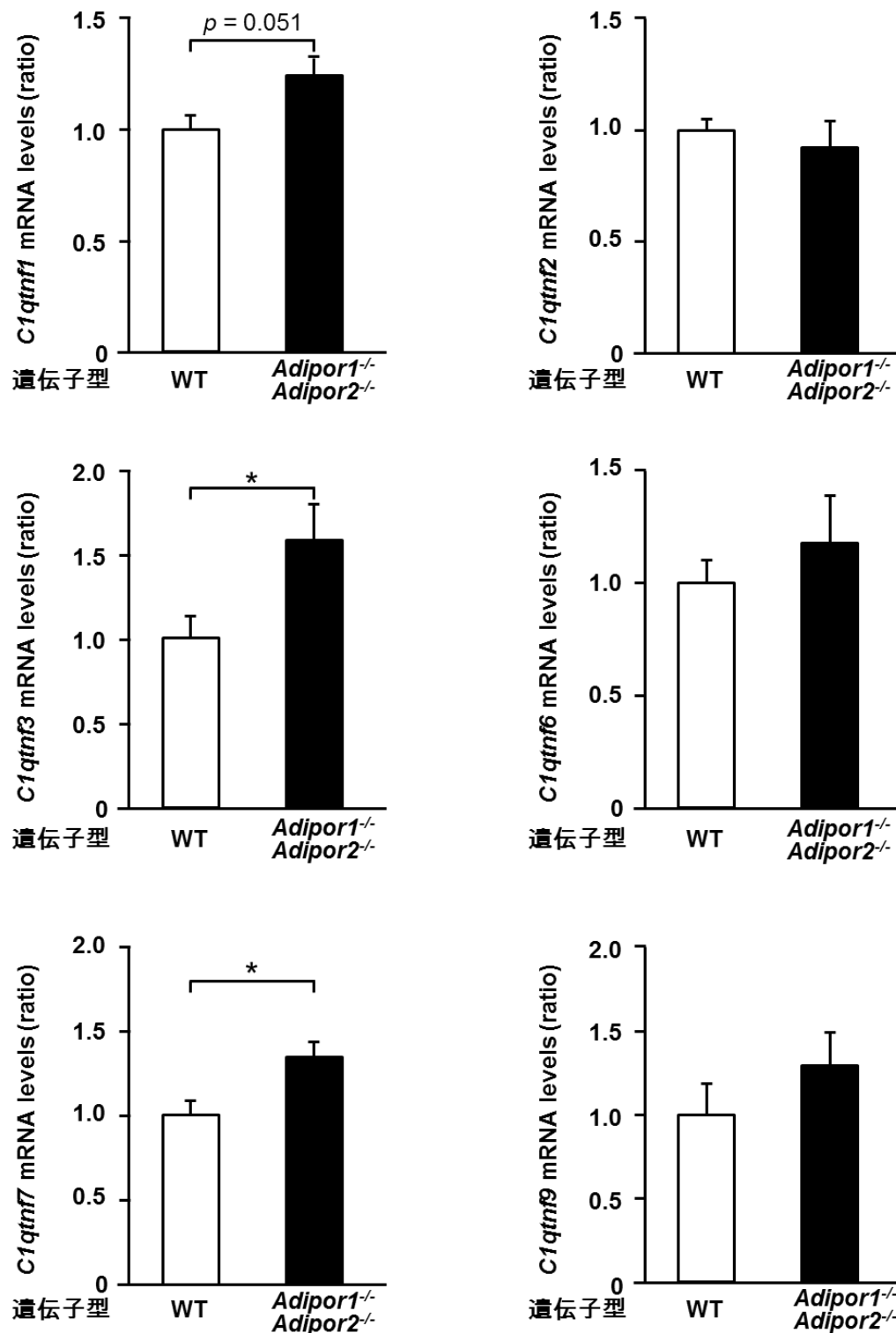


図 13. アディポネクチン受容体 AdipoR1・AdipoR2 ダブル欠損マウスの白色脂肪組織における遺伝子発現

WT, 野生型マウス. *Adipor1*^{-/-}*Adipor2*^{-/-}, アディポネクチン受容体 AdipoR1・AdipoR2 ダブル欠損マウス.

マウスは各群 n = 9. Cyclophilin (*Ppia*) で相対補正。**p* < 0.05

肥満・2型糖尿病モデルマウスに高脂肪食を負荷することにより、白色脂肪組織における CTRPs mRNA の発現は低下した

次に、病態モデルマウスにおける CTRP ファミリーの発現変化を検討した。過食による肥満・2型糖尿病モデルマウスである db/db マウスに高脂肪食を2週間負荷したところ、CTR1 の mRNA 発現が有意に低下し、CTR7 mRNA の発現低下傾向が認められた。CTR3、CTR9 も同様に高脂肪食負荷により発現は低下したが有意差を認めなかった。一方、CTR2 は高脂肪食負荷でも普通食でも発現量はほぼ同じで病態による変化は見られず、CTR6 については有意差はないものの高脂肪食負荷によりその mRNA 発現量は増加していた (図 14)。

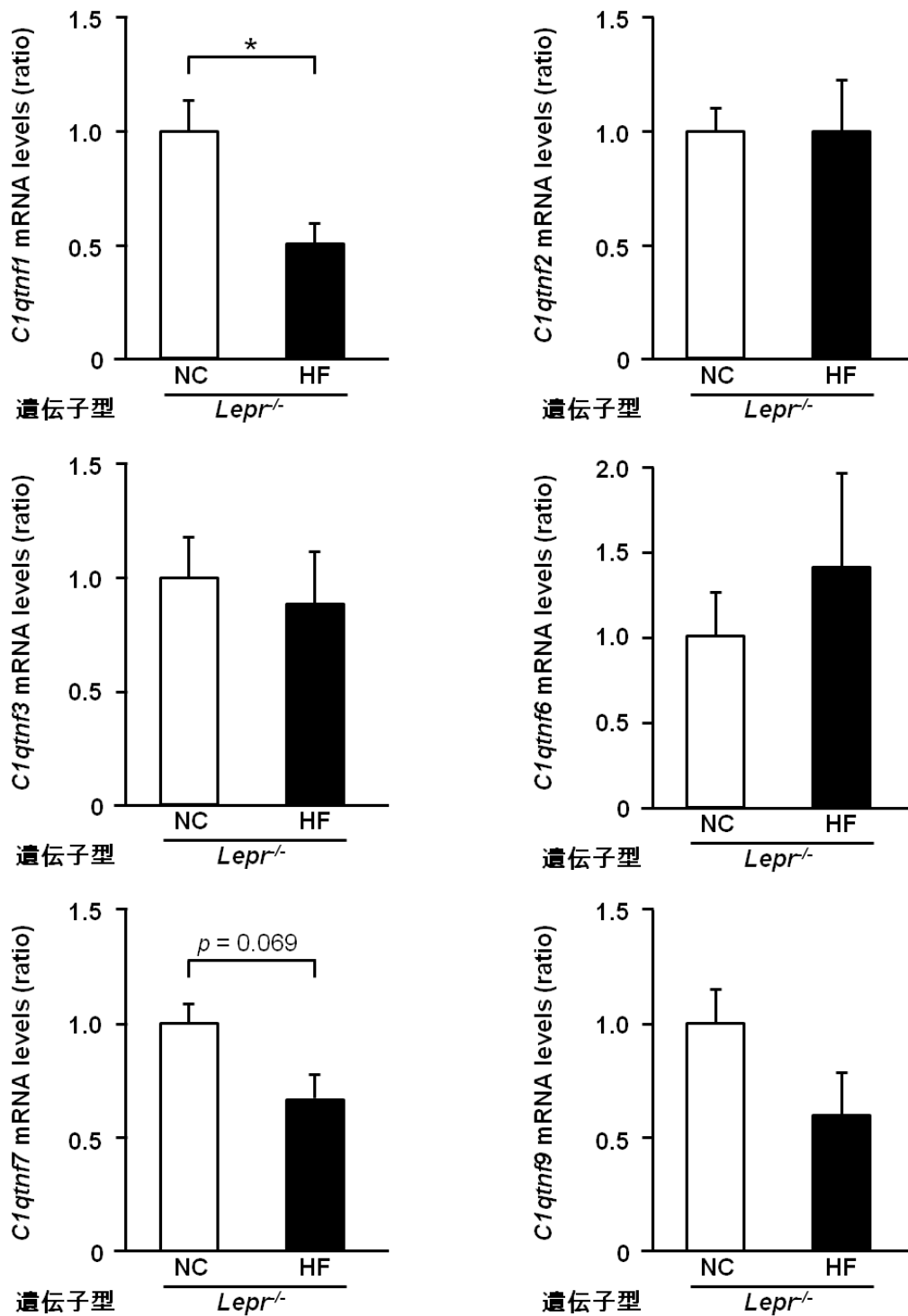


図 14. 高脂肪食負荷 db/db マウスの白色脂肪組織における遺伝子発現
NC, 普通食. HF, 高脂肪食.

Lepr^{-/-}, db/db マウス

マウスは各群 n = 3

























Cyclophilin (*Ppia*) で相対補正

* $p < 0.05$

以上の結果をまとめると、CTRP1、CTRP7 の mRNA 発現量は、アディポネクチン欠損マウスの脂肪組織において、野生型マウスと比較し有意に増加していたが、db/db アディポネクチン欠損マウスではアディポネクチンの補充によりその発現は低下した。また、アディポネクチン受容体 AdipoR1・AdipoR2 ダブル欠損マウスの脂肪組織において、アディポネクチン欠損マウスと同様に CTRP1、CTRP7 の遺伝子発現は増加していた。興味深いことに、肥満・2 型糖尿病モデルマウスである db/db マウスに高脂肪食を負荷するとアディポネクチンレベルが低下することが明らかとなっているが^[9]、それと同様に CTRP の発現も低下しており、病態によって変化しうると考えられた (表 1)。今回の実験結果から、特に CTRP1 と CTRP7 がアディポネクチン作用を代償する分子の候補として挙げられるが、CTRP1 は CTRP7 よりもユビキタスに発現していたため、まずはアディポネクチン同様に脂肪細胞に多く発現している CTRP7 の機能解析を行うこととした。

表 1. アディポネクチン欠損マウス、アディポネクチン受容体 AdipoR1・AdipoR2 ダブル欠損マウス、病態モデルマウスにおける、白色脂肪組織での CTRP ファミリーの遺伝子発現変化

太矢印 $p < 0.1$, 細矢印 $p \geq 0.1$

	アディポネクチン欠損マウス	アディポネクチンの補充	AdipoR1・AdipoR2 ダブル欠損マウス	高脂肪食負荷
CTRP1				
CTRP2				
CTRP3				
CTRP6				
CTRP7				
CTRP9				

3T3-L1 脂肪細胞において、CTRP7 mRNA 発現量は分化に伴い増加し、さらに肥大化に伴うアディポネクチン発現量の低下後に CTRP7 mRNA の発現は最大となった

次に *in vitro* の系で検証した。3T3-L1 脂肪細胞において、分化に伴ってアディポネクチンの発現量が上昇し、より肥大化するとその発現量は低下することが明らかになっている^[4,7]。そこで、CTRP7 も脂肪細胞の分化・肥大化に伴ってその発現量が変わるかどうかを検討するために、3T3-L1 脂肪細胞を用い

て、分化誘導日、分化誘導 2、4、6、8、12、16、24 日後の CTRP7 mRNA 発現量の経時変化を定量的 RT-PCR 法を用いて調べた。アディポネクチンは脂肪細胞の分化に伴いその発現量は上昇し、分化 12 日後に発現量がピークとなった。一方、CTRP7 はアディポネクチン同様に、脂肪細胞の分化に伴って発現量は増加したが、非常に興味深いことに、アディポネクチンよりも遅い分化 16 日後にその発現量はピークとなった。また、アディポネクチンは肥大化に伴いその遺伝子発現量は低下したが、CTRP7 は肥大化に伴う発現量の低下の程度は少なく、分化 24 日後までには有意な発現低下を認めなかった (図 15A,B)。なお、他の CTRP2、CTRP3、CTRP6 については、アディポネクチンと同様のパターンを呈した (図 15C-E)。

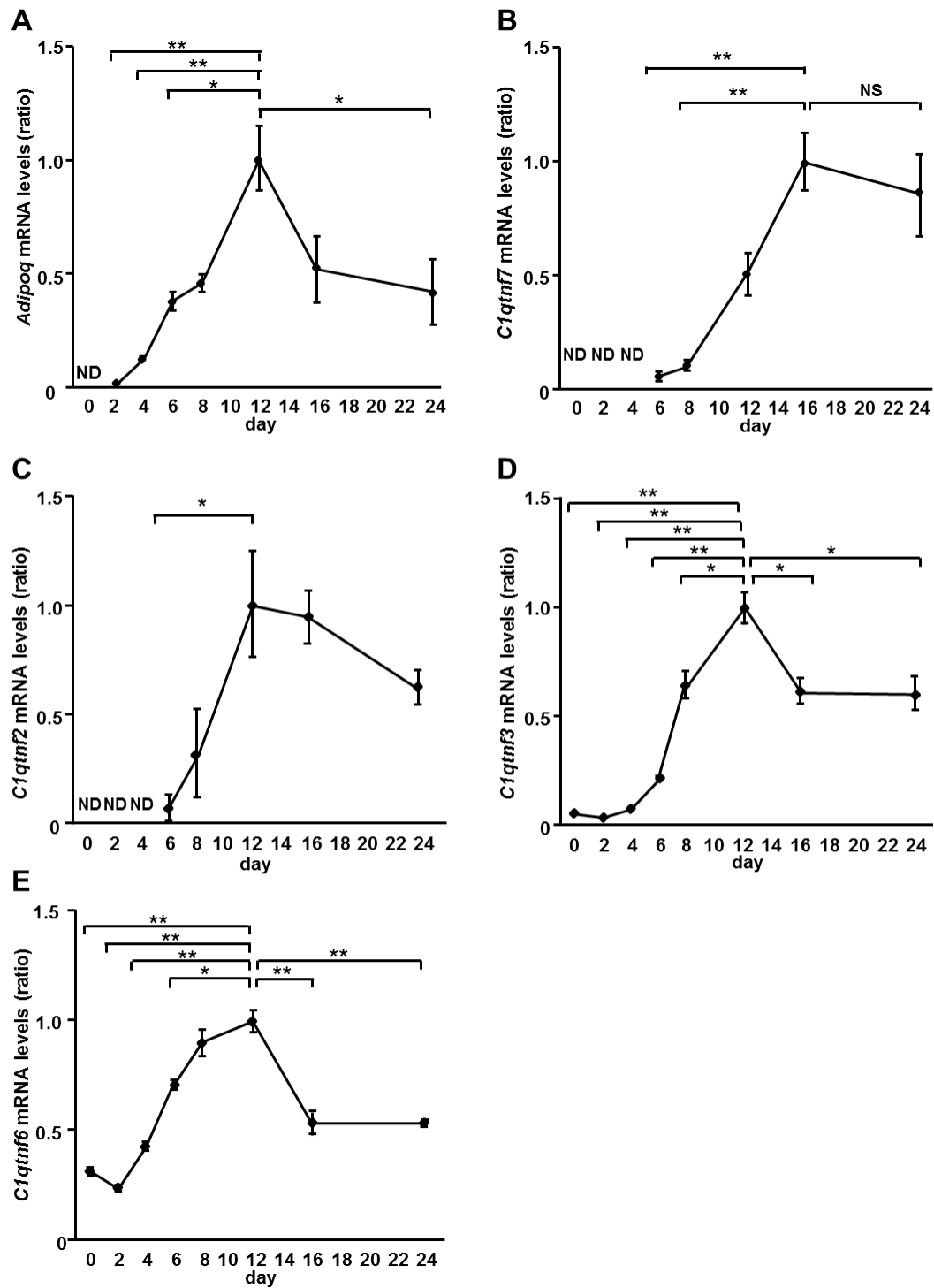


図 15. 3T3-L1 脂肪細胞の分化過程における遺伝子発現変化
 adiponectin (*Adipoq*) mRNA (A)、CTRP7 (*C1qtnf7*) mRNA (B)、CTRP2 (*C1qtnf2*)
 mRNA (C)、CTRP3 (*C1qtnf3*) mRNA (D)、CTRP6 (*C1qtnf6*) mRNA (E)。
 ND, Not Detected. NS, Not Significant. 各 day n = 6。
 day0 は分化誘導日。36B4 (*Rplp0*) で相対補正し最大発現量を 1 とした。
 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$

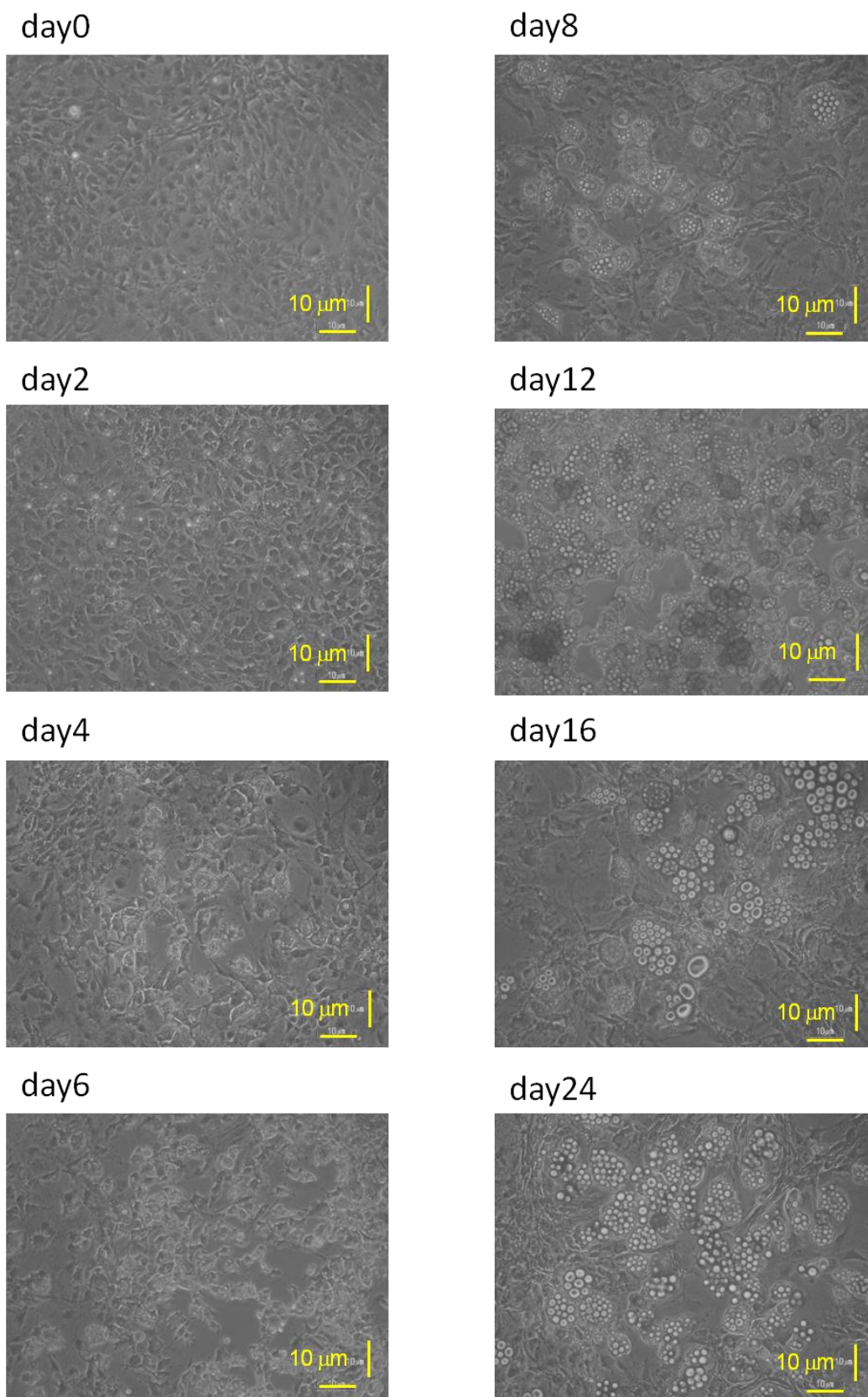


図 16. 3T3-L1 脂肪細胞

globular CTRP7 はアディポネクチンと同様の **time course** で、濃度依存的に AMPK を活性化させた

次にリコンビナント CTRP7 を精製し、CTR7 の機能解析を行った。まず、full-length CTRP7 に比べて、globular CTRP7 の方が大腸菌から大量に精製することができたため、globular CTRP7 で実験を行うこととした (図 17)。

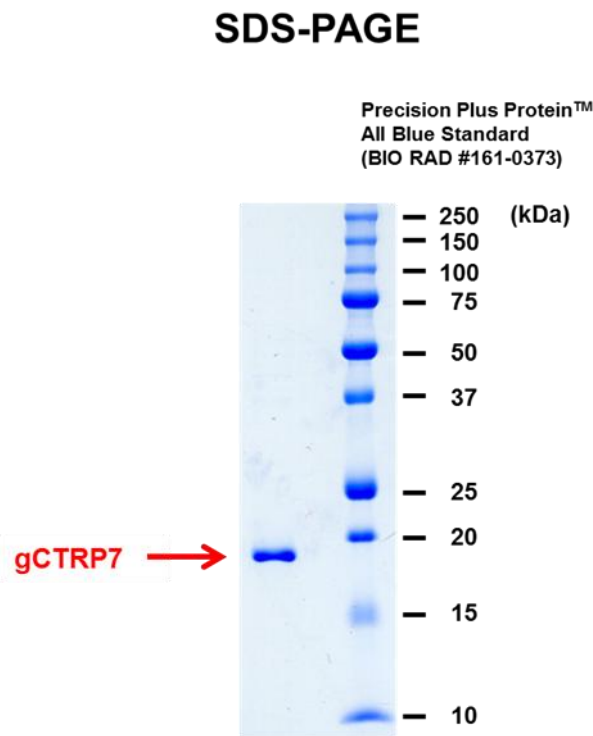


図 17. globular CTRP7 の SDS-PAGE・CBB 染色
gCTR7, globular CTRP7

分化した C2C12 骨格筋細胞において、globular Adiponectin は full-length

Adiponectin と同様に、AMPK をリン酸化し、活性化するが^[26]、globular CTRP7 もアディポネクチン同様に AMPK 活性化能を有するかどうかを検討した。分化した C2C12 細胞に、刺激時間を 10 分で固定して、0、0.5、1、5、10、20、30、40、50 $\mu\text{g/ml}$ のリコンビナント globular CTRP7 を添加し、Immunoblotting によりリン酸化 AMPK および総 AMPK を検出したところ、アディポネクチン同様に濃度依存的に AMPK を活性化させた (図 18A)。次に、40 $\mu\text{g/ml}$ のリコンビナント globular CTRP7 を刺激時間 0、1、2、5、10、20 分で添加したところ、globular CTRP7 はアディポネクチンと同様の time course で AMPK を活性化させた (図 18B)。

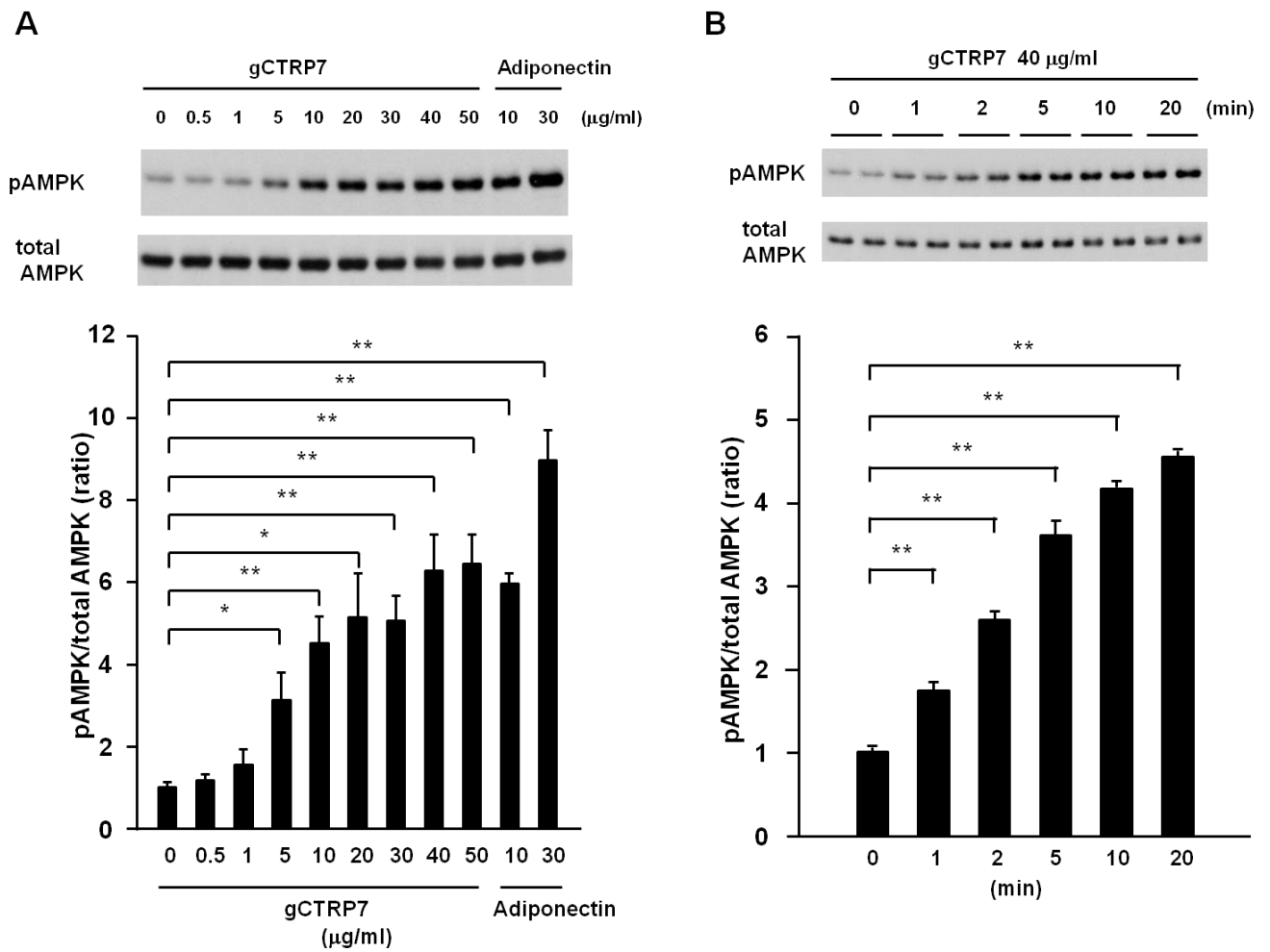


図 18. globular CTRP7 の C2C12 骨格筋細胞における AMPK 活性化能

gCTR7, globular CTRP7
pAMPK, リン酸化 AMPK

Starve 8 時間後

A. 刺激時間 10 分、n = 3。

B. 濃度 40 μg/ml、n = 4。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

db/db マウスにおいて globular CTRP7 の腹腔内投与により血糖値が低下した

次に、CTR7 の *in vivo* における効果を検討した。AMPK は骨格筋にお

ける GLUT4 を介した糖取り込みの促進^[28]、肝臓における糖新生の抑制^[29]によって糖代謝の調節に関与している。globular CTRP7 が AMPK を活性化したことから、CTRP7 に耐糖能を改善する作用があるのではないかと考え、db/db マウスに、体重 10 g あたり 30 μ g のリコンビナント globular CTRP7 を腹腔内投与し、投与前 0 分値の血糖値を 100% としたときの投与 120 分後の血糖値の割合を検討した。非常に興味深いことに globular CTRP7 の腹腔内投与により投与 120 分後の血糖値が有意に低下しており、globular CTRP7 の血糖降下作用が示された (図 19)。

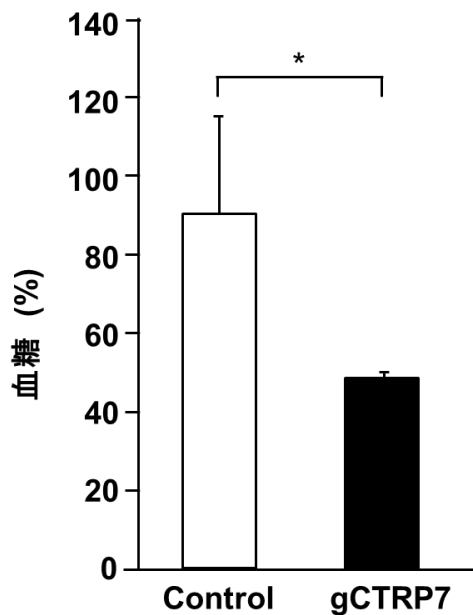


図 19. db/db マウスにおける globular CTRP7 の血糖降下作用

0 分値の血糖値を 100% としたときの globular CTRP7 腹腔内投与 120 分後の血糖値の割合

gCTR7, globular CTRP7

マウスは各群 n = 3

絶食 4 時間後

* $p < 0.05$

考察

今回の解析結果より、CTRP7 が生体内でアディポネクチン様作用を有する候補分子であること、globular CTRP7 が AMPK を活性化させること、globular CTRP7 が血糖降下作用を有することが明らかとなった。

これまでに当研究室では、アディポネクチン受容体欠損マウスを作製し機能解析を行ってきたが、アディポネクチン欠損マウスの表現型がアディポネクチン受容体欠損マウスの表現型に比べて軽度であったため、今回、生体内でアディポネクチン作用を代償する分子が存在する可能性を想定し、その候補分子を探索した。CTRP1-CTRP15 のうち、CTRP1、CTRP2、CTRP3、CTRP6、CTRP7、CTRP9 は比較的白色脂肪組織に多く発現しており、そのうち、CTRP1 と CTRP7 の白色脂肪組織における遺伝子発現は、アディポネクチン欠損マウス、アディポネクチン受容体欠損マウスでは上昇し、アディポネクチンの補充によりその発現は低下していたことから、CTRP1 と CTRP7 がその候補分子に挙げられたが、CTRP1 は CTRP7 よりもユビキタスに発現していたため、まずはアディポネクチン同様に脂肪細胞に多く発現している CTRP7 の機能解析を行った。

また、C2C12 骨格筋細胞を用いた実験で globular CTRP7 が AMPK を活性化することを示したが、これまでに CTRP1、CTRP2、CTRP5、CTRP9、CTRP13 では AMPK を活性化するという報告はあるものの CTRP7 についてはその報告は

なく^[15, 18, 30-33]、今回初めて CTRP7 の AMPK 活性化能が明らかになった。また、CTRP1、CTRP3、CTRP9、CTRP12 については、これまでに *in vivo* で血糖降下作用の報告があるが CTRP7 についてはその報告はなく^[17, 19, 20, 33-35]、今回 db/db マウスに globular CTRP7 を腹腔内投与した実験により、初めて CTRP7 が血糖降下作用を有することが示された。

当研究室ではこれまでに、環境因子とアディポネクチンの遺伝子多型の相互作用による、脂肪細胞からのアディポネクチン分泌量の低下が、インスリン抵抗性、メタボリックシンドローム、2型糖尿病、動脈硬化の発症・増悪を惹起することを明らかにしてきた^[26]。さらに、アディポネクチンの受容体、AdipoR1、AdipoR2 を同定し^[13]、遺伝子改変動物の解析結果から、アディポネクチンが肝臓において AdipoR1 を介して AMPK を活性化し、糖新生関連遺伝子の発現を抑制して、個体レベルでの肝臓を中心とした糖新生を抑制することを示してきた^[14]。また、骨格筋ではアディポネクチン/AdipoR1 経路が、AMP 濃度上昇を介し liver kinase B1 (LKB1) 依存的に AMPK を活性化すること、細胞内カルシウム濃度の上昇を介して Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase β (CaMKK β) 依存的に AMPK を活性化すること、その活性化した AMPK がエネルギー代謝に重要な分子である PPAR γ coactivator-1 α (PGC-1 α) を直接活性化するだけでなく SIRT1 を介しても PGC-1 α を活性化することで、骨格筋におけるミトコンドリア

量・機能を増加し脂肪酸酸化の促進、酸化ストレスの減少を介してインスリン感受性を高めること^[36]、活性化した AMPK が骨格筋において糖取り込みを上昇させることを報告している^[26]。

今回、globular CTRP7 は C2C12 細胞において AMPK を活性化しており、db/db マウスへの globular CTRP7 投与による血糖値低下は投与後 120 分という急性の変化であったことから、globular CTRP7 の血糖降下作用のメカニズムの一部として、AMPK 活性化を介した骨格筋での GLUT4 のトランスロケーションによる糖取り込みの増加、肝臓での糖新生の抑制が仮説として考えられる。今後、骨格筋や肝臓をはじめとした臓器での解析も行い、CTRP7 の血糖降下作用の機序を明らかにしていく。

また、当研究室ではこれまでに、肝臓におけるアディポネクチン/AdipoR1 シグナルは、AMPK を活性化し脂肪酸燃焼の促進や脂肪酸合成を抑制することにより肝臓における中性脂質含量を低下させインスリン抵抗性を改善することを明らかにした^[14]。また、メタボリックシンドロームや脂肪肝の病態では、fatty acid synthase (FAS) や stearyl-CoA desaturase-1 (SCD-1) といった脂肪酸合成に関与する遺伝子の発現が上昇していること、一方で肥満・2 型糖尿病モデルマウスの肝臓において脂肪酸合成に関与する sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) の発現を低下させると脂肪肝が改善することから、メタ

ポリックシンドロームや脂肪肝の治療標的としてこれらの分子は重要であると
考えられている^[37]。今後、CTRP7 を投与したマウスの肝臓における中性脂質含
量や FAS、SCD-1、SREBP-1c の遺伝子発現についても検討することが重要であ
ると考えられた。

さらに、今後 CTRP7 欠損マウスを用いて、生体内における CTRP7 の生
理的意義を検討していく予定であり、現在 CTRP7 欠損マウスの作製に着手して
いる。

アディポネクチンの発現調節については、peroxisome proliferator-activated
receptor γ (PPAR γ)、CCAAT-enhancer-binding protein α (C/EBP α)、SREBP-1c な
どの転写因子によって制御されていることが報告されており^[38-40]、また、糖尿
病治療薬であるチアゾリジン誘導体が PPAR γ を介してアディポネクチンの発現
を直接的に増加させることも明らかとなっている^[38]。アディポネクチンは、3
量体、6 量体、さらには数百 kDa に及ぶ高分子量多量体といった多量体構造を形
成して血中に存在し^[22,41]、中でも高分子量アディポネクチンは AMPK を最も活
性化するフォームと考えられているが^[42,43]、Endoplasmic reticulum resident protein
44 (ERp44) や Endoplasmic oxidoreductin 1 like protein α (Ero-1L α) といった小
胞体シャペロン分子がチアゾリジン誘導体による高分子量アディポネクチンの
分泌促進に関与していることも報告されている^[44]。さらに、空腹・飢餓状態や

カロリー制限により血中アディポネクチン濃度が上昇することや、SIRT1 が PPAR γ の Lys268 と Lys293 を脱アセチル化することでアディポネクチンの発現量を増加させることが近年明らかになってきており^[45]、アディポネクチンの発現調節には多くの分子が複雑に寄与していると考えられる。

一方、CTRP ファミリーの発現調節機構については、現時点では明らかにはなっていない。しかし、今回の実験において、アディポネクチン欠損およびアディポネクチン受容体欠損のいずれでも CTRP7 の発現が上昇していることから、CTRP7 の発現調節の一つとして、まずはアディポネクチン受容体を介したメカニズム、すなわちアディポネクチンシグナル低下に伴い up regulate するという発現調節が考えられる。その一方で、CTRP7 の遺伝子発現は db/db マウスに高脂肪食を負荷した際にアディポネクチン同様に低下しており、病態でも変化すると考えられるため、アディポネクチン/アディポネクチン受容体経路以外のメカニズムでも、CTRP7 の発現調整メカニズムを検討していくことが重要であり、今回 db/db アディポネクチン欠損にアディポネクチンを補充しても CTRP mRNA の発現低下に有意差がつかなかった原因としては、CTRP の一部は血糖値、インスリン抵抗性の悪化に伴い発現が低下することが明らかとなったことから、今回はアディポネクチンの補充によりこれら病態が改善したため、CTRP の発現は増加する方向に動き、その影響があった可能性も示唆される。さらに、3T3-L1

脂肪細胞の実験結果からは、脂肪細胞の分化に伴って CTRP7 の発現は増加しており、実際に、どのようなメカニズムが CTRP7 の発現調節を担っているのかについては、今後検討していきたい。

リガンドと受容体の関係性に関しては、実際に CTRP7 がアディポネクチン受容体と結合しアディポネクチン様作用を有するかどうか、また、結合する場合は AdipoR1、AdipoR2 のどちらと主に結合するかなどを含めて、今後、結合アッセイなど詳細な検討が必要である。さらに、CTRP7 がアディポネクチン受容体のリガンドとして作用するのであればアディポネクチンを阻害しないかどうか競合アッセイを行う必要がある。

CTRP ファミリーはアディポネクチン同様にシグナルペプチドを有しており、血中に分泌されている可能性が高く、実際に、CTRP1、CTRP2、CTRP3、CTRP 5、CTRP6、CTRP9、CTRP12、CTRP13、CTRP15 については *in vivo* の実験で血中に分泌されているという報告がある^[18-20, 35, 46]。全てについての具体的な濃度の報告はないものの、報告されているものに関しては 0.2-1 µg/ml 程度で、アディポネクチンの 1/10-1/100 程度の血中濃度であるが^[47]、この点からも、CTRP のアディポネクチン受容体への親和性をアディポネクチンと比較して検証したい。さらに CTRP1、CTRP3、CTRP9、CTRP12、CTRP15 については食餌性肥満マウスモデルで血中濃度の低下が報告されている^[17, 30, 32, 34, 46, 48]。今回は血中

CTRP 濃度については検討していないため、今後、CTRP7 が血中に分泌されているか否か、また、血中 CTRP7 濃度がアディポネクチン同様に肥満の進行に伴って低下していくか、さらに、摂食による CTRP7 の発現変動や日内変動についても現時点では明らかになっていないため、この点についても今後検討の必要がある。

また、ヒト血清中には CTRP1, CTRP3, CTRP5, CTRP9, CTRP12 の存在が報告されているが^[49-57]、CTRP7 のみならずその他の CTRP も含めてヒト血清中における CTRP の有無を今後検証していきたい。

当研究室で、アディポネクチン受容体アゴニストである、アディポネクチン受容体活性化低分子化合物 (AdipoRon) が抗糖尿病作用を示し、2 型糖尿病などの肥満関連疾患の効果的な治療法となりうること、さらには、肥満で短くなった寿命を改善することを報告してきたように^[25]、アディポネクチンやアディポネクチン受容体を増加・活性化させる物質は、メタボリックシンドロームや 2 型糖尿病、動脈硬化の根本的治療法の開発の道を切り開く可能性がある。本研究において、CTRP7 は代謝に重要な組織において AMPK を活性化しインスリン抵抗性や耐糖能障害を改善している可能性が示唆された。また、脂肪細胞が肥大化して、肥満の進行・病態の悪化に伴い CTRP7 の発現は低下する可能性が示唆された (図 20)。今後、CTRP7 の病態生理的意義を解明することが、肥

満関連疾患の根本的治療法の開発の道を切り開くにあたって非常に重要である
と考えられた。

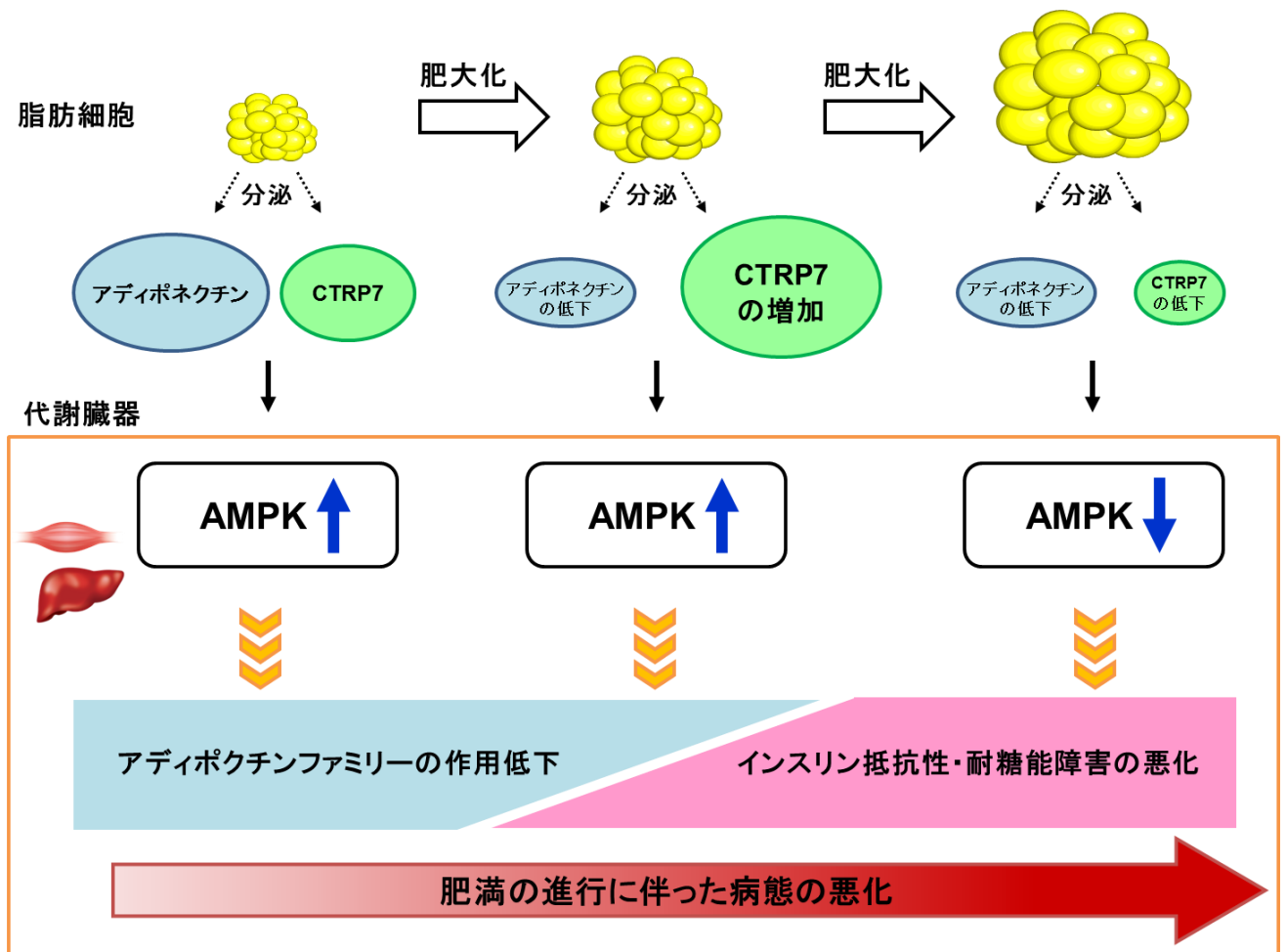


図 20. CTRP7 の作用機序 (仮説)

引用文献

1. International Diabetes Federation, *IDF diabetes Atlas 6th edition*:11 (2013).
2. 厚生労働省, 平成 24 年国民健康・栄養調査報告:33 (2013).
3. Matsuzawa, Y., T. Funahashi, and T. Nakamura, Molecular mechanism of metabolic syndrome X: contribution of adipocytokines adipocyte-derived bioactive substances. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **892**:146-154 (1999).
4. Hu, E., P. Liang, and B.M. Spiegelman, AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *Journal of Biological Chemistry*. **271**:10697-10703 (1996).
5. Maeda, K., K. Okubo, I. Shimomura, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, and K. Matsubara, cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **221**:286-289 (1996).
6. Nakano, Y., T. Tobe, N.H. Choi-Miura, T. Mazda, and M. Tomita, Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *Journal of Biochemistry*. **120**:803-812 (1996).
7. Scherer, P.E., S. Williams, M. Fogliano, G. Baldini, and H.F. Lodish, A novel

- serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*. **270**:26746-26749 (1995).
8. Yamauchi, T., J. Kamon, H. Waki, K. Murakami, K. Motojima, K. Komeda, T. Ide, N. Kubota, Y. Terauchi, K. Tobe, H. Miki, A. Tsuchida, Y. Akanuma, R. Nagai, S. Kimura, and T. Kadowaki, The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) deficiency and PPARgamma agonist improve insulin resistance. *Journal of Biological Chemistry*. **276**:41245-41254 (2001).
 9. Yamauchi, T., J. Kamon, H. Waki, Y. Terauchi, N. Kubota, K. Hara, Y. Mori, T. Ide, K. Murakami, N. Tsuboyama-Kasaoka, O. Ezaki, Y. Akanuma, O. Gavrilova, C. Vinson, M.L. Reitman, H. Kagechika, K. Shudo, M. Yoda, Y. Nakano, K. Tobe, R. Nagai, S. Kimura, M. Tomita, P. Froguel, and T. Kadowaki, The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nature Medicine*. **7**:941-946 (2001).
 10. Yamauchi, T., H. Waki, J. Kamon, K. Murakami, K. Motojima, K. Komeda, H. Miki, N. Kubota, Y. Terauchi, A. Tsuchida, N. Tsuboyama-Kasaoka, N. Yamauchi, T. Ide, W. Hori, S. Kato, M. Fukayama, Y. Akanuma, O. Ezaki, A. Itai, R. Nagai, S. Kimura, K. Tobe, H. Kagechika, K. Shudo, and T. Kadowaki,

- Inhibition of RXR and PPARgamma ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes. *Journal of Clinical Investigation*. **108**:1001-1013 (2001).
11. Kubota, N., Y. Terauchi, T. Yamauchi, T. Kubota, M. Moroi, J. Matsui, K. Eto, T. Yamashita, J. Kamon, H. Satoh, W. Yano, P. Froguel, R. Nagai, S. Kimura, T. Kadowaki, and T. Noda, Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *Journal of Biological Chemistry*. **277**:25863-25866 (2002).
 12. Maeda, N., I. Shimomura, K. Kishida, H. Nishizawa, M. Matsuda, H. Nagaretani, N. Furuyama, H. Kondo, M. Takahashi, Y. Arita, R. Komuro, N. Ouchi, S. Kihara, Y. Tochino, K. Okutomi, M. Horie, S. Takeda, T. Aoyama, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa, Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nature Medicine*. **8**:731-737 (2002).
 13. Yamauchi, T., J. Kamon, Y. Ito, A. Tsuchida, T. Yokomizo, S. Kita, T. Sugiyama, M. Miyagishi, K. Hara, M. Tsunoda, K. Murakami, T. Ohteki, S. Uchida, S. Takekawa, H. Waki, N.H. Tsuno, Y. Shibata, Y. Terauchi, P. Froguel, K. Tobe, S. Koyasu, K. Taira, T. Kitamura, T. Shimizu, R. Nagai, and T. Kadowaki, Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. **423**:762-769 (2003).

14. Yamauchi, T., Y. Nio, T. Maki, M. Kobayashi, T. Takazawa, M. Iwabu, M. Okada-Iwabu, S. Kawamoto, N. Kubota, T. Kubota, Y. Ito, J. Kamon, A. Tsuchida, K. Kumagai, H. Kozono, Y. Hada, H. Ogata, K. Tokuyama, M. Tsunoda, T. Ide, K. Murakami, M. Awazawa, I. Takamoto, P. Froguel, K. Hara, K. Tobe, R. Nagai, K. Ueki, and T. Kadowaki, Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nature Medicine*. **13**:332-339 (2007).
15. Wong, G.W., J. Wang, C. Hug, T.S. Tsao, and H.F. Lodish, A family of Acrp30/adiponectin structural and functional paralogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101**:10302-10307 (2004).
16. Schaffler, A. and C. Buechler, CTRP family: linking immunity to metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. **23**:194-204 (2012).
17. Peterson, J.M., Z. Wei, and G.W. Wong, C1q/TNF-related protein-3 (CTRP3), a novel adipokine that regulates hepatic glucose output. *Journal of Biological Chemistry*. **285**:39691-39701 (2010).
18. Wei, Z., J.M. Peterson, and G.W. Wong, Metabolic regulation by C1q/TNF-related protein-13 (CTRP13): activation OF AMP-activated protein

- kinase and suppression of fatty acid-induced JNK signaling. *Journal of Biological Chemistry*. **286**:15652-15665 (2011).
19. Wong, G.W., S.A. Krawczyk, C. Kitidis-Mitrokostas, G. Ge, E. Spooner, C. Hug, R. Gimeno, and H.F. Lodish, Identification and characterization of CTRP9, a novel secreted glycoprotein, from adipose tissue that reduces serum glucose in mice and forms heterotrimers with adiponectin. *FASEB Journal*. **23**:241-258 (2009).
20. Wong, G.W., S.A. Krawczyk, C. Kitidis-Mitrokostas, T. Revett, R. Gimeno, and H.F. Lodish, Molecular, biochemical and functional characterizations of C1q/TNF family members: adipose-tissue-selective expression patterns, regulation by PPAR-gamma agonist, cysteine-mediated oligomerizations, combinatorial associations and metabolic functions. *Biochemical Journal*. **416**:161-177 (2008).
21. Nishizawa, H., I. Shimomura, K. Kishida, N. Maeda, H. Kuriyama, H. Nagaretani, M. Matsuda, H. Kondo, N. Furuyama, S. Kihara, T. Nakamura, Y. Tochino, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa, Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes*. **51**:2734-2741 (2002).

22. Pajvani, U.B., X. Du, T.P. Combs, A.H. Berg, M.W. Rajala, T. Schulthess, J. Engel, M. Brownlee, and P.E. Scherer, Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *Journal of Biological Chemistry*. **278**:9073-9085 (2003).
23. Xu, A., K.W. Chan, R.L. Hoo, Y. Wang, K.C. Tan, J. Zhang, B. Chen, M.C. Lam, C. Tse, G.J. Cooper, and K.S. Lam, Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*. **280**:18073-18080 (2005).
24. Wei, Z., M.M. Seldin, N. Natarajan, D.C. Djemal, J.M. Peterson, and G.W. Wong, C1q/tumor necrosis factor-related protein 11 (CTRP11), a novel adipose stroma-derived regulator of adipogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. **288**:10214-10229 (2013).
25. Okada-Iwabu, M., T. Yamauchi, M. Iwabu, T. Honma, K. Hamagami, K. Matsuda, M. Yamaguchi, H. Tanabe, T. Kimura-Someya, M. Shirouzu, H. Ogata, K. Tokuyama, K. Ueki, T. Nagano, A. Tanaka, S. Yokoyama, and T. Kadowaki, A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature*. **503**:493-499 (2013).

26. Yamauchi, T., J. Kamon, Y. Minokoshi, Y. Ito, H. Waki, S. Uchida, S. Yamashita, M. Noda, S. Kita, K. Ueki, K. Eto, Y. Akanuma, P. Froguel, F. Foufelle, P. Ferre, D. Carling, S. Kimura, R. Nagai, B.B. Kahn, and T. Kadowaki, Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine*. **8**:1288-1295 (2002).
27. Peterson, J.M., Z. Wei, and G.W. Wong, CTRP8 and CTRP9B are novel proteins that hetero-oligomerize with C1q/TNF family members. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **388**:360-365 (2009).
28. Winder, W.W., Energy-sensing and signaling by AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)*. **91**:1017-1028 (2001).
29. Koo, S.H., L. Flechner, L. Qi, X. Zhang, R.A. Scretton, S. Jeffries, S. Hedrick, W. Xu, F. Boussouar, P. Brindle, H. Takemori, and M. Montminy, The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature*. **437**:1109-1111 (2005).
30. Kambara, T., K. Ohashi, R. Shibata, Y. Ogura, S. Maruyama, T. Enomoto, Y. Uemura, Y. Shimizu, D. Yuasa, K. Matsuo, M. Miyabe, Y. Kataoka, T. Murohara, and N. Ouchi, CTRP9 protein protects against myocardial injury following ischemia-reperfusion through AMP-activated protein kinase (AMPK)-dependent

- mechanism. *Journal of Biological Chemistry*. **287**:18965-18973 (2012).
31. Park, S.Y., J.H. Choi, H.S. Ryu, Y.K. Pak, K.S. Park, H.K. Lee, and W. Lee, C1q tumor necrosis factor alpha-related protein isoform 5 is increased in mitochondrial DNA-depleted myocytes and activates AMP-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*. **284**:27780-27789 (2009).
 32. Peterson, J.M., S. Aja, Z. Wei, and G.W. Wong, CTRP1 protein enhances fatty acid oxidation via AMP-activated protein kinase (AMPK) activation and acetyl-CoA carboxylase (ACC) inhibition. *Journal of Biological Chemistry*. **287**:1576-1587 (2012).
 33. Zheng, Q., Y. Yuan, W. Yi, W.B. Lau, Y. Wang, X. Wang, Y. Sun, B.L. Lopez, T.A. Christopher, J.M. Peterson, G.W. Wong, S. Yu, D. Yi, and X.L. Ma, C1q/TNF-related proteins, a family of novel adipokines, induce vascular relaxation through the adiponectin receptor-1/AMPK/eNOS/nitric oxide signaling pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. **31**:2616-2623 (2011).
 34. Enomoto, T., K. Ohashi, R. Shibata, A. Higuchi, S. Maruyama, Y. Izumiya, K. Walsh, T. Murohara, and N. Ouchi, Adipolin/C1qdc2/CTRP12 protein functions as an adipokine that improves glucose metabolism. *Journal of Biological*

- Chemistry*. **286**:34552-34558 (2011).
35. Wei, Z., J.M. Peterson, X. Lei, L. Cebotaru, M.J. Wolfgang, G.C. Baldeviano, and G.W. Wong, C1q/TNF-related protein-12 (CTRP12), a novel adipokine that improves insulin sensitivity and glycemic control in mouse models of obesity and diabetes. *Journal of Biological Chemistry*. **287**:10301-10315 (2012).
36. Iwabu, M., T. Yamauchi, M. Okada-Iwabu, K. Sato, T. Nakagawa, M. Funata, M. Yamaguchi, S. Namiki, R. Nakayama, M. Tabata, H. Ogata, N. Kubota, I. Takamoto, Y.K. Hayashi, N. Yamauchi, H. Waki, M. Fukayama, I. Nishino, K. Tokuyama, K. Ueki, Y. Oike, S. Ishii, K. Hirose, T. Shimizu, K. Touhara, and T. Kadowaki, Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1. *Nature*. **464**:1313-1319 (2010).
37. Awazawa, M., K. Ueki, K. Inabe, T. Yamauchi, K. Kaneko, Y. Okazaki, N. Bardeesy, S. Ohnishi, R. Nagai, and T. Kadowaki, Adiponectin suppresses hepatic SREBP1c expression in an AdipoR1/LKB1/AMPK dependent pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **382**:51-56 (2009).
38. Maeda, N., M. Takahashi, T. Funahashi, S. Kihara, H. Nishizawa, K. Kishida, H. Nagaretani, M. Matsuda, R. Komuro, N. Ouchi, H. Kuriyama, K. Hotta, T. Nakamura, I. Shimomura, and Y. Matsuzawa, PPARgamma ligands increase

- expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes*. **50**:2094-2099 (2001).
39. Saito, K., T. Tobe, M. Yoda, Y. Nakano, N.H. Choi-Miura, and M. Tomita, Regulation of gelatin-binding protein 28 (GBP28) gene expression by C/EBP. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **22**:1158-1162 (1999).
40. Seo, J.B., H.M. Moon, M.J. Noh, Y.S. Lee, H.W. Jeong, E.J. Yoo, W.S. Kim, J. Park, B.S. Youn, J.W. Kim, S.D. Park, and J.B. Kim, Adipocyte determination- and differentiation-dependent factor 1/sterol regulatory element-binding protein 1c regulates mouse adiponectin expression. *Journal of Biological Chemistry*. **279**:22108-22117 (2004).
41. Waki, H., T. Yamauchi, J. Kamon, Y. Ito, S. Uchida, S. Kita, K. Hara, Y. Hada, F. Vasseur, P. Froguel, S. Kimura, R. Nagai, and T. Kadowaki, Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *Journal of Biological Chemistry*. **278**:40352-40363 (2003).
42. Hada, Y., T. Yamauchi, H. Waki, A. Tsuchida, K. Hara, H. Yago, O. Miyazaki, H. Ebinuma, and T. Kadowaki, Selective purification and characterization of adiponectin multimer species from human plasma. *Biochemical and Biophysical*

- Research Communications*. **356**:487-493 (2007).
43. Kobayashi, H., N. Ouchi, S. Kihara, K. Walsh, M. Kumada, Y. Abe, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa, Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. *Circulation Research*. **94**:e27-31 (2004).
 44. Wang, Z.V., T.D. Schraw, J.Y. Kim, T. Khan, M.W. Rajala, A. Follenzi, and P.E. Scherer, Secretion of the adipocyte-specific secretory protein adiponectin critically depends on thiol-mediated protein retention. *Molecular and Cellular Biology*. **27**:3716-3731 (2007).
 45. Qiang, L., L. Wang, N. Kon, W. Zhao, S. Lee, Y. Zhang, M. Rosenbaum, Y. Zhao, W. Gu, S.R. Farmer, and D. Accili, Brown remodeling of white adipose tissue by SirT1-dependent deacetylation of Pparggamma. *Cell*. **150**:620-632 (2012).
 46. Seldin, M.M., J.M. Peterson, M.S. Byerly, Z. Wei, and G.W. Wong, Myonectin (CTRP15), a novel myokine that links skeletal muscle to systemic lipid homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*. **287**:11968-11980 (2012).
 47. Seldin, M.M., S.Y. Tan, and G.W. Wong, Metabolic function of the CTRP family of hormones. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*. **15**:111-123 (2014).
 48. Enomoto, T., R. Shibata, K. Ohashi, T. Kambara, Y. Kataoka, Y. Uemura, D.

- Yuasa, T. Murohara, and N. Ouchi, Regulation of adipolin/CTRP12 cleavage by obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **428**:155-159 (2012).
49. Choi, K.M., S.Y. Hwang, H.C. Hong, H.Y. Choi, H.J. Yoo, B.S. Youn, S.H. Baik, and H.S. Seo, Implications of C1q/TNF-related protein-3 (CTRP-3) and progranulin in patients with acute coronary syndrome and stable angina pectoris. *Cardiovascular Diabetology*. **13**:14 (2014).
50. Choi, K.M., S.Y. Hwang, H.C. Hong, S.J. Yang, H.Y. Choi, H.J. Yoo, K.W. Lee, M.S. Nam, Y.S. Park, J.T. Woo, Y.S. Kim, D.S. Choi, B.S. Youn, and S.H. Baik, C1q/TNF-related protein-3 (CTRP-3) and pigment epithelium-derived factor (PEDF) concentrations in patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome. *Diabetes*. **61**:2932-2936 (2012).
51. Hwang, Y.C., S. Woo Oh, S.W. Park, and C.Y. Park, Association of serum C1q/TNF-Related Protein-9 (CTRP9) concentration with visceral adiposity and metabolic syndrome in humans. *International Journal of Obesity* (2005). **38**:1207-1212 (2014).
52. Jeon, J.H., K.Y. Kim, J.H. Kim, A. Baek, H. Cho, Y.H. Lee, J.W. Kim, D. Kim, S.H. Han, J.S. Lim, K.I. Kim, Y. Yoon do, S.H. Kim, G.T. Oh, E. Kim, and Y.

- Yang, A novel adipokine CTRP1 stimulates aldosterone production. *FASEB Journal*. **22**:1502-1511 (2008).
53. Pan, X., T. Lu, F. Wu, L. Jin, Y. Zhang, L. Shi, X. Li, and Z. Lin, Circulating complement-C1q TNF-related protein 1 levels are increased in patients with type 2 diabetes and are associated with insulin sensitivity in Chinese subjects. *PloS One*. **9**:e94478 (2014).
54. Tan, B.K., K.C. Lewandowski, J.P. O'Hare, and H.S. Randeve, Insulin regulates the novel adipokine adipolin/CTRP12: in vivo and ex vivo effects. *Journal of Endocrinology*. **221**:111-119 (2014).
55. Xin, Y., X. Lyu, C. Wang, Y. Fu, S. Zhang, C. Tian, Q. Li, and D. Zhang, Elevated circulating levels of CTRP1, a novel adipokine, in diabetic patients. *Endocrine Journal*. **61**:841-847 (2014).
56. Yuasa, D., K. Ohashi, R. Shibata, K. Takeshita, R. Kikuchi, R. Takahashi, Y. Kataoka, M. Miyabe, Y. Joki, T. Kambara, Y. Uemura, K. Matsuo, S. Hayakawa, M. Hiramatsu-Ito, M. Ito, N. Ikeda, T. Murohara, and N. Ouchi, Association of circulating C1q/TNF-related protein 1 levels with coronary artery disease in men. *PloS One*. **9**:e99846 (2014).
57. Choi, H.Y., J.W. Park, N. Lee, S.Y. Hwang, G.J. Cho, H.C. Hong, H.J. Yoo, T.G.

Hwang, S.M. Kim, S.H. Baik, K.S. Park, B.S. Youn, and K.M. Choi, Effects of a combined aerobic and resistance exercise program on C1q/TNF-related protein-3 (CTRP-3) and CTRP-5 levels. *Diabetes Care*. **36**:3321-3327 (2013).

謝辞

本研究を行うにあたり、東京大学大学院医学系研究科 糖尿病・代謝内科教授 門脇 孝 先生、また、同准教授 山内 敏正 先生、同特任助教 岩部 真人 先生、同特任助教 岩部 美紀 先生のご指導を賜りました。

ここに深甚なる謝意を表します。