

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 小堀 勤子

序論

糖尿病は平均寿命の短縮を引き起こす主要な要因の一つであることから、近年の糖尿病有病者数の増加は大きな社会問題となっている。急増の背景には、高脂肪食、運動不足などに伴う肥満、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、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。今回、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、特に、アディポネクチンのパラログである C1q TNF α related protein (CTRP) に注目し、その探索を行った。

結果

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、CTRP の中には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ため、まず、代謝に重要な組織である、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ところ、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となった。

そこで、CTRP1、CTRP2、CTRP3、CTRP6、CTRP7、CTRP9 に絞って実験を進めることとし、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 法で検討した。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が増加していた。

アディポネクチン欠損に対する反応として CTRP の遺伝子発現が増加し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 の発現は低下するのではないかと考え、次に、アディポネクチン欠損 db/db マウスにリコンビナントアディポネクチン 50 μ g/day を1週間腹腔内投与したところ、有意差は見られないものの CTRP2、CTRP3、CTRP7、CTRP9 の白色脂肪組織における mRNA 発現はアディポネクチン補充により低下する方向に動いた。

これらの結果から、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 遺伝子発現量を検討したところ、非常に興味深いことに、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 では発現増加傾向が見られた。

次に、病態モデルマウスの白色脂肪組織における 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、CTRP1 の mRNA 発現は有意に低下し、CTRP7 の発現低下傾向が認められた。

以上より、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、db/db マウスに高脂肪食を負荷するとアディポネクチンの発現は低下することが明らかになっているが、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。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。

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が、CTRP7 も脂肪細胞の分化・肥大化に伴ってその発現量が変化するかどうかを検討するために、3T3-L1 脂肪細胞を用いて経時的にアディポネクチンおよび CTRP7 の遺伝子発現量を検討した。CTRP7 はアディポネクチンと同様に脂肪細胞の分化に伴いその発現量は増加することが明らかになった。さらに非常に興味深いことに、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。

次にリコンビナント globular CTRP7 を精製し、その機能解析を行った。アディポネクチンは分化した C2C12 骨格筋細胞において AMPK を活性化するが、CTRP7 も同様に AMPK を活性化するか否かを immunoblotting で検証したところ、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。

AMPK は糖代謝の調節に関与していることから、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分後の血糖値は有意に低下しており、globular CTRP7 の血糖降下作用が示された。

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 活性化能を有すること、globular CTRP7 が血糖降下作用を有することが明らかとなった。

globular CTRP7 は C2C12 骨格筋細胞において 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 投与による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、今後、骨格筋や肝臓などの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とともに、CTRP7 投与による肝中性脂質含量、脂肪酸合成関連遺伝子発現の変化についても検討することが重要である。さらに今後 CTRP7 欠損マウスを用いて、生体内における CTRP7 の生理的意義について検討していく予定である。

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なっていないが、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の低下に伴い up regulate するという発現調節が考えられる。その一方で、病態モデルマウスの実験から、CTRP7 の遺伝子発現は病態でも変化すると考えられたため、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たい。

また、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、結合する場合は AdipoR1、AdipoR2 のどちらと主に結合するか、CTRP7 のアディポネクチン受容体への親和性、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など、今後、結合アッセイや競合アッセイなどを含めた詳細な検討が必要である。

さらに、CTRP7 がアディポネクチン同様に血中に分泌されているか否か、血中 CTRP7 濃度が肥満の進行に伴い低下していくか、摂食による CTRP7 の発現変動や日内変動についても現時点は明らかになっていないため、これらの点についても今後検討していく。

本研究により、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。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。