

審査の結果の要旨

氏名 小堀 勤子

本研究は、生体内でアディポネクチン様作用を有する分子の探索および、その機能解析を行うため、種々の動物モデル、3T3-L1 脂肪細胞、C2C12 骨格筋細胞を用いて、特にアディポネクチンのパラログである C1q TNF α related protein (CTRP) に焦点を当てて検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. C57BL/6J マウスの肝臓、白色脂肪組織、褐色脂肪組織、骨格筋、膵臓における CTRP1-CTRP15 の遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法を用いて検討した。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。
2. 次に、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。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。
3. 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を腹腔内投与し、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。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。
4. 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。そこで、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 CTRP1、CTRP2、CTRP3、CTRP6、CTRP7、CTRP9 の遺伝子発現量を検討した。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。
5. 次に、病態における CTRP ファミリーの発現変化を検討するために、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、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。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。
6. 以上の実験結果から、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た。CTRP1 は CTRP7 よりもユビキタスに発現していたこと

から、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 の機能解析を行い、次に *in vitro* の系で検証した。脂肪細胞の分化・肥大化に伴う発現量の変化を検討するために、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 の遺伝子発現量を定量的 RT-PCR 法で検討した。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。また、アディポネクチンは脂肪細胞の肥大化に伴い遺伝子発現量が低下したのに対し、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。

7. 次にリコンビナント globular CTRP7 を精製し、C2C12 骨格筋細胞を用いて AMP-activated protein kinase (AMPK) 活性化能を Western blotting 法で検証した。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。
8. そこで、globular CTRP7 の *in vivo* での作用を検証するために、db/db マウスにリコンビナント globular CTRP7 を腹腔内投与した。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、globular CTRP7 の血糖降下作用が示された。

今回の結果より、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。以上より、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。

以上、本論文は、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、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降下作用を有することを初めて明らかにしたものである。本研究は未だ明らかとなっていない CTRP7 の病態生理的意義の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。