

## アディポネクチン及びアディポネクチン受容体を介した 抗糖尿病作用を有する食品の開発

廣瀬理沙

東京大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝内科 博士課程

### 緒言

罹患者数が約 890 万人にもものぼる糖尿病は、心筋梗塞・脳卒中発症のリスクを増大させ国民の健康をおびやかしている。当研究室では、アディポネクチンが糖尿病の鍵分子であることを見出し (*Nature Medicine* 7, 941-946, 2001)<sup>1)</sup>、その受容体を世界に先駆けて単離・同定した (*Nature* 423, 762-769, 2003)<sup>2)</sup>。さらにその受容体欠損マウスの解析により、アディポネクチンとその受容体がインスリン抵抗性を改善させることを明らかにした (*Nature Medicine* 13, 332-339, 2007)<sup>3)</sup>。

本研究では、アディポネクチン受容体の特異的アゴニストを植物（果物・野菜）から抽出・精製し、糖尿病の根本的治療薬・食品を開発する。既に、酵母におけるホモログのリガンドである植物ペプチド、オスモチンが、立体構造上アディポネクチンと相同性を持ち、受容体に結合して AMP キナーゼを活性化すること (*Molecular Cell*, 17, 171-180, 2005)<sup>4)</sup> を明らかにしている。本研究では、植物（果物・野菜）由来の抽出物からアディポネクチン及びアディポネクチン受容体を介した抗糖尿病作用のある物質をスクリーニングし、糖尿病の治療薬・食品を開発することを目的とする。

#### ①アディポネクチン発現・分泌促進、アディポネクチン受容体の発現促進・活性化作用のある植物（果物・野菜）抽出物の *in vitro* スクリーニング系の確立

脂肪細胞・骨格筋細胞・肝細胞を用いた *in vitro* 培養細胞系を用い、スクリーニングの指標として、アディポネクチンとアディポネクチン受容体の発現量の変化、アディポネクチン受容体への結合能、また、アディポネクチン受容体の活性化作用として細胞内の下流分子の一つである AMP キナーゼのリン酸化を用いる。

#### ②植物（果物・野菜）抽出物の *in vivo* における糖、脂質代謝改善効果の検討

①により得られた有効な候補植物（果物・野菜）抽出物について、肥満・2型糖尿病モデルマウスである db/

db マウスに経口投与し、糖・脂質代謝を改善させるか検討する。更に当該物質を豊富に含有する果物・植物などの食品について、積極的摂取群と通常摂取群との2群によるランダム化比較試験を開始し、実際に薬効が認められるかどうかヒトで確認する。

#### ③糖尿病患者、健常人のコホート集団における植物・果物の摂取頻度調査

①②のスクリーニングによりアディポネクチン経路を活性化しうる植物（果物・野菜）抽出物について、その摂取量と糖尿病関連臨床指標や糖尿病発症率との相関を検討する。植物（果物・野菜）抽出物の精製分離により有効な成分を単離しその RIA アッセイ系を確立し血中レベルについてデータを得る。

上記スクリーニングにより、アディポネクチン発現・分泌促進、アディポネクチン受容体の発現促進・活性化作用のある植物（果物・野菜）抽出物を同定することができる。②の *in vivo* における解析により、その中から経口投与・摂取によってもアディポネクチン、アディポネクチン受容体を介した糖・脂質代謝改善作用のある植物（果物・野菜）抽出物を同定できる。またヒトにおける投与実験により、*in vitro*、マウスにおける検討により得られた有効な植物（果物・野菜）抽出物が、実際に糖尿病の治療薬・食品として用いられうる可能性について検討できる。更に、③の糖尿病患者、健常人のコホート集団における植物・果物の摂取頻度調査においては、これらの有効成分が、日常の摂取レベルにおいて、生理的にどの程度、糖尿病の発症に関わっているかが推定することができる。

当研究室はアディポネクチンの糖・脂質代謝改善作用、その分子メカニズムの解明、アディポネクチン受容体の単離・同定・機能解析において世界をリードしている。また、我々が日常摂取する植物由来の抽出物を本スクリーニングに用いることは、糖尿病を含めた生活習慣

病の予防、治療に有用な機能を持つ食品素材の開発を可能とする点が独創的と考えられる。

## 実験方法

### ①アディポネクチン発現・分泌促進、アディポネクチン受容体の発現促進・活性化作用のある植物（果物・野菜）抽出物の *in vitro* スクリーニング系の確立

脂肪細胞・骨格筋細胞・肝細胞を用いた *in vitro* 培養細胞系を用い、スクリーニングの指標として、アディポネクチンとアディポネクチン受容体の発現量の変化、アディポネクチン受容体への結合能、また、アディポネクチン受容体の活性化作用として細胞内の下流分子の一つである AMP キナーゼのリン酸化を用いる。

### ②植物（果物・野菜）抽出物の *in vivo* における糖、脂質代謝改善効果の検討

①により得られた有効な候補植物（果物・野菜）抽出物について、肥満・2型糖尿病モデルマウスである db/db マウスに経口投与し、糖・脂質代謝を改善させるか検討する。更に当該物質を豊富に含有する果物・植物などの食品について、積極的摂取群と通常摂取群との2群によるランダム化比較試験を開始し、実際に薬効が認められるかどうかヒトで確認する。

### ③糖尿病患者、健常人のコホート集団における植物・果物の摂取頻度調査

①②のスクリーニングによりアディポネクチン経路を活性化しうる植物（果物・野菜）抽出物について、その摂取量と糖尿病関連臨床指標や糖尿病発症率との相関を検討する。植物（果物・野菜）抽出物の精製分離により有効な成分を単離しその RIA アッセイ系を確立し血中レベルについてデータを得る。

## 結 果

### ①アディポネクチン発現・分泌促進、アディポネクチン受容体の発現促進・活性化作用のある植物（果物・野菜）抽出物の *in vitro* スクリーニング系の確立

スクリーニング用の細胞として、アディポネクチン発現・分泌促進作用には 3T3-L1 脂肪細胞、アディポネクチン受容体の発現促進・活性化作用の検討には C2C12 骨格筋細胞、FaO 肝細胞を用いた。また、スクリーニング素材には植物（野菜・果物など）由来の抽出物のライブラリーを用いた。アディポネクチン・アディポネクチン受容体 mRNA 発現量増加のスクリーニングは、realtime-PCR 法による mRNA の定量を指標に 96 well

plate におけるアッセイ系の確立に貢献した。また刺激時の分化日数、刺激時間等の条件の最適化検討を行った。また、アディポネクチン分泌促進作用においては、培地中のアディポネクチン量について、ウェスタンブロットティングによって評価・測定する系を用い、その一部を行った。さらにアディポネクチン受容体の活性化作用におけるスクリーニングには、C2C12、FaO 細胞における AMP キナーゼのリン酸化を指標に検討を行い、その一部に貢献した。1次スクリーニングにより得られた候補物質について、2次、3次スクリーニングを行い、再現性のある物質を絞り込み、また脂肪細胞分化を促進スクリーニングのレポーター細胞脂肪細胞株を既に確立し、その一部に貢献した。

アディポネクチン発現・分泌促進、アディポネクチン受容体の発現促進・活性化作用のある植物（果物・野菜）抽出物のスクリーニング系の確立に貢献し、preliminary に有用な候補を挙げることができ、この確立したスクリーニング系を用い、200個近くの植物由来の抽出物についてスクリーニングの一部を行った結果、アディポネクチン発現・分泌促進する抽出物を15個、アディポネクチン受容体の発現促進・活性化作用のある抽出物を19個、AMPKを活性化する抽出物を23個、候補として挙げる事ができ、その一部に貢献した。さらにこれらの候補抽出物について、動物投与実験を行い、効果の検討を着手した。

### ②植物（果物・野菜）抽出物の *in vivo* における糖、脂質代謝改善効果の検討

①により得られた有効な候補植物（果物・野菜）抽出物について、肥満・2型糖尿病モデルマウスである db/db マウスへの経口投与により AMP キナーゼの活性化能、糖・脂質代謝の改善作用の検討の一部を行った。更に当該物質を豊富に含有する果物・植物などの食品について、積極的摂取群と通常摂取群との2群によるランダム化比較試験を開始し、実際に薬効が認められるかどうかヒトで確認する計画においては、その実施に着手した。

### ③糖尿病患者、健常人のコホート集団における植物・果物の摂取頻度調査

東大病院に入院・通院する糖尿病患者あるいは兵庫県宍粟郡の住民からなるコホート集団を対象としてアディポネクチン経路を活性化しうる植物の摂取頻度調査を行い、前者では摂取量と糖尿病関連臨床指標との相関を、後者では摂取量と糖尿病発症率との相関を検討する。また植物抽出物の精製分離により有効な成分を単離しその

RIA アッセイを確立し血中レベルについてデータを得る計画については、その実施に着手した。

## 考 察

本研究の結果、アディポネクチン発現・分泌促進、アディポネクチン受容体の発現促進・活性化作用のある植物（果物・野菜）抽出物の候補を挙げられたことより、今後、それらの効果における成分の同定及び、その成分の細胞・動物レベルでの効果、さらには、ヒトでの効果の検討が重要であると考えられる。

## 要 約

我々が日常摂取する植物由来の抽出物を本スクリーニングに用い、実際、アディポネクチン発現・分泌促進、アディポネクチン受容体の発現促進・活性化作用のある植物（果物・野菜）抽出物の候補を挙げられたことより、

今後、糖尿病を含めた生活習慣病の予防、治療に有用な機能を持つ食品素材の開発に繋がる可能性が高いと考えられる。

## 謝 辞

本研究を進めるにあたりご指導頂きました門脇教授、山内准教授をはじめとする東京大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝内科の先生方に御礼申し上げます。また、三島海雲記念財団の3年間のご支援に、この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Yamauchi T et al., : *Nature Medicine*, **7**, 941-946, 2001.
- 2) Yamauchi T et al., : *Nature*, **423**, 762-769, 2003.
- 3) Yamauchi T et al., : *Nature Medicine*, **13**, 332-339, 2007.
- 4) Narasimhan LM et al., : *Mol. Cell* **17**, 171-180, 2005.