

## 79. 生活習慣病治療薬創製に向けたシグナル伝達経路の解明

岩部 真人

日本医科大学 大学院医学研究科 内分泌代謝・腎臓内科学分野

Key words : MASLD, アディポネクチン, アディポネクチン受容体, AdipoRon, AdipoRaMab

### 緒言

わが国の死因の上位を占める心血管疾患（心筋梗塞・脳梗塞など）、癌の主要な原因は、肥満を基盤とした耐糖能障害・脂質代謝異常・高血圧が一個人に重積するいわゆるメタボリックシンドロームと考えられる。これらの生活習慣病はわが国、並びに世界において増加の一途をたどっており、その原因を解明し先制医療を実現することは、世界的な課題の解決に貢献する挑戦的な取り組みといえる。また、肥満や糖尿病の病態解明のみならず、Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) をはじめとした併存疾患に対する根本的治療法・治療薬の開発も重要な課題である。

我々が所属していた研究室ではこれまでに、肥満（脂肪細胞の肥大化）に伴って、脂肪細胞から分泌される生理活性物質アディポネクチンが低下することが、メタボリックシンドローム・2型糖尿病の原因の一部になっていること、一方でアディポネクチンを補充することがこれら病態の治療法になり得ることを研究成果として示してきた [1, 2]。さらに培養細胞を用いて、アディポネクチンの受容体のひとつとして AdipoR1 および AdipoR2 を同定した [3]。

これら一連の研究に引き続き、我々は、AdipoR が個体レベルにおいて、インスリン感受性、糖・脂質・エネルギー代謝、炎症や酸化ストレスの制御において生理的に重要な役割を果たすことを示した [4, 5]。さらに、独自の AdipoR 活性化薬スクリーニング法を駆使し、AdipoR 活性化低分子化合物 (AdipoRon) の取得に成功した [6]。この化合物は経口投与可能な低分子化合物であり、実際に肥満・2型糖尿病モデルマウスへの経口投与によって、インスリン抵抗性が改善することが明らかになった。また、この化合物をシーズとして、ヒトへ最適化することは、極めて重要な課題であるが、AdipoR の立体構造を明らかにすることにも成功し [7]、得られた立体構造情報によって現在の AdipoRon (proof of concept) のヒトへの最適化 (best-in-class) が可能となってきた [8]。これら一連の研究過程において、アディポネクチン/AdipoR 経路は抗糖尿病作用を発揮するのみならず、MASLD も改善することが分かった。AdipoR 欠損マウスの解析により、肝臓においては、AdipoR1/AMP-activated protein kinase (AMPK) 経路、AdipoR2/peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) 経路の活性が低下し MASLD が発症すること (未発表データ)、また AdipoR 活性化低分子化合物は MASLD を改善することが明らかになっているが (未発表データ)、肝臓における AdipoR シグナルの全容は明らかになっていない。

AdipoR の立体構造解析より AdipoR1 および AdipoR2 の 7 回膜貫通ドメインに 1 つの  $Zn^{2+}$  の存在を見出した [7]。 $Zn^{2+}$  結合部位は細胞の内側の細胞膜からおよそ 4 Å の距離に位置しており、 $Zn^{2+}$  は 3 つの His と配位していた。さらに、 $Zn^{2+}$  と Asp の側鎖カルボキシル基とのあいだに 1 つの水分子が存在した。 $Zn^{2+}$  は膜貫通ヘリックス II、III、VII を固定し、疎水性の相互作用をしている膜貫通ヘリックス I と合わせ、膜貫通ヘリックス I、II、III、VII から構成されるサブドメインの構造を安定化している可能性があった。これら 3 つの His および Asp は AdipoR のホモログにも保存されていた。そこで、これらの  $Zn^{2+}$  の配位にかかわるアミノ酸残基を Ala に置換して活性との相関について解析した。AdipoR1 において、3 つの His および Asp の四重変異体は、アディポネクチンによる AMPK の活性を低下させたが、単独のアミノ酸残基の変異体は活性を維持していた。このこ

とから、AdipoR1において、 $Zn^{2+}$ との結合はAMPKの活性化に直接的には必要なく、構造の維持に効果のあることが示された。一方で、これまでにAdipoR1はAMPK経路、AdipoR2はPPAR $\alpha$ 経路を特異的に活性化することを明らかにしてきたが、その詳細なメカニズムは全く分かっていなかった。この大きな謎に対する解決の糸口として、新しいAdipoRの立体構造からAdipoRはclosed formとopen formをとり、構造変化を起こすことが明らかになり [9]、さらにAdipoR1とAdipoR2の構造は非常に似ているものの、細胞内に位置するヘリックスIVとヘリックスVをつなぐintracellular loop 2 (ICL2)は構造が大きく異なっていることが明らかになった。そこで、細胞内でAdipoR1のICL2に特異的に結合する分子が存在する可能性が想定されたためLC-MSを用いた網羅的解析を行い、AdipoR2には結合せずAdipoR1のICL2にのみ結合する分子AdipoR1 binding protein (AR1BP)の同定に成功した(未発表データ)。

そこで本研究課題では、1. 各種遺伝子改変動物を用いたAdipoR1/AR1BPの生理的・病態生理的意義の解明、2. ヒト型AdipoRマウスを用いたAdipoR活性化低分子化合物および抗体の最適化を計画の2つの柱として、糖尿病・MASLD治療薬創製に向けた肝臓における新規シグナル伝達経路の解明を目指した。

## 方法および結果

### 1. 各種遺伝子改変動物を用いたAdipoR1/AR1BPの生理的・病態生理的意義の解明

各種肥満・2型糖尿病およびMASLDモデルマウスの肝臓においてAR1BPの発現がmRNAレベル、タンパクレベルで低下していることが確かめられた。またsiRNAを用い、肝臓のAR1BPをノックダウンすると、アディポネクチンによる肝臓でのAMPKの活性化は低下し、アディポネクチン/AdipoR1による糖新生の抑制および脂肪酸燃焼効果が消失したことから、AR1BPは肝臓におけるアディポネクチン/AdipoR1経路の鍵分子であることが明らかになった。

次に肝細胞特異的*AdipoR1*欠損マウスおよび肝細胞特異的*AdipoR2*欠損マウスを作製し解析した。肝細胞特異的*AdipoR1*欠損マウスは、肝臓においてAMPKの活性化が低下し、糖新生に関与するphosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)やglucose-6-phosphatase (G6Pase)の発現が上昇し、その結果、全身での耐糖能障害およびインスリン抵抗性を認め、グルコースクランプ試験においては、糖産生が亢進していることが明らかになった。さらに、肝臓におけるAdipoR1シグナルのより詳細な糖新生抑制メカニズムの解明を行った。その結果、肝臓においてはAdipoR1シグナルが、グルカゴンシグナルの一部を直接的に抑制することが明らかとなり、そのことにより、糖新生が抑えられることが分かった(論文投稿準備中)。また肝細胞特異的*AdipoR2*欠損マウスは、肝臓においてPPAR $\alpha$ シグナルが低下し、酸化ストレス消去系遺伝子である*superoxide dismutase1(SOD1)*および*catalase*、また脂肪酸燃焼に関わる*acyl CoA oxidase (ACO)*および*uncoupling protein2 (UCP2)*の発現が低下し、肝臓における中性脂質含量が増加し、全身でのインスリン抵抗性が認められた。また、AdipoR活性化低分子化合物は肝臓においてAdipoR1/AMPK経路およびAdipoR2/PPAR $\alpha$ 経路を活性化し、肝臓における糖新生を抑制するだけでなく、MASLDも改善することを明らかにした(論文投稿準備中)。

さらに実験は予想以上に進展し、腸管におけるAdipoRが肝臓におけるMASLDに寄与する可能性が明らかになった。野生型マウス、*AdipoR1*欠損マウス、*AdipoR2*欠損マウス、*AdipoR1*・*R2*ダブル欠損マウス由来の腸内細菌を無菌の野生型マウスに移植し、糖代謝について検討したところ、*AdipoR1*欠損マウスおよび*AdipoR1*・*R2*ダブル欠損マウス由来の腸内細菌を移植したマウスでは、耐糖能障害、インスリン抵抗性を認め、さらにMASLDを発症することが明らかになった。さらに、野生型マウス、*AdipoR1*欠損マウス、*AdipoR2*欠損マウス、*AdipoR1*・*R2*ダブル欠損マウスの腸内細菌叢を次世代シーケンサーで解析したところ、*AdipoR1*欠損マウスおよび*AdipoR1*・*R2*ダブル欠損マウスの腸内細菌叢が変化していることが分かり、この腸内細菌叢の変化が全身の糖代謝に影響をおよぼしていることを明らかにした。現在、免疫細胞もしくは腸上皮におけるAdipoR1シグナルが腸内細菌叢を変化させる可能性を見出しており、免疫細胞特異的および腸上皮特異的*AdipoR1*欠損マウスの腸内細菌叢の解析を行っている。また、一連の実験過程において、全身の糖・脂質代謝に影響をおよぼす

腸内細菌群を明らかにしている。無菌マウスにこれら腸内細菌群を移植し、そのマウスの糖・脂質代謝を解析することで、より直接的な検証を行っている。

## 2. ヒト型 AdipoR マウスを用いた AdipoR 活性化低分子化合物および抗体の最適化

現在、2013年に発表した AdipoR 活性化低分子化合物 (AdipoRon) よりも高活性で特異性が高く、安全性も高い候補化合物が得られている。さらに、抗体医薬を目指し、細胞免疫法やセンダイウィルス免疫法等で AdipoR 活性化抗体 (AdipoRaMab) の取得にも成功している [10]。また臨床応用を視野に入れると、取得化合物および抗体がヒト型の AdipoR に作用することを証明することが重要である。そこで本研究課題では、まず AdipoRon および AdipoRaMab の抗糖尿病作用のみならず MASLD に対する効果を検証した。さらにヒトへの最適化に向け、「ヒト AdipoR 有効性検証モデルマウス」として、ヒト型 AdipoR マウス (内在性の AdipoR1 および AdipoR2 が欠損し肝細胞特異的にヒト AdipoR1 が発現したマウス) を作製して、AdipoRon および AdipoRaMab の MASLD 改善作用を検証した。

AdipoRaMab を週 1 回、4 週間、高脂肪食を負荷した肥満・2 型糖尿病モデルマウスに投与した結果、高脂肪食によるインスリン抵抗性が改善することが明らかになった (図 1) [10]。一方で *AdipoR1*・*R2* ダブル欠損マウスでは、その改善効果がなかったことから、AdipoRaMab によるインスリン抵抗性改善作用は AdipoR を介していることが確かめられた。次に MASLD モデルマウスに AdipoRaMab を週 1 回、4 週間、投与したところ、肝臓における PPAR $\alpha$  シグナルを活性化し、炎症性サイトカインである interleukin-6 (IL-6) や monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)、また線維化関連遺伝子 tissue inhibitors of metalloproteinase-1 (TIMP-1) の発現を抑制し、MASLD の病態改善効果を有することが明らかになった (図 2) [10]。さらにヒト型 AdipoR マウスでも AdipoRon および AdipoRaMab は抗糖尿病、抗 MASLD 効果を発揮したことより、現在得られている低分子化合物および抗体は生体内においてヒト AdipoR を介して作用することが確かめられた。

Science Advances, 9, eadg4216, 2023

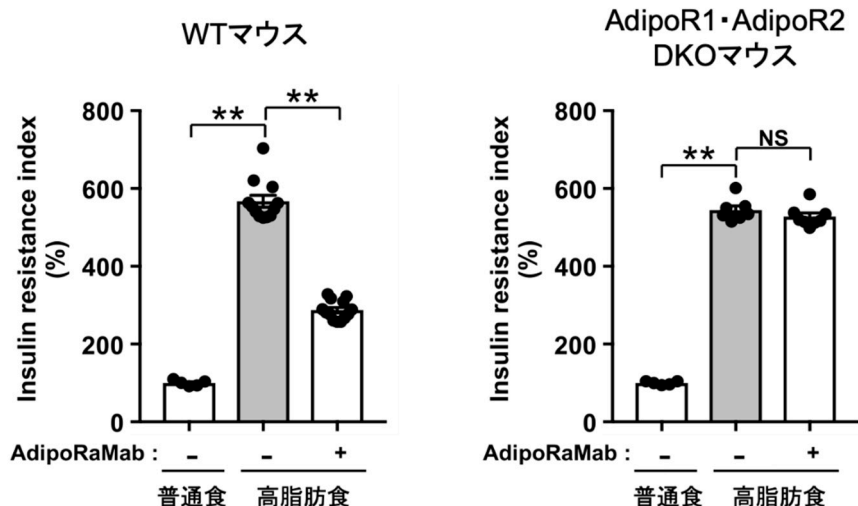


図 1. AdipoRaMab は高脂肪食によるインスリン抵抗性を改善した

AdipoRaMab を週 1 回、4 週間、高脂肪食を負荷した肥満・2 型糖尿病モデルマウスに投与した結果、高脂肪食によるインスリン抵抗性が改善することが明らかになった。一方で *AdipoR1*・*R2* ダブル欠損マウスでは、その改善効果がなかった。NS: not significant, \*\* $P < 0.01$  (ANOVA followed by the Tukey-Kramer multiple comparison test).

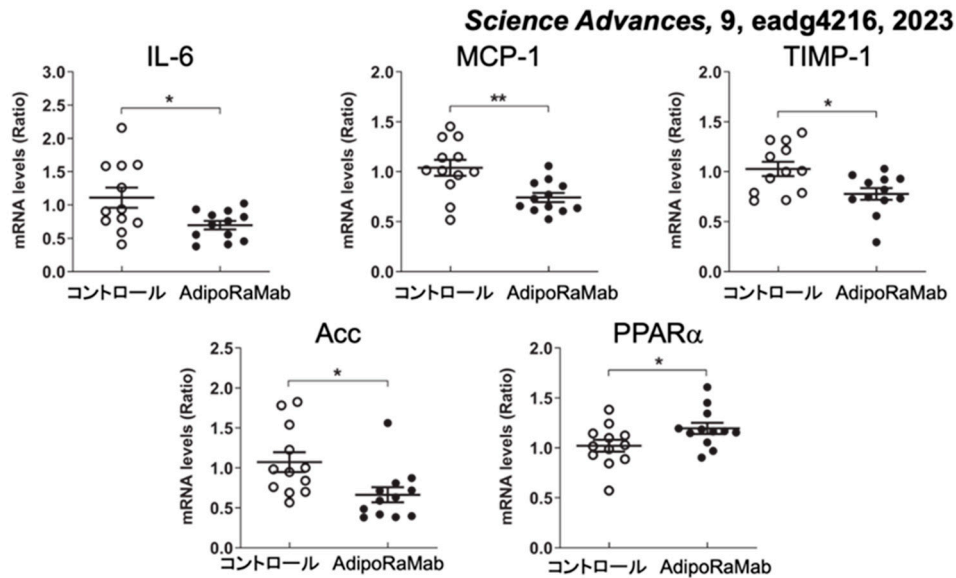


図 2. AdipoRaMab は MASLD モデルマウスの肝臓において炎症を抑制した  
 AdipoRaMab は肝臓における PPAR $\alpha$  シグナルを活性化し、炎症性サイトカインである IL-6 や MCP-1、また線維化関連遺伝子である TIMP-1 の発現を抑制した。  
 \*\*P<0.01, \*P<0.05 (ANOVA followed by the Tukey-Kramer multiple comparison test) .

## 考 察

AdipoR の同定 [3] 以降、各種遺伝子改変マウス (Loss-of-function) を用いた解析 [4, 5]、AdipoR 活性化低分子化合物 (Gain-of-function) を用いた解析 [6]、さらに AdipoR の立体構造解析より [7]、AdipoR1 は AMPK 経路、AdipoR2 は PPAR $\alpha$  経路を特異的に活性化することを明らかにしてきたが、その詳細なメカニズムは全く分かっていなかった。この大きな謎に対する解決の糸口として、新しい AdipoR の立体構造から AdipoR は closed form と open form をとり、構造変化を起こすことが明らかになり [9]、さらに AdipoR1 と AdipoR2 の構造は非常に似ているものの、細胞内に位置するヘリックス IV とヘリックス V をつなぐ ICL2 は構造が異なっていた。その結果より細胞内で AdipoR1 の ICL2 に特異的に結合する分子が存在する可能性が想定されたため、LC-MS を用いた網羅的解析を行い、AR1BP を同定することに成功した。AdipoR と結合する分子として、adaptor protein、phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 1 (APPL1) が報告されている。APPL1 は、AdipoR1 の N 末端側の細胞内ドメインをベイトとして yeast two-hybrid 法で同定されたが、AdipoR1 のみならず AdipoR2 にも結合することが示されており、AdipoR1 と AdipoR2 の異なるシグナル伝達機構を証明する分子としては位置付けられていない。今回、同定することに成功した ARBP1 は AdipoR1 の ICL2 にのみ結合することが明らかになっている。本研究課題の遂行によって、世界で初めて AdipoR の詳細なシグナル伝達機構を明らかにすることが出来るだけでなく、GPCR とは逆向きのトポロジーを持つ細胞膜受容体研究の発展に貢献することが期待される。

また医療費の面からも、糖尿病・生活習慣病の克服は、活力ある超高齢社会の実現に向けて、行政上極めて重要な課題である。MASLD は成人の 4 人に 1 人が罹患し、肝臓および肝硬変の主因となりつつある。2027 年には欧州 5 ヶ国と日米で MASLD 治療薬の市場は年間約 5 兆円に達するとの試算もある一方で、現在、世界的に数多くの研究機関および製薬企業により MASLD 治療薬の開発が行われているが、未だ成功していない。本研究課題の成果は、これまでにない新規糖尿病、MASLD 治療薬の開発の道を切り開き、経済的にも貢献をもたらす可能性があると考えられる。



## 共同研究者・謝辞

本研究は、東京大学大学院医学系研究科糖尿病・内分泌代謝内科の山内敏正先生、岩部美紀先生との共同研究として進めました。この場をお借りして心より厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Yamauchi, T. et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. *Nat Med* 7, 941-946, doi:10.1038/90984 (2001). PMID: 11479627
- 2) Yamauchi, T. et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8, 1288-1295, doi:10.1038/nm788 (2002). PMID: 12368907
- 3) Yamauchi, T. et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423, 762-769, doi:10.1038/nature01705 (2003). PMID: 12802337
- 4) Yamauchi, T. et al. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med* 13, 332-339, doi:10.1038/nm1557 (2007). PMID: 17268472
- 5) Iwabu, M. et al. Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1. *Nature* 464, 1313-1319, doi:10.1038/nature08991 (2010). PMID: 20357764
- 6) Okada-Iwabu, M. et al. A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature* 503, 493-499, doi:10.1038/nature12656 (2013). PMID: 24172895
- 7) Tanabe, H. et al. Crystal structures of the human adiponectin receptors. *Nature* 520, 312-316, doi:10.1038/nature14301 (2015). PMID: 25855295
- 8) Iwabu, M. et al. AdipoR agonist increases insulin sensitivity and exercise endurance in AdipoR-humanized mice. *Commun Biol* 4, 45, doi:10.1038/s42003-020-01579-9 (2021). PMID: 33420419 PMCID: PMC7794315
- 9) Tanabe, H. et al. Human adiponectin receptor AdipoR1 assumes closed and open structures. *Commun Biol* 3, 446, doi:10.1038/s42003-020-01160-4 (2020). PMID: 32796916 PMCID: PMC7427782
- 10) Asahara, N. et al. A monoclonal antibody activating AdipoR for type 2 diabetes and nonalcoholic steatohepatitis. *Sci Adv* 9, eadg4216, doi:10.1126/sciadv.adg4216 (2023). PMID: 37948516 PMCID: PMC10637737