

インスリン抵抗性と RBP4

ノックアウトマウス

一般的なノックアウトマウス(KO mouse)は、体中すべての細胞から、目的の遺伝子が発現しなくなってしまうために、胚発生や胎児の発育に必須の遺伝子の場合、不幸にも、KO mouse は誕生してきません(胎生致死)。もしご誕生あそばしたとしても、ご幼少時におなくなりになる場合は、その遺伝子の大人での機能は当然解析できません。たとえご誕生し成人されたとしても、特定の細胞・組織だけでその遺伝子の機能を見ることはできません。そこで、登場したのが、Inducible Gene Targeting と Tissue-Specific Gene Targeting という方法です。いずれの方法にも多くの場合、Cre/loxP system を用いています。この分野をかじったことがある人は誰でもご存知かと思いますが、一応 Cre/loxP system について簡単に説明しておきます。バクテリオファージ P1 由来の配列特異的組換え酵素 Cre とその特異的組換え配列 loxP を用いて、目的の遺伝子を切り出したり、逆位を起こしたりする方法です。同じ向きの loxP 配列で挟まれた DNA は切り出され、逆向きだと逆位を生じます。loxP 配列は 34bp と長いため、偶然この配列と一致した配列が存在することは皆無に近く、特異的に目的の遺伝子を切り出したり、逆位を起こしたりすることが可能となります。Tissue-Specific Gene Targeting では、オーソドックスには、まず、目的の遺伝子を loxP 配列で挟んだベクターを用いて ES 細胞にノックインします。この ES 細胞からノックインマウス(KI mouse)を作製します。書くのは簡単だけど、construct のデザインや実際にノックインマウスを作るのは結構大変な作業かと思えます。と言うのも、Cre/loxP system を用いて効率良く切り出される DNA の長さはせいぜい 2 kb くらいなので、目的遺伝子のすべての部分を欠失させることは、よほど小さい遺伝子でないと不可能になります。そこで多くの場合は目的の遺伝子の 5' 側を部分的に欠失させることになりませんが、残った部分から転写、翻訳が起こらないとは限りませんので、十分にこの点を考慮して設計し、検証する必要があります。次にこの相同組換えによりノックインした ES 細胞を 8 細胞期胚又は胚盤胞期胚の中に放り込み、キメラ胚を作製します。そのキメラ胚を偽妊娠マウスの子宮に移植し、キメラマウスを生まれ、こいつらが大きくなって思春期を迎えたら、片端から野生型マウスと交配し、生殖細胞が組換え ES 細胞由来の細胞により形成されているか(germinal transmit したか)どうかを確認します。最後に germinal transmit した男の仔と女の仔を交配して、めでたく一定の割合で、ノックインマウスが生まれてくることになる筈です。選別は野生型マウス(C57BL/6 系)と違う毛色のマウス由来の ES 細胞を使いますので、見分けるのは簡単。普通、アグーチ(1本の毛の色に濃い色と薄い色の縞がある)のマウス由来(129 系[♂])の ES 細胞を使うことが多いので、アグーチなお仔達をご誕生あそばしたら、親しい人と手に手を取って喜ぶことになるわけです。これだけで終了ではないので、一応簡単な祝杯を挙げるにとどめます。次のステップとして、組織特異的に発現する promoter/enhancer の下流に NLS (Nuclear Localization Sequence)を付加した Cre を含むベクター

を用いて、NLS-Cre を組織特異的に発現するトランスジェニックマウス(Tg mouse)を作製します。こちらは、TargetingしたES細胞を作る必要がない分だけ随分簡単です。作ったベクターを前核期受精卵にただマイクロインジェクトするだけです。後は KI mouse の時とほぼ同じ、確かに組織特異的に NLS-Cre が発現していることを確かめるだけでおしまいです。とは言っても、ROSA26-lacZ reporter mouse (lacZ 遺伝子の N 端に loxP 配列に挟まれた stop codon が配置された遺伝子が導入されたマウスで、Cre が発現している細胞では stop codon が切り出され、lacZ 遺伝子にコードされる β -galactosidase が発現する)と交配して、生まれた仔が、確かに組織特異的に β -galactosidase が発現していることを確認する必要があります。結局のところ、最終的には必ずお仔達を作らないと確認できないのです。実は、現在では、様々な組織に特異的に NLS-Cre が発現している Tg mice が既にいろいろな研究室で作製され、繁殖維持されているので、そこから貰えば、この作業は必要なしになります。最後に、作った KI mouse と NLS-Cre-TG mouse とを交配して、やっと Tissue-Specific Gene Targeting されたマウスが生まれてくるわけです。その後、目的としない組織では発現し、目的とした組織だけで目的の遺伝子が発現していないことを確認して、Tissue-Specific Gene Targeting mouse の作製の作業は大団円を迎えます。ここで、少し派手な祝杯を挙げることとなりますが、まだ研究材料が整った段階ですので、やはり控えめにならざるを得ないようです。フー、一体何匹のお仔達を誕生させなければならぬのでしょうか。たくさんマウスをお世話ができる人、もしくは、たくさんマウスのお世話してくれる人を雇える人でないと、この手のマウスを世に先駆けて手に入れることはできないようです。

GLUT4 の脂肪細胞異的ノックアウトマウス

インスリン抵抗性を示す肥満および 2 型糖尿病の人では、グルコース輸送体である GLUT4 (Glucose Transporter 4) の発現が脂肪組織のみで減少しており、骨格筋や肝臓では変化がないことが知られていました。そこで、脂肪細胞のみで GLUT4 が発現しないマウスを作ったら、どうなるのか知りたくなるのは研究者の性だと思います。実際、E. Dale Abel 等はそのようなマウスを作っているいろいろ調べてみました。その結果が 2001 年 Nature 誌に報告されました(9)。その時に使用したテクニックが上述した Tissue-Specific Gene Targeting でした。彼等は脂肪細胞異的に機能する promoter/enhancer として、FABP4/aP2 のものを使いました。ちなみに、大阪大大学院医学系研究科の下村伊一郎教授の研究室から当時医学部 6 年の学生だった駒沢さんが筆頭著者として、2004 年 Nature Medicine の電子版に報告し、その後取り下げた論文に登場する、しかし実際はどこにもいなかった幻の脂肪細胞異的 PTEN ノックアウトマウス(たくさん食べても太らないマウス)にも、仮想上ですが、同じ FABP4/aP2 の promoter/enhancer を使った Adipo-NLS-Cre Tg mouse が使われていました。

話を元に戻しますと、GLUT4 の脂肪細胞異的ノックアウトマウスは正常に育って、脂肪組織の量も野生型マウスと変わりはありませんでしたが、脂肪細胞ではインスリン刺激によるグルコースの細胞内への取り込みが著しく低下していました。GLUT4 が無いのだから、当然と言えば当然の結果です。しかしです、骨格筋や肝臓では GLUT4 がちゃんと発現しているにもかかわらず、インスリン

抵抗性(二次性のインスリン抵抗性)が亢進していたのです。その結果、耐糖能が亢進し、高インスリン血漿になりました。平たく言えば、典型的な 2 型糖尿病の病態を示したのでした。そこで、普通の人なら、次のような疑問を持つでしょう。なぜ脂肪細胞で GLUT4 を発現させなくすると GLUT4 が発現している骨格筋や肝臓のインスリン抵抗性が亢進してしまうのか? きっと GLUT4 が無いために、脂肪細胞内のグルコース濃度が低くなり、細胞内のグルコースセンサーが働いて、新たな遺伝子発現を誘導する。その中のホルモン用分子が分泌性され、骨格筋や肝臓に到達して、インスリン抵抗性を引き起こすのではないかと想像することは容易です。では一体どうやってその仮想上のホルモン用分子を見つけるのでしょうか? GLUT4 の脂肪細胞異的ノックアウトマウスの作ったグループが 2005 年 7 月に Nature 誌にその答えを発表しました(1)。彼等は Affymetrix の DNA アレイを用いて、GLUT4 ノックアウト脂肪細胞でのみで発現が亢進している 5 個の分泌タンパク質をコードする遺伝子を見つけました。その中の1つ、リポカリンファミリーのメンバーである RBP4 (Retinol Binding Protein 4)は GLUT4 ノックアウト脂肪細胞で 2.3 倍野生型マウスの脂肪細胞に比較して発現が高くなっており、逆に GLUT4 トランスジェニック脂肪細胞では 0.54 倍に低下していました。

RBP4

ここでようやく今回のお題の RBP4 が登場させることができました。彼等はインスリン抵抗性マウスや肥満および 2 型糖尿病を有するヒトにおいても血清中の RBP4 量が増加しており、インスリン抵抗性改善薬であるロシグリタゾンによって RBP4 量は正常化することを示しました。さらに、ヒト RBP4 を過剰発現させたトランスジェニックマウスや、リコンビナント RBP4 タンパク質を注射した正常マウスでは、インスリン抵抗性が惹起され、逆に、Rbp4 遺伝子を欠損するとインスリン感受性が増強することも明らかにしました。ここで重要なことは、最後に記した表現形、RBP4 がなくなるとインスリン感受性が高くなる、即ちインスリン抵抗性が低下することが確認されたことでしょう。つまり、インスリン抵抗性に関連する因子は他にもいろいろありますが、ただ 1 つ RBP4 だけを発現しないようにすれば、インスリン抵抗性が低下するという事実は、RBP4 がインスリン抵抗性を亢進させる主要な原因であり、血清中の RBP4 量の増加はインスリン抵抗性を獲得したただ単なる結果を反映しているのではないことを示唆しているからです。さらに彼等は合成レチノイドであるフェンレチニドが、尿中への RBP4 排泄を増加させ、高脂肪食性の肥満マウスで血清中 RBP4 量を正常化し、インスリン抵抗性および耐糖能を改善することを示しました。以上のことから、RBP4 は脂肪細胞由来の「シグナル」として働き、2 型糖尿病の発症に関与する重要な因子であると結論づけました。このことは RBP4 量を低下させることが、2 型糖尿病治療の新たな戦略となる可能性を示唆しています。

そもそも RBP4 は、血清中にソコソコの濃度(20-80 $\mu\text{g}/\text{ml}$)で存在している比較的低分子量 (21 kDa)のビタミン A 輸送タンパク質としてかなり昔から研究されていた血清タンパク質です。教科書には以下のようなことが書いてあります。「主に肝臓で生成された後、ビタミン A と結合して血中に放出され、さらにプレアルブミン(トランスサイレチン)結合し複合体を形成しますが、ビタミン A が標的細胞へ輸送されて離れるとプレアルブミンとの親和性が失われます。このフリーになった RBP(現在の RBP4 と同じ、昔は RBP は 1 種類しか知られていなかったが現在ではいくつかの RBP が同定さ

てれています。ただ RBP と記載してあれば RBP4 のことを指し示します。) は腎臓糸球体でろ過され、細尿管で再吸収されます。腎疾患患者では細尿管で RBP が再吸収されずに、尿中に検出されるため、尿中 RBP は尿細管機能の指標となります。血中半減期は 0.4-0.7 日と非常に短く、短期間の栄養状態の把握にも広く用いられています。」

RBP の血清中の濃度ですが、臨床検査的には 27-76 $\mu\text{g/ml}$ が正常値だそうです。この濃度の血清タンパク質の測定には、実は ELISA のような高感度な方法は向いていません。実際、血清 RBP の測定はネフェロメトリーやラテックス比濁法などで行われており、日本では保険にも収載されています。しかし、2005 年 7 月の Nature の報告以来、肝臓で作られるこの古典的な血清タンパク質、RBP は ELISA kit を用いて測定されることがにわかには増えているようです。ネフェロメトリーで測定したという論文は調べた限り皆無でした。どうもこの業界の研究者は ELISA 法がお好きなようです。

RBP4 は肝臓で生成されていると昔の教科書にはありますが、実は肝臓だけではなかったのです。またもや GLUT4 の脂肪細胞異的ノックアウトマウスの作ったグループとライブチヒ大の共同研究によって、RBP4 は内臓脂肪で優先的に生産されることがわかりました(10)。内臓脂肪の多い肥満の人は痩せた人に比べて、内臓脂肪の RBP4 の mRNA レベルが 60 倍以上高く、一方、皮下脂肪の多いタイプの肥満の人は 12 倍に過ぎなかったと報告しました。さらに、肥満の人は標準体重の人に比べ血中の RBP4 が 2~3 倍であり、血中の RBP4 量が内臓脂肪の量を正確に反映していたことから、RBP4 は 2 型糖尿病ばかりでなく心疾患リスクのマーカーとして使える可能性があるかと結論づけました。平たく言えば、「RBP4 は最強の悪玉アディポカインだ」と言いたいのでしょう。

この素晴らしいネタを逃さぬよう、いくつかの会社が新たに RBP4 ELISA kit を開発・販売しました。デブ-RBP4 関連の初期の論文に最も多く使用されているのが Phoenix Pharmaceuticals 社の competitive ELISA kit です。最近では AdipoGen 社の sandwich ELISA kit が良く使われているようです。その他に R&D Systems、Immunodiagnostik、老舗の Alpco Diagnostics などからも販売されています。しかし、最近、competitive ELISA kit での測定データは、western blotting でのデータと相関せず、直線性もないことから、測定系として信頼性が著しく低く問題があることが指摘されました(11)。また、competitive ELISA kit では尿中の RBP4 は比較的精度良く測定できるが、血清中の RBP4 では、定量値が非常に低くなってしまう問題点もあるようです。最も多く論文に登場する Phoenix Pharmaceuticals 社の製品は competitive ELISA kit ですので、この kit を使用した論文は俄かには信用できないことを意味しています。AdipoGen 社は sandwich ELISA kit を最近発売しましたが、初期はやはり competitive ELISA kit でした(現在でも売っていますけど)。RBP4 は血中ではプレアルブミン結合し複合体を形成していると既にも書きましたが、何と RBP4 の 96 % はこの複合体を形成しており、フリーの RBP4 (ここでは尿中の RBP4 とほぼ同義だと考えて下さい) はたった 4 % 前後しかありません。ここに、私達が sandwich ELISA kit の開発に手間取った理由がありました。作製した RBP4 に対するモノクローナル抗体はフリーの RBP4 とは良く反応するのですが、血中のプレアルブミンとの複合体とは、エピトープが隠されているためか、ほとんど反応しませんでした。いろいろすったもんだした挙句、ようやく、プレアルブミンとの複合体になっている RBP4 と反応するモノクローナル抗体を取得することができ、sandwich ELISA kit を組むことができました。この kit を用いた



RBP4 の定量値は、western blotting でのデータと良く相関しています。さらに、この kit で弊社社員の血清 RBP4 値を測定したところ、予想通り、デブ系もしくはポッチャリ系男性社員の全てが高値を示しました(当人達にとってはあまり嬉しくない?)。割と信用できそうな最近の論文に、血清 RBP4 の値はエクササイズをすると比較的早期に低下すると報告されていますので(エクササイズを行うことによって、内臓脂肪は皮下脂肪より落ちやすいと言われていることと一致します)、メタボリックシンドロームという言葉に敏感な方にとって、定期的な血清 RBP4 測定は意味があるかもしれません。

References

1. Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, et al.; Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* **436**: 356-62, 2005
2. Maeda K, Cao H, Kono K, Gorgun CZ, Furuhashi M, Uysal KT, et al.; Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes. *Cell Metab.* **1**: 107-119, 2005
3. Hotamisligil GS, Johnson RS, Distel RJ, Ellis R, Papaioannou VE, Spiegelman BM.; Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science* **274**: 1377-9, 1996
4. Wang Y, Lam KS, Kraegen EW, Sweeney G, Zhang J, Tso AW, Chow WS, Wat NM, Xu JY, Hoo RL, Xu A.; Lipocalin-2 is an inflammatory marker closely associated with obesity, insulin resistance, and hyperglycemia in humans. *Clin. Chem.* **53**: 34-41, 2007
5. van Dam RM, Hu FB.; Lipocalins and insulin resistance: etiological role of retinol-binding protein 4 and lipocalin-2 *Clin. Chem.* **53**: 5-7, 2007
6. Graham, T. E., Yang, Q., Bluher, M., Hammarstedt, A., Ciaraldi, T. P., Henry, R. R., Wason, C. J., Oberbach, A., Jansson, P.-A., Smith, U., Kahn, B. B.; Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *New Eng. J. Med.* **354**: 2552-2563, 2006.
7. Cho YM, Youn BS, Lee H, Lee N, Min SS, Kwak SH, Lee HK, Park KS.; Plasma retinol-binding protein-4 concentrations are elevated in human subjects with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes Care.* **29**: 2457-61, 2006
8. Haider DG, Schindler K, Prager G, Bohdjalian A, Luger A, Wolzt M, Ludvik B. Serum retinol-binding protein-4 is reduced after weight loss in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Dec 12; [Epub ahead of print]
9. Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim YB, Boss O, Hadro E, Minnemann T, Shulman GI, Kahn BB.; Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* **409**: 729-33, 2001.
10. N Kloting, TE Graham, J Berndt, S Kralisch, P Kovacs, CJ Wason, M Fasshauer, MR Schon, M

Stumvoll, M Bluher, and BB Kahn; Serum retinol-binding protein is more highly expressed in visceral than in subcutaneous adipose tissue and is a marker of intra-abdominal fat mass. *Cell Metab*, **6**: 79-87, 2007

11. Graham TE, Wason CJ, Bluher M, Kahn BB.; Shortcomings in methodology complicate measurements of serum retinol binding protein (RBP4) in insulin-resistant human subjects. *Diabetologia*. **50**: 814, 2007

RBP4 およびリポカリンファミリー関連製品

- CircuLex ヒト RBP4 ELISA キット (Cat# CY-8072)
- CircuLex ヒト NGAL/Lipocalin-2 ELISA キット (Cat# CY-8070)
- CircuLex ラット NGAL/Lipocalin-2 ELISA キット (Cat# CY-8053)
- CircuLex マウス FABP1/L-FABP ELISA キット (Cat# CY-8054)
- CircuLex マウス FABP3/H-FABP ELISA キット (Cat# CY-8055)
- CircuLex ラット FABP4/A-FABP ELISA キット (Cat# CY-8076)
- CircuLex マウス FABP4/A-FABP ELISA キット (Cat# CY-8077)
- CircuLex マウス FABP5/E-FABP/mal1 ELISA キット (Cat# CY-8056)

その他糖尿病/脂質研究関連製品

- CircuLex マウス/ラット PCSK9 ELISA キット (Cat# CY-8078)
- CircuLex ヒト PCSK9 ELISA キット (Cat# CY-8079)
- CircuLex PCSK9-LDLR in vitro Binding Assay キット (Cat# CY-8150)
- CircuLex ラット Adiponectin ELISA キット (Cat# CY-8049)
- CircuLex ヒト Adiponectin ELISA キット (Cat# CY-8050)
- CircuLex マウス Adiponectin ELISA キット (Cat# CY-8051)
- CircuLex イヌ Adiponectin ELISA キット (Cat# CY-8052)
- CircuLex マウス Visfatin/PBEF ELISA キット (Cat# CY-8065)
- CircuLex ヒト High-Sensitivity CRP ELISA キット (Cat# CY-8071)
- CircuLex ヒト Chitotriosidase ELISA キット (Cat# CY-8074)
- CircuLex ヒト AIM/CD5L/Sp α ELISA キット (Cat# CY-8080)
- CircuLex ヒト soluble LOX-1/OLR1 ELISA キット (Cat# CY-8081)
- 組み換え ヒト PCSK9 Wild Type in culture medium (Cat# CY-R2310)
- 組み換え ヒト PCSK9 D374Y in culture medium (Cat# CY-R2311)
- 組み換え ヒト PCSK9 Wild Type/ Δ 53 in culture medium (Cat# CY-R2320)
- 組み換え ヒト PCSK9 D374Y/ Δ 53 in culture medium (Cat# CY-R2321)
- 組み換え ヒト PCSK9 Wild Type (Cat# CY-R2330)
- 組み換え ヒト PCSK9 D374Y (Cat# CY-R2331)



- 組み換え ヒト PCSK9 R194A (Cat# CY-R2333)
- 組み換え ヒト LDLR EGF-AB domain (Cat# CY-R2340)
- 組み換え ヒト LDLR EGF-AB domain, Myc-tagged (Cat# CY-R2341)
- 組み換え PA0122 (Pseudomonas aeruginosa) Low Endotoxin (Cat# CY-R2474)
- 組み換え Asp-hemolysin (Aspergillus fumigatus) Low Endotoxin (Cat# CY-R2475)
- 組み換え ヒト soluble LOX-1/OLR1 (Cat# CY-R2271)
- 組み換え ヒト AIF-1 (Allograft Inflammatory Factor 1) Low Endotoxin (Cat# CY-R2468)
- 組み換え ヒト NAMPT/Visfatin Low Endotoxin (Cat# CY-R2471)
- 抗 ヒト PCSK9 Prodomain Clone KS-2C8 モノクローナル抗体 (Cat# CY-M1032)
- 抗 ヒト PCSK9 Clone KS-4H12 モノクローナル抗体 (Cat# CY-M1033)
- 抗 ヒト PCSK9 ポリクローナル抗体 (Cat# CY-P1037)
- 抗 ヒト Adiponectin ポリクローナル抗体 (Cat# CY-P1017)
- 抗 マウス Adiponectin ポリクローナル抗体 (Cat# CY-P1018)
- 抗 ヒト ANGPTL4 (Angiopoietin-Like 4) ポリクローナル抗体 (Cat# CY-P1021)
- 抗 マウス ANGPTL4 (Angiopoietin-Like 4) ポリクローナル抗体 (Cat# CY-P1022)
- 抗 ヒト Paraoxonase-1 ポリクローナル抗体 (Cat# CY-P1034)
- 抗 ヒト AIM/SP α /CD5L (Lymphocyte antigen CD5-like) ポリクローナル抗体 (Cat# CY-P1036)
- 抗 ヒト Paraoxonase-1 Clone KS-5F5 モノクローナル抗体 (Cat# CY-M1034)

国内販売代理店

株式会社医学生物学研究所 営業推進部 基礎試薬グループ
〒460-0008 名古屋市中区栄四丁目 5 番 3 号 KDX 名古屋栄ビル 10 階
TEL:052-238-1904/FAX:052-238-1441
URL: <https://ruo.mbl.co.jp/>
E-mail: support@mbi.co.jp

株式会社サイクレックス

〒396-0002 長野県伊那市手良沢岡 1063-103
URL: <http://www.cyclex.co.jp/>
E-mail: info@cyclex.co.jp