

骨格筋におけるアディポネクチン・パラドクスは サルコペニア発症のキープレイヤーか？

豊橋創造大学大学院 後藤 勝 正

Does Adiponectin Induce Skeletal Muscle Atrophy? -A Physiological Aspect of Adiponectin Paradox-

by

Katsumasa Goto

*Department of Physiology, Graduate School of Health Sciences,
Toyohashi SOZO University*

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the profile of adiponectin expression in slow soleus (SOL) and fast extensor digitorum longus (EDL) muscles of 10- and 100-week old mice, and to evaluate the effects of adiponectin analogue AdipoRon (AR) on myogenesis of C2C12 cells. Age-associated decrease in muscle weight in EDL was higher than that in SOL. Protein expression level of adiponectin in both SOL and EDL was increased by aging. Aging-associated up-regulation of adiponectin in SOL was lower than that in EDL. AR partially suppressed myogenic differentiation of C2C12 cells in a dose-dependent manner. However, AR-associated suppression of myogenesis was partially inhibited by knockdown of adiponectin receptor 1. Evidences suggests that aging-associated up-regulation of skeletal muscle-specific adiponectin may be a cause of sarcopenia, and strongly support “adiponectin paradox” in the regulation of skeletal muscle mass.

要 旨

本研究では、加齢によるマウスヒラメ筋および長趾伸筋におけるアディポネクチン発現量の変化を追究すると共に、アディポネクチンアナログ AipoRon (AR) が C2C12 細胞の筋管細胞への分化に及ぼす影響を検した。加齢によりヒラメ筋および長趾伸筋は共に筋重量が低下したが、その低下率はヒラメ筋に比べて長趾伸筋で大きかった。ヒラメ筋および長趾伸筋におけるアディポネクチン発現量は、共に加齢により増加したが、その増加率はヒラメ筋に比べて長趾伸筋で大きかった。AR 添加量により C2C12 細胞の筋管細胞への分化が抑制され、筋タンパク量が減少した。この筋分化抑制作用は AR 濃度に比例したものであった。しかし、アディポネクチン受容体 1 のノックダウンにより、AR の筋分化抑制作用は減弱した。以上より、加齢性筋肉減弱症の発症要因の 1 つとして、骨格筋細胞に発現するアディポネクチンによる筋分化抑制作用が関与することが示唆され、骨格筋量の制御においてもアディポネクチン・パラドクスが存在すると考えられた。

緒 言

高齢者では骨格筋の萎縮と筋力の低下などが認められる。これは、加齢に伴う骨格筋の量的かつ機能的な退行性変化として認められるもので、加齢性筋肉減弱症 (サルコペニア)¹⁾ と呼んでいる。このサルコペニアは、運動機能を著しく低下させることから運動器症候群 (ロコモティブシンドローム) あるいは身体全体の虚弱化を伴うことからフレイルと呼ばれ、超高齢社会に突入し、さらに高齢化が進行している我が国において喫緊の課題となっている。しかしながら、サルコペニアの発症機序は未解明であり、効果的な対策は依然として確立していない。

一方で、疫学研究により、高濃度の血中アディ

ポネクチンが心臓血管系のリスクを高めること²⁾ が報告され、「アディポネクチン・パラドクス」として注目を浴びている³⁻⁶⁾。さらに、最近になって、高齢者において血中アディポネクチン濃度と骨格筋機能 (筋力) には負の相関関係にあること^{7,8)} が報告され、骨格筋にもアディポネクチン・パラドクスの存在が示唆されている。

一般に、脂肪細胞から分泌されるサイトカインはディポサイトカインあるいはアディポカインと呼ばれ、インスリン抵抗性に関わるいわゆる「悪玉アディポサイトカイン」と抗炎症作用を有するいわゆる「善玉アディポサイトカイン」が知られている⁹⁾。アディポネクチンは善玉アディポカインの 1 つで、長寿ホルモンとも呼ばれ、アディポネクチンの血中濃度が高いほうが健康の維持増進、すなわち健康長寿に良いと一般に考えられてきた¹⁰⁻¹³⁾。

しかし、アディポネクチンが骨格筋細胞に及ぼす影響に関して報告はほとんどない。我々は最近、アディポネクチンの筋細胞分化促進作用を見出した (未発表資料)。この作用は筋細胞に発現するアディポネクチンによりもたらされること、筋細胞に発現したアディポネクチンが自己分泌あるいは傍分泌様に振る舞い、筋細胞に発現するアディポネクチン受容体 1 (AdipoR1) を介して筋細胞の分化に寄与することを確認した。

一方で、アディポネクチンが骨格筋に萎縮を引き起こすというエビデンスはこれまで報告されていない。前述したように、筋細胞の分化におけるアディポネクチンの作用に関しては、筋細胞に発現するアディポネクチンによるものである。筋細胞に発現するアディポネクチン量は少ないが、骨格筋の増量に伴いその発現量は増大する。しかし、共同筋腱切除による骨格筋量を増加させても、血中アディポネクチン濃度には変化が認められない。したがって、アディポネクチンによる筋分化促進作用は、低濃度のアディポネクチンによ

るものである。一方、高濃度アディポネクチンは骨格筋を萎縮させる作用を持つ可能性は否定できない。

また、サルコペニアでは速筋線維に優位な萎縮が認められる¹⁴⁾ものの、この筋線維タイプ選択的な加齢性骨格筋萎縮のメカニズムは明らかになっていない。加齢に伴い速筋細胞に発現するアディポネクチンが増加することが速筋に選択的な萎縮をもたらすことも十分に考えられる。しかし、骨格筋に発現するアディポネクチンは速筋と遅筋における差があるか、骨格筋に発現するアディポネクチンに加齢に伴う変化があるか、加齢に伴いアディポネクチン発現量の変化に速筋と遅筋で差があるか、に関する報告はない。

そこで本研究では、①アディポネクチン発現量が速筋と遅筋で異なるか、②骨格筋に発現するアディポネクチンに加齢性変化はあるか、③もし骨格筋に発現するアディポネクチンの加齢性変化があるならば、その変化は速筋と遅筋で異なるか、そして④高濃度アディポネクチンは骨格筋細胞を萎縮させるか、について検討し、骨格筋におけるアディポネクチン・パラドクスの存在を追究することを目的とした。

1. 方法

本研究は、動物実験ならびに培養細胞実験の2つの実験系により構成された。動物実験は、日本生理学会が定める「生理学領域における動物実験に関する基本的指針」に従い、豊橋創造大学動物実験委員会による審査・承認を経て実施された。

1.1 動物実験

動物実験では、速筋と遅筋における筋重量とアディポネクチン発現量とその加齢性変化を検討した。実験には、生後10週齢および100週齢の雄性マウス(C57BL/6J)を用いた。全てのマウスよりヒラメ筋および長趾伸筋を摘出した。筋重量

は、成長に伴うマウス体サイズの増加を補正するために、体重当たり均質重量似て評価した。すべてのマウスは、室温 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (平均 \pm 標準誤差)、湿度約50%、明暗周期12時間に制御された実験動物飼育室で飼育された。また、餌と水は自由摂取とした。

1.1.1 サンプル調整

摘出したヒラメ筋および長趾伸筋は、即座に結合組織を除去し、筋湿重量を測定した。その後、ヒラメ筋の一部を秤量後、Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail (Cell Signaling Technology) が添加された isolation buffer (Sigma-Aldrich) を用いて得られたサンプルを完全にホモジネートし、Bradford法 (Bio-Rad) により総タンパク量を測定した。タンパク測定後、SDS サンプルバッファー [30% (vol/vol) glycerol, 5% (vol/vol) 2-mercaptoethanol, 2.3% (wt/vol) sodium-dodecylsulfate, 62.5mM Tris-HCl, 0.05% (wt/vol) bromophenol blue (BPB), pH6.8] を用いて、タンパク濃度を一定に調整した後、 95°C で5分間煮沸処理し、SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) のサンプルとした。

1.2 培養細胞実験

培養細胞実験では、高濃度アディポネクチンが骨格筋細胞の分化に及ぼす影響を検討した。実験には、マウス筋芽細胞由来細胞株 C2C12 細胞を用いた。C2C12細胞は、タイプIコラーゲンがコーティングされた培養プレート (直径35mm) を用い、増殖培地にてサブコンフルエント状態にまで増殖させた。また、一部の細胞を対象に、分化誘導前にアディポネクチン受容体1 (AdipoR1) あるいはアディポネクチン受容体2 (AdipoR2) に対する siRNA (タカラバイオ) を RNAiMAX (Life Technology) を用いてトランスフェクションし、AdipoR1 (R1-si) あるいは AdipoR2 (R2-si) をノックダウンした。対照には non-targeting

siRNA (NT-si: タカラバイオ) を同様に培地に添加して細胞にトランスフェクションした。また, siRNA あるいは NT-si による処理は 24 時間とした。siRNA 処理によるノックダウンの効率の評価は, NT-si に対する R1-si あるいは R2-si 処理による AdipoR1 および AdipoR2 の mRNA 発現量により評価した。

サブコンフルエント状態の C2C12 細胞を NT-si, R1-si あるいは R2-si で処理した後, 分化培地に交換することで筋管細胞への分化を誘導した。分化培地には, 異なる濃度のアディポネクチンアナログ AdipoRon (AR: Abcam) を dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解して添加した。

1. 2. 1 リアルタイム RT-PCR

本研究では, mRNA 発現量の評価はリアルタイム RT-PCR にて実施した。C2C12 細胞内の RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen) により抽出した。抽出した RNA サンプル (~40 ng RNA) は, cDNA synthesis kit [Prime Script RT Master Mix (Perfect Real Time) for mRNA: タカラバイオ] を用いて complementary DNA (cDNA) に逆転写した。合成した cDNA は Takara SYBR Premix Ex Taq II を用いて, Takara Thermal Cycler Dice[®] Real Time System Software Ver. 4.00 (タカラバイオ) を使い, reverse-time reverse transcription-PCR (Thermal Cycler Dice[®] Real Time System II MRQ: タカラバイオ) を行った。反応状況は, 95°C で 30 秒を 40 サイクル, 95°C で 5 秒, 60°C で 30 秒とした。各遺伝子の増幅に用いたプライマーの配列は, AdipoR1 は 3' -CTGGGCATCTCTGCCATCA-5' (forward), 3' -CTTGCAAAGCCCTCAGCGATA-5' (reverse), AdipoR2 は 3' -ATCAGCAGCCAGACGCACTC-5' (forward), 3' -TGACCAGTCCCAAAGACCTCTACTC-5' (reverse) とした。内在性コントロールとして glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

(GAPDH) cDNA を用い, GAPDH に対する各遺伝子発現レベルの相対的発現量を評価した。GAPDH のプライマーの配列として, 3' -TGTGTCCGTCGTGTGGATCTGA-5' (forward), 3' -TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-5' (reverse) を用いた。

1. 2. 2 サンプル調整

培地に siRNA あるいは NT-si を処理した後, 継時的に細胞を回収した。回収した細胞は, 動物実験の骨格筋組織と同様に処理して SDS-PAGE のサンプルを調整した。

1. 3 ウェスタンブロッティング

ヒラメ筋および長趾伸筋ならびに C2C12 細胞より得られた各サンプルは, SDS-PAGE のゲルにタンパク量が等しくなるようにロードし, 20 mA の定電流にて電気泳動を行った。BPB がゲル下端に達した時点で泳動を終了し, その後 polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (0.2 μ m, Bio-Rad) へ 100V の定電圧, 60 分間, 4°C の条件で転写を行った。PVDF 膜に対してブロッキング処理 [5% skim milk, pH 7.5 Tris-buffered saline (TTBS), 0.1% Tween 20] を 60 分間行った。その後, 各種一次抗体 [アディポネクチン (R&D Systems), AMP-activated protein kinase (AMPK) (Cell Signaling Technology), β -actin (Cell Signaling Technology)] を 4°C, overnight で反応させた。二次抗体 (Cell Signaling Technology, Jackson ImmunoResearch Laboratories) を室温で 1~2 時間反応させた。Light-Capture (アトー) を用いて化学発光 (GE Healthcare) を行った。得られたデータを CS Analyzer Ver. 2.08b (アトー) を使って定量的に算出した。アディポネクチン発現量は, 内在性コントロールである β -actin に対する相対値で, AMPK 発現量に関しては総 AMPK 発現量に対するリン酸化 AMPK 発現量にてそれぞれ評価した。

1. 4 統計処理

動物実験では、10週齢のヒラメ筋における値を1.0として、各測定値はヒラメ筋における値の相対値で示した。筋重量ならびにAMPK発現量の差は、週齢と筋タイプを主効果とした2元配置分散分析にて検定した。培養細胞実験では、培地にARを添加しない(0 μM, DMSO添加)条件での値を1.0として、各測定値はこの値の相対値で示した。アディポネクチンならびにAMPK発現量の差の検定は、siRNA処置とAR濃度を主効果とした二元配置分散分析にて検定した。なお、動物実験および培養細胞実験ともに、二元配置分散分析の結果、交互作用が認められた場合には、一元配置分散分析後、多重比較検定(Tukey-Kramer)にて差の検定を行った。危険率5%未満をもって統計学的に有意差ありと判定した。

2. 結果

2. 1 動物実験

2. 1. 1 筋重量

体重当たりの筋湿重量(筋重量)では、二元配置分散分析の結果、週齢と筋タイプに有意な主効果が認められた($p < 0.05$)が、有意な交互作用は認めなかった(図1)。ヒラメ筋ならびに長趾

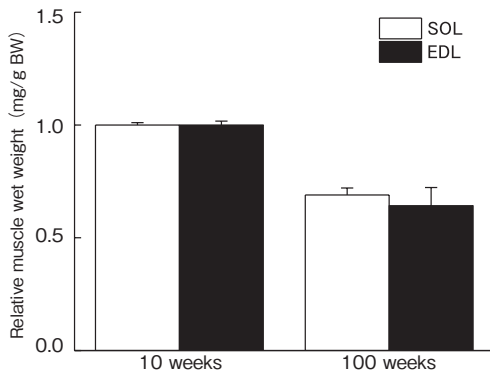


図1 Relative soleus and extensor digitorum longus muscles wet weight to body weight in 10- and 100-week old mice
age: $p < 0.05$, muscle: $p < 0.05$, interaction: $p > 0.05$
SOL: soleus muscle, EDL: extensor digitorum longus muscle.
Values are means \pm SEM. $n = 4$. Values are expressed relative to the value of 10-week old mice (1.0)

伸筋共に10週齢に比べて100週齢の筋重量が低値を示した。また、10週齢の筋重量に対する100週齢の筋重量の減少率は、ヒラメ筋に比べて長趾伸筋で大きかった。

2. 1. 2 骨格筋におけるアディポネクチン発現量

本研究で対象とした10週齢ならびに100週齢のマウスヒラメ筋および長趾伸筋の両筋において、アディポネクチンの発現が認められた。二元配置分散分析の結果、週齢と筋タイプに有意な主効果が認められた(図2, $p < 0.05$)。しかし、有意な交互作用は認めなかった。ヒラメ筋および長趾伸筋共に10週齢に比べて100週齢で高いアディポネクチン発現量が認められたが、ヒラメ筋に比べて長趾伸筋における発現増加が顕著であった。

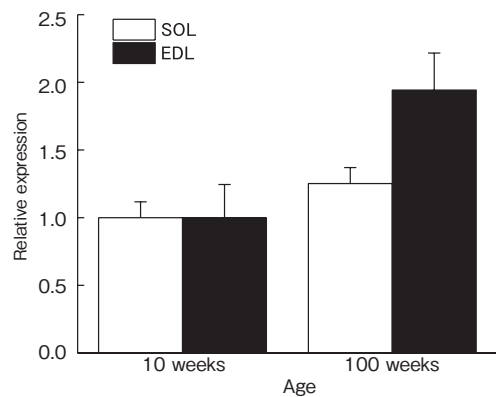


図2 Protein expression level of adiponectin in both soleus and extensor digitorum longus muscles in 10- and 100-week old mice
age: $p < 0.05$, muscle: $p < 0.05$, interaction: $p > 0.05$
Values are means \pm SEM. $n = 4$. Values are expressed relative to the value of 10-week old mice (1.0). Abbreviations are the same as in 図1

2. 2 培養細胞実験

2. 2. 1 AdipoRon (AR) が筋タンパク量に及ぼす影響

本研究で用いたsiRNAによりAdipoR1およびAdipoR2共にmRNAレベルで約80%のノックダウン効果が認められた。二元配置分散分析によりsiRNA処置とAR濃度に有意な主効果が認めら

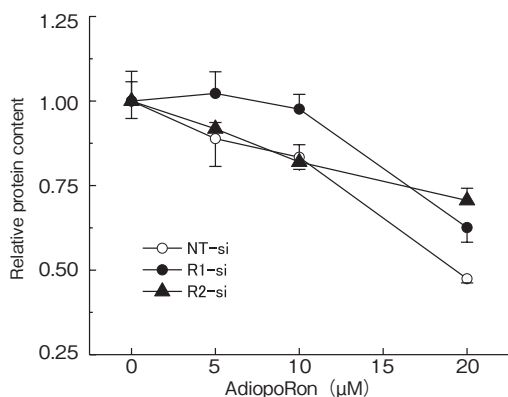


図3 Changes in muscle protein content in C2C12 myotubes in response to AdipoRon concentration

treatment: $p < 0.05$, concentration: $p < 0.05$, interaction: $p > 0.05$
 NT-si: cells treated with non-targeting siRNA, R1-si: cells treated with siRNA for adiponectin receptor R1, R2-si: cells treated with siRNA for adiponectin receptor R2. Values are means \pm SEM. $n = 3$. Values are expressed relative to the value of the condition medium with 0 μ M AdipoRon (1.0)

れたが ($p < 0.05$), 有意な交互作用は認めなかった (図3). NT-si では, AR 添加量の増加に伴い, 筋管細胞への分化が抑制され, 筋タンパク量の減少が認められた. 一方, R1-si で AdipoR1 をノックダウンすることで, AR 濃度が 10 μ M までは AR 添加による筋タンパク量に変化は認めなかった. しかし R2-si 処理では, AR 濃度が 10 μ M までは筋タンパク量の減少が認められた.

2. 2. 2 AdipoRon (AR) が AMPK のリン酸化レベルに及ぼす影響

二元配置散分析により siRNA 処置と AR 濃度に有意な主効果が認められたが ($p < 0.05$), 有意な交互作用は認めなかった (図4). NT-si では, AR 添加量の上昇に伴い, AMPK のリン酸化レベルが増加した. 一方, R1-si および R2-si で AdipoR1 をノックダウンすることで, AR 濃度上昇に伴う AMPK リン酸化レベルの増加が抑制された. また, R1-si 処理と R2-si 処理の間に, 顕著な差は認めなかった.

3. 考 察

本研究では, 加齢によるヒラメ筋および長趾伸筋の筋重量ならびにアディポネクチン発現量の変

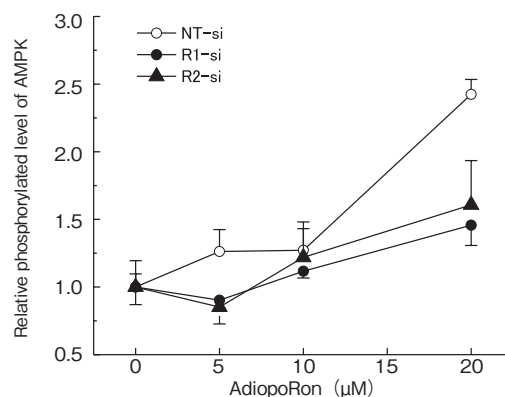


図4 Changes in the phosphorylated level of AMP-activated protein kinase (AMPK) in C2C12 myotubes in response to AdipoRon concentration

treatment: $p < 0.05$, concentration: $p < 0.05$, interaction: $p > 0.05$
 Values are means \pm SEM. $n = 3$. Values are expressed relative to the value of the condition medium with 0 μ M AdipoRon (1.0). Abbreviations are the same as in 図3

化を検討すると共に, アディポネクチンアナログ AR が C2C12 筋管細胞のタンパク量に及ぼす影響を検討した. その結果, 加齢によりヒラメ筋および長趾伸筋は共に筋重量が低下したが, その低下率はヒラメ筋に比べて長趾伸筋で大きかった. ヒラメ筋および長趾伸筋におけるアディポネクチン発現量は加齢により増加し, その増加率はヒラメ筋に比べて長趾伸筋で大きかった. AR 添加量により C2C12 細胞の筋管細胞への分化が抑制され, 筋タンパク量が減少した. この筋分化抑制作用は濃度に比例したものであった. しかし, AdipoR1 のノックダウンにより, AR の筋分化抑制作用は減弱した. 加齢により骨格筋アディポネクチン発現量の増加ならびに高濃度アディポネクチン (AdipoRon : AR) による筋タンパク減少効果についての報告はこれまでになく, 本研究が初めてである.

加齢性筋肉減弱症とアディポネクチン発現量

本研究では, 10 週齢と 100 週齢のマウス骨格筋の筋重量を比較した. ヒラメ筋ならびに長趾伸筋共に, 加齢による筋重量の低下が認められた. また, 萎縮率は遅筋であるヒラメ筋に比べて速筋

である長趾伸筋で大きかった。加齢性筋肉減弱症（サルコペニア）は遅筋に比べて速筋に顕著に出現する¹⁴⁾ことから、本研究で用いた100週齢のマウスでは加齢性筋肉減弱症が発症していたと考えられる。

また、100週齢のマウス骨格筋では、アディポネクチン発現量が増加しており、その増加はヒラメ筋に比べて長趾伸筋で顕著であった。骨格筋細胞に発現するアディポネクチンが自己分泌あるいは傍分泌用に作用し（未発表資料）、かつ骨格筋細胞における発現量と分泌量が比例すると仮定すると、若齢に比べて高齢において、そして遅筋に比べて速筋においてアディポネクチンの作用が増大していることが示唆される。

アディポネクチンと骨格筋細胞

本研究では、アディポネクチンの作用をアディポネクチンアナログであるAR¹⁵⁾で評価した。ARをC2C12細胞の分化誘導時に作用させると、筋管細胞への分化が抑制され、筋タンパク量が減少した。このことは、高濃度のアディポネクチンは骨格筋量を減少させる要因の1つになることを示唆するものと考えられる。また、AR添加による筋分化抑制作用は、AdipoR1をノックダウンすることで抑制された。したがって、ARはAdipoR1への結合を介して、筋分化を抑制することがあわせて示唆された。

AMPKは筋分化を抑制^{16,17)}して、筋タンパク量を負に調節する因子^{16,18)}であることから、ARによる筋分化抑制作用におけるAMPKの関与を検討した。その結果、ARはAMPKのリン酸化レベル増加、すなわちAMPKを活性化させた。一方、AdipoR1あるいはAdipoR2をノックダウンするとAMPKの活性化が抑制された。したがって、本研究で認められたARによる筋分化抑制は、AMPKの活性化を介したものであることが示唆された。

4. 結 論

本研究の結果から、加齢性筋肉減弱症の発症要因の1つとして、骨格筋細胞に発現するアディポネクチンによる筋分化抑制作用が関与することが示唆された。したがって、骨格筋量の制御においてもアディポネクチン・パラドクスが存在することが示唆された。今後さらなる検討を加え、加齢性筋肉減弱症の発症機序の解明とその予防法の開発へつなげていきたい。

謝 辞

本研究に対して助成を賜りました財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に深く感謝いたします。また、本研究に対して協力いただいた関係各位に深謝します。

文 献

- 1) Cruz-Jentoft A.J., Baeyens J.P., Bauer J.M., Boirie Y., Cederholm T., Landi F., Martin F.C., Michel J.P., Rolland Y., Schneider S.M., Topinková E., Vandewoude M., Zamboni M.; European Working Group on Sarcopenia in Older People. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing*, 39: 412-423(2010)
- 2) Alehagen U., Vorkapic E., Ljungberg L., Länne T., Wågsäter D., Gender difference in adiponectin associated with cardiovascular mortality. *BMC Med. Genet.*, 16: 37(2015)
- 3) Beatty A.L., Zhang M.H., Ku I.A., Na B., Schiller N.B., Whooley M.A., Adiponectin is associated with increased mortality and heart failure in patients with stable ischemic heart disease: data from the Heart and Soul Study. *Atherosclerosis*, 220:587-592(2012)
- 4) Choi S.H., Ku E.J., Hong E.S., Lim S., Kim K.W., Moon J.H., Kim K.M., Park Y.J., Park K.S., Jang H.C., High serum adiponectin concentration and low body mass index are significantly associated with increased all-cause and cardiovascular mortality in an elderly cohort, "adiponectin paradox": the

- Korean Longitudinal Study on Health and Aging (KLoSHA). *Int. J. Cardiol.*, **183**: 91-97 (2015)
- 5) Gotoda T., Another paradox regarding adiponectin revisited. *J. Atheroscler. Thromb.* **23**: 292-294 (2016)
 - 6) Wannamethee S.G., Interventions to increase adiponectin may be associated with increased coronary heart disease in older adults. *Future Cardiol.*, **5**: 19-22 (2009)
 - 7) Huang C., Tomata Y., Kakizaki M., Sugawara Y., Hozawa A., Momma H., Tsuji I., Nagatomi R., High circulating adiponectin levels predict decreased muscle strength among older adults aged 70 years and over: A prospective cohort study. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, **25**: 594-601 (2015)
 - 8) Huang C., Niu K., Momma H., Kobayashi Y., Guan L., Nagatomi R., Inverse association between circulating adiponectin levels and skeletal muscle strength in Japanese men and women. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, **24**: 42-49 (2014)
 - 9) 山内敏正, 門脇孝. メタボリックシンドロームとアディポネクチン. 炎症と免疫 **17**: 191-198 (2009)
 - 10) Fisher F.M., Trujillo M.E., Hanif W., Barnett A.H., McTernan P.G., Scherer P.E., Kumar S., Serum high molecular weight complex of adiponectin correlates better with glucose tolerance than total serum adiponectin in Indo-Asian males. *Diabetologia.*, **48**: 1084-1087 (2005)
 - 11) Hara K., Horikoshi M., Yamauchi T., Yago H., Miyazaki O., Ebinuma H., Imai Y., Nagai R., Kadowaki T., Measurement of the high-molecular weight form of adiponectin in plasma is useful for the prediction of insulin resistance and metabolic syndrome. *Diabetes Care.*, **29**: 1357-1362 (2006)
 - 12) Pajvani U.B., Hawkins M., Combs T.P., Rajala M.W., Doebber T., Berger J.P., Wagner J.A., Wu M., Knopps A., Xiang A.H., Utzschneider K.M., Kahn S.E., Olefsky J.M., Buchanan T.A., Scherer P.E., Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J. Biol. Chem.*, **279**: 12152-12162 (2004)
 - 13) Waki H., Yamauchi T., Kamon J., Ito Y., Uchida S., Kita S., Hara K., Hada Y., Vasseur F., Froguel P., Kimura S., Nagai R., Kadowaki T., Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J. Biol. Chem.*, **278**: 40352-40363 (2003)
 - 14) Nilwik R., Snijders T., Leenders M., Groen B.B., van Kranenburg J., Verdijk L.B., van Loon L.J., The decline in skeletal muscle mass with aging is mainly attributed to a reduction in type II muscle fiber size. *Exp. Gerontol.*, **48**: 492-498 (2013)
 - 15) Okada-Iwabu M., Yamauchi T., Iwabu M., Honma T., Hamagami K., Matsuda K., Yamaguchi M., Tanabe H., Kimura-Someya T., Shirouzu M., Ogata H., Tokuyama K., Ueki K., Nagano T., Tanaka A., Yokoyama S., Kadowaki T., A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature*, **503**: 493-499 (2013)
 - 16) Egawa T., Ohno Y., Goto A., Ikuta A., Suzuki M., Ohira T., Yokoyama S., Sugiura T., Ohira Y., Yoshioka T., Goto K., AICAR-induced activation of AMPK negatively regulates myotube hypertrophy through HSP72-mediated pathway in C2C12 skeletal muscle cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **306**: E344-E354 (2014)
 - 17) Fulco M., Cen Y., Zhao P., Hoffman E.P., McBurney M.W., Sauve A.A., Sartorelli V., Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt. *Dev. Cell*, **14**: 661-673 (2008)
 - 18) Egawa T., Goto A., Ohno Y., Yokoyama S., Ikuta A., Suzuki M., Sugiura T., Ohira Y., Yoshioka T., Hayashi T., Goto K.: Involvement of AMPK in regulating slow-twitch muscle atrophy during hindlimb unloading in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **309**: E651-E662 (2015)