

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19524

研究課題名(和文)メタボリックシンドローム関連遺伝子KAT-1による糖代謝制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Influence of metabolic syndrome-associated gene KAT-1 on glucose metabolism

研究代表者

山本 隆史(YAMAMOTO, TAKASHI)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：00572033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：メタボリックシンドロームの発症には、生活習慣と遺伝素因の関与が知られているが、その詳しい発症メカニズムは不明である。

本研究では、メタボリックシンドローム関連遺伝子KAT-1の欠損マウスでは、キヌレン酸量が低下しており、耐糖能異常とインスリン抵抗性を呈することを見出した。さらに内因性のキヌレン酸含量を増加させると糖尿病モデルマウスの病態が改善することを見出した。キヌレン酸代謝への介入は糖尿病やメタボリックシンドロームの進展を抑制する手段になるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：It is well known that metabolic syndrome is associated with lifestyle and genetic factor but precise mechanism of pathogenesis of metabolic syndrome is unclear. Present study found that in metabolic syndrome-associated gene KAT1 knockout mice kynurenic acid contents in some tissues was decreased and glucose intolerance and insulin-resistant state were observed.

Furthermore, increasing endogenous kynurenic acid contents ameliorated glucose intolerance in diabetic mice with diet-induced obesity. The therapeutic intervention to manipulate metabolism of kynurenic acid may be an effective tool for controlling progression of diabetes mellitus and metabolic syndrome.

研究分野：生化学

キーワード：メタボリックシンドローム キヌレン酸

1. 研究開始当初の背景

(1)近年の食生活の欧米化や運動不足、ストレスなどの影響により我が国でも生活習慣病の人口が増加している。メタボリックシンドロームは、内臓脂肪蓄積を背景に生活習慣病のうち糖尿病・高血圧・脂質異常症が複数重複した病態である。これらの因子が重複することにより、心疾患や脳血管疾患に至る致命的な動脈硬化症のリスクが高まるとされる。メタボリックシンドロームの発症には、生活習慣の偏りと遺伝素因の関与が知られているが、なぜこれら複数の代謝異常を同一の個人の中に生じさせ、相乗的な動脈硬化症のリスクの増悪をもたらすのか、そのメカニズムには不明な点が多い。

(2)ヒトにおいては遺伝的な背景や環境などが個々人で大きく異なるため、様々な素因によって引き起こされるメタボリックシンドロームのような疾患について遺伝素因を同定するのに大きな困難が伴う。一方、モデル動物では各個体の遺伝的な背景や外部環境の均一化が可能となる。高血圧自然発症ラット(spontaneously hypertensive rat; SHR)は本態性高血圧症のモデルラットとして知られている。同時に SHR は高インスリン血症及び耐糖能異常、高 TG 血症と低 HDL-C 血症、内臓脂肪蓄積、交感神経系の亢進など、メタボリックシンドロームに似た表現型も呈する。われわれはメタボリックシンドロームに関わる新規分子の同定を目的として、そのモデル動物である SHR の遺伝解析を行い、キヌレン酸を合成する酵素 KAT-1(Kynurenine aminotransferase-1)を見出した。すなわち、SHR と野生型である WKY の交配に由来する世代における連鎖解析の結果、SHR の 3 番染色体には血圧、体重、インスリン抵抗性と脂肪分解障害に連鎖する QTL(Quantitative trait locus)が集簇していた。その領域には KAT-1 遺伝子が存在し、SHR には機能的な変異(E61G)が認められることから、我々はメタボリックシンドロームの原因候補遺伝子として KAT-1 遺伝子を報告してきた。KAT-1 は KAT family に属するタンパクでヒト・げっ歯類に広く存在し、トリプトファンの代謝物であるキヌレニンからキヌレン酸を合成する経路の律速酵素である。キヌレン酸は多彩な生理作用が知られており、グルタミン酸受容体の内因性アンタゴニストとして働き、神経興奮や神経毒性に対して抑制的に作用する他、酸化ストレス抑制などの働きが報告されている。KAT-1 やキヌレン酸の生理的な役割は不明な点が多く、メタボリックシンドローム及びこれを構成する諸症状とキヌレン酸・KAT-1 との関連も不明である。

2. 研究の目的

メタボリックシンドロームの発症には遺伝素因の関与が知られている。われわれのこれ

までの検討から、KAT-1 が SHR のメタボリックシンドローム様の表現型に関連があること、さらに KAT-1 欠損マウス(KAT-1 KO マウス)は野生型マウスに比べて血圧の上昇を呈することを見出した。本研究では、SHR において KAT-1 と関連が認められた表現型の中で、耐糖能異常との関連に焦点を絞って、KAT-1 とその酵素反応の生成物であるキヌレン酸の生理的機能の解明を行い、KAT-1 やキヌレン酸の新規治療標的分子としての可能性を検討し、臨床応用に展開するための基礎研究を行う。

3. 研究の方法

(1)KAT-1 KO マウスの解析

全身性の KAT-1 の欠損が糖代謝に与える影響を in vivo で検討する。

KAT-1 欠損の確認

KAT-1 の欠損を確認するため、8 週齢の雄の KAT-1 KO ホモマウス及び野生型マウスの肝臓及び脳を採取し KAT-1 発現量を mRNA レベル・タンパクレベルで確認した。

KAT 活性及びキヌレン酸濃度の測定

KAT-1 の欠損が KAT 活性に及ぼす影響を検討するため、4 週齢の雄の KAT-1KO マウス及び野生型マウスの肝臓を採取し、肝全タンパク中の KAT 活性を³H]キヌレニンを用いて測定した。また、8 週齢の雄の KAT-1KO マウス及び野生型マウスの血清、脳、肝臓を採取し、HPLC を用いて組織中のキヌレン酸濃度を測定した。

体重・摂餌量・飲水量・尿量の測定

雄の KAT-1KO マウス及び野生型マウスについて 4~12 週齢まで体重を測定した。9 週齢の雄の KAT-1KO マウス及び野生型マウスについて代謝ケージ中での個別飼育を行い、摂餌量・飲水量・尿量を測定した。

糖負荷試験による耐糖能の評価

KAT-1 の耐糖能に及ぼす影響を調べるため、12 週齢の雄の KAT-1KO マウス及び野生型マウスについて糖負荷試験を行った。あらかじめ絶食させたマウスにグルコースを腹腔内投与し、経時的に採血後、血中グルコース濃度及び血中インスリン濃度を測定した。

インスリン負荷試験によるインスリン感受性の評価

KAT-1 のインスリン感受性に及ぼす影響を調べるため、12 週齢の雄の KAT-1KO マウス及び野生型マウスについてあらかじめ絶食させたマウスにインスリンを腹腔内投与し、経時的に採血後、血中グルコース濃度を測定した。

(2)正常マウス及び糖尿病モデルマウスにおけるキヌレニン代謝物濃度の測定

正常マウスにおける栄養状態の違いがキヌレン酸含量に与える影響を調べるため、雄の C57BL/6J マウスについて 24 時間絶食及び 24 時間絶食後高スクロース食を 12 時間再摂食させた 2 群について、血中キヌレン酸濃度、KAT の基質であるキヌレニン濃度そしてキヌレニン代謝の主経路でキヌレニンから合成される 3-ヒドロキシキヌレニン濃度を測定した。さらに 2 型糖尿病モデルマウスである db/db(雄)と対照群である db/m マウスについて、絶食及び再摂食群にそれぞれ分けて肝臓中のキヌレン酸濃度を測定した。

(3)KMO (kynurenine 3-monooxygenase)の肝特異的発現抑制による糖代謝への影響

KMO はキヌレニンからの 3-ヒドロキシキヌレニン合成を担う酵素で NAD へと至るキヌレニン代謝の律速酵素である。近年、キヌレン酸の前駆体であるキヌレニンからの 3-ヒドロキシキヌレニン合成を触媒する酵素 KMO 欠損マウスでは、3-ヒドロキシキヌレニン量が減少する一方、キヌレン酸量が上昇することが報告されている。そこで KAT-1KO マウスとは反対に、*in vivo* においてキヌレン酸濃度の亢進が、糖代謝制御に及ぼす影響を検討する。

KMO 発現抑制がキヌレニン代謝物濃度に及ぼす影響

雄の C57BL/6J マウス 12 週齢について KMO に対する shRNA 発現アデノウイルスあるいは対照群として LacZ に対する shRNA 発現アデノウイルスを尾静脈より投与し、6 日後に解剖し、肝臓の KMO タンパク発現量をタンパクレベルで確認した。また肝臓の 3-ヒドロキシキヌレニン濃度を測定した。さらに肝臓に加えて、血清、脳、骨格筋、白色脂肪組織のキヌレン酸濃度を測定した。

KMO 発現抑制が食事誘発性の肥満・糖尿病モデルマウスの糖代謝に及ぼす影響

耐糖能試験

雄の C57BL/6J マウスに 6 週齢より高脂肪食を与え、肥満に伴う糖尿病モデルマウスを作製した。12 週間後に KMO に対する shRNA アデノウイルスを感染させ、経時的に摂餌量を測定後、7 日目に糖負荷試験を行った。

インスリン負荷試験

雄の C57BL/6J マウスに 6 週齢より高脂肪食を与え、肥満に伴う糖尿病モデルマウスを作製した。8 週間後に KMO に対する shRNA アデノウイルスを感染させ、経時的に摂餌量を測定後、7 日目にインスリン負荷試験を行った。

ピルビン酸負荷試験

雄の C57BL/6J マウスに 6 週齢より高脂肪食を与え、肥満に伴う糖尿病モデルマウスを作製した。8 週間後に KMO に対する shRNA アデノウイルスを感染させ、経時的に摂餌量を測定後、7 日目にピルビン酸負荷試験を行

った。

4. 研究成果

(1)KAT-1 KO マウスのキヌレン酸レベルと糖代謝

KAT-1 KO マウスでは KAT-1 の消失が確認された。KAT-1 の消失は代償性の KAT-2 や KAT-3 といったその他 KAT ファミリーの発現量には影響を与えなかった。KAT-1 KO マウスは野生型マウスに比べて若過齢(5-6 週齢時)で有意な低体重の傾向を示したが、その違いは成長につれ消失した。一日当たりの摂食量、飲水量、尿量には違いはなかった。KAT-1KO マウスは、体重に違いがない週齢であっても各種負荷試験の結果、有意な耐糖能の悪化と、インスリン感受性の低下を示していた。KAT-1KO マウスでは肝 KAT 活性が有意に低下しており、脳や血中のキヌレン酸濃度の低下と肝臓における低下傾向を示しており、KAT-1KO マウスにおけるキヌレン酸含量の低下が糖代謝異常と関連していることが示された。

(2) 正常マウス及び糖尿病モデルマウスにおけるキヌレニン代謝物濃度の測定

野生型マウスにおいて絶食時に比べて再摂食時の血中キヌレン酸濃度は約 2 倍に上昇し、一方、KAT の基質であるキヌレニン濃度は約半分に低下した。キヌレニンから合成される 3-ヒドロキシキヌレニン濃度も有意に低下していた。一方、db/db マウスでは絶食時ではキヌレン酸濃度が db/m マウスにくらべて約 4 倍に増加していた。以上のことから、摂食や過栄養状態が血中及び肝キヌレン酸合成を亢進させること、これらの臓器中のキヌレン酸濃度が栄養状態によって変動することが明らかになった。

(3) KMO 発現抑制が食事誘発性の肥満・糖尿病モデルマウスの糖代謝に及ぼす影響

KAT-1KO マウスとは反対にキヌレン酸濃度の上昇が糖代謝に及ぼす影響を検討するため、KMO の肝特異的な発現抑制実験を行った。KMO の発現抑制によりその酵素生成物である 3-ヒドロキシキヌレニンが 1/3 程度まで低下し、一方肝臓におけるキヌレン酸含量が有意に増加した。キヌレン酸濃度の上昇は血中及び脳、骨格筋、脂肪組織などでも認められ、肝臓中のキヌレン酸濃度の上昇は、血液を介してさまざまな組織に反映していることが分かった。このように一過性の KMO 発現抑制は全身性のキヌレン酸含量を増加させる有用なツールであることが分かった。そこで各種負荷試験を行ったところ、KMO の発現抑制群では、対照群と比べて体重や摂餌量に違いがないにもかかわらず、耐糖能とインスリン感受性の有意な改善が認められた。さらにピルビン酸負荷試験によって、ピルビン酸経路で合成されるグルコース濃度、すなわち糖新生由来の血糖上昇が KMO 発現

抑制群では有意に低下していた。以上のことから、キヌレン酸合成の亢進は耐糖能を改善させること、またそのメカニズムとして糖新生の抑制の関与が示唆された。

本研究から SHR で認められたさまざまな形質のうち、低体重や糖代謝異常が KAT-1KO マウスによって再現され、SHR が示すメタボリックシンドローム様の諸症状のうち少なくとも一部は KAT-1 経路によるものと考えられた。また、KAT-1KO マウスの解析及び KMO 発現抑制実験よりキヌレン酸レベルが全身の糖代謝を制御している可能性が考えられる。キヌレン酸量を規定する分子を標的とした薬剤などが新たなメタボリックシンドロームに対する有効な治療法となりうる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Takeuchi Y, Yahagi N, Aita Y, Murayama Y, Sawada Y, Piao X, Toya N, Oya Y, Shikama A, Takarada A, Masuda Y, Nishi M, Kubota M, Izumida Y, Yamamoto T, Sekiya M, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Urayama O, Kawakami Y, Iizuka Y, Gotoda T, Itaka K, Kataoka K, Nagai R, Kadowaki T, Yamada N, Lu Y, Jain MK, Shimano H. KLF15 Enables Rapid Switching between Lipogenesis and Gluconeogenesis during Fasting. *Cell Rep.* 2016 Aug 30; 16(9):2373-86. 査読有
doi: 10.1016/j.celrep.2016.07.069.

[学会発表](計 4 件)

1. 山本隆史、飯塚陽子、藤田敏郎、後藤田貴也. メタボリックシンドローム関連遺伝子 KAT-1 (kynurenine aminotransferase-1) の糖代謝に及ぼす影響 第 49 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、広島県広島市 グランドプリンスホテル広島、2017 年 7 月 6-7 日

2. 山本隆史、飯塚陽子、藤田敏郎、後藤田貴也. キヌレン酸代謝系が糖代謝制御に及ぼす影響 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会、愛知県名古屋市 名古屋国際会議場、2017 年 5 月 18-20 日

3. 山本隆史、飯塚陽子、藤田敏郎、後藤田貴也. キヌレン酸代謝系が糖代謝制御に及ぼす影響 第 54 回日本臨床分子医学会学術集会、東京都千代田区 東京国際フォーラム、2017 年 4 月 14-15 日

4. 山本隆史、飯塚陽子、藤田敏郎、後藤田貴也. メタボリックシンドローム関連遺伝子

KAT-1 (kynurenine aminotransferase-1) の糖代謝に及ぼす影響 第 48 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、東京都新宿区 京王プラザホテル、2016 年 7 月 14-15 日

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 隆史(Takashi Yamamoto)
杏林大学・医学部・助教
研究者番号:00572033