

令和元年6月13日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01820

研究課題名(和文) ChREBPによるGLUT2の発現制御を介した血糖調節機構の解明

研究課題名(英文) ChREBP regulates blood glucose level via the expression of GLUT2

研究代表者

中川 勉 (Nakagawa, Tsutomu)

北海道医療大学・薬学部・准教授

研究者番号：50722063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：GLUT2の発現におよぼすChREBPの影響について調べるため、ChREBP KOマウスにおけるGLUT2の発現レベルを野生型マウスと比較した。その結果、腎臓を除き、調べた全ての臓器においてKOマウスにおけるGLUT2の発現量は野生型マウスに比べて減少していることが明らかとなった。一方、ChREBPの安定発現細胞を用いてGLUT2発現量の変化を調べた結果、低グルコース濃度下ではChREBPの発現に相関したGLUT2発現量の増加が認められなかった。以上の結果から、ChREBPの活性化により増加したグルコース代謝物がGLUT2の発現を制御していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GLUT2の発現量がChREBP KOマウスの様々な臓器において減少したことから、ChREBPがGLUT2の発現を制御していることが明らかとなった。この結果は、ChREBPを標的とした血糖降下薬の開発につながると考えられるため、糖尿病治療に新たな選択肢を加えることができるという点において社会的意義は大きいと考えられる。また、本研究によりChREBPは血糖調節機能を有することが明らかとなり、これまでに明らかになっている生理機能であるグルコース代謝と脂質合成の他に、血糖調節機能というChREBPの新たな生理機能を明らかにしたという点において学術的意義も高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：ChREBP KO mice showed a decrease in GLUT2 mRNA expression levels in all tissues, except the kidney, compared to the wild type mice. Next, to investigate whether ChREBP binds to the active promoter region of GLUT2, a series of reporter plasmids were constructed, each with a 500 bp insert, located 2.0 kb upstream and up to 500 bp downstream of the transcription start site of GLUT2 gene. The promoter activities of ChREBP were measured in HepG2 cells and not all reporter vectors used in this study demonstrated active promoter-binding interactions. Furthermore, experiments using ChREBP-overexpressed stable cell line, under low glucose condition, showed no correlation between mRNA level of GLUT2 and protein level of ChREBP. These results suggest that ChREBP did not regulate GLUT2 expression directly, but that glucose metabolite(s), which were increased in cells by ChREBP activation, might be involved in the regulation of GLUT2 expression.

研究分野：生活習慣病

キーワード：ChREBP GLUT2

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ChREBP は血中グルコース濃度の上昇によりインスリン非依存的に解糖系を亢進し、脂肪酸の合成を促進する。ChREBP のノックアウト (KO) マウスは、解糖系の阻害によるグルコース消費の減少により血糖値が上昇することが報告されている。

GLUT2 は、促進拡散によりグルコースを輸送するトランスポーターであり、グルコース濃度の増加により発現が誘導されることが報告されている。しかしながら、血糖値の高い ChREBP KO マウスの肝臓において GLUT2 の mRNA レベルが大きく減少していることから、グルコースは直接 GLUT2 の発現を誘導するのではなく、ChREBP の活性化を介して誘導していることが示唆された。また、これまでに GLUT2 の細胞膜への局在に N 型糖鎖の分岐が関与することが報告されている。ChREBP は解糖系を制御することにより N 型糖鎖の分岐を担うドナー基質である UDP-GlcNAc の合成を制御していると考えられるため、GLUT2 の細胞膜への局在にも影響を与える可能性が考えられた。さらに、GLUT2 は側基底膜側のみ局在するが、ラット小腸においてはグルコース濃度の増加により刷子縁膜側にも局在することが報告されている。これまでに極性分布に関するメカニズムは明らかになっておらず、ChREBP が GLUT2 の糖鎖の分岐に影響を与え側基底膜側からのエンドサイトーシスを亢進することで刷子縁膜側への局在に関与していることが考えられた。

### 2. 研究の目的

ChREBP KO マウスの肝臓において GLUT2 の発現が大きく減少することから、ChREBP は GLUT2 の発現を制御していることが示唆された。したがって、ChREBP は GLUT2 の発現を制御することにより小腸からのグルコースの吸収、および肝臓への血中グルコースの取り込みを制御することで血糖値をコントロールしていると考えられる。そこで本研究では、ChREBP による GLUT2 の発現制御機構を明らかにし、ChREBP による血糖値調節の分子メカニズムを解明する。これにより ChREBP を標的とした血糖降下作用を有する新たな糖尿病治療薬の開発へと展開するための研究基盤を確立する。

### 3. 研究の方法

- (1) GLUT2 mRNA レベルの比較は、TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法により行った。内在性コントロール遺伝子として GAPDH を用いた。
- (2) GLUT2 の発現における ChREBP のプロモーター活性の測定は、ルシフェラーゼアッセイにより行った。GLUT2 の転写開始点の上流 2000bp までと下流 500bp までを 500bp ずつレポーターベクターへ組み込み、それぞれ HepG2 細胞へ導入した。ChREBP の発現ベクターを導入していない細胞をコントロールとして、ChREBP を過剰発現させた際のルシフェラーゼ活性を測定した。
- (3) ChREBP の安定発現細胞の作成は、3XFLAG タグを付加した ChREBP をレトロウイルスベクターへ組み込み、パッケージングベクターとともに HEK293 細胞へ遺伝子導入し、レトロウイルス粒子を含む培養上清を回収した。得られたレトロウイルスを HT29-MTX-E12 細胞に感染させ、G418 で選択することにより安定発現細胞を樹立した。得られた細胞における ChREBP の発現量はウェスタンブロット解析により行った。

### 4. 研究成果

#### (1) ChREBP KO マウスにおける GLUT2 mRNA レベルの変化

肝臓以外の臓器において GLUT2 の発現におよぼす ChREBP の影響について調べるため、ChREBP KO マウスにおける GLUT2 の mRNA レベルを野生型マウスと比較した。その結果、腎臓を除き、調べた全ての臓器において KO マウスにおける GLUT2 の mRNA レベルは野生型マウスに比べて減少していることが明らかとなった。また、その減少の程度は臓器間で異なっており、肝臓と骨格筋においてはその発現がほぼ消失していたのに対して (図 1)、小腸や脂肪組織における減少の程度は約 50% であることが明らかとなった。ChREBP KO マウスの血糖値はこれまでの報告と同様に野生型マウスに比べて増加していたことから、GLUT2 の発現はこれまで考えられていたようにグルコース濃度依存的に増加するのではなく、ChREBP の活性化を介して増加することが示唆された。また、臓器間で発現量の減少の程度にバラつきがあったことから (図 1)、一部の臓器においては ChREBP 以外の発現制御機構が存在する、または ChREBP の活性化により増加した細胞内のグルコース代謝物が GLUT2 の発現を制御しており、臓器間でその代謝物の濃度が異なっていることが示唆された。

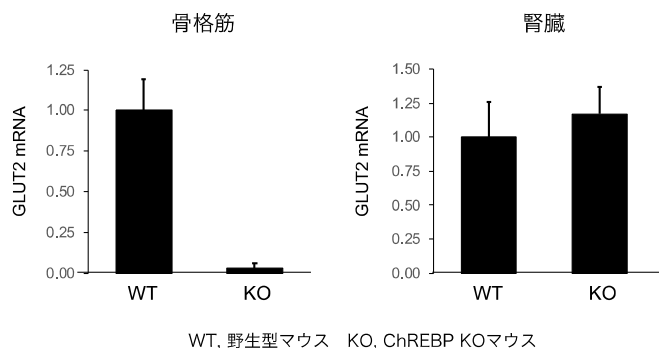


図 1. 各臓器における野生型マウスと ChREBP KO マウス間での GLUT2 mRNA レベルの比較 (一部抜粋)

## (2) GLUT2 発現における ChREBP のプロモーター活性の検討

(1)における検討により ChREBP はほぼ全ての臓器において GLUT2 の発現に関与していることが明らかになった。次に ChREBP が GLUT2 のプロモーター/エンハンサー領域に結合して発現を直接制御しているか明らかにするために、HepG2 細胞を用いてルシフェラーゼアッセイにより GLUT2 発現における ChREBP のプロモーター活性の検討を行った。実験に用いた遺伝子領域は、ChREBP が結合する既知の DNA 配列は存在しないが未知の配列に結合することも考えられたことから、GLUT2 の転写開始点の上流と下流域 (-2000/+500) とした。また、グルコース代謝物の生成を最小限にするため低グルコース濃度下での活性を測定した。低グルコース濃度下では ChREBP が核内へ移行しないために活性を示さない可能性があるため、全長 ChREBP とともに低グルコース濃度下においても核内に局在するアイソフォームである ChREBP- を用いた検討も合わせて行った。その結果、全長 ChREBP、ChREBP- とともに発現を増加させてもルシフェラーゼ活性の増加は認められなかった (データは示さない)。

## (3) ChREBP の安定発現細胞を用いた検討

(2)における検討により ChREBP は GLUT2 の転写活性化領域に結合しないことが示唆されたが、検討した領域外に結合し発現を増加させることも考えられたため、ChREBP を過剰発現した安定発現細胞の作成を行い、ChREBP の過剰発現が GLUT2 の発現に与える影響について調べた。前述のように GLUT2 は高グルコース濃度下の小腸において本来の側基底膜の他に刷子縁膜側にも局在することが報告されていることから、ChREBP が GLUT2 の発現と局在に与える影響を検討するために、ヒト結腸癌由来の細胞で極性を有する HT29-MTX-E12 細胞を用いて ChREBP の安定発現細胞を作成した。ChREBP の発現量はウェスタンブロット解析で検出できる程度であり、発現量の異なる 2 種類の細胞を樹立した。得られた 2 種類の細胞に関して、GLUT2 の mRNA 量の変化を検討した結果、ChREBP の発現量が高い細胞ほど、GLUT2 mRNA 量が減少する傾向が見られた (図 2)。この結果は ChREBP KO マウスにおいて GLUT2 mRNA 量が減少した結果と矛盾しており、(2)における検討とあわせて ChREBP は直接 GLUT2 の発現を制御しないことが示唆された。

また、高グルコース濃度下で GLUT2 の発現が増加した条件において GLUT2 の極性分布に関して検討を行ったが、刷子縁膜側における GLUT2 の局在は確認できなかった (データは示さない)。

以上の結果から、これまで考えられていたグルコース濃度依存的な GLUT2 の発現制御は、グルコース濃度の増加により活性化した ChREBP により制御されていることが明らかとなった。また、(1)における検討によりグルコース代謝が盛んな臓器である肝臓や骨格筋において、ChREBP KO マウスにおける GLUT2 の発現がほぼ消失していたことから、ChREBP は解糖系の促進を介して GLUT2 の発現を制御していることが示唆され、細胞内で増加したグルコース代謝物が GLUT2 の発現を制御していると考えられる。

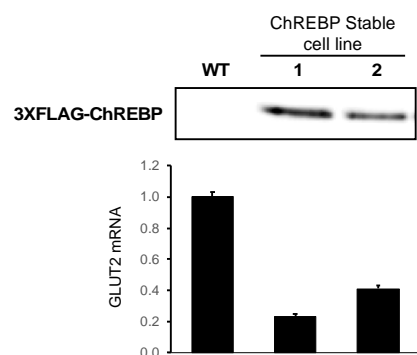


図2. ChREBP安定発現細胞における GLUT2 mRNAレベルの変化

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

Yamamoto K., Hara T., Nakagawa T., Hirai M., Miyake H., Fujisawa M., Yano I. Association of Expression Levels or Activation Status of STAT3 with Treatment Outcomes of Sunitinib in Patients with Renal Cell Carcinoma. *Targeted Oncol.* 13, 371-378, 2018. DOI: 10.1007/s11523-018-0563-4

崎山晴彦, 中川勉, 江口裕伸, 吉原大作, 藤原範子, 鈴木敬一郎, 転写因子 ChREBP を標的とした生活習慣病の予防法及び治療薬の開発, *細胞* 49(2), 81-4, 2017.

[http://www.hokuryukan-ns.co.jp/magazines/04cell/cell2017\\_02.html](http://www.hokuryukan-ns.co.jp/magazines/04cell/cell2017_02.html)

Yamamoto K., Shichiri H., Ishida T., Kaku K., Nishioka T., Kume M., Makimoto H., Nakagawa T., Hirano T., Bito T., Nishigori C., Yano I., Hirai M. Effects of Ascorbyl-2-phosphate Magnesium on Human Keratinocyte Toxicity and Pathological Changes by Sorafenib. *Biol. Pharm. Bull.* 40, 1530-1536, 2017. DOI: 10.1248/bpb.b17-00386

Mizuta N., Nakagawa T., Yamamoto K., Nishioka T., Kume M., Makimoto H., YANO I., Minami H., Hirai M. Compatibility and Stability of Nab-Paclitaxel in Combination with Other Drugs. *Kobe J. Med. Sci.* 63, 9-16, 2017.

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/journal/contents/63/E9.pdf>

Watanabe A., Yamamoto K., Ioroi T., Hirata S., Harada K., Miyake H., Fujisawa M., Nakagawa T., Yano I., Hirai M. Association of Single Nucleotide Polymorphisms in STAT3, ABCB1, and ABCG2 with Stomatitis in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated with Sunitinib: A Retrospective Analysis in Japanese Patients. *Biol. Pharm. Bull.* 40, 458-464, 2017.

DOI: 10.1248/bpb.b16-00875

Shichiri H., Yamamoto K., Tokura M., Ishida T., Uda A., Bito T., Nishigori C., Nakagawa T., Hirano T., Yano I., Hirai M. Prostaglandin E1 reduces the keratinocyte toxicity of sorafenib by maintaining signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activity and enhancing the cAMP response element binding protein (CREB) activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 485, 227-33, 2017.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.02.107

Sato S., Jung H., Nakagawa T., Pawlosky R., Takeshima T., Lee W. R., Sakiyama H., Laxman S., Wynn R. M., Tu B. P., MacMillan J. B., De Brabander J. K., Veech R. L., Uyeda K. Metabolite Regulation of Nuclear Localization of Carbohydrate-response Element-binding Protein (ChREBP): ROLE OF AMP AS AN ALLOSTERIC INHIBITOR. *J. Biol. Chem.* 291, 10515-27, 2016.

DOI: 10.1074/jbc.M115.708982

Yamamoto K., Shinomiya K., Ioroi T., Hirata S., Harada K., Suno M., Nishioka T., Kume M., Makimoto H., Nakagawa T., Hirano T., Bito T., Nishigori C., Miyake H., Fujisawa M., Hirai M. Association of Single Nucleotide Polymorphisms in STAT3 with Hand-Foot Skin Reactions in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated with Multiple Tyrosine Kinase Inhibitors: A Retrospective Analysis in Japanese Patients. *Target Oncol.* 11, 93-9, 2016.

DOI: 10.1007/s11523-015-0382-9

Yamamoto K., Ioroi T., Kanaya K., Shinomiya K., Komoto S., Hirata S., Harada K., Watanabe A., Suno M., Nishioka T., Kume M., Makimoto H., Nakagawa T., Hirano T., Miyake H., Fujisawa M., Hirai M. STAT3 polymorphism rs4796793 may be a predictive factor of tumor response to multiple tyrosine kinase inhibitors in metastatic renal cell carcinoma in Japanese population. *Med. Oncol.* 33, 1-7, 2016.

DOI: 10.1007/s12032-016-0733-0

#### 〔学会発表〕(計5件)

崎山晴彦, 中川勉, 井上美奈子, 江口裕伸, 吉原大作, 藤原範子, 鈴木敬一郎, ChREBP 欠損マウスが有する抗肥満作用の検討, 第91回日本生化学会大会, 2018年

崎山晴彦, 井上美奈子, 中川勉, 江口裕伸, 吉原大作, 藤原範子, 鈴木敬一郎, 転写因子 ChREBP 欠損マウスにおける抗肥満効果の解明, ConBio2017, 2017年

中川勉, 吉村友希, 崎山晴彦, 中川孝俊, 山本和宏, 矢野育子, 藤原範子, 朝日通雄, 鈴木敬一郎, 平井みどり, 第64回日本生化学会近畿支部例会, 2017年

中川勉, 崎山晴彦, 山本和宏, 藤原範子, 鈴木敬一郎, 平井みどり: エイコサペンタエン酸 (EPA) が血清中性脂肪を低下させる分子メカニズムの解明, 第63回日本生化学会近畿支部例会, 2016年

中川勉, 崎山晴彦, 山本和宏, 藤原範子, 鈴木敬一郎, 平井みどり, Carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) の活性制御に及ぼす O-GlcNAc 修飾の影響, 第89回日本生化学会大会, 2016年

#### 〔図書〕(計0件)

#### 〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

#### 〔その他〕

北海道医療大学薬剤学 (製剤学) ホームページ

<http://www.hoku-iryu-u.ac.jp/~siba/>

## 6. 研究組織

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名: Uyeda Kosaku

ローマ字氏名: (UYEDA, kosaku)

研究協力者氏名: 崎山 晴彦

ローマ字氏名: (SAKIYAMA, haruhiko)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。