

令和元年6月10日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08273

研究課題名(和文)複合的代謝疾患の総合的治療を目指したAMPK新規活性調節機構の解明

研究課題名(英文) Study on the novel post translational modification of AMPK aimed at comprehensive prevention and treatment of complex metabolic disorders

研究代表者

宮本 理人 (MIYAMOTO, Licht)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・助教

研究者番号：60456887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：身体運動によるメタボリックシンドローム改善作用の鍵となる5' AMP-activated protein kinase (AMPK)に食餌性の刺激により調節される新たな翻訳後修飾を見出し、その制御機構を細胞間、細胞内情報伝達の観点から明らかにした。これらはAMPK活性の新たな調節機構の一つであり、本研究によりAMPKが身体運動と食事というそれぞれ異なる外部刺激からのシグナルがクロストークし、エネルギー状態の調節を行う場であることがその機序とともに解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により糖尿病や肥満、メタボリックシンドロームなどの複合的代謝疾患を予防、治癒しうる標的分子であるAMPKの新たな活性制御機構や生理学的意義が明らかとなり、新たな代謝疾患治療薬の創薬に繋がることが期待される。さらに、高齢化社会において増加が見込まれる神経変性疾患やガンなどに対する予防、治療戦略の構築にも有益であり、身体運動や食事療法の健康向上効果の一部を模倣可能な薬物の創出にも重要な情報がもたらされた。現在これらの情報を元に、AMPK活性を制御する一連の新たな化合物を見出し、構造展開を進めている。

研究成果の概要(英文)：We found a novel post translational modification of AMPK responsive to food intake and have determined intra- as well as inter-cellular signaling mechanisms regulating the modulation, which suggests AMPK as a metabolic intersection where metabolic signals evoked by physical exercise and food intake crosstalk.

研究分野：薬理学、生理学、生化学

キーワード：AMPK

1. 研究開始当初の背景

身体運動が健康の維持増進に効果的であることは一般的にもよく知られている。実際、近年の疫学的研究や運動生理学的研究により、様々な疾患の予防や治療に身体運動が役立つことが示されている。特に、糖尿病、肥満症、脂質異常症といった代謝疾患に対しては運動療法の有用性が顕著であり、たとえばメタボリックシンドロームの基盤をなすすべての代謝疾患において、運動療法は食事療法と共に第一選択療法として治療ガイドライン上位置づけられている。代謝疾患はしばしば複合的に異常を呈するが、身体運動はその幅広い治療効果のスペクトルにより、複合的代謝異常を総合的に改善するために有用な手段と考えられる。

運動療法による代謝改善の分子機序としては近年、5'AMP-activated protein kinase (AMPK)の重要性が幅広く認識されてきている(AMPK 仮説)。近年の研究により AMPK は細胞内エネルギー状態の低下を検知し、細胞内の代謝状態を同化から異化優位に切り替える、細胞内エネルギー代謝の調節分子であることが示されており、AMPK は糖尿病をはじめとする様々な代謝疾患に対する理想的な創薬標的として製薬会社を中心に創薬の試みも多く行われてきている。我々は以前より AMPK の生理的役割や創薬を指向した活性調節機構の解明に取り組んできた。(Miyamoto L, et al, AJP 2013, Miyamoto L, JPFMS 2015, Miyamoto L, et al. JBC 2012, etc.) AMPK は様々な代謝疾患の治療標的として有望されているだけでなく、最近では神経変性疾患やガンなど、高齢化社会の進行に伴い増加している様々な疾患に対する効果も期待されており、AMPK を標的とした治療薬の社会的期待は極めて大きい。しかしながら、数多くの試みにも関わらず、臨床応用に有望な AMPK 活性化剤は未だ見出されていない。

2. 研究の目的

これまで、AMPK の活性調節機構としては AMP によるアロステリック効果とそれを介したサブユニット Thr172 残基のリン酸化状態の安定化による活性上昇がよく知られ、この Thr172 残基のリン酸化が AMPK 活性の指標として汎用されている。しかし、我々は AMPK のアイソフォーム特異的活性測定系を有しており、これまでの様々な検討の中で Thr172 残基のリン酸化状態と活性の乖離例を数多く経験してきたため、AMPK には未知の活性調節機構があると考えている。このような背景のもと、様々な刺激下における AMPK の翻訳後修飾の変化の検討を行ってきた結果、絶食時と食後でリン酸化の度合いが大きく異なるリン酸化部位を新たに見出した。そこで、この新たな翻訳後修飾による AMPK 活性調節機構の詳細と代謝疾患における病態的意義、生理学的意義を解明し、メタボリックシンドロームにみられる複合的代謝疾患の病態発症メカニズムとの関連を明らかにすると共に、薬理的治療に向けた、創薬標的としての新たな戦略を提供したい。本研究は、この新規活性調節機構の生理学的、病態学的意義を解明する基礎的観点と、その創薬標的としての可能性を明らかにする応用的観点の双方から進め、今後このリン酸化修飾部位を標的とした創薬研究へ展開できることを本研究期間内の目標と位置づけている。

3. 研究の方法

I. AMPK の新たなリン酸化修飾部位による新規活性調節機構の解明 (上流)

Ia). 新規修飾部位のリン酸化制御を行う分子機構の解明

Ib). 新規修飾部位のリン酸化制御に与える生理学的、病態学的刺激(キュー)の解明

II. AMPK の新規活性調節機構の生理学的、病態学的意義の解明 (下流)

IIa). 糖脂質代謝制御に対する AMPK 新規活性調節機構の意義の解明 (主に培養細胞系)

IIb). 糖尿病や脂肪肝、肝癌などの病態における AMPK 新規活性調節機構の意義の解明 (主に個体)

これまでの予備検討の結果を踏まえ、培養細胞(Ia, Ib, IIa)および正常動物(Ib)における proof of concept 実験 病態モデル動物における検討(Ib)・新規遺伝子改変動物作成、解析(IIb)のステップで解析を行うことにより、本修飾部位の意義および応用への可能性を解明する。

より具体的には、培養細胞やマウス等の実験動物を用い、この新たなリン酸化部位を修飾する上流 kinase の同定、および、さらに上流に位置するホルモンなどの細胞外制御因子とその制御シグナル経路の同定を試みると共に、この部位を遺伝子操作により破壊した培養細胞系や遺伝子改変動物を作成し、この新規活性調節機構が糖尿病や肥満などの代謝疾患の病態において果たす役割を解明する。さらに、糖尿病や脂肪肝などの病態モデル動物を用いて、どのような病態においてこの活性調節機構が破綻するのかをその原因と共に追求し、治療標的としての可能性を明らかにする。

4. 研究成果

まず、我々の見出した新規修飾部位における食餌性の刺激によるリン酸化状態の変化を多数の個体を用いて検証し、コンセプトの妥当性を確認した。この時、この変化はアイソフォーム特異的に生じていることを見出した。次に、上流からの制御機構を解明するべく、食餌性リズムと関係する内分泌性、神経性の刺激を想定し、培養細胞のモデル系を用いてスクリーニングを行うことにより、インスリンがその状態変化を制御する主な因子であることを明らかにした。この結果はマウス個体レベルにおいても確認された。レプチンにも類似の作用を見出したが、インスリンと比べ作用が弱く、副次的な制御作用を示しているものと考えられる。

本修飾部位を直接リン酸化する上流キナーゼを厳密に同定するには至らなかったが、阻害剤の活用等により、少なくとも PI 3-kinase の下流で制御されており、生理学的条件下においては p70 S6 kinase や PKA 等の下流では制御されていないことを解明した。なお、本リン酸化はフォスコリンの刺激により強く誘導されることを見出しており、Gs を介する受容体刺激等によっても制御されうると考えられる。

これらの実験条件下において、AMPK 活性はアイソフォーム特異的にそのリン酸化状態変化と関係することを細胞レベル、マウス個体レベルでの解析を通じ確認し、間接的ではあるが、この新規翻訳後修飾の変化がアイソフォーム特異的に AMPK 活性制御に関わることを示し、創薬標的としての可能性を明らかにした。

当初、ゲノム編集を用いた遺伝子改変により本修飾部位を破壊したノックインマウスの作成を計画していたが、ノックインマウスの作成を得意とする欧州のグループがすでに同一部位を修飾したノックインマウスの作成に着手しているとの情報を得たことから、培養細胞における遺伝子改変体作成を優先して進めることとし、本修飾部位の周辺部位を用いてドミナントネガティブ体として期待される遺伝子組換えコンストラクトを複数作成した。これらのコンストラクトを複数の培養細胞系に発現させ、安定発現細胞株の取得を試みたが、本修飾部位に対してドミナントネガティブとして機能するような高発現細胞は一過的には得られるものの、全て短期間にて死滅し、複数回の試みにもかかわらず、安定発現細胞株として株化することは不可能であった。リン酸化を特異的に阻害するものではないが、本修飾部位近辺の分子構造は AMPK もしくは相互作用する分子に影響を与え、細胞の生存に必須な役割を果たしている可能性が示唆された。

高脂肪食負荷マウスなどのメタボリックシンドローム様病態モデル動物を解析したところ、正常動物に比べこのリン酸化状態の変化が顕著に減弱していることを見出し、この修飾による AMPK 活性変化とメタボリックシンドローム様病態との関連が強く示唆された。因果の上下関係は明快ではないが、インスリンが本修飾部位を支配するドミナントな因子であると考えられることから、末梢組織においてインスリン抵抗性が本部位のリン酸化状態変化を減弱し、その結果としてインスリン感受性低下がさらに生じる、という一種の vicious cycle が存在しているのではないかと考えられる。よって、このリン酸化状態変化を治療標的とすることでこの vicious cycle を克服し、末梢組織の代謝状態を正常化できるものと思われる。

骨格筋を中心とする末梢組織の AMPK 活性を強く制御する代表的な生理学的刺激である、身体運動の効果を検討したところ、身体運動時には本修飾とは独立して サブユニット Thr172 残基リン酸化状態の変化を介した AMPK 活性変化が臓器特異的に生じることが判明し、身体運動と食餌はそれぞれ独立した活性調節機構を介し AMPK 活性を制御していることが明らかとなった。以上より、AMPK が食と運動による代謝制御シグナルのクロストークの場として機能していると考えられる。

これら検討の過程において、構造に関する我々独自の知見を元に探索的解析を行ったところ、既知の AMPK 活性化剤とは異なる骨格を有し、AMPK 活性に影響を与える一連の化合物群を見出した。代謝疾患治療薬のリード化合物としてだけでなく、AMPK 活性制御機構研究の新たなツールとしても有用性が期待される。これらの化合物に関しては、本研究期間以降、別途構造展開による最適化やメカニズム研究を実施する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

すべて査読有り

1

Tsuda K, **Miyamoto L***, Hamano S, Morimoto Y, Kangawa Y, Fukue C, Kagawa Y, Horinouchi Y, Xu W, Ikeda Y, Tamaki T, Tsuchiya K. Mechanisms of the pH- and Oxygen-Dependent Oxidation Activities of Artesunate. *Biol Pharm Bull.* 2018;41(4):555-563. doi: 10.1248/bpb.b17-00855. PMID: 29607928

2

Xu W, **Miyamoto L***, Aihara H, Yamaoka T, Tanaka N, Tsuchihashi Y, Ikeda Y, Tamaki T, Kashiwada Y, and Tsuchiya K. Methanol extraction fraction from Citrus Sudachi peel exerts lipid reducing effects in cultured cells. *J Med Invest*. 2018;65(3.4):225-230. doi: 10.2152/jmi.65.225.

3

Miyamoto L*. Molecular Pathogenesis of Familial Wolff-Parkinson-White Syndrome. ~Molecular Mechanisms of Cardiac Glycogen Regulation by AMPK~ *J Med Invest*. 65(1,2). 1-8. 2018 DOI 10.2152/jmi.65.1

4

宮本理人*, 「身体運動と食をつなぐ生体内エネルギー調節の分子機構 (AMPK as a metabolic intersection between diet and physical exercise)」 *Yakugaku Zasshi (薬学雑誌)*, 138 巻 10 号:1291-1296. (2018) , (*invited review*)

5

Miyamoto L*, Yamane M, Tomida Y, Kono M, Yamaoka T, Kawasaki A, Hatano A, Tsuda K, Xu W, Ikeda Y, Tamaki T, Tsuchiya K. Nitrite Activates 5'AMP-Activated Protein Kinase-Endothelial Nitric Oxide Synthase Pathway in Human Glomerular Endothelial Cells. *Biol Pharm Bull*. 2017;40(11):1866-1872. doi: 10.1248/bpb.b17-00316. PMID: 29093333

6

Miyamoto L*. Can Food Factors Provide us with the Similar Beneficial Effects of Physical Exercise? *Food Sci. Biotechnol*. 25(S). 9-13. 2016 (*invited review*) DOI 10.1007/s10068-016-0

7

宮本理人「血管関連疾患治療標的としての AMPK の可能性, AMPK as a therapeutic target for vascular diseases」 *血管* 39(3). 93-100 (2016), (*invited review*)

[学会発表](計 46 件)

1

宮本理人, 「運動療法の効果を模倣する創薬と薬物治療の可能性」 第 24 回日本心臓リハビリテーション学会学術集会 (学術委員会特別企画 循環器学のトピックスと心臓リハビリテーション~心リハ領域における学術研究課題~) 2018 年 7 月 14-15 日 パシフィコ横浜 (横浜) (招待講演)

2

宮本理人, 梅本果奈, 上島沙弥香, 友成奈央実, 池田康将, 玉置俊晃, 土屋浩一郎, 食後の末梢組織における代謝調節を担う新たな AMPK の活性調節機構, 日本糖尿病学会, 2018 年 5 月 24-26 日

3

宮本理人, 「運動療法の新たなメカニズムとしての中枢 - 末梢連関の意義」日本薬学会第 138 回年会シンポジウム 「「生活の質」改善促進を基盤とする糖尿病の新規治療戦略の開発戦略」 2018 年 3 月 28 日(金沢) ANA クラウンプラザ金沢 (招待講演)

4

宮本理人, 梅本果奈, 上島沙弥香, 友成奈央実, 保岡堯, 中山卓, 桂明里, 大西怜奈, 井上陽加, 土橋有希, 土屋浩一郎, 食事と身体運動による代謝制御のクロストークの場としての AMPK, 第 138 回日本薬学会, 2018 年 3 月 25-28 日, 金沢

5

Licht Miyamoto, Goki Tomokawa, Yuki Matsuda, Megumi Yamane, Reina Oonishi, Kazuya Takenokuma and Koichiro Tsuchiya. Hypothalamic pathways mediate physical exercise-induced AMPK activation in skeletal muscles. Keystone symposia-Bioenergetics, 2018.1.21-25, Keystone, US.

6

宮本理人, 梅本果奈, 上島沙弥香, 友成奈央実, 土橋有希, 井上貴久, 許文婷, 津田勝範, 土

屋浩一郎, 食と運動による代謝制御のクロスロードとしての新たな AMPK 活性制御機構, 第 38 回日本肥満学会, 2017 年 10 月 7-8 日, 大阪

7

宮本理人, 「AMPK as a metabolic intersection between diet and physical exercise / 身体運動と食をつなぐ生体内エネルギー調節の分子機構」日本薬学会第 137 年会シンポジウム S4 1 食事、運動、睡眠～生活習慣から薬物治療と創薬を考える～ 2017 年 3 月 27 日 仙台国際センター (仙台) (招待講演)

〔図書〕(計 4 件)

1

宮本理人*, カフェインによるエネルギー代謝調節における中枢性制御機構の解明, ネスレ栄養科学会議研究報告書, p.1-8, 2017 年, ネスレ栄養科学会議

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：梅本 果奈

ローマ字氏名：(UMEMOTO, Kana)

研究協力者氏名：上島 沙弥香

ローマ字氏名：(UESHIMA, Sayaka)

研究協力者氏名：友川 剛己

ローマ字氏名：(TOMOKAWA, Goki)

研究協力者氏名：土屋 浩一郎

ローマ字氏名：(TSUCHIYA Koichiro)

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。