

令和元年6月21日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09786

研究課題名(和文) 転写因子PREBトランスジェニックマウス解析結果を用いた生活習慣病改善戦略

研究課題名(英文) Analyzing PREB, the transcriptional factor, transgenic mouse for treatment of lifestyle disease

研究代表者

井町 仁美 (Imachi, Hitomi)

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：80380187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子prolactin regulatory element binding (PREB)は糖尿病や動脈硬化症など生活習慣病改善に関わる因子であるが、今回、さらにその機能を解明した。(1)脂肪肝で、細胞内からコレステロール流出に関わるABCA1の転写を調節し発現を増強させ、脂肪蓄積を改善させた。(2)In vivoで脂肪細胞のアディポネクチンの発現調節した。(3) ABCA1発現調節し脂肪毒性解除させ膵細胞を保護し、糖尿病抵抗性をうむ可能性を示唆した。つまりPREBの標的としてABCA1が推察でき、生活習慣病改善のためにPREBによるABCA1発現調節機序をさらに解明していく必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転写因子PREBがABCA1分子発現調節を通じて細胞内脂肪蓄積やそれによる細胞機能障害により生活習慣病に関連していることが判明した。今後さらにPREBによるABCA1遺伝子の発現調節が新たな生活習慣病の治療方法に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Previously, we reported that the transcriptional factor, prolactin regulatory element binding (PREB) relates with lifestyle disease, such as diabetes mellitus and atherosclerosis. That is, we showed that PREB acts as anti-diabetic in pancreatic cells and regulates adiponectin expression in adipocytes. In this study, we tried to clear the role of PREB on lifestyle disease. Results are; (1) ABCA1 is a pivotal regulator of lipid efflux from cells, and PREB increases ABCA1 expression in hepatocyte by binding to ABCA1 promoter. As a result, PREB improve fatty liver. (2) PREB regulates adiponectin expression in vivo. (3) PREB may effect protects pancreatic cells improving lipotoxicity via ABCA expression. Thus ABCA1 should be the target molecule of PREB, and we need to elucidate the mechanism of ABCA1 expression by PREB for lifestyle disease treatment.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 生活習慣病 PREB ABCA1

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

1. 研究開始当初の背景

転写因子 prolactin regulatory element binding (PREB)は、膵細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、脂肪細胞など様々な細胞に発現し、これまでの我々の解析から PREB は生活習慣病に関連した機能が推察される。

例えば、PREB は膵β細胞において非常に強い発現を認めた。膵細胞に発現するインスリン遺伝子やグルコセンサーであるグルコキナーゼ遺伝子のプロモーターには、転写因子 PREB の特異的な DNA 結合配列 (consensus sequence :PRE 配列)がある。PREB 遺伝子導入実験では、PREB により両遺伝子の転写を促進することを解明した。また PREB がグルコース応答性にこれらの遺伝子発現を調節することを解明し (Diabetologia. 2006. 49:1599-607.、J Cell Mol Med. 2009. 13:2386-95.)、PREB はインスリン合成に強く関与することが推察した。脂肪細胞に発現を認めた PREB の発現調節は細胞内情報伝達系 PKA 応答性であった。また DNA サーチの結果、PREB は脂肪細胞より分泌される善玉アディポサイトカイン、adiponectin の遺伝子発現を調節する可能性が示唆された。PREB は高血糖刺激または PKA を介して adiponectin の発現を抑制した。よって糖尿病における高血糖状態では、PREB は adiponectin を抑制し、動脈硬化など糖尿病合併症の増悪の一因になることが推定された (J Cell Mol Med. 2010. 14:1294-302.)。血管内皮細胞にも PREB の発現を認めた。炎症性サイトカイン TNF- α により PREB が誘導されることを報告した。誘導された PREB は核内へ移行し、動脈硬化症を惹起させるケモカイン MCP-1 のプロモーターへ結合し、転写を亢進することを報告した (Atherosclerosis. 2009 207:45-50.)。逆に血管平滑筋細胞においては、PREB は cAMP の刺激に反応してコレステロール汲み出しに重要な分子である ABCA1 の転写促進することが判明した (Atherosclerosis. 2010 212:418-25)。動脈硬化の観点から PREB の機能を考えると相反する機能を有している可能性を推察した。

このような生活習慣病に関係のある様々な細胞で機能する PREB について、今回予生活習慣病における役割を解析し治療に役立てるようすることとした。

2. 研究の目的

脂肪肝の中の 10%は非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)へ進行し、肝硬変・肝がんの発症をみると報告されている。脂肪肝治療に関しては、食事療法・運動療法が行われているが、難治性の症例が大部分である。薬物療法に関しては、皆無であり、未だに有益な治療法の確立がなされていない。全くの偶然ではあるが、我々の研究対象である PREB が、脂肪肝発症を抑制することが判明した。さらなる研究により非アルコール性脂肪性肝 (NAFLD)/NASH 抑制の分子標的が発見させる可能性が高いと思われる。さらに PREB トランスジェニック (PREB-Tg)マウスでは、膵島(β細胞)が増殖している。PREB はインスリン遺伝子転写を促進する転写因子でもあり、増殖の機序を解明できれば糖尿病発症抑制及び治療に大きく貢献できると考えられる。また PREB は転写因子であり、結合領域のモチーフ解析から、脂質代謝、糖代謝に関連する遺伝子群を制御していることが判明している。以上よりトランスジェニックマウスの解析および遺伝子解析を統合して、NAFLD/NASH 発症抑制および脂肪蓄積のメカニズム、膵細胞の増殖の機序をはじめとした生活習慣病における PREB の臨床的役割について検討し生活習慣病改善の治療戦略につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 高脂肪食負荷による脂肪肝・NASH 発症マウスにおける、PREB の発現について検討した。
- (2) 転写因子 PREB が制御する分子 ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)と細胞内脂肪蓄積と細胞機能の関連について検討した。
- (3) 作成した PREB-Tg マウスにおける、脂肪蓄積の原因となる key 分子について検討した。

脂肪細胞における、PREB 発現調節について検討する。また脂肪細胞における PREB 役割について検討した。肝細胞においては、key 分子と考えられる ABCA1 の発現と脂肪肝形成について検討した。膵細胞における PREB の役割について検討した。

4. 研究成果

脂肪負荷による脂肪肝モデルマウスにおいても転写因子 PREB の過剰発現を確認した。そこで NASH における PREB 発現の意義について検討するために PREB-Tg マウス (組み替え DNA 承認番号:10219)を作成した。PREB-Tg マウスおよびコントロールマウスに高脂肪食を負荷すると、コントロールマウスにおいては、肝細胞に脂肪蓄積を認めた。一方、PREB-Tg マウスにおいては、コントロールマウスと比較して、肝細胞への脂肪蓄積は著明に抑制されていた。この脂肪蓄積機序を解明するために、脂肪細胞における PREB の役割について検討した。脂肪細胞においても PREB の発現を免疫染色にて確認した。In vitro で PREB は脂肪細胞内情報伝達系 PKA 応答性に善玉アディポサイトカイン、adiponectin の遺伝子発現を調節する可能性が示唆してきた。そこで PREB-Tg マウスにおいて解析を行うと、脂肪細胞

においてもPREBが強発現されており、血中adiponectinは低下していた。一方肝臓におけるadiponectin受容体は増加していた。PREB-Tgマウスではコントロールマウスに比較してインスリン抵抗性を認め耐糖能異常を呈するが、チアゾリジン誘導体はPREB-Tgマウスの耐糖能異常を改善することを報告した(J Endocrinol Invest. 2017 40:437-445.)。また近年、脂肪肝改善効果が多く報告されている糖尿病治療薬の一つであるGLP-1アナログ(exendin-4)に注目して、PREBの関連性について検討した。肝細胞においてexendin-4はCa依存性細胞内伝達系路の一つであるCaMKK/CaMKIVを介して細胞内からコレステロール流出に関わる分子であるATP-binding cassette transporter A1(ABCA1)の発現を増加させた。さらにABCA1発現増加に伴い細胞内のコレステロール含有量を減らし、細胞内の脂肪蓄積を減少させていることを認めた。転写因子PREBはABCA1プロモーターに直接結合し、このexendin-4によるABCA1発現増加にはPREBが直接関与することを証明した。PREB-Tgマウスでは肝細胞におけるABCA1の発現が減少し、細胞内のコレステロール含有量を減らし、脂肪肝の発症が抑制されていた。通常のマウスに高脂肪食負荷した上でexendin-4添加することにより、PREBとABCA1の発現が増加、細胞内コレステロールが減少し、脂肪肝発症が抑制していた。つまり肝細胞における脂肪蓄積の機序にCaMKK/CaMKIVと転写因子PREBを介したABCA1の発現増強が重要であることを解明した(American Diabetes Association 77th Scientific Session 2017)。今回我々がPREBにより発現が増強される分子として注目したABCA1は、既に、肝細胞において脂肪合成を抑制的に制御し、また高血糖などの代謝障害によりABCA1発現が抑制されると脂肪合成が活発になり、高中性脂肪血症、および脂肪肝が形成されること(BBA-Mol Cell Biol L. 2012. 1821:770-77)が報告されている。我々はさらなる検討を行い肝臓におけるABCA1の発現にPI3-kinase/Aktを介した経路も関与し、PI3-kinase系の抑制により、肝細胞内の脂質の蓄積が低下することを証明した(Am J Physiol Endocrinol Metab. 2018 315:E1232-E1241.)。PREB-Tgマウスではコントロールマウスに比較して膵ランゲルハンス島の増殖認めたが、さらなる検討で、P38-MAPKを介したABCA1の発現抑制により膵細胞内のコレステロール含有量は増加し、細胞機能障害をきたしていることが解明できた(J Mol Endocrinol. 2018 61(4):185-193.)。本研究を通じて、細胞内脂肪蓄積やそれによる細胞機能障害のターゲットの一つがABCA1発現であり、今後さらにPREBによるABCA1遺伝子の発現調節が新たな生活習慣病の治療方法に繋がると推察できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7件)

- 1) Zhang XZ, Imachi H, Lyu JY, Fukunaga K, Sato S, Ibata T, Kobayashi T, Yoshimoto T, Kikuchi F, Dong T, Murao K. Prolactin regulatory element-binding protein is involved in suppression of the adiponectin gene in vivo. J Endocrinol Invest. 2017, 40(4):437-445. doi: 10.1007/s40618-016-0589-3. 査読有
- 2) Lyu J, Imachi H, Iwama H, Zhang H, Murao K. Insulin-like Growth Factor 1 Regulates the Expression of ATP-Binding Cassette Transporter A1 in Pancreatic Beta Cells. Horm Metab Res. 2016, 48(5):338-44. doi: 10.1055/s-0035-1569272. 査読有
- 3) Lyu J, Imachi H, Yoshimoto T, Fukunaga K, Sato S, Ibata T, Kobayashi T, Dong T, Yonezaki K, Yamaji N, Kikuchi F, Iwama H, Ishikawa R, Haba R, Sugiyama Y, Zhang H, Murao K. Thyroid stimulating hormone stimulates the expression of glucose transporter 2 via its receptor in pancreatic β cell line, INS-1 cells. Sci Rep. 2018, 8(1):1986. doi: 10.1038/s41598-018-20449-3. 査読有
- 4) Lyu J, Imachi H, Fukunaga K, Sato S, Ibata T, Kobayashi T, Dong T, Yoshimoto T, Yonezaki K, Nagata H, Iwama H, Murao K. Angiotensin II induces cholesterol accumulation and impairs insulin secretion by regulating ABCA1 in beta cells. J Lipid Res. 2018, 59(10):1906-1915. doi: 10.1194/jlr.M085886. 査読有
- 5) Fukunaga K, Imachi H, Lyu J, Dong T, Sato S, Ibata T, Kobayashi T, Yoshimoto T, Yonezaki K, Matsunaga T, Murao K. IGF1 suppresses cholesterol accumulation in the liver of growth hormone-deficient mice via the activation of ABCA1. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2018, 315(6):E1232-E1241. doi: 10.1152/ajpendo.00134.2018. 査読有
- 6) Sato S, Imachi H, Lyu J, Miyai Y, Fukunaga K, Dong T, Ibata T, Kobayashi T, Yoshimoto T, Kikuchi F, Yonezaki K, Yamaji N, Iwama H, Murao K. Effect of TNF- α on the expression of ABCA1 in pancreatic β -cells. J Mol Endocrinol. 2018, 61(4):185-193. doi: 10.1530/JME-18-0167. 査読有

- 7) Selective peroxisome proliferator-activated receptor- α modulator K-877 regulates the expression of ATP-binding cassette transporter A1 in pancreatic beta cells. Dong T, Lyu J, Imachi H, Kobayashi T, Fukunaga K, Sato S, Ibata T, Yoshimoto T, Yonezaki K, Iwama H, Zhang G, Murao K. Eur J Pharmacol. 2018, 838:78-84. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.09.015. 査読有

〔学会発表〕(計 3件)

- 1) 糖尿病の病態形成における HDL 代謝の関与 村尾孝児、井町仁美 第 48 回日本動脈硬化学会総会・学術集会(招待講演) 2016 年 7 月 14 日 15 日 東京
- 2) Exendin-4 suppresses cholesterol accumulation via elevation of ATP-binding cassette transporter A1 in the liver. Lyu J, Imachi H, Fukunaga K, Zhang H, Dong T, Sato S, Ibata T, Yamaji N, Yonezaki K, Kikuchi F, Yoshimoto T, Murao K. American Diabetes Association 77th Scientific Session (国際学会) 2017 年
- 3) Glucagon Expression is Regulated by Exendin-4 via CaMKK/AMPK/FoxO1 Pathway in Alpha TC1.6 Cells Lyu J, Imachi H, Fukunaga K, Sato S, Dong T, Ibata T, Kobayashi T, Murao K. American Diabetes Association 78th Scientific Session (国際学会) 2018 年

〔図書〕(計 0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：村尾 孝児

ローマ字氏名：Koji Murao

所属研究機関名：香川大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 20291982

(2)研究協力者

なし

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。