

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：32203
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2018～2021
 課題番号：18K08486
 研究課題名(和文) SMRTによるレチノイン酸受容体シグナル制御と肥満抑制メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of anti-obese mechanism via the retinoic acid receptor signal controlled by SMRT

研究代表者
 清水 裕晶 (Shimizu, Hiroaki)
 獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：60594398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：核内受容体転写抑制補助因子SMRTは、甲状腺ホルモンに対する作用とは独立した強力な体重制御因子として機能することを報告した(Shimizu H, et al. PLoS One 2019)。また、LC-MS/MSを使ったプロテオミクス解析により、全身SMRT欠失マウスの肝臓ではレチノイン酸代謝酵素群の高発現を認めた。これにより肝臓でレチノイン酸の分解が亢進している可能性が示唆された。これらの研究結果は、レチノイン酸の減少が臓器の脂肪蓄積を誘発するメカニズムを明らかにする上で重要な知見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

飽食が社会問題となる一方、栄養素のレチノイン酸(ビタミンA)の不足はかえって肥満を誘引するという報告が増えているが、詳細機序は不明である。SMRTはレチノイン酸受容体に結合し遺伝子転写を抑制する分子である。筆者は、本研究でSMRT欠失マウスは内臓肥満(脂肪肝)をきたすことを報告した。更に同マウスの肝臓を質量分析器で詳しく解析し、肝臓内でレチノイド代謝酵素群が高発現することを確認した。即ちSMRTが代謝酵素群の発現を制御し、肝臓でのレチノイド消費を防ぐことにより、全身の内臓脂肪の蓄積を抑制する機序が考えられた。本結果はSMRTを標的とした新たな肥満治療の開発につながる可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：We recently reported that the nuclear corepressor; SMRT is a strong regulator of body weight independently of its ability to regulate thyroid hormone action (Shimizu H, et al. PLoS One 2019).

In addition, by the proteomics analysis using LC-MS/MS, we found that a variety of catabolic enzymes for retinoic acids were up-regulated in the liver of global deletion of SMRT KO mice. This suggests the possibility that the degradation of retinoic acids aggravates in the mouse liver. These are the remarkable findings which clarify the mechanism that the depletion of retinoic acid induces fat accumulation in organ.

研究分野：核内受容体転写抑制因子

キーワード：核内受容体 転写抑制補助因子 肥満 レチノイド 内臓脂肪

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

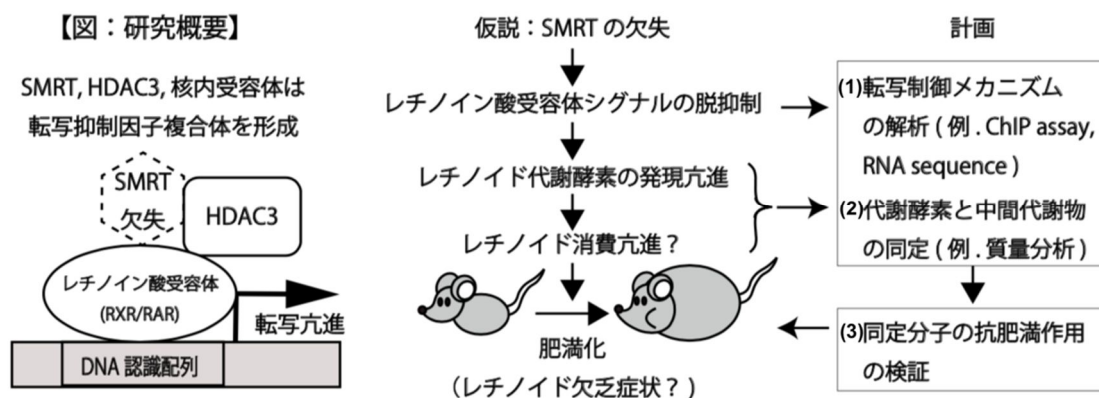
近年、活性型レチノイン酸(ビタミンA)の摂取不足と肥満との関連を示唆する報告が増加しているが、詳しい肥満発症メカニズムについては不明である。核内受容体転写抑制補助因子の SMRT は様々な臓器においてレチノイン酸受容体 (RXR/RAR) と結合することにより、その受容体シグナルによる遺伝子転写促進作用を抑制することが知られている。加えて、筆者は SMRT 分子を欠失した成体マウスの作成に世界で初めて成功し、それをを用いた研究の過程で、体内から本分子を欠失したマウスには著しい内臓型肥満を生じる現象を発見した。これらの背景を踏まえ、SMRT による生体臓器のレチノイン酸代謝制御と肥満発症の関係に着目した研究を進めている。

2. 研究の目的

筆者は、SMRT 分子の欠失が核内受容体シグナルを特異的に亢進させ、全身組織のレチノイン酸代謝酵素の発現を誘導することにより、臓器のレチノイド欠乏状態を惹起すると考えた。それによって組織に脂肪が蓄積し内臓型肥満をきたすと仮定した。本研究は、これらを検証すべくマウス組織内のレチノイド代謝に関わる主要な酵素蛋白を網羅的に同定し、亢進したレチノイド代謝を正常に制御することによって抗肥満効果を導く手段を見出し、治療応用への展開を目指すことを目的とした。

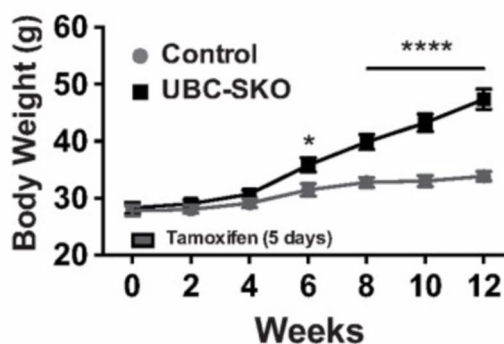
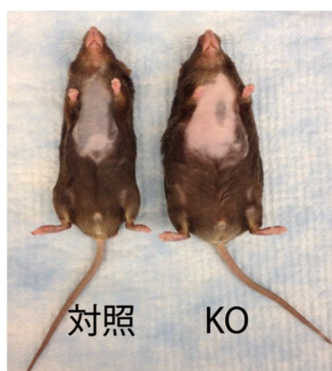
3. 研究の方法

主要な研究方法としては申請した通り以下の3段階で施行した。(1)SMRT 欠損マウス臓器・細胞の受容体シグナルの解析、(2)質量分析装置を駆使した SMRT に制御される代謝酵素、代謝中間体の同定、(3)同定分子の生理作用(マウスの食欲・基礎代謝、アディポカイン感受性、及び脂肪細胞分化能への影響等)の解析であり、これらに取り組んだ(図：研究概要参照)。

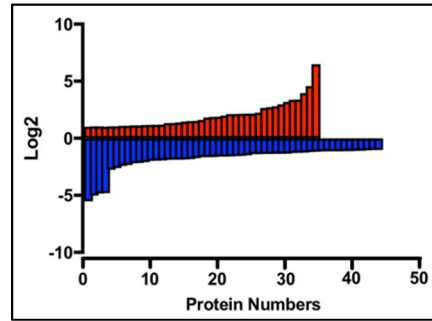


4. 研究成果

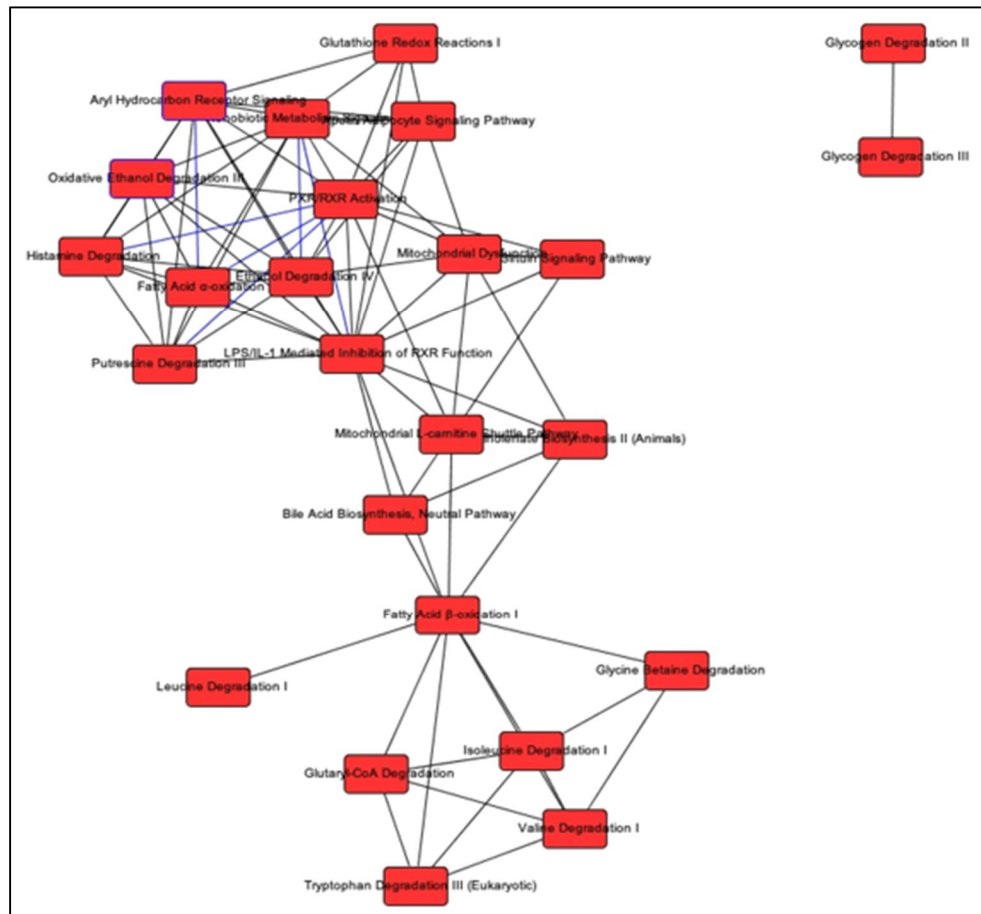
(1) SMRT 欠損マウス(UBC-SKO マウス, 別名 SMRT KO マウス)に生じた肥満などの病態生理の解析結果をまとめ報告した (Shimizu H, et al. PLoS One 2019) (マウス写真、体重グラフ参照)。これは、ERT2-Cre を用いたタモキシフェン誘導性の全身 SMRT KO マウスについての解析結果であり、これまで困難であった SMRT の全身欠失によるマウス胚性致死の問題を、上記手法を用いることで回避した。即ち、SMRT 分子を欠失したマウス生体試料を解析することを可能にし、KO マウスに肥満化が生じる事を世界で初めて初めて報告した。また、KO マウス組織細胞を解析した結果、特に肝細胞においてレチノイン酸代謝酵素群遺伝子の有意な発現増加を認め、これを報告した。



(2) 更にレチノイド代謝の主要臓器である肝臓に注目し、Sciex6600 質量分析装置を用いた肝臓抽出蛋白の網羅的プロテオミクス解析(下棒グラフ参照) およびレチノイド代謝酵素の蛋白発現解析を行った。プロテオミクス解析では予測した通り、SMRT KO マウスの肝臓で律速酵素である ALDH などのレチノイン酸代謝酵素アイソザイムを多数検出した。一方、CPT1 などの酸化関連蛋白の発現は低下を認めた。続いて行った優位パスウェイ解析でも、PXR/RXR 受容体シグナルの関与が示唆されたほか、脂肪酸酸化は抑制を認めた(下ネットワーク図参照)。更にウェスタンブロットングによる蛋白発現解析を行い、KO マウス肝臓では、代謝酵素 CYP26A1 の有意な発現増加を確認した。上記の結果から、多数の代謝酵素の発現により SMRT KO マウスの肝臓では活性型レチノイン酸の分解が亢進している可能性が示唆された。



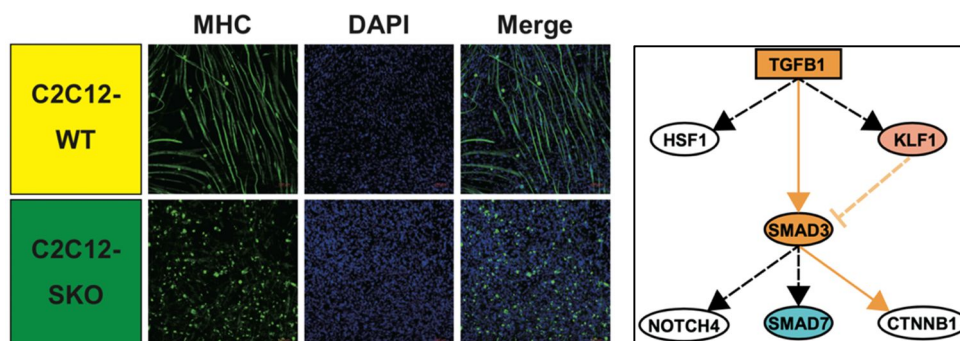
(1)と(2)で述べた解析結果から、SMRT の欠失により核内受容体レチノイド X 受容体 (RXR) を介したシグナルが亢進していると考えられ、本マウス肝臓内では律速酵素を含む多数のレチノイド代謝酵素蛋白の発現が増加しており、レチノイド代謝が過剰に亢進している可能性が示唆された。今後は、質量分析器を応用した更なる解析を進め、肝臓内での消費が著しいレチノイド分子種を同定し、その補充による肥満改善効果を検証するなど、治療応用を目指した研究を進める。



(3) 解析の過程で SMRT KO マウスは肥満のみならず、骨格筋量の低下も生じることを見出し、本現象の原因究明も併せて行った。SMRT は臓器特異的機能を有することが知られているが、骨格筋分化における SMRT の機能は解明されていないことから、まず、CRISPR-Cas9 を使用したマウス培養筋細胞 (C2C12 細胞) を用いた SMRT 欠失筋芽細胞モデル (C2C12-SKO 細胞) を作成し、解析を進めることにした。本解析でも質量分析装置 (LC-MS/MS) を使用したプロテオミクスを行なうことにより、C2C12-SKO 細胞は、その分化課程で筋線維の形成が著しく減少し、細胞内 TGF- 受容体シグナルの亢進と、線維化マーカーの高発現を認めることがわかった(以下の免疫蛍光染色標本とネットワーク図参照)。筋肉量の低下が、線維化に伴う萎縮により生

じている可能性が示唆され、SMRT KO マウスを用いた更なる *in vivo* 解析を進めている。

これまで得られた成果は 2020 年の米国内分泌学会(ENDO 2020, San Francisco)にてポスター発表を行なったほか(新型コロナ流行拡大により現地開催は中止され、オンライン誌上での公表)、英文学術誌に投稿し、現在査読中である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiroaki Shimizu, Yu Lu, Kristen R. Vella, Federico Damilano, Inna Astapova, Izuki Amano, Megan Ritter, Molly R. Gallop, Anthony N. Rosenzweig, Ronald N. Cohen, Anthony N. Hollenberg	4. 巻 Aug 12;14(8):e0220717
2. 論文標題 Nuclear corepressor SMRT is a strong regulator of body weight independently of its ability to regulate thyroid hormone action	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0220717	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroaki Shimizu, Yasuhiro Horibata, Chieko Aoyama, Izuki Amano, Megan Ritter, Hiromi Ando, Hiroyuki Sugimoto, Ronald N Cohen, Anthony N Hollenberg
2. 発表標題 Nuclear corepressor; SMRT acts as an important regulator for both beta-oxidation and the maturation of myogenesis in mouse C2C12 cell
3. 学会等名 The 102nd Endocrine Society Annual Meeting & Expo; ENDO 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Weill Cornell Medicine	University of Chicago	