

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目: 基盤研究(B)

研究期間: 2007 年—2008 年

課題番号: 19390250

研究課題名(和文) 肝臓における糖脂質代謝関連遺伝子の発現制御機構の解析

研究課題名(英文) Regulation of the genes for hepatic glucose and lipid metabolism

研究代表者

小川 渉(OGAWA WATARU)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 40294219

研究成果の概要:

各種転写因子による糖脂質代謝関連酵素遺伝子の発現制御機構を検討した。転写因子 KLF15 は糖新生系酵素遺伝子及びアミノ酸異化系遺伝子の発現制御に重要な機能を果たすとともに、その発現抑制により糖尿病モデル動物の高血糖の改善に繋がることが明らかとなった。また、転写因子 Stra13 は SREBP1c の発現制御を介して脂肪酸合成系遺伝子の発現制御に関わり、その発現抑制によって高脂血症が改善することも明らかとなった。

交付額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2008 年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 内科系臨床医学・代謝学

キーワード: 転写因子, 糖尿病, 糖新生, 脂肪酸合成

1. 研究開始当初の背景

肝臓は糖脂質代謝恒常性の維持に中心的な役割を果たす臓器であり、肝臓の代謝関連遺伝子の発現制御機構の破綻は、糖尿病、高脂血症、脂肪肝といった多くの代謝異常症の発症原因となる。すなわち、肝臓の糖新生系遺伝子の発現増加は糖尿病や耐糖能障害を誘導し、脂肪酸合成系遺伝子の発現増加や脂肪酸酸化系遺伝子の発現低下は高脂血症や脂肪肝を惹起する。転写調節因子 PPAR α のリガンドが高脂血症治療薬として、また PPAR γ のリガンドが糖尿病治療薬として臨

床応用されていることから、代謝関連遺伝子発現調節機構の研究は臨床応用に繋がる可能性が高いと考えられ、基礎医学領域からも臨床医学領域からも、多くの研究者が参集している。しかし、インスリンをはじめとしたホルモンや栄養状態の変化に対応して、どのような機構で肝臓の代謝関連遺伝子の発現が制御されるかについては、未だ不明な点が多いのが実情である。

2. 研究の目的

代表者はインスリン作用機構や糖尿病の病態生理を解明するという観点から、肝臓の糖脂質代謝制御に関わる遺伝子発現の制御機構に関する研究を行ってきた。その過程で転写調節因子 STAT3 が糖新生系遺伝子の発現抑制因子であること、及びそのシグナルの活性化により高血糖や脂肪肝、高脂血症が著しく改善することを見出し、STAT3 が種々の代謝異常症の治療標的となる可能性を明らかとした。また、このような解析と平行して DNA マイクロアレイを用いた各種病態モデルマウスの肝臓における遺伝子発現変動の網羅的解析により、bHLH 型転写調節因子 Stra13 の発現がインスリンによって誘導され、脂肪酸合成系遺伝子の発現を制御すること、また Kruppel-like 型転写調節因子 KLF15 の発現はインスリンによって抑制され、新生系遺伝子の発現制御に関与することも明らかとしている。

本研究計画では STAT3 や KLF15、Stra13 などの肝臓に発現する転写調節因子の糖脂質代謝制御に対する生理的機能のさらなる解析をすすめ、エネルギー代謝恒常性の維持や代謝異常症の病態との関連を明らかとすることを目的とした。また肝臓に豊富に発現する E3 ユビキチンリガーゼ GRAIL の糖脂質代謝制御に関する解析も行った。

3. 研究の方法

1) 培養細胞を用いた各種転写因子の標的遺伝子の探索

各種の転写因子を過剰発現した細胞系または shRNA を用いて発現を抑制した細胞系を確立し、糖脂質代謝制御に関わる遺伝子の発現変動を解析することにより、各種転写因子の糖脂質代謝制御への関与の検討を行った。また、各種転写因子の標的遺伝子の候補が明らかとなれば、プロモーター解析やクロマチン免疫沈降法などにより、標的遺伝子と転写因子の制御機構の詳細について検討した。

2) 各種モデル動物を用いた個体レベルでの機能解析

各種の生理的また病態的モデルマウスにおいて各種の転写因子の遺伝子発現変動を解析するとともに、肝臓特異的過剰発現マウスや肝臓特異的発現抑制マウスを作成した。このようなマウスにおける、各種遺伝子発現の変動、血糖、インスリン値や血清脂質などの代謝パラメーターの変動を解析することにより、各種転写因子の代謝制御への関与を個体レベルで検討した。

4. 研究成果

1) KLF15 の機能解析

① 培養肝細胞における KLF15 の標的遺伝子の解析

培養肝細胞に KLF15 を強制発現することにより代表的糖新生系酵素遺伝子である phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) 及び代表的アミノ酸異化酵素遺伝子である 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPD) 遺伝子の発現が増強されることを見出した。PEPCK 及び HPD 遺伝子のプロモーター領域には KLF15 の結合可能塩基配列が存在し、クロマチン免疫沈降法により、KLF15 は PEPCK 及び HPD 遺伝子のプロモーター領域に結合することが明らかとなった。また、shRNA を用いた KLF15 の発現抑制により糖新生系酵素遺伝子の発現は抑制された。また、アデノウイルスベクターを用いた shRNA の導入により PEPCK 及び HPD 遺伝子発現は抑制されることも明らかとなり、KLF15 はこれらの遺伝子発現に必須の機能を果たす可能性が示唆された。また、これらの遺伝子の発現制御には転写コアクチベーターである PGC1 α が関与することも明らかとなった。

② 病態モデルマウスにおける KLF15 の機能の解析

肥満糖尿病モデル動物の肝臓においては KLF15 の発現が増強していたが、shRNA によって肝臓特異的に KLF15 の発現を抑制すると、肝臓の糖新生系酵素遺伝子やアミノ酸異化系酵素遺伝子の発現は抑制され高血糖の改善が見られた。また、糖新生の基質であるピルビン酸を負荷した際の血糖上昇が抑制されたことから、KLF15 の発現抑制は糖新生の抑制に繋がることが明らかとなった。すなわち、KLF15 はインスリンによる糖新生酵素遺伝子の制御因子のひとつであり、糖尿病の治療標的として有用な分子である可能性が示唆された。

③ メトホルミン作用における KLF15 の機能の解析

種々の薬剤による KLF15 の発現制御機構を検討した結果、抗糖尿病薬メトホルミンによって KLF15 の発現が抑制されることが明らかとなった。メトホルミンによる KLF15 の発現抑制は遺伝子レベルでの発現の抑制とともに、ユビキチン化を促しプロテアソーム依存性の蛋白分解を促進させることによっても生じると考えられた。メトホルミンは培養肝臓細胞において PEPCK や HPD の遺伝子発現抑制効果を示したが、メトホルミン処理した細胞にアデノウイルスを用いて外来性に KLF15 を再発現させると、メトホルミンによる PEPCK や HPD の遺伝子発現抑制作用がほぼ完全に消失した。以上の結果より、メトホルミンの糖新生抑制作用は KLF15 の発現抑制により生じることが示唆された。個体レベルでメ

トホルミン作用への KLF15 の関与の詳細について検討するため、グルコースクランプ法によりメトホルミンによる肝糖産生抑制作用への影響を検討した。メトホルミンの投与により、肝臓における KLF15、糖新生系酵素、アミノ酸異化系酵素の発現は低下したが、アデノウイルスを用いて肝特異的に KLF15 を再発現させることにより、これらの遺伝子発現の低下は回復した。さらに、外来性に KLF15 を再発現させたマウスではメトホルミン投与による肝糖産生抑制作用は減弱し、個体レベルにおいても KLF15 はメトホルミンの糖産生抑制作用の発現に重要な役割を果たすことが示唆された。

このような KLF15 の肝臓糖代謝制御における機能やメトホルミン作用への関与に対する新知見は、本遺伝子が糖尿病治療の標的分子として有用であること示すものであり、本研究成果の意義は大きいと考えられる。

2) Stra13 の機能解析

①培養肝細胞における Stra13 の標的遺伝子の解析

培養肝細胞にアデノウイルスベクターを用いて Stra13 を強制発現すると SREBP1c 遺伝子とともに、FAS や SCD1 などの脂肪酸合成系遺伝子の発現が増強した。逆に shRNA の導入によって Stra13 の発現を低下させると、インスリンによる SREBP1c や脂肪酸合成系遺伝子の発現誘導作用が阻害された。SREBP1c は SREBP1c 自身の遺伝子のプロモーターを活性化する自己活性化能を持つ。Stra13 を単独で発現させても SREBP1c 遺伝子のプロモーターの活性化は見られなかったが、SREBP1c と Stra13 を同時に発現させると SREBP1c 単独発現時に比べて、SREBP1c 遺伝子のプロモーター活性は増強した。このことから Stra13 は SREBP1c の自己活性化能を増強させることにより、SREBP1c の遺伝子の発現を活性化すると考えられた。

②病態モデルマウスにおける Stra13 の機能の解析

アデノウイルスベクターを用いてマウスの肝臓に Stra13 を過剰発現させると、SREBP1c や脂肪酸合成系遺伝子の摂食による発現増加が亢進した。遺伝性肥満モデル動物である db/db マウスの肝臓では対照マウスに比べ Stra13 遺伝子の発現は増強していたが、アデノウイルスベクターを用いた shRNA の導入により db/db マウスの肝臓特異的に Stra13 の発現を低下させると、肝臓の SREBP1c や脂肪酸合成系遺伝子の発現は低下し、血清トリグリセリド値が低下した。また KK^{ay} マウスにおいても同様に shRNA による肝特異的 Stra13 の発現低下により、脂肪酸合成系遺伝子の発現や血清トリグリセリド値の低下を

見た。

以上のような知見から Stra13 はインスリンによる SREBP1c の発現誘導に関わる転写調節因子であり、脂肪酸合成系遺伝子の発現制御を介して、脂質代謝に重要な機能を担うことが示唆された。Stra13 は脂質異常症の治療における有用な標的分子となる可能性が示唆される。

3) GRAIL の機能解析

E3 ユビキチンリガーゼである GRAIL の機能を解析するため、アデノウイルスによる shRNA の導入し、肝臓特異的に GRAIL の発現を抑制したマウスを作成した。GRAIL の発現抑制により、肝臓のグルコース 6 リン酸脱リン酸化酵素遺伝子発現が亢進し、また SREBP1c 遺伝子の発現も亢進した。肝臓特異的 GRAIL 発現抑制マウスは、空腹時血糖や空腹時インスリン値に異常はなかったが、糖負荷時の耐糖能障害が生じることが明らかとなった。また、血清コレステロール値やトリグリセリド値も対象に比べ変化はなかったが、遊離脂肪酸値の上昇を認めた。以上のような知見から、本研究によって E3 ユビキチンリガーゼ GRAIL が肝臓における糖脂質代謝制御に関わる分子であることが始めて明らかとなった。

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 6 件)

- ① Nagare T, Sakaue H, Takashima M, Takahashi K, Gomi H, Matsuki Y, Watanabe E, Hiramatsu R, Ogawa W, Kasuga M. The Kruppel-like factor KLF15 inhibits transcription of the adrenomedullin gene in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 379:98-103, 2009 査読有
- ② Nakamichi S, Senga Y, Inoue H, Emi A, Matsuki Y, Watanabe E, Hiramatsu R, Ogawa W, Kasuga M. Role of the E3 ubiquitin ligase gene related to anergy in lymphocytes in glucose and lipid metabolism in the liver. *J Mol Endocrinol.* 42(2):161-9. 2009 査読有
- ③ Yoshioka T, Inagaki K, Noguchi T, Sakai M, Ogawa W, Hosooka T, Iguchi H, Watanabe E, Matsuki Y, Hiramatsu R, Kasuga M. Identification and characterization of an alternative promoter of the human PGC-1 α gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 381:537-543, 2009 査読有
- ④ Haga S, Ozaki M, Inoue H, Okamoto Y,

Ogawa W, Takeda K, Akira S, Todo S. The survival pathways phosphatidylinositol-3 kinase(PI3-K)/phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)/Akt modulate liver regeneration through hepatocyte size rather than proliferation. Hepatology. 49:204-214, 2009 査読有

- ⑤ Zhang HQ, Haga S, Fukai M, Oikawa Y, Inoue H, Ogawa W, Kano A, Maruyama A, Fu XY, Todo S, Enosawa S, Ozaki M. Identification of de novo STAT3 target gene in liver regeneration. Hepatol Res. 38:374-384, 2008 査読有
- ⑥ Kinoshita S, Ogawa W, Okamoto Y, Takashima M, Inoue H, Matsuki Y, Watanabe E, Hiramatsu R, Kasuga M. Role of hepatic STAT3 in the regulation of lipid metabolism. Kobe J Med Sci. 54:E200-208, 2008 査読有

[学会発表] (計 15 件)

- ① 衣斐亜希, 小川渉, 高嶋基嗣, 木下真一, 春日雅人. SREBP1c の転写制御における Stra13 の重要性. 第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2009 年 5 月 23 日, 大阪
- ② 千賀陽子, 小川渉, 高嶋基嗣, 春日雅人. AMP キナーゼを介した KLF15 の細胞内局在制御. 第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2009 年 5 月 23 日, 大阪
- ③ 高嶋基嗣, 小川渉, 林久美子, 木下真一, 井上啓, 春日雅人. メトホルミンは KLF15 の発現制御を介して肝糖産生を抑制する. 第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2009 年 5 月 22 日, 大阪
- ④ 高嶋基嗣, 小川渉, 林久美子, 木下真一, 井上啓, 春日雅人. 肝糖代謝制御とメトホルミン作用における転写因子 KLF15 の役割. 第 82 回日本内分泌学会学術集会. 2009 年 4 月 25 日, 前橋
- ⑤ 高嶋基嗣, 小川渉, 林久美子, 木下真一, 井上啓, 春日雅人. 肝糖代謝制御とメトホルミン作用における転写因子 KLF15 の役割. 第 20 回分子糖尿病学シンポジウム. 2008 年 12 月 13 日, 東京
- ⑥ Ogawa W. Regulation of hepatic energy metabolism by insulin. 13th International Congress of Endocrinology. 2008 年 11 月 9 日, リオデジャネイロ
- ⑦ 小川渉. 摂食・栄養による肝代謝遺伝子発現制御機構. 第 29 回日本肥満学会. 2008 年 10 月 17 日, 大分
- ⑧ 衣斐亜希, 小川渉, 高嶋基嗣, 木下真一, 春日雅人. 転写因子 Stra13 のインスリンに

よる脂質代謝制御機構における役割. 第 45 回日本臨床分子医学会学術集会. 2008 年 7 月 24 日, 神戸

- ⑨ Ogawa W, Takashima M, Kasuga M. Role of Kluppel-like factor 15 in hepatic glucose metabolism. 51 回日本糖尿病学会学術集会 2008 年 5 月 23 日, 東京
- ⑩ 小川渉, 高嶋基嗣, 井上啓, 春日雅人. 肝臓の遺伝子転写とメタボリックシンドローム. 81 回日本内分泌学会学術総会 2008 年 5 月 17 日, 青森
- ⑪ 高嶋基嗣, 小川渉, 木下真一, 岡本安生, 阪上浩, 春日雅人. 転写因子 KLF15 の肝糖代謝制御における機能 第 44 回日本臨床分子医学会学術集会. 2007 年 7 月 21 日, 和歌山
- ⑫ 小川渉. 肝臓の遺伝子転写を標的としたメタボリックシンドロームの治療戦略. 第 44 回日本臨床分子医学会学術集会 2007 年 7 月 20 日, 和歌山
- ⑬ 小川渉, 井上啓, 春日雅人. インスリンによる肝糖産生抑制のメカニズム 第 80 回日本内分泌学会学術総会. 2007 年 6 月 15 日, 東京
- ⑭ 高嶋基嗣, 小川渉, 木下真一, 岡本安生, 春日雅人. KLF15 の肝糖代謝制御における機能の解析. 第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2007 年 5 月 26 日, 仙台
- ⑮ Ogawa W, Okamoto Y, Takashima M, Kinoshita S, Teshigawara K, Inoue H, Kasuga M. Insulin regulation of hepatic glucose metabolism: A therapeutic target of diabetes mellitus. 第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2007 年 5 月 25 日, 仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 渉 (OGAWA WATARU)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 40294219

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし