

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580103

研究課題名(和文)

生体内エネルギー代謝恒常性調節機構解明によるメタボリック症候群へのアプローチ

研究課題名(英文) Approach to metabolic syndrome by analysing the energy metabolism homeostasis

研究代表者

渡辺 光博 (WATANABE MITSUHIRO)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：10450842

研究成果の概要(和文): 高脂肪食負荷マウスへの胆汁酸受容体 FXR 合成アゴニストの長期投与による FXR の活性化は、脂肪肝・肥満・糖尿病を誘発するものであり、メタボリックシンドローム治療に適していないといえる。そのメカニズムとして、肝臓での胆汁酸合成を低下させ胆汁酸プール量を低下させエネルギー代謝を低下させたと推察される。また、DNA マイクロアレイとメタボローム解析により、エネルギー代謝恒常性において胆汁酸がアミノ酸代謝に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文): Administration of FXR agonist accentuated body weight gain and glucose intolerance induced by the high fat diet and led to a pronounced worsening of the changes in liver and adipose tissue. Mechanistically, treatment with FXR agonist decreased BA biosynthesis, BA pool size and energy expenditure. Our data hence suggest that activation of FXR with synthetic agonists is not useful for long term management of the metabolic syndrome, as it reduces the BA pool size and subsequently decreases energy expenditure, translating in weight gain and insulin resistance. In addition, it was suggested that bile acid participated in amino acid metabolism in energy homeostasis by DNA micro array and metabolome analysis.

## 交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：代謝、糖尿病、胆汁酸、核内受容体

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は、食事とリンクし大量に体内を循環する胆汁酸に着目し、数年前まで単なる脂質の消化吸収に関する分子とされてきた胆汁酸が、代謝における生体内シグナル伝達分子として代謝・エネルギー代謝調節に重要であり、胆汁酸代謝に関与する化合物、遺伝子改変マウスが代謝に大きく影響を与えるこ

とを明らかにしてきた。つまり、エネルギー代謝において胆汁酸は、GPCR(TGR5)を活性化し、細胞内で T4 を活性化型の T3 に変換する酵素 D2 活性を亢進させ、エネルギー消費に重要な臓器、褐色脂肪組織・骨格筋細胞内 T3 濃度が増加し、エネルギー消費を高めていることを明らかにした。T3 にはエネルギー代謝

亢進作用があることが古くから知られているが、血中 T3 の増加は種々の副作用を引き起こす為、肥満・糖尿病治療には用いることが出来ない。しかし、我々の発見は血中 T3 には影響を及ぼさず、必要組織の細胞内だけで T3 を増加させエネルギー消費を高めるため、副作用の少ない薬剤ができると考えている。今後、胆汁酸誘導体や TGR5 合成アゴニストが新しい作用メカニズムでのエネルギー消費亢進によって、肥満・糖尿病治療を副作用なく行えるアプローチへと発展する可能性が示唆されている。また、胆石症治療の為に胆汁酸を投与した場合、血清中性脂肪低下が認められるなど、胆汁酸と血清脂質の関係は長い間示唆されてきたが、メカニズムは不明であったため、メカニズム解析を行った結果、胆汁酸核内受容体 FXR 活性化により発現誘導された核内受容体 SHP を介して行われる SREBP-1c 発現制御 脂肪酸合成酵素遺伝子発現抑制 肝臓からの VLDL 分泌抑制 血清中性脂肪低下の経路を明らかにした。我々の検討より FXR をターゲットにした高中性脂肪血症新規治療薬の開発の可能性が示唆され、多数の製薬会社により高活性化化合物がスクリーニングされ、現在、臨床開発研究が行われている。

## 2. 研究の目的

しかし、臨床応用のためには胆汁酸の生体代謝機能に与える影響のより詳細な検討が必須である。注目すべき1つは、治療のターゲットと考えられている FXR は、絶食、再食などの食餌条件により発現制御されており、胆汁酸の糖、エネルギー代謝への関与を示唆する論文が多く報告されていることの検証である。例えばこれまでの研究において以下のことが報告されている。1、肝臓において FXR は、インスリンシグナル活性化を誘導するため、糖尿病モデルマウスにおいて、FXR を活性化させることで糖尿病が改善する。2、FXR は脂肪組織等、末梢の Akt/PKB の活性化に関与し、糖取込みを促進させ、脂肪細胞の分化を誘導しているため、FXR 欠損マウスは耐糖能、インスリン感受性の悪化を呈している。3、FXR 欠損マウスでは血清 FFA の上昇により肝臓、筋肉におけるインスリンシグナリングが低下し、インスリン抵抗性を惹起している。4、FXR のターゲット遺伝子である FGF15/19 のトランスジェニックマウス及び、FGF15/19 の投与によって糖尿病が改善される。等の報告がある。しかし、これらの報告はどれも短期の実験結果であり、申請者が C57BL/6J マウスへ胆汁酸及び FXR アゴニスト

を長期投与する検討を行ったところ、多くの他施設の報告と異なり、胆汁酸投与群ではエネルギー産生が亢進し、肥満・糖尿病の改善が見られたが、FXR アゴニスト投与群では、熱産生機能が低下し、褐色脂肪組織で著しい脂肪蓄積が認められ、体重の有意な増加が認められた。このように、胆汁酸の糖代謝への関与を示唆する報告は多いが、その作用メカニズム、薬剤の標的、そして FXR アゴニストが胆汁酸そのものを狙うべきなのか、という点で一致していない。また、もう1つの課題は、高脂肪食を負荷シマウスのエネルギー過剰な時のみ、熱産生臓器において胆汁酸は胆汁酸 GPCR (TGR5) を介して *Dio2* 遺伝子発現・活性を亢進させ、細胞内 T3 濃度を上げ、エネルギー産生を亢進している事実であり、先の研究ではそのメカニズムは明らかにすることができなかった。しかしこの現象は、これまで明確にされていない生体内エネルギー代謝恒常性機序を解明していく上で重要であるとのコメントを頂き国内外で注目されている。本研究はこれまでの胆汁酸のエネルギー代謝調節研究をモデルケースにし、この点に着目し、生体内シグナル伝達分子としての胆汁酸の役割を申請者の有するノウハウ・研究材料、さらにメタボロミクス・プロテオミクス・ゲノミクスの手法を用いて、代謝産物・タンパク質・遺伝子より多面的に探索し、新規代謝経路・新規代謝調節メカニズムを解明する。

以上の点を明らかにし、胆汁酸による生体内エネルギー代謝恒常性機序解明を行い、生物学に新たな概念を創出し臨床応用へ推進していくことを本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) マウスへの FXR 合成アゴニスト長期投与における代謝への影響

オスの C57BL/6J マウスに 100 日間、通常食、高脂肪食、高脂肪食 + FXR 合成アゴニスト、高脂肪食 + コール酸(胆汁酸)を負荷し、食餌量、体重、脂肪組織重量、胆汁酸組成解析、糖尿病の指標として空腹時血糖、インシュリン値、OGTT, IPITT を行った。さらに、血清脂質解析、肝臓脂質解析、RNA 発現解析を行った。また脂肪細胞への影響を検討するため、NIH3T3-L1 細胞を用い、胆汁酸、FXR アゴニストの脂肪細胞分化に対する影響を検討した。前駆脂肪細胞をコンフルエントからさらに 3 日培養し、IBMX、デキサメサゾン、インシュリンを含む分化誘導培地で 2 日培養し、10  $\mu$ M FXR アゴニスト、10mM ケノデオキシコール酸 (CDCA) をそれぞれ添加したイン

シュリンを含む分化培地にて 1 週間培養し、サンプルとして RNA 解析、細胞へのグルコースの取り込み量、細胞への脂肪蓄積に関する解析、Akt、IRS-1 のリン酸化をウェスタンブローディングを行い解析した。

#### (2) DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析

FXR アゴニストと胆汁酸の差を解明するために、我々は、通常食、高脂肪食、高脂肪食 + 胆汁酸、高脂肪食 + FXR アゴニストを 2 週間投与し解剖し、血液・肝臓・脂肪組織・褐色脂肪組織・筋肉・膵臓等の臓器を採取し、遺伝子発現解析、代謝産物の解析を行った。代謝産物は CE-TOF/MS を用いてメタボローム解析を行い、遺伝子発現解析は DNA マイクロアレイを用いてトランスクリプトーム解析を行い、定量 PCR を用いてその確認を行った。

胆汁酸による mRNA 発現への影響を網羅的に解析する目的で、上記サンプルを用い、DNA マイクロアレイを行った。マウスにおいて加齢とリンクするエネルギー代謝に重要な臓器である褐色脂肪組織 (BAT) をサンプルにした。対象とした 24841 遺伝子について、遺伝子発現レベルの比較は「通常食・薬剤非投与群」、「通常食・胆汁酸投与群」、「高脂肪食・薬剤非投与群」、「高脂肪食・胆汁酸投与群」、「高脂肪食・合成 FXR アゴニスト投与群」の間で実施し、信号強度の 2 倍以上の変化を以って発現の増減あり、5% 以内の変動を以って有意な変化なしと判断した。

#### (3) CE-TOF/MS による代謝産物解析結果

上記アレイと同様に、通常食または高脂肪食を負荷したマウスに胆汁酸を混餌投与したマウス (それぞれ CA, FA) の BAT をサンプルとし、代謝産物の動態を網羅的に検討する目的で、CE-TOF/MS によるメタボローム解析を行った。各代謝産物の m/z、migration time より代謝産物を同定し、IS 比により定量を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) マウスへの FXR 合成アゴニスト長期投与における代謝への影響

FXR アゴニスト投与により食餌量を変えずに体重、脂肪組織重量の有意な上昇を観察した。また、胆汁酸組成解析では総胆汁酸量、とくに TCA の減少を示した。糖尿病の指標では空腹時血糖、インシュリン値の上昇、OGTT、IPITT の悪化を呈し、耐糖能異常、インシュリン抵抗性の悪化が観察された。この結果は、既報の糖尿病改善効果と大きく異なるものであった。また、病的解析により脂肪肝、脂肪細胞肥大化、BAT における顕著な脂

肪蓄積が観察され基礎代謝の低下が観察された。既報の FXR 活性化による脂肪蓄積亢進作用の結果である可能性が考えられたため、NIH3T3-L1 細胞を用い、胆汁酸、FXR アゴニストの脂肪細胞分化に対する影響を検討した。分化誘導後の脂肪細胞に 10  $\mu$ M FXR アゴニスト、10mM ケノデオキシコール酸 (CDCA) をそれぞれ添加したインシュリンを含む分化培地にて 1 週間培養し、サンプルとして用いた。その結果、細胞へのグルコースの取り込み量、細胞への脂肪蓄積は変化しなかった。さらに、mRNA を抽出し脂肪細胞への分化の際、発現誘導される遺伝子マーカー (PPAR、FAS、GLUT4、ACC1、ACC2) を定量 PCR にて測定した。その結果、いずれの遺伝子も胆汁酸や FXR アゴニストにより変化せず、既報とは異なる結果であった。さらに、インシュリンシグナルに重要な Akt、IRS-1 のリン酸化が FXR 活性化により亢進していなかった。これらのことから FXR アゴニスト投与による肥満誘導は脂肪組織へ直接的に作用しているのではないということが示唆され既報と異なるものであった。そのメカニズム解明のため組織における mRNA 解析をおこなった。その結果、肝臓、回腸での遺伝子の発現変異は SHP、Cyp7A1、IBABP、FGF-15 など FXR ターゲット遺伝子の発現は、胆汁酸、FXR アゴニストを投与した場合同様であったが、BAT においては胆汁酸投与でエネルギー産生遺伝子発現亢進が観察されたのに対し FXR アゴニスト投与では低下していた。これらのことから、FXR を活性化することにより胆汁酸合成が低下し、TGR5 活性の高い一次胆汁酸や TCA の低下によりエネルギー産生が低下し、肥満・糖尿病を誘発することが示唆され、我々が提唱している胆汁酸-TGR5 系によるエネルギー産生が FXR を介した系よりも重要であることが強く示唆された。脂肪組織において FXR の発現は肝臓の 1% と極めて低値であり、血糖降下における影響は弱いのではないかと考えられる。

#### (2) DNA マイクロアレイによる「高脂肪食・薬剤非投与群」と「高脂肪食・胆汁酸投与群」の遺伝子発現比較検討結果

生体内エネルギー代謝恒常性を検討する目的で、胆汁酸あるいは合成 FXR アゴニストの投与による遺伝子発現の変化について検討する目的でマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。その際、我々の研究対象として特にエネルギー過剰状態における変化に着目すべきであるとの判断から、抽出された膨大な数の遺伝子に「通常食摂取では胆汁酸投与で変化しない」という条件を付加して絞り込みを試みた。通常食群では胆汁酸投与で変化なく、高脂肪食群で胆汁酸を投与す

ると発現が増加あるいは減少する遺伝子を検索したところ、高脂肪食群で胆汁酸投与により発現が増加したものとして 39 遺伝子が、減少したものとして 34 遺伝子が抽出された。ここでは、抽出された遺伝子群のうち特に興味深いものについて概説する。今回の検討の結果得られた遺伝子群は機能別に類型化することができるが、例えば細胞骨格の維持や細胞容積の調節に関与する遺伝子が複数見出されている。Coronin 7 は、進化の過程で高度に保存され細胞骨格の維持や細胞内輸送に関与する Coronin family に属し、特に細胞小器官である Golgi 体の周辺に局在し、Golgi 輸送に関与していると考えられている (*Trend Cell Biol* 16 : 421 2006)。また、Septin 10 は、微小管の重合あるいは脱重合を調節する Septin family の一員であるが、種々のシグナル伝達系の影響下にある MAP (mitogen activating protein) を介した微小管の機能調節に深く関わっていることが示されている (*ScientificWorldJournal* 8 : 611 2008)。また、細胞増殖に関与する遺伝子も複数見出されており、具体例として cyclin family のひとつである cyclin T1 などが挙げられる。その他にも Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 の様にインシュリン作用に関与している遺伝子、p21 (CDKN1A) -activated kinase (PAK) 3 のように活性化された Rho GTPase と結合して細胞増殖などに関与している遺伝子が見出された。

### (3) DNA マイクロアレイによる「高脂肪食・胆汁酸投与群」と「高脂肪食・合成 FXR アゴニスト投与群」の遺伝子発現比較検討結果

通常食群では胆汁酸投与で変化なく、高脂肪食群で胆汁酸および合成 FXR アゴニスト (GW4064) の投与により発現が増加したものとして 13 遺伝子が、発現が減少したものとして 24 遺伝子が、高脂肪食群で胆汁酸投与により発現増加・GW4064 投与により発現減少したものとして 40 遺伝子 (うち 2 遺伝子は通常食群で胆汁酸投与により変化しないもの) が、高脂肪食群で胆汁酸投与により発現減少・GW4064 投与により発現増加したものとして 45 遺伝子 (うち 4 遺伝子は通常食群で胆汁酸投与により変化しないもの) が、それぞれ抽出された。

抽出された遺伝子群はいずれも興味深く、例えば高脂肪食群で胆汁酸および合成 FXR アゴニスト (GW4064) の投与により発現が増加したものとして見出された Secreted

frizzled-related protein 2 (SFRP 2) は、細胞死の制御などに関連するシグナル伝達系である Wnt シグナルを伝える受容体 Frizzled protein (Fz) の分泌型であるが、同じ family に属する SFRP 1 と拮抗し Wnt シグナルの伝達を調節していることが知られている (*J Cell Sci* 121 : 737 2008)。高脂肪食群で胆汁酸および合成 FXR アゴニスト (GW4064) の投与により発現が減少したものとして見出された 24 遺伝子には、やはり細胞骨格の形成や細胞内輸送に関与する遺伝子である Tubulin tyrosine ligase-like (TTL) 9 や Kinesin family member 26A が含まれる。Tubulin は細胞骨格を形成するうえで重要な分子であり、TTL 9 が属する TTL family は tubulin の機能制御、特に翻訳後の修飾に深く関与し (*J Bio Chem* 281 : 30707 2006) また kinesin family が dynein とともに細胞の形態維持や細胞内輸送の中心的役割を担っていることはよく知られており、興味深い。

高脂肪食群で胆汁酸投与により発現増加・GW4064 投与により発現減少したものとして抽出された遺伝子として、著名なものでは Inhibitor of  $\kappa$ B kinase gamma (IKK) がある。炎症などに深く関与する遺伝子として知られている NF- $\kappa$ B の活性は I $\kappa$ B により制御されているが、本遺伝子の産物はその I $\kappa$ B の活性をリン酸化により調節する (*Cell* 132 : 344 2008)。脂肪組織における炎症性サイトカインのプロファイルがメタボリック症候群の病態形成に大きな影響を与えることと関連して、このような遺伝子が見出されたことは特筆に値する。高脂肪食群で胆汁酸投与により発現減少・GW4064 投与により発現増加した遺伝子もまた多岐にわたるが、例えば局所の炎症や細胞死への関与が指摘されている nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat (NLR) family (*Nat Rev Immunol* 8 : 372 2008) などが認められた。

### (4) CE-TOF/MAS による代謝産物解析結果

胆汁酸投与においてアミノ酸代謝の変動が確認された。アミノ酸代謝はエネルギー代謝に深く関与していると考えられるが、網羅的に検討した報告例は多くない。今後、胆汁酸代謝がアミノ酸代謝に与える影響を明確にし、エネルギー代謝への影響のメカニズムを解明していきたい。

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4件)

1. Atsushi Tamura, Hisayoshi Hayashi, Mitsunobu Imasato, Yuji Yamazaki, Asuka Hagiwara, Masami Wada, Tetsuo Noda, Mitsuhiro Watanabe, Yuichi Suzuki, and Sachiko Tsukita. Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na<sup>+</sup> deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine. *Gastroenterology*. 2011; 140: 913-923. (査読あり)
2. Sayeepriyadarshini Anakk, Mitsuhiro Watanabe, Scott A Ochsner, Neil J McKenna, Milton J Finegold, and David D Moore. Combined deletion of FXR and SHP results in juvenile onset cholestasis and *de novo* induction of Cyp17A1. *J Clin Invest*. 2010 ; 121 : 86-95. (査読あり)
3. Nakatani H, Kasama K, Oshiro T, Watanabe M, Hirose H, Itoh H. Serum bile acid along with plasma incretins and serum high molecular weight adiponectin levels are increased after bariatric surgery. *Metabolism*. 2009 ; 58: 1400-1407. (査読あり)
4. Park YJ, Qatanani M, Chua SS, LaRey JL, Johnson SA, Watanabe M, Moore DD, Lee YK. Loss of Orphan Receptor Small Heterodimer Partner Sensitizes Mice to liver injury from obstructive cholestasis. *Hepatology*. 2008 ; 47: 1578-1586. (査読あり)

[学会発表](計11件)

1. 渡辺光博. 代謝とアンチエイジング. 北海道 アンチエイジング学会. 2011年3月5日. 北海道
2. 渡辺光博. Decreasing bile acid synthesis with an FXR agonist induces obesity and diabetes through the decrease of energy expenditure. Falk Symposium 175. 2010年10月8日. フライブルグ. ドイツ
3. 渡辺光博. The reduction of LXR activity by ezetimibe improves the fatty liver and diabetes. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting Nuclear Receptors & Disease. 2010年9月3日. ニューヨーク. USA
4. 渡辺光博. Lowering bile acid pool size with an FXR agonist induces obesity and diabetes through the decrease of energy expenditure. 2010 Keystone Symposia. 2010

年3月24日. Keystone. USA

5. 渡辺光博. Influence of FXR activation in the metabolic control. 2009 EMBO Meeting. 2009年9月27日. クロアチア
6. 渡辺光博. 胆汁酸代謝調節によるメタボリックシンドローム治療への可能性. 第45回高血圧関連疾患モデル学会 シンポジウム. 2009年9月5日. 東京
7. 渡辺光博. Bile acids binding resins improve metabolic syndrome. 2009 Keystone Symposia. Type 2 Diabetes and Insulin Resistance. 2009年1月23日. Banff. Canada
8. 渡辺光博. Bile signaling pathway for the control the metabolism. 1st International Conference of Health and Longevity Sciences. 2008. 12. 18-19. Shizuoka
9. 渡辺光博. Bile acid binding resins improve obesity and Insulin resistance. CBI Society Annual Meeting 2008 (International Symposium), Tokyo, 2008, 10.24
10. 渡辺光博. Bile acid control the metabolic signaling. Proceeding of the CBI Society Annual Meeting 2008. 2008. 10. 22-24. Tokyo
11. 渡辺光博. 胆汁酸代謝調節によるメタボリックシンドローム治療への可能性. 第45回高血圧関連疾患モデル学会 シンポジウム. 2008年7月10日. 筑波

[図書](計3件)

1. 渡辺光博. 胆汁酸による糖・エネルギー代謝. 中外医薬社. 2010年. 126-132
2. 渡辺光博. 胆汁酸による甲状腺ホルモン代謝調節. 医学の世界社. 2010年. 735-745
3. 渡辺光博. 肥満と脂肪エネルギー代謝. 建バク社. 2008年. 139-176

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等  
特になし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 光博 (WATANABE MITSUHIRO)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：10450842

(2)研究分担者

谷川原 祐介 (TANIGAWARA YUSUKE)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：30179832

伊藤 裕 (ITOHI HIROSHI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：40252457

森本 耕吉 (MORIMOTO KOKICHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：10468506

杉崎 太一 (SUGIZAKI TAICHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：00468480

(H20 H21)

(3)連携研究者

なし