

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591043

研究課題名(和文) SREBP-1cによる糖尿病性合併症発症のオートループ機構

研究課題名(英文) The autoloop pathogenic mechanism of diabetic complication by SREBP-1c

研究代表者

小林 和人 (KOBAYASHI KAZUTO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：30455935

研究成果の概要(和文)：

Sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c)は肝臓において脂質合成に機能する転写因子である。肝臓における SREBP-1c は栄養状態により制御され、持続的な活性化は脂肪肝やインスリン抵抗性を惹起する。SREBP-1c の機能は転写による制御が重要であり、インスリンによりその活性は上昇する。しかし、その詳細なメカニズムは未だ明らかになっていない。本研究ではそのメカニズムの解明を目指す。

インスリン刺激を介した肝臓 SREBP-1c の発現誘導に Protein kinase C beta (PKCbeta) が関わることを明らかにした。PKCbeta の機能阻害により再摂食時のインスリン依存的な SREBP-1c の発現誘導は阻害された。また、インスリン欠乏の1型糖尿病マウスでは PKCbeta の阻害による SREBP-1c の発現抑制は起こらなかった。つまり、インスリン刺激依存的な SREBP-1c の発現誘導に PKCbeta が積極的に関与することが明らかとなった。さらに詳細な検討を SREBP-1c プロモーター解析からも PKCbeta は Sp1 による Sp3 の置換反応を活性化する。SREBP-1c の発現は Sp1 および Sp3 を中心に制御されていることが明らかとなった。SREBP-1c の発現における栄養制御は PKCbeta が関わることを明らかとなり、PKCbeta 阻害剤が糖尿病治療の有力な治療薬になりえることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：

Sterol-regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) is a transcription factor that controls lipogenesis in the liver. Hepatic SREBP-1c is nutritionally regulated, and its sustained activation causes hepatic steatosis and insulin resistance. Although regulation of SREBP-1c is known to occur at the transcriptional level, the precise mechanism by which insulin signaling activates SREBP-1c promoter remains to be elucidated. Here we show that protein kinase C beta (PKCbeta) is a key mediator of insulin-mediated activation of hepatic SREBP-1c and its target lipogenic genes. Activation of SREBP-1c in the liver of re-fed mice was suppressed by either adenoviral RNAi-mediated knockdown or dietary administration of a specific inhibitor of protein kinase C beta. The effect of PKCbeta inhibition was cancelled in insulin depletion by streptozotocin (STZ) treatment of mice. Promoter analysis indicated that PKCbeta activates SREBP-1c promoter through replacement of Sp3 by Sp1 for binding to the GC box in the sterol regulatory element (SRE) complex, a key cis-element of SREBP-1c promoter. Knockdown of Sp proteins demonstrated that Sp3 and Sp1 play reciprocally negative and positive roles in nutritional regulation of SREBP-1c, respectively. This new understanding of PKCbeta involvement in nutritional regulation of SREBP-1c activation provides a new aspect of PKCbeta inhibition as a potential therapeutic target for diabetic complications.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：代謝学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：メタボリックシンドローム、脂質代謝、遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

欧米先進各国では、メタボリックシンドローム患者の増加が深刻な社会問題となっている。日本でも、食生活の欧米化に伴い欧米同様、生活習慣病患者が急速に増加している。生活習慣病患者の増大は医療費の増加といった社会的な問題とともに、患者自身のQOLの低下を引き起こし、個人のみならず、社会全体にとっても大きな問題となっている。生活習慣病の発症の原因としては、食生活の欧米化、老化、運動不足、生活におけるストレスである。しかし、現在の治療法ではライフスタイルを変えずに治療をすることできない。そのため、現在までに行われている治療以外に新たなライフスタイルを変えない治療法の確立が必要である。

糖尿病性血管合併症の原因が高血糖の持続であることは多くの臨床研究から明らかであり、高血糖による影響が合併症の成因として重要であることが分かっている。

糖尿病モデル動物より単離した血管組織(網膜,心臓,大動脈,腎糸球体)および高ブドウ糖条件における培養血管構成細胞(内皮細胞,平滑筋細胞,メサングウム細胞)において, DG 含量の増加と PKC 活性化が生じている。PKCbeta に特異性が高く,経口投与可能な PKCbeta 阻害薬が開発され,その有効性が糖尿病モデル動物で検証されている。その結果,糖尿病動物の網膜症,腎症,神経障害に対し,PKCbeta 阻害薬が有効であることが分かっている。現在では, PKCbeta 阻害薬が糖尿病性合併症の治療薬として開発が進んでいる。

2. 研究の目的

糖尿病性合併症の発症における PKC を介すエネルギー代謝調節転写因子の制御に着目する。SREBP-1c による糖尿病性合併症における活性制御メカニズムを、PKC を中心に解明する。

SREBP-1c の制御に関する新たな知見は SREBP-1c を標的とするトータルな生活習慣病治療薬の開発の足がかりになる。糖尿病性合併症における PKCbeta の SREBP-1c 発現制御メカニズムを明らかにすることで、さらに効果的な治療薬の開発の礎を作る。

3. 研究の方法

(1)プロモーター解析

HepG2 および HEK293 細胞に SREBP-1c プロモーターLuc を導入し、その後 PKC 活性化剤(PMA)、PKCbeta 阻害剤(LY333531)などを添加した。また、他の遺伝子を同時に添加するなどし、SREBP-1c プロモーター活性を測定した。

また、SREBP-1c プロモーター上の配列を用い、各種転写因子との直接的な結合についてゲルシフトアッセイで検討した。マウス肝臓における転写因子とプロモーターの結合を検討するため、クロマチン免疫沈降法(ChIP)を用い検討した。

(2)細胞レベルでの SREBP-1c 発現に対する PKCbeta の関与

ラットから単離した肝細胞に PKCbeta 活性化剤、阻害剤を添加後、ノーザンブロッティングにより遺伝子の発現を検討した。

(3)マウス個体における PKCbeta の影響

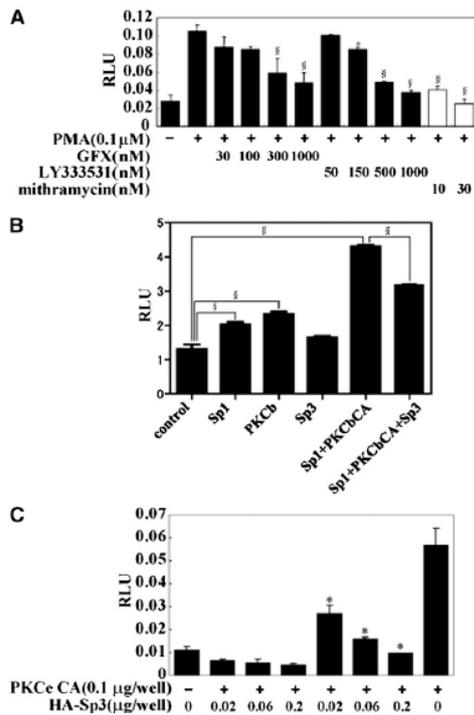
正常マウスおよび STZ を投与し膵臓 beta 細胞を破壊し 1 型糖尿病を発症したマウスに PKCbeta 阻害剤を投与し遺伝子発現をノーザンブロッティングで解析した。また、血中成分、体重、組織重量、食欲などの変化を測定した。

(4)マウス個体における PKCbeta ノックダウンによる影響

アデノウイルス PKCbeta RNAi を作成しマウスへ投与し、遺伝子発現をノーザンブロッティングで解析した。また、標的遺伝子の発現の低下をタンパクレベルでも解析し、ウェスタンブロッティングで検討した。

4. 研究成果

(1) SREBP-1c Luc を用いた *in vitro* でのプロモーター解析の結果、-90 までの領域に PMA により活性化を受ける領域があることが分かった。この活性化は PKC 阻害剤 GF109203X(GFX)、PKCbeta 特異的阻害剤 LY333531、MEK 阻害剤 U0126 により抑制された。逆に PKCbeta および PKCepsilon により活性化された。さらに、転写因子 Sp1 は PKCbeta により活性化され SREBP-1c の活性を上昇させる。逆に SP3 はその活性を抑制した。ゲルシフトアッセイで PMA により活性化される転写因子を同定するため、ゲルシフトアッセイで解析を行った。Sp3 が -90 の領域に結合した(下図)。



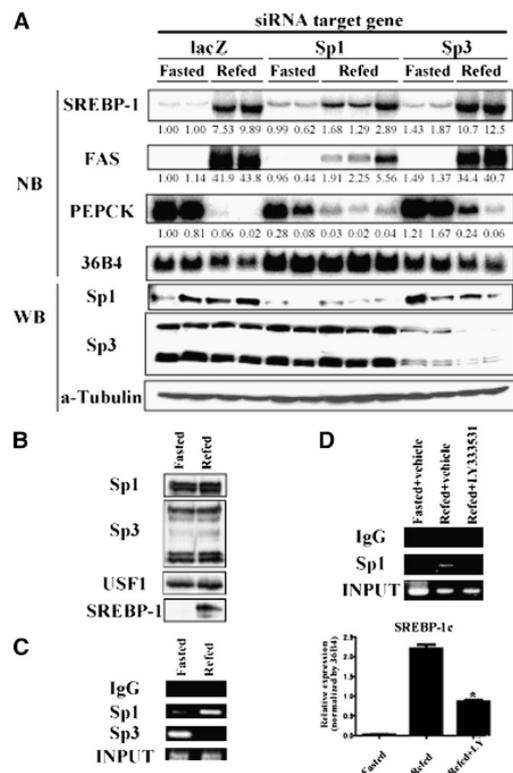
(2) PKC 活性化剤 PMA は細胞レベル SREBP-1c の発現を誘導し、その発現上昇は PKCbeta 阻害剤 LY333531 でキャンセルされる。また、インスリンで発現が上昇する SREBP-1c の発現に対しても PKCbeta 阻害剤は抑制的に働く。

(3) マウス肝臓における過栄養状態での SREBP-1c の発現に対しても PKC 阻害剤 LY333531 は SREBP-1c とその標的遺伝子である FAS の発現を低下させた。インスリンが欠乏したマウス (STZ) においては LY333531 による抑制が見られなかったことから LY333531 はインスリンを介した SREBP-1c の発現制御に関わっていることが明らかとなった。

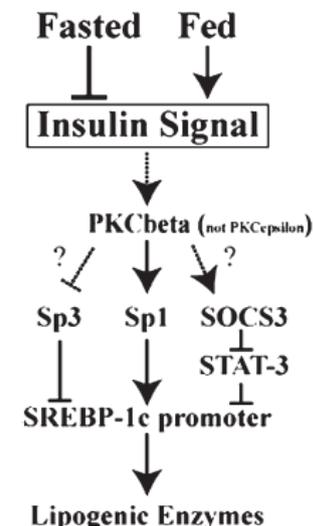
(4) RNAi を用いマウス肝臓で PKCbeta をノックダウンすると SREBP-1 の発現は低下し、さ

らにその標的遺伝子 FAS も低下する。逆に PKCbeta を過剰発現させるとやはり、SREBP-1 の発現は上昇しており、マウス個体でも PKCbeta が SREBP-1 の発現を制御していることが分かった。

(5) PKCbeta のターゲットである Sp3 をノックダウンすると SREBP-1 の発現は低下し、Sp1 の場合は逆に上昇させた。Sp1 と Sp3 の転写因子としての機能を解析するため ChIP アッセイを用い、マウス個体における SREBP-1c プロモーター上での結合状態を検討したところ、Sp1 は過栄養状態で、Sp3 は絶食状態の際に結合していた(下図)。



過栄養状態ではインスリンが過剰に分泌されており、インスリンシグナルが PKCbeta を活性化する。



PKCbeta は Sp1 を活性化し SREBP-1c の発現を上昇させる。Sp3 は PKCbeta により抑制され、SREBP-1c の発現を抑制したものができなくなり、SREBP-1c の発現が上昇する。

Sp1, Sp3 が SREBP-1c の活性化制御していることが明らかとなった。

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 1 件)

1. Yamamoto T, Watanabe K, Inoue N, Nakagawa Y, Ishigaki N, Matsuzaka T, Takeuchi Y, Kobayashi K, Yatoh S, Takahashi A, Suzuki H, Yahagi N, Gotoda T, Yamada N, Shimano H. Protein kinase Cbeta mediates hepatic induction of sterol regulatory element-binding protein-1c by insulin. *J Lipid Res.* 2010 ;51(7):1859-70 査読有

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/clinical-medicine/endocrinology/research/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 和人 (KOBAYASHI KAZUTO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：30455935

(2) 研究分担者

中川 嘉 (NAKAGAWA YOSHIMI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：80361351

鈴木 浩明 (SUZUKI HIROAKI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授

研究者番号：40344890