

機関番号：32409

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790879

研究課題名 (和文) 生活習慣病に関連する遺伝子の探索および機能解析

研究課題名 (英文) Identification and characterization of the new therapy target for metabolic syndrome

研究代表者

横尾 友隆 (YOKOO TOMOTAKA)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：80400688

研究成果の概要 (和文)：生活習慣病に関連する機能未知な遺伝子を探索し、その機能解析を行い、現在までに候補遺伝子を複数個得た。PPAR の制御を受けるミトコンドリア構成タンパク mitoNEET が糖尿病あるいはインスリン抵抗性に与える影響を検討した結果、mitoNEET は肝臓において、糖代謝、体重、脂肪肝に関与することが示された。さらに、他の候補として同定された新規消化管ホルモン候補因子 IBCAP は、糖尿病治療標的になり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：We identified and analyzed the gene related metabolic syndrome with unknown function. The PPARs controlled mitochondrial protein, mitoNEET was ameliorated a glucose metabolism, body weight and HbA1c in diabetic mice adenovirus mediated overexpression of the liver. Additionally, novel intestine specific secretory protein, IBCAP, was other candidate of metabolic syndrome relation factor as another potential therapeutic target for diabetes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：代謝学

科研費の分科・細目：

キーワード：生活習慣病、糖尿病、遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

日本では、食生活の欧米化や生活環境の変化により、高血圧・高脂血症・肥満・糖尿病などの生活習慣病患者が増加の一途をたどっており、その中でも特に糖尿病の患者数は糖尿病予備軍を含めると1500万人以上といわれ、大きな社会問題となっている。

近年、これまでの様々な糖尿病・肥満研究からも、様々な転写因子・末梢組織由来の

内分泌因子などの密接なネットワークの連携が生活習慣病において非常に重要な役割を果たしていることが知られている。また、未だに明らかとなっていない連携因子が数多く存在し、その回路は複雑に制御されていることも考えられている。それらの因子の作用機序や意義の解明は、急増している糖尿病などの生活習慣病に対する治療法のための基礎の確立のためにも非常に重要かつ急務である。

2. 研究の目的

本研究課題では、生活習慣病のメカニズムの解明および治療法確立のために、未だ機能の知られていない、あるいは生活習慣病、特に糖尿病との関連が示唆されていない遺伝子を探索し、その機能を解析することで、これまで知られていなかった生活習慣病の病態像を明らかにし、糖尿病治療・診断など臨床応用へとつながる基礎基盤の解明、および、他因子との様々な連携ネットワークの解明を目的とした。また、消化管ホルモンであるインクレチン関連薬が糖尿病治療に臨床応用され始め、今後の糖尿病の治療を大きく変える可能性が注目されていることから、未だに知られていない末梢組織由来の内分泌因子を探索し、その機能を解析することも本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) mitoNEET の機能解析

本研究では、マイクロアレイ法を利用して KK-Ay マウス (肥満・高血糖・インスリン抵抗性を持つ 2 型糖尿病モデルマウス) に運動、PPAR- α (フェノフィブラート)、 $-\delta$ (GW501516)、 $-\gamma$ (pioglitazone) アゴニストの投与、およびサイロキシン投与負荷を与え、対照群と比較して発現量に変化のあった遺伝子を生活習慣病関連遺伝子として探索した。その結果、得られた生活習慣病関連候補遺伝子について糖・脂質代謝に与える影響を検討した。

(2) IBCAP の機能解析

内分泌器官としての消化管に注目し、糖尿病に関連する新規消化管ホルモンの探索を目的として、消化管特異的な分泌タンパクおよび膜タンパクをマウス腸管より作成した cDNA ライブラリーよりスクリーニングし、同定された因子の機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) mitoNEET の機能解析

① mitoNEET の同定

マイクロアレイ法を用いた網羅的スクリーニングの結果、PPARs に反応し発現量を亢進させる遺伝子として mitoNEET を見出した。mitoNEET は、生活習慣病に対して機能未知なミトコンドリア構成タンパクで、インスリン抵抗性改善薬 pioglitazone に結合するタンパク質である。そこで、肝臓での mitoNEET 発現量を検討した結果、再摂食時に比べ絶食時に発現が高いこと、肥満マウスにおいてそ

の遺伝子発現が変動するこら (図 1, 2) からエネルギー代謝との関連が示された。また、アデノウイルスによる mitoNEET を肝臓に強制発現した結果、インスリン感受性の改善が確認された (図 3)。

図 1 肝臓における絶食、再摂食による遺伝子発現。mitoNEET は絶食時に発現が誘導される。

F; 絶食、R; 絶食後再摂食

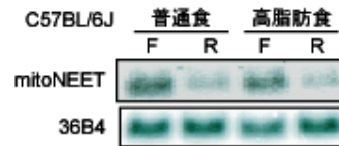


図 2 肝臓における mitoNEET の遺伝子発現。

mitoNEET は絶食時に発現が誘導され、*ob/ob* マウスでは発現が亢進している。また、絶食時の肝臓においても STZ 投与糖尿病マウスでも発現が増えている。

F; 絶食、R; 絶食後再摂食 (普通食)

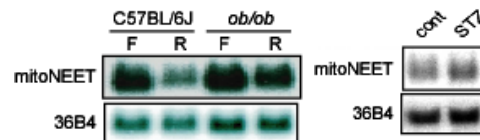
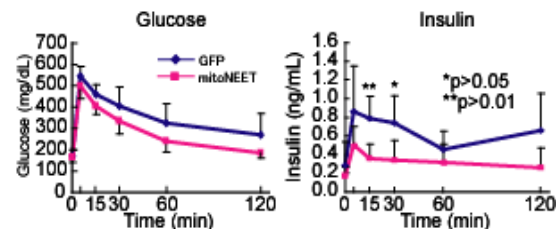


図 3 アデノウイルスを用いた強制発現モデルマウスにおける糖負荷テストを行うと、mitoNEET 強制発現群でインスリン抵抗性改善の可能性が示唆された。



② mitoNEET の糖尿病病態における効果

mitoNEET は栄養状態で肝臓における発現が変化し、また、*ob/ob* マウスや STZ 糖尿病マウスで発現が亢進していること (図 2) から、糖脂質代謝において何らかの作用を持つことが考えられる。そのために、まず、糖尿病モデルマウス KK-Ay を用いて mitoNEET の過剰発現や siRNA によるノックダウンをマウス生体内、特に肝臓で起こす事によりおこる表現型を解析し、エネルギー代謝におけるその役割を検討した。

その結果、mitoNEET を過剰発現すると、体重が減少し (図 4)、HbA1c が低下傾向を示した。逆に、ノックダウンすると HbA1c およ

び体重で有意差はないものの増加傾向を示し、脂肪肝が改善された(図 5)。これらの効果は、肝臓での Glut2 の発現を介している可能性が考えられた(図 5)。

図 4 mitoNEET 強制発現による体重変化。枠内はノザンプロットによる mitoNEET の発現を表す。GFP; コントロール GFP 強制発現、mito; mitoNEET 強制発現

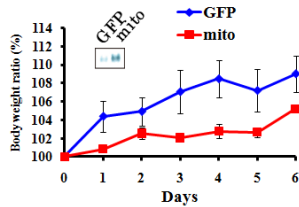
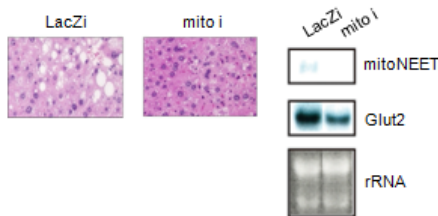


図 5 KK-Ay マウスに mitoNEET を強制発現させると脂肪肝が改善し、Glut2 の発現も抑制された。LacZi; コントロール siRNA, mito i; mitoNEET siRNA



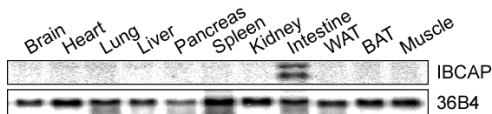
以上の結果より、mitoNEET が糖・脂質代謝のコントロールに重要な役割を果たしている調節タンパクである可能性が示唆された。mitoNEET は、新たな糖尿病治療のターゲットになりうる可能性が考えられ、今後、詳細な分子メカニズムの解明により糖尿病の診断・治療に寄与することが期待される。

(2) IBCAP の機能解析

①新規消化管特異的分泌タンパクの同定

消化管由来分泌タンパクおよび膜タンパク、ひいては新規消化管ホルモンの探索を目的として、独自に改良を加えた Oligo-cap SST (Signal Sequence Trap) 法により単離・同定を行った結果、得られたクローンの 1 つである CF266 (後に IBCAP と命名した。) は、遺伝子発現が消化管に特異的で、機能未知な分泌タンパクであることを確認した(図 7)。

図 7 IBCAP は消化管特異的に発現する。



② IBCAP の機能解析

この新規消化管ホルモン様因子 CF266 は、機能の一部として、マウス単離ラ氏島におけるインスリン分泌刺激を誘導することを明らかにした。また、STZ 投与 1 型糖尿病マウスにアデノウイルスによる IBCAP を強制発現させたマウスでは、糖尿病改善効果を示し(図 8)、また、膵臓ラ氏島に作用し、ラ氏島の増殖や保護作用など形態学変化を起こすことも明らかにした。そこで、この CF266 を、IBCAP (Intestinal Beta-cell Augmenting Promoter) と名付けた。

また、IBCAP トランスジェニックマウスの解析結果からも、IBCAP は膵臓ラ氏島の面積および数に影響を与えることが明らかとなった(図 9)。

以上より、IBCAP は膵臓移植や膵臓再生医療への応用も含め、糖尿病、特に 1 型糖尿病の治療薬になり得る可能性があり期待される。

図 8 STZ 投与糖尿病マウスに IBCAP アデノウイルスによる強制発現し、経口ブドウ糖負荷テストを行うと、血糖値が降下する。

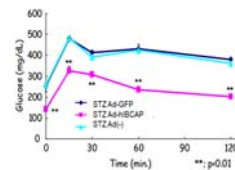
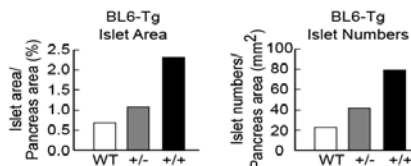


図 9 IBCAP トランスジェニックマウスの膵臓切片の免疫染色。トランスジェニックマウスでラ氏島数・面積が増える。



以上のことから、mitoNEET や IBCAP は糖尿病の治療標的となり得る遺伝子であると考えられ、今後、生活習慣病病態改善に対する効果的な遺伝子機能の増強について検討が必要である。

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 Yokoo T, Watanabe K, Iida KT, Suzuki H, Shimano H, Ishikawa S-E, Kawakami M, Okazaki Y, Yamada N, Toyoshima H,

Transgenic mice expressing an intestine-specific secretory protein, IBCAP, demonstrates pancreatic beta cell augmenting activity, Diabetologia 53(Suppl1), S1-S556 (2010) 査読有

- ② Yokoo T, Watanabe K, Iida KT, Suzuki H, Shimano H, Ishikawa S-E, Kawakami M, Yamada N, Toyoshima H, Transgenic Mice Expressing an Intestine-Specific Secretory Protein, IBCAP (Formerly CF266), Demonstrates Pancreatic β -Cell Augmenting Activity., Endocrine Reviews, 31(3) Suppl 1, S1-S2558 (2010) 査読有
- ③ Watanabe K, Okamoto F, Yokoo T, Iida KT, Suzuki H, Ishikawa S, Kawakami M, Shimano H, Oshika T, Yamada N, Toyoshima H., SPARC is a major secretory gene expressed and involved in the development of proliferative diabetic retinopathy., J Atheroscler Thromb., 16(2):69-76. (2009) 査読有
- ④ Yokoo T, Watanabe K, Tada-Iida K, Suzuki H, Shimano H, Ishikawa S-E, Kawakami M, Yamada N, Toyoshima H, Transgenic Mice Expressing an Intestine-Specific Secretory Protein, IMCAP (Formerly CF266), Demonstrates Pancreatic β -Cell Augmenting Activity., Diabetes 58, Suppl (1) 1-A413 (2009) 査読有

[学会発表] (計 10 件)

- ① Tomotaka Yokoo, Kazuhisa Watanabe, Kaoruko Tada Iida, Hiroaki Suzuki, Hitoshi Shimano, San-e Ishikawa, Masanobu Kawakami, Nobuhiro Yamada, Yasushi Okazaki and Hideo Toyoshima. : Transgenic mice expressing an intestine-specific secretory protein, IBCAP, demonstrates pancreatic beta cell augmenting activity., 46th EASD Annual Meeting, (Stockholm, Sweden), 2010. 9. 22
- ② Tomotaka Yokoo, Kazuhisa Watanabe, Kaoruko Tada Iida, Hiroaki Suzuki, Hitoshi Shimano, San-e Ishikawa, Masanobu Kawakami, Nobuhiro Yamada and Hideo Toyoshima. : Transgenic Mice Expressing an Intestine-Specific Secretory Protein, IBCAP (Formerly CF266), Demonstrates Pancreatic β -Cell Augmenting Activity., ENDO

2010: The 92nd Annual Meeting & Expo, (San Diego, USA), 2010. 6. 19

- ③ 横尾友隆、渡邊和寿、飯田薫子、鈴木浩明、島野仁、石川三衛、川上正舒、山田信博、豊島秀男 Identification and Characterization of IBCAP, a Novel Intestine-specific Secretory Protein with Pancreatic Beta-cell Augmenting Activity. 第 32 回 日本分子生物学学会年会 (横浜) 2009. 12. 10
- ④ 横尾友隆、渡邊和寿、飯田薫子、鈴木浩明、島野仁、石川三衛、川上正舒、山田信博、豊島秀男 新規消化管特異的分泌タンパク IBCAP の機能解析 第 82 回日本生化学会大会 (神戸) 2009. 10. 23
- ⑤ Tomotaka Yokoo, Kazuhisa Watanabe, Kaoruko Tada Iida, Hiroaki Suzuki, Hitoshi Shimano, San-e Ishikawa, Masanobu Kawakami, Nobuhiro Yamada and Hideo Toyoshima. : Transgenic Mice Expressing an Intestine-Specific Secretory Protein, IBCAP (Formerly CF266), Demonstrates Pancreatic β -Cell Augmenting Activity. The 69th Scientific Sessions of America Diabetes Association, New Orleans, 2009. 6. 8
- ⑥ 横尾友隆、渡邊和寿、飯田薫子、鈴木浩明、島野仁、石川三衛、川上正舒、山田信博、豊島秀男 膵 β 細胞増加作用を持つ新規消化管特異的分泌タンパク IBCAP の解析 第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会 (大阪) 2009. 5. 23
- ⑦ 豊島秀男、横尾友隆、渡邊和寿、飯田薫子、鈴木浩明、島野仁、石川三衛、川上正舒、山田信博 膵 β 細胞増加作用を持つ新規消化管特異的分泌タンパク IBCAP の解析 第 82 回日本内分泌学会学術集会 (前橋) 2009. 4. 23

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横尾 友隆 (YOKOO TOMOTAKA)
埼玉医科大学・医学部・助教
研究者番号：80400688

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし