

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01883

研究課題名(和文) ChREBP欠損による抗肥満作用の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism on effect of anti-obesity by chrebp deficiency

研究代表者

崎山 晴彦(sakiyama, haruhiko)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：30508958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：グルコース応答性を持つ転写因子ChREBPは、グルコース濃度に応じて核内へと移行することで糖や脂質代謝に関連する酵素群の発現量の調整を行っている。つまりChREBPが活性化されれば、代謝が活発となり、解糖や脂肪酸合成が亢進する。ChREBP KOマウスでは、これらの代謝が相対的に低下することで肥満になりにくいと考えられる。また特に、褐色脂肪組織では代謝が低下していることに加えて、脂肪燃焼に関わる脱共役タンパク質UCP1の発現量が亢進していた。従って、脂肪が蓄積したとしてもすぐに分解されるため、体重が増加しにくいと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満や糖尿病を含めたメタボリックシンドロームは社会問題となっている。転写因子ChREBPの活性化はこれら病態の亢進に深く関与していることが分かってきた。そこでChREBP KOマウスの特徴である抗肥満作用のメカニズムを解明することで、ChREBPをターゲットとした治療薬の開発につなげようと試みている。ChREBPの阻害剤が開発されればメタボリックシンドロームの予防や治療に役立つことが大いに期待される。

研究成果の概要(英文)：The glucose responsive transcription factor ChREBP regulates the expression levels of enzymes related to glycolysis and lipogenesis by translocating into the nucleus according to glucose concentration. Once ChREBP is activated, glycolysis and fatty acid synthesis are accelerated. In ChREBP KO mice, it is considered that obesity is unlikely to occur due to the relative decrease in these metabolisms. In brown adipose tissue, in addition to decreased metabolism, the expression level of uncoupling protein1 (UCP1) involved in fat burning was increased. Therefore, even if fat is accumulated, it is quickly decomposed, and it is considered that weight is unlikely to increase. Therefore, if the activation of ChREBP can be suppressed, it is expected to be useful for the treatment and prevention of metabolic syndrome.

研究分野：糖・脂質代謝

キーワード：ChREBP 転写因子 スクララーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肥満に伴う生活習慣病は、先進国において近年増加の一途をたどり、重大な問題となっている。過剰に摂取された糖質は速やかに単糖類に消化され解糖系を経て脂肪酸や中性脂肪に変換、蓄積される。糖質から脂肪酸合成経路には、多岐にわたる酵素群が関与しておりこれらの経路を担う酵素群は、翻訳後修飾や、ホルモン合成、分泌、栄養摂取などにより制御されている。

転写因子 ChREBP (carbohydrate response element binding protein) はグルコース濃度に応答し、糖・脂質代謝に関連する酵素群の遺伝子発現量を調節している。同様の機能を持つ SREBP1c (Sterol-response element binding protein) に比べて、ChREBP には不明な点が多く、特に ChREBP 自体の調節メカニズムがよく分かっていなかった。

我々は ChREBP 欠損マウスを保有しており、肝臓における表現型を中心に検討してきた。いくつか例を挙げると、肝臓においてグリコーゲン、乳酸の増加や、血中グルコースの増加などを認める一方、血漿中では遊離脂肪酸の低下なども見られた。さらに ChREBP 欠損マウスを肥満モデルマウスと交配させると、肥満が改善されることが分かっている。つまり ChREBP が低下すれば生活習慣病が改善されると言える。解糖系の最終産物であるピルビン酸を基質に脂質合成系が活発となるが、ChREBP 欠損マウスでは基質となるピルビン酸が十分ではないため、脂質合成系が低下していることが予想される。

また、エネルギー消費の調節に関与する分子の一つがミトコンドリア脱共役タンパク質(UCP: Uncoupling protein)である。そこで我々は褐色脂肪細胞に特異的に発現する UCP1 に着目し、脂質合成系の低下に加え新たに ChREBP 欠損マウスが肥満になりにくい分子機構を解明しようと試みることにした。脂肪組織における ChREBP の役割が解明できれば ChREBP をターゲットとした抗肥満薬の開発が期待される。

2. 研究の目的

糖・脂質代謝に関与する転写因子 ChREBP の欠損マウスは肥満を改善することが知られている。本研究では、エネルギー消費の自立的調節に関与するタンパク質 UCP に着目し、ChREBP が UCP 発現量や活性化に及ぼす影響を検討することを目的とする。転写因子 ChREBP を介したエネルギー代謝調節機構の解明を行うことで、ChREBP が抗肥満のターゲット分子の一つであることを明らかにする。転写因子による抗肥満作用を知ることは、学術的にも臨床応用的にも意義が大きく、メタボリックシンドロームの治療と予防に役立つと期待される。

3. 研究の方法

(1) ChREBP 欠損による UCP 発現量や活性化の解析

褐色脂肪細胞が多い場合や UCP の発現量が多く活性化していれば肥満を改善すると考えられている。我々は ChREBP を欠損することにより UCP1 の mRNA 発現量が増加することを認めている。そこで ChREBP が UCP1 発現に及ぼす直接的な影響を検討する。

A) マウスより単離した褐色脂肪組織を用いた検討

各マウスより脂肪組織を単離し、以下の実験を行う。

脂肪組織よりタンパク抽出を行う。一部は凍結切片やパラフィン切片を作製する。

UCP1 のタンパク発現量をウエスタンブロッティングにより定量し ChREBP 欠損による影響を検討する。

パラフィン切片を用いて免疫組織化学的により UCP1 の発現量や局在を解析する。

分化・増殖による脂肪組織の変化量は肥満の指標となる。凍結切片を用いて Oil Red O 染色に

より各マウスの脂肪内に蓄積した脂肪滴の量を比較するとともに脂肪組織の量を測定する。

ミトコンドリアマーカ―を用いて各マウスの褐色脂肪細胞におけるミトコンドリアの発現量を測定する。

B) 培養細胞を用いた検討

マウスより単離した初代脂肪細胞/前駆細胞あるいは株化された脂肪細胞を用いて ChREBP の UCP1 活性化への影響を検討する。

培養細胞に野生型 ChREBP を過剰発現し UCP1 の発現量を解析する。

培養細胞において siRNA や CRISPR の系を用いて ChREBP をノックダウンし、UCP1 の発現量を解析する。

ChREBP の変異体を発現させ UCP1 の発現量を解析する。この時、変異体は活性型や不活性型の ChREBP を用いる。

(2)ChREBP による UCP1 発現調節、活性化の分子メカニズムの解明

UCP1 の遺伝子発現には核内受容体(TR : T3 受容体、RXR : レチノイド受容体、PPAR : ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体)や、PGC-1(PPAR γ コアクチベーター)などが関与している。ChREBP がこれらの発現量に影響を与えるのか、あるいは UCP1 遺伝子のプロモーター領域への結合に影響を及ぼすのかを検討する。

A) UCP 1 発現調節に関わる遺伝子群に及ぼす影響の検討

培養細胞に野生型 ChREBP を過剰発現し核内受容体の発現量を解析する。

同様に siRNA や CRISPR の系を用いて ChREBP をノックダウンし、核内受容体の発現量を解析する。

B) UCP1 遺伝子のプロモーター領域への結合に及ぼす影響の検討

ゲルシフトアッセイにより、UCP 1 発現調節に関わる転写因子や核内受容体の UCP 1 プロモーター領域への結合が ChREBP により阻害されるのか調べる。

ルシフェラーゼアッセイを用いてリポーター活性が ChREBP によりどのような影響を受けるのか検討する。この時、野生型、変異型 ChREBP など試す。

(3)ChREBP を阻害する化合物のスクリーニングへと発展

これまでの研究成果より得た情報をもとに、ChREBP が UCP1 活性化を阻害するメカニズムを利用したアッセイ系を確立する。このアッセイ系を用いて ChREBP を阻害する化合物のスクリーニングを実施する。

4 . 研究成果

脂肪組織において、UCP1 の発現量を検討した結果、リアルタイム PCR により RNA レベルにおいて ChREBP KO マウスでは増加していることが確認された。同様に、ウエスタンブロットによりタンパク質レベルでも増加していることが分かった。よって ChREBP が UCP1 発現に対して負に制御している可能性が示唆された。さらに ChREBP のプロモーター領域を解析した結果、従来より報告されていた ChREBP が結合できる配列を見出した。

そこで ChREBP が結合可能な配列を含むプロモーター領域をクローニングし、レポータージェーンアッセイが可能なベクターを構築した。本ベクターを C3H10T 細胞に遺伝子導入し、レチノイン酸で刺激することにより、転写活性を測定することにした。このとき、細胞には野生型 ChREBP を強制発現させたもの、不活性型 ChREBP を発現させたものなどを試した。その結果、

野生型 ChREBP を発現した細胞では、UCP1 の発現量が抑制されることが判明した。またこの抑制はレチノイン酸の濃度依存的であった。現在、より生理的な条件下で検討を行うとともに、本アッセイ系を使用して UCP1 発現に関わるレチノイン酸以外の新規な化合物をスクリーニングしている。

UCP1 はミトコンドリア内膜に存在するタンパク質であるが、ChREBP の新たな役割の探索を行うとともに、UCP1 発現制御に関わる生理的な意義を検討するために、ミトコンドリアの機能に関する解析を行った。まず、ATP 合成能について検討を行った結果、ChREBP KO マウスでは ATP 産生量の低下を認め、一方では電子伝達系複合体の発現量が亢進していた。また、電子顕微鏡画像よりミトコンドリアの構造自体が変化をおこしていることが分かった。現在、これらの理由について検討を行っている。

また、ChREBP の活性化を阻害する化合物をライブラリーよりスクリーニングを行った結果、候補となり得るリード化合物をいくつか獲得することに成功した。現在、本化合物の阻害効果について検討を行っている。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fang C, Cai X, Hayashi S, Hao S, Sakiyama H, Wang X, Yang Q, Akira S, Nishiguchi S, Fujiwara N, Tsutsui H, Sheng J.	4. 巻 1864
2. 論文標題 Caffeine-stimulated muscle IL-6 mediates alleviation of non-alcoholic fatty liver disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids	6. 最初と最後の頁 271-280
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbaliip.2018.12.003	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 崎山晴彦、Li Ran、中川勉、江口裕伸、吉原大作、藤原範子、鈴木敬一郎
2. 発表標題 転写因子ChREBP欠損マウスにおける抗肥満効果に関する研究
3. 学会等名 日本酸化ストレス学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 崎山晴彦、Li Ran、中川勉、江口裕伸、吉原大作、藤原範子、鈴木敬一郎。
2. 発表標題 転写因子ChREBP阻害による抗肥満効果のメカニズムの検討
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Li Ran、崎山晴彦、中川勉、江口裕伸、吉原大作、藤原範子、鈴木敬一郎
2. 発表標題 ChREBP-KOマウスの褐色脂肪組織における脂質代謝と熱産生に関する研究
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上美奈子、崎山晴彦、江口裕伸、吉原大作、藤原範子、鈴木敬一郎
2. 発表標題 ChREBP欠損マウスが有する抗肥満作用の検討
3. 学会等名 第65回日本生化学会 近畿支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 崎山晴彦、中川勉、江口裕伸、吉原大作、藤原範子、鈴木敬一郎
2. 発表標題 ChREBP欠損マウスが有する抗肥満作用の検討
3. 学会等名 第91回 日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 崎山晴彦、Li Ran、中川勉、江口裕伸、吉原大作、藤原範子、鈴木敬一郎
2. 発表標題 転写因子ChREBP欠損マウスにおける抗肥満効果の解明
3. 学会等名 第28回日本メイラード学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 崎山晴彦、井上美奈子、江口裕伸、藤原範子、吉原大作、鈴木敬一郎
2. 発表標題 転写因子ChREBP欠損マウスにおけるフルクトース代謝の解析
3. 学会等名 第27回日本メイラード学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 崎山晴彦、中川勉、江口裕伸、吉原大作、藤原範子、鈴木敬一郎
2. 発表標題 転写因子ChREBP欠損マウスにおける抗肥満効果の解明
3. 学会等名 第90回日本生化学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 崎山晴彦、中川勉、江口裕伸、吉原大作、藤原範子、鈴木敬一郎	4. 発行年 2017年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 4
3. 書名 月刊細胞	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 スクロース吸収阻害剤、ChREBP阻害剤およびその利用	発明者 崎山晴彦	権利者 学校法人 兵庫 医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、2017-235473	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	鈴木 敬一郎 (suzuki keiichiro) (70221322)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	
研究分担者	江口 裕伸 (eguchi hironobu) (60351798)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	吉原 大作 (yoshihara daisaku) (00567266)	兵庫医科大学・医学部・助教 (34519)	
研究 分 担 者	藤原 範子 (fujiwara noriko) (10368532)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	