

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580139

研究課題名(和文)メタボリック症候群新規治療法を目指した 酸化調節鍵因子ACC2の発現制御機構解明

研究課題名(英文)The expression of beta-oxidation adjustment key factor ACC2 elucidation which aimed at the metabolic syndrome new therapy

研究代表者

渡辺 光博(WATANABE, Mitsuhiro)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・教授

研究者番号：10450842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、メタボリックシンドローム治療標的としてAcetyl-CoA Carboxylase 2 (ACC2)に着目した。ACC2はエネルギー代謝改善につながる治療標的たりうるが、我々は胆汁酸投与によるマウス肝ACC2遺伝子発現低下を見出しており、これを踏まえACC2転写制御機構解明を目指した。マウスACC2遺伝子には2つの転写開始点があり、本研究で各調節領域を検討、また各mRNAの諸条件下での発現変化を検討した。その結果、2種類のmRNAは異なる発現様式を示し、特に3'側のmRNA発現に関与する機序が肝内エネルギー代謝改善の治療標的となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We propose that Acetyl-CoA Carboxylase 2 (ACC2) is an attractive therapeutic target of metabolic syndrome, and we analyzed the mechanisms implied in the regulation of ACC2 gene expression to develop a brand-new therapeutic approach of metabolic syndrome. Prior to this study, we had found that hepatic ACC2 expression was repressed by cholic acid administration in mice. We had also found that murine ACC2 gene had two different transcription initiation sites with two different transcriptional regulatory regions. In this study, we analyzed the transcriptional regulatory regions by cloning. We also investigated the alterations of the expressions of the ACC2 mRNA subtypes under special conditions such as high-fat feeding, fasting, and refeeding. According to our result, the regulatory mechanisms participated in the expression of the 3-side ACC2 mRNA seemed to become an therapeutic target to improve hepatic energy homeostasis.

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 メタボリックシンドローム 胆汁酸 脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

(1) メタボリックシンドロームは人類の健康に対する大きな脅威であり、その病態の解明と治療法の開発は、世界人類の健康、保持のために急務である。しかし、メタボリックシンドロームにおけるエネルギー代謝について、現在のところ臨床応用に直結するような研究成果は得られていない。当研究室では、エネルギー代謝において胆汁酸が生体内シグナル伝達分子として重要な役割を果たしている可能性に注目し、研究を推進しており、胆汁酸代謝関連化合物の投与やマウスにおける胆汁酸代謝関連遺伝子の改変が、エネルギー代謝に大きな影響を与えることを明らかにしてきた(Watanabe M, et al. Nature. 439:484-9, 2006.)。当研究室における胆汁酸投与動物由来サンプルの検討において、胆汁酸投与により Acetyl-CoA Carboxylase 2(ACC2)の発現が抑制されることが示された。そこで、当研究室では、メタボリックシンドロームの治療標的として、Acetyl-CoA Carboxylase(ACC)に注目した。

(2) ACC は Acetyl-CoA を Malonyl-CoA に変換する酵素であり、2 種類のアイソザイム(ACC1 および ACC2)が存在する。ACC1 は肝臓や脂肪組織に多く発現し細胞質における脂肪酸合成を担う。ACC2 は筋肉に多く発現しミトコンドリアでの酸化を調節する。具体的には、ミトコンドリア外膜に存在する ACC2 が産生する Malonyl-CoA は、同じくミトコンドリア外膜に存在する Carnitine palmitoyl transferase 1(CPT1)に結合してその活性を阻害し、脂肪酸アシル CoA のミトコンドリア内への移動を抑制する。つまり、ACC2 はエネルギー余剰下で酸化によるエネルギー産生を抑制する。この ACC2 の作用を減じることで、エネルギー余剰下でも酸化が抑制されずに脂肪酸消費が維持されると期待される。この着眼点は、メタボリックシンドロームの治療法開発における新規アプローチとして注目されている。実際に、ACC2 ノックアウトマウスで野生型と比較して摂餌量は保たれているにも拘らず体重増加や内臓脂肪蓄積が抑制されること(Abu-Elheiga L, et al. Science. 291:2613-6, 2001.)、ラットで ACC2 アンチセンス配列の腹腔内投与により酸化亢進や脂肪肝改善が認められること(Savage DB, et al. J Clin Invest. 116:817-24, 2006.)などの報告がある。

(3) 本研究の開始にあたり、当研究室では、注目しているマウス ACC2 遺伝子が 2 つの異なる転写開始点を有していることを見出した(図 1)。これらの転写開始点はそれぞれ特定の条件で発現が調節されている可能性が見出され、本研究ではまずこれらの異なる 2 つの転写開始点の発現調節が、検討の足がかりとなった。

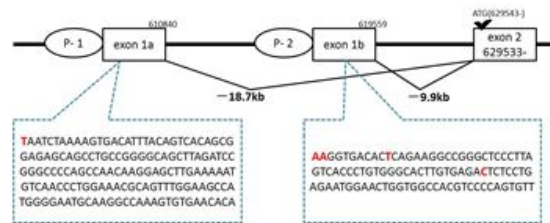


図 1, マウス ACC2 遺伝子の転写開始点

2. 研究の目的

本研究は、エネルギー代謝関連生理活性分子としての胆汁酸とエネルギーセンサーである ACC2 の遺伝子発現制御の関係を明らかにし、メタボリックシンドロームの病態の解明、さらに ACC2 の活性を抑え酸化を亢進させエネルギー代謝を改善するというメタボリックシンドローム治療の新規アプローチへとつなげることをねらいとした。

3. 研究の方法

(1) マウス ACC2 遺伝子の転写調節領域に関する検討

一般的にゲノム上で転写開始点の上流 1000 ~ 2000 塩基までの範囲に殆どの転写因子結合部位が含まれると考えられることから、予備検討で決定された転写開始点の上流約 2000 塩基を目安にプライマーを設計、長鎖 DNA の増幅に適した DNA polymerase (TaKaRa Taq® LA) を用いて当該領域を増幅、その産物を TA クローニングによりクローニングし、転写調節領域の配列における転写因子応答配列の有無を検討した。さらに、クローニングした転写調節領域をルシフェラーゼベクターに組み込み、ルシフェラーゼアッセイを用い転写活性について検討した。

(2) マウス多臓器 cDNA パネルの作成およびこれを用いた ACC2 遺伝子発現条件の解析

細胞レベルでの検討と並行して個体レベルでの検討も必要と考えられたことから、マウス多臓器 cDNA パネルを作成し、ACC2 遺伝子発現に関する検討に供した。具体的には、マウスの主要なエネルギー代謝関連臓器ならびに組織において、高脂肪食摂取や絶食/再摂食の各条件下で飼育したマウスを解剖し検体を採取した。高脂肪食群として 6 週齢より高脂肪食(Research Diets D12492)を給餌した雄 C57BL/6J を、対照群として通常食(Research Diets D12450B)を給餌した雄 C57BL/6J を購入、1 週間馴化ののち解剖した。高脂肪食群ならびに対照群は解剖 2 時間前より絶食、絶食群は解剖 24 時間前より絶食、再摂食群は解剖 38 時間前より 24 時間絶食ののち 12 時間自由摂餌させ解剖 2 時間前より絶食とし、二酸化炭素を用いて安楽死させたのち解剖に供した。尚、本研究における動物の飼育から解剖に至る一連の動物実験はす

べて本学の倫理規定に基づいた審査を受け認可されたものである。

4. 研究成果

(1) ACC2 遺伝子の 2 つの異なる転写調節領域には、それぞれ PPAR / / 、HNF-4、LXR / / 、FXR といった核内受容体応答配列のコンセンサス配列が含まれていた。胆汁酸は FXR のアゴニストであり、胆汁酸が ACC2 の発現を下げる機序に FXR のシグナルが関連している可能性が示唆された。

(2) ACC2 遺伝子の異なる 2 つの mRNA (ACC2a および ACC2b と呼称) の諸条件下における発現パターンの変化を図 2 および図 3 に示す。ACC2a は骨格筋・心筋や褐色脂肪組織において比較的高発現を認め、いずれも高脂肪食摂取や絶食・再摂食に対し類似の変化が観察された。また、脂肪組織のうち 酸化の起こる BAT では、筋肉より高発現を認めた。また、ACC2b は、肝臓および BAT に比較的高発現し、高脂肪食摂取や絶食・再摂食への応答パターンは ACC2a ではなく ACC1 に類似する変化であった。このように、ACC2a と ACC2b で発現組織、パターンが異なるという結果にが得られた。

さらに仔細に検討すると、ACC2 について、ACC2a と ACC2b で発現組織も摂食・絶食による発現パターンの変化も異なることが示された。ACC2a は骨格筋、BAT、心筋に、ACC2b は肝臓、BAT に主に発現していた。ACC2 は各組織での 酸化を制御しており、組織によって ACC2a、ACC2b のどちらが (もしくは両者) 発現するかが決まっていると考えられる。

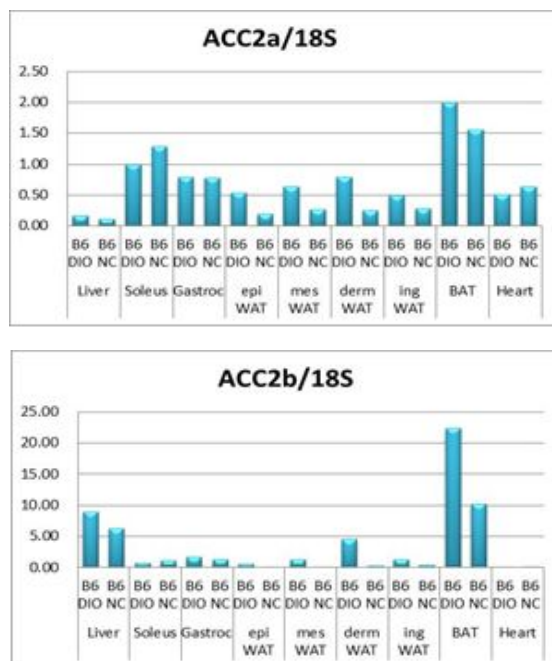


図 2 . 高脂肪食 (D10) と通常食 (NC) での発現パターン変化

また、ACC2b の発現量は、「摂食で亢進、絶食で低下」という従来の知見から予想される変化に合致するが、ACC2a はこれに一致しない

結果となったので、これについて考察したい。これには、リン酸化などによるタンパク活性調節、また発現組織による違いが関連すると考えられ、それぞれ順に述べていく。

ACC の発現量はインスリンによって調節される。このような発現量の変化による調節のことを長期調節といい、数時間から数日を要する。これに対し、ある酵素の活性を基質濃度、アロステリック効果、共有結合修飾(リン酸化)で調節することを短期調節といい、応答時間は 1 分以下である。脂肪酸合成は、一部短期調節を受ける。これには、AMPK (AMP-activated kinase) や PKA (protein kinase A) が関与し、AMPK や PKA によるリン酸化で ACC の活性は低下する。また、AMPK は AMP/ATP の上昇 (つまり、エネルギー不足) を感知し活性化し、PKA はグルカゴンやアドレナリンにより活性化される。よって、絶食によりグルカゴン分泌が上昇・AMP が上昇すると、AMPK や PKA が活性化され、ACC の活性は低下する。また、クエン酸によっては、ACC の活性は上昇する。

ACC2a は、絶食時と再摂食で発現量にあまり差が見られず、発現量から考えると、絶食時にも 酸化が抑制されていることになる。しかし、絶食時には 酸化によりエネルギーを得るため、その可能性は考えにくい。そこで考えられるのは、発現量が多いものの、AMPK や PKA によるリン酸化で、ACC2a の活性が落ちているということである。つまり、ACC2a は発現量の変化(長期調節)よりも、主にリン酸化による活性の変化(短期調節)によって、絶食や再摂食といった変化に应答し

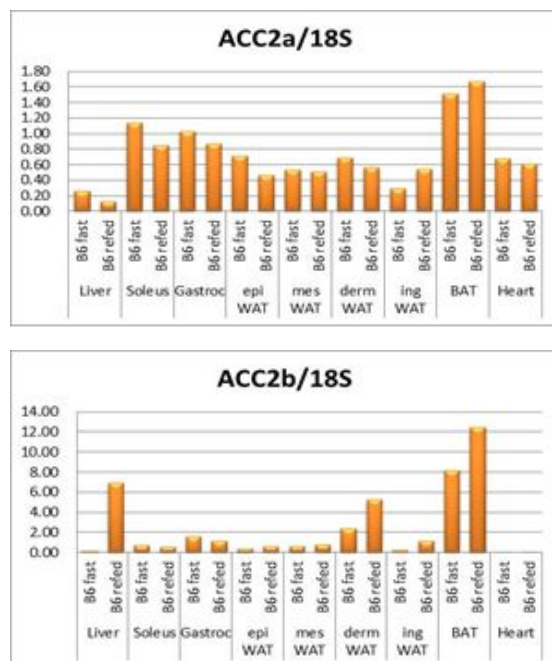


図 3 . 絶食 (fast) と再摂食 (refed) での発現パターン変化

ている可能性が考えられる。次に、ACC2a と ACC2b の発現組織の違いから考察する。ACC2a が主に発現する筋肉では絶食時、酸化が進

み、合成されたアセチル CoA は TCA サイクルに入り、ATP を産生する。一方、ACC2b が主に発現する肝臓では絶食時、TCA サイクルに入るために必要なオキサロ酢酸が糖新生に使われるため、アシル CoA は 酸化の後、TCA サイクルに入らず、ケトン体産生に使われる。このような違いが、ACC2a と ACC2b の絶食・再摂食の発現パターンの違いを生む可能性も考えられた。

以上の検討により、ACC2 には ACC2a と ACC2b が存在し、特に ACC2b は主に肝臓で発現していることが分かったが、これは NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease: 非アルコール性脂肪性肝疾患) の治療の新規アプローチとなりうる。ACC2b のみ抑制できれば、筋肉での 酸化には影響を与えず、肝臓でのみ 酸化を促進することができるためである。NAFLD は、日本人の約 30% が罹患しており、またメタボリックシンドロームやインスリン抵抗性と密接な関係があることが最近明らかになってきた。しかし、現時点で、十分な効果の期待できる治療法は確立されておらず、ACC2b の活性を抑制できれば、それは NAFLD の新たな有効な治療法となりうる。

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 13 件)

すべて査読あり

Bouillon R, Carmeliet G, Lieben L, Watanabe M, Perino A, Auwerx J, Schoonjans K, Verstuyf A. Vitamin D and energy homeostasis-of mice and men. *Nature Rev Endocrinol*. 2013 Nov 19.

Matsuzaki J, Suzuki H, Tsugawa H, Watanabe M, Hossain S, Arai E, Saito Y, Sekine S, Akaike T, Kanai Y, Mukaisho KI, Auwerx J, Hibi T. Bile Acids Increase Levels of microRNAs 221 and 222, Leading to Degradation of CDX2 During Esophageal Carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2013 Aug 8. doi:pii: S0016-5085(13)01154-2.

Kerr TA, Matsumoto Y, Matsumoto H, Xie Y, Hirschberger LL, Stipanuk MH, Anakk S, Moore DD, Watanabe M, Kennedy S, Davidson NO. Cysteine Sulfinic Acid Decarboxylase

Regulation: A Role for FXR and SHP in Murine Hepatic Taurine Metabolism. *Hepatol Res*. 2013 Aug 23.

Ban N, Ozawa Y, Inaba T, Miyake S, Watanabe M, Shinmura K, Tsubota K. Light-dark condition regulates sirtuin mRNA levels in the retina. *Exp Gerontol*. 2013 ; May 3. pii: S0531-5565(13)00108-3.

Kawashima M, Ozawa Y, Shinmura K, Inaba T, Nakamura S, Kawakita T, Watanabe M, Tsubota K. Calorie restriction (CR) and CR mimetics for the prevention and treatment of age-related eye disorders. *Exp Gerontol*. 2013 Apr 12. pii: S0531-5565(13)00100-9.

Mizuno Y, Ninomiya Y, Nakachi Y, Iseki M, Iwasa H, Akita M, Tsukui T, Shimozawa N, Ito C, Toshimori K, Nishimukai M, Hara H, Maeba R, Okazaki T, Alodaib AN, Al Amoudi M, Jacob M, Alkuraya FS, Horai Y, Watanabe M, Motegi H, Wakana S, Noda T, Kurochkin IV, Mizuno Y, Schönbach C, Okazaki Y. Tysnd1 deficiency in mice interferes with the peroxisomal localization of PTS2 enzymes, causing lipid metabolic abnormalities and male infertility. *PLoS Genet*. 2013;9(2):e1003286.

Watanabe M(Corresponding Author), Morimoto M, Houten S, Kaneko-Iwasaki N, Sugizaki T, Horai Y, Matakai C, Sato H, Murahashi K, Arita E, Schoonjans K, Suzuki T, Itoh H and Auwerx J. Bile acid binding resin improves metabolic control through the induction of energy expenditure. *PLoS ONE*. 2012; 7(8): e38285.

Harach T, Pols TW, Nomura M, Maida A, Watanabe M, Auwerx J, Schoonjans K.

TGR5 potentiates GLP-1 secretion in response to anionic exchange resins. *Nature. Sci Rep.* 2012; 2: 430.

Kawashima M, Kawakita T, Inaba T, Okada N, Ito M, Shimmura S, Watanabe M, Shimura K, Tsubota K. Dietary lactoferrin alleviates age-related lacrimal gland dysfunction in mice. *PLoS ONE.* 2012; 7(3): e33148.

Ichikawa R, Takayama T, Yoneno K, Kamada N, Kitazume MT, Higuchi H, Matsuoka K, Watanabe M, Itoh H, Kanai T, Hisamatsu T, Hibi T. Bile acids induce monocyte differentiation toward IL-12 hypo-producing dendritic cells via a TGR5-dependent pathway. *Immunology.* 2012 ; 136 : 153-62.

Watanabe M (Corresponding Author), Horai Y, Houten SM, Morimoto K, Sugizaki T, Arita E, Matakai C, Sato H, Tanigawara Y, Schoonjans K, Itoh H and Auwerx J. Lowering Bile Acid Pool Size with a Synthetic Farnesoid X Receptor (FXR) Agonist Induces Obesity and Diabetes through Reduced Energy Expenditure. *JBiol Chem.* 2011; 286: 26913-26920.

[学会発表](計16件)

渡辺光博, 機能食材の研究 Update 北海道アンチエイジング学会 2014 北海道 (2014. 3. 8)

渡辺光博, 日本消化器学会 胆汁酸代謝調節によるメタボリックシンドローム予防 東京 (2013. 12. 7)

M. Watanabe, Bile acid metabolism for

the control of metabolic syndrome. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting-Nuclear Receptors & Disease. 中国 (2013. 11. 7)

渡辺光博, 肝臓の抗加齢を求めて エネルギー代謝の問題点とその解決に向けて 胆汁酸による肝脂質代謝とエネルギー代謝調節. 日本抗加齢医学会総会 横浜 (2013.06.28~30)

渡辺光博, 健康長寿と食品因子 日本抗加齢医学会総会 横浜(2013.06.28~30))

渡辺光博, 健康長寿における食とサーカディアンリズムの関わり 北海道アンチエイジング学会 2013 北海道 (2013. 3.2)

渡辺光博, 概日リズムと健康 抗加齢学会教育講演 東京 (2012. 12.16)

渡辺光博, 胆汁酸と腸内環境の重要性 慶應義塾生命科学シンポジウム 食と医科学、そして健康長寿 第4回 東京 (2012. 12.5)

渡辺光博, 第34回 胆汁酸代謝調節によるメタボリックシンドローム治療展開 胆汁酸研究会 名古屋 (2012. 12.1)

渡辺光博, 代謝調節によるアンチエイジングへのアプローチ、Bio Japan 2012 横浜 (2012. 10. 10)

Watanabe, M, The NPCL1 inhibitor ezetimibe improves metabolic disease via decreased LXR Activity. Falk Symposium186. Mainz/Germany. (2012. 10. 7) 学会賞受賞 1st prize

Watanabe, M, Bile acid binding resins affect diverse molecules to improve metabolic syndrome. Falk Symposium 184. Vienna/Austria (2012. 9. 15)

渡辺光博, 胆汁酸とメタボエイジング 第5回 東京アンチエイジング学会 東京 (2012. 5. 21)

Watanabe, M, Bile acid metabolism for the control of metabolic disease. 15th International Congress of Endocrinology and 14th European Congress of Endocrinology. Florence (2012. 5. 6)

渡辺光博, 胆汁酸代謝制御によるメタボリックシンドローム創薬, 日本内分泌学会名古屋 (2012. 4.19)

渡辺光博, エネルギー代謝調節における胆汁酸とメタボリックシンドローム治療への可能性, 第1回褐色脂肪シンポジウム 北海道 (2011年6. 18)

〔図書〕(計18件)

渡辺 光博. くらしと胆汁酸 胆汁酸と代謝調節. たんじゅうさん(1348-0189) 2013 12巻2号 20-21 (アークメディア社)

渡辺 光博. アンチエイジングを目指した胆汁酸による代謝調節. アンチ・エイジング医学(1880-1579)9巻4Page562-571(2013.08) (メディカルビュー社)

渡辺 光博. 【肥満症の病態と治療に関する最近の知見-肥満症医療の新しい地平】胆汁酸とエネルギー代謝調節. カレントセラピー 30巻 6号 515 - 521 (2012, 5.15) (株式会社ライフメディコム)

杉崎太一、渡辺光博 【栄養素の受容・情報伝達と代謝制御】胆汁酸の受容体と代謝制御. 内分泌・糖尿病・代謝内科 2012 vol.34 no.4 p328-337 (科学評論社)

杉崎太一、渡辺光博 第15章レスベラトロールの脂肪動員への作用. 書籍「レスベラトロールの基礎と応用」 p153-160 (2012) (シーエムシー出版)

森本耕吉. 渡辺光博【次世代の2型糖尿病薬物治療】胆汁酸吸着レジンの血糖降下作用 (colestimide, colesevelam など). Mebio 2011 : 28巻 125-131 (メディカルビュー社)

森本耕吉. 渡辺光博【腎における内分泌関

連トピックス】胆汁酸のホルモン様作用 メタボリックシンドロームへの関与. 腎と透析 2011 : 71巻 713-720 (東京医学社)

渡辺光博. 伊藤裕【消化管とエネルギー代謝】胆汁酸による代謝調節. Medical Science Digest 2011 : 37巻 269-273 (ニューサイエンス社)

渡辺光博. 胆汁酸代謝を介した肥満及び糖・脂質代謝異常への介入 farnesoid X receptor、TGR5/M-Bar の知見から. 糖尿病 2011 : 54巻 156-160 (日本糖尿病学会)

渡辺光博. 【メタボリックシンドロームと臓器連関】胆汁酸による代謝臓器間連関. Medical Science Digest 2011 : 37巻 52-55 (ニューサイエンス社)

森本耕吉, 渡辺光博【核内受容体とアディポサイエンス】LXR、FXR、PXR、TR とアディポサイエンス コレステロール関連化合物がつなぐ核内受容体群. Adiposcience 2011 : 7巻 118-126 (フジメディカル出版)

渡辺光博. 「糖尿病に効く！胆汁酸健康法」 2013 p1-189 (洋泉社) 一般書籍

〔産業財産権〕
出願状況 (計0件)
取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 光博 (WATANABE Mitsuhiro)
慶應義塾大学 政策・メディア研究科 教授
研究者番号 : 10450842

(2) 研究分担者

森本 耕吉 (MORIMOTO Kohkichi)
慶應義塾大学 医学部 助教
研究者番号 : 10468506