

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350911

研究課題名(和文) 転写因子ChREBPを標的とした生活習慣病の予防法および治療薬の開発

研究課題名(英文) The effect of ChREBP activation in the development of metabolic syndrome

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子ChREBP(carbohydrate response element binding protein)は解糖系の律速酵素のひとつであるL-PKや脂肪酸合成のFAS、ACCの発現調節を行っている。ChREBPによる酵素の発現調節メカニズムはグルコース濃度に応じてChREBPが核内へと移行するわけだが、酸化ストレスにも応答していることを我々は見い出した。

研究成果の概要(英文)：Carbohydrate Response Element Binding protein (ChREBP) regulates glucose and lipid metabolism via regulating glycolytic, gluconeogenic, and lipogenic gene expression. The transcriptional activation of ChREBP is regulated by concentration of glucose, however details of the mechanism for this activation remains unclear. In this study, we observed the effect of oxidative stress on the transcriptional activation of ChREBP.

研究分野：糖尿病

キーワード：ChREBP 酸化ストレス 糖尿病 肥満

1. 研究開始当初の背景

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。過剰に摂取された炭水化物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)は解糖系の律速酵素のひとつである L-PK や脂肪酸合成の FAS、ACC の発現調節を行っている。ChREBP による酵素の発現調節メカニズムはグルコース濃度に応じて ChREBP が核内へと移行するわけだが、そのメカニズムにはリン酸化・脱リン酸化が重要であるとされてきた。その後、我々は ChREBP 結合タンパクである 14-3-3 も核移行に関与していることや、O-GlcNAc による修飾も受けていることを報告してきた。

今回の研究では、高濃度のグルコースに長時間さらされると酸化ストレスによる膵 b 細胞の障害が惹起されるが、その原因は解糖系の亢進によるものだと考えられることに着目した。つまり酸化ストレスと解糖系の亢進との関係を ChREBP を中心に検討することで、膵 b 細胞の障害などを改善しようと試みた。

しかしながら、ChREBP の活性化メカニズムには不明な点が多い。まずは酸化ストレスにより活性化メカニズムにどのような影響が出るのかなどの検討が必要であろう。

2. 研究の目的

メタボリックシンドロームの発症機序には転写因子を含む代謝調節の異常が深く関与しており、転写因子の活性を制御することで、脂質・糖代謝を改善する治療法の開発が進められている。解糖系、脂質合成系の調節酵素、すなわち「肥満酵素」の遺伝子発現を促進する転写因子が ChREBP である。本研究の目的は、高グルコースに暴露されて惹起される酸化ストレスも ChREBP の転写活性化に影響を及ぼすという我々の最近の知見に基づき、その活性化機構の解明を通して『肥満予防や糖尿病のための医

薬品や治療法の開発を目指す』ことにある。

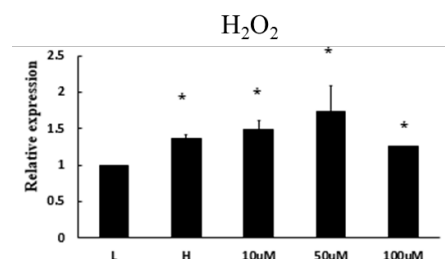
3. 研究の方法

本研究計画では、以下の研究項目を行った。

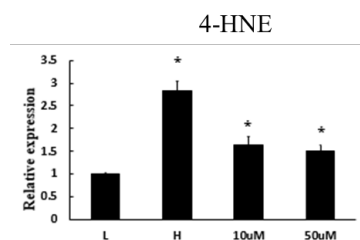
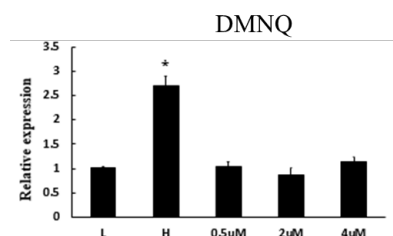
- (1) 酸化ストレス(H_2O_2 及びその他の活性酸素種)による ChREBP の転写活性化機構の解明 培養細胞 (293、HepG2、Hepa1,6 など)に酸化ストレスを与え、ChREBP の発現量などをリアルタイム PCR などの手法により解析する。添加化合物として H_2O_2 、4-HNE、DMNQ などを使用する。
- (2) 酸化ストレスのモデルマウスを使用し固体において L-PK および ChREBP の発現についての検討 モデルマウスとして SOD1 ノックアウトマウスを使用する。本マウスの肝臓における ChREBP の発現量をリアルタイム PCR、ウエスタンブロットティング法などで解析する。糖・脂質代謝物の測定も行う。また糖尿病モデルマウスとの比較検討により酸化ストレス、高血糖、ChREBP(糖代謝)の関係性を探る。
- (3) O-GlcNAc 修飾を受けることの意義とその構造、また修飾部位の特定を行う。
- (4) ChREBP の転写活性化機構の解明によって肥満・糖尿病予防の為の医薬品や治療法の開発につなげる

4. 研究成果

本研究ではまず我々は、培養細胞を用いて酸化ストレスによる ChREBP の発現量を検討した。用いた細胞は 293 細胞と Hepa1,6 細胞である。酸化ストレスとして、培養液に H_2O_2 、DMNQ、4-HNE を添加した。その結果、化合物を添加 1 2 時間後にリアルタイム PCR で ChREBP の RNA 発現量を解析した結果、下図に示すように、 H_2O_2 の添加により、濃度依存的に ChREBP の



発現量が増加した。



しかしながら DMNQ や 4-HNE を添加した場合は、大きな変化は認められなかった。

さらに H₂O₂ の添加による、DNA への結合能や GFP を用いた核内への移行を検討した結果、両方とも確認された。よって H₂O₂ の添加により ChREBP は活性化されることが判明した。

次に我々は、抗酸化酵素のひとつである SOD1 を欠損したマウス (SOD1KO マウス) を用いた検討を行った。本マウスは野生型マウスに比べてより酸化ストレスに暴露されていると考えられている。本マウスは脂肪肝になり肝線維化、肝硬変を経て最終的に肝がんにより死亡すると報告されている。肝臓における ChREBP の発現量や変化量、また酸化ストレスとの関係が分かれば、糖尿病に起因する肝炎の予防や治療につながると予想される。よって SOD1KO マウスの肝臓における ChREBP の発現量を解析したところ、低下していた。これは培養細胞のデータとは異なる結果となった。興味深いことに、SOD1KO マウスと腎臓では ChREBP の発現量は低下を認めた。従って、マウスの臓器別に酸化ストレスの度合いが異なるということと、細胞によってストレス応答が違ふということが複合的に関与し培養細胞とは異なる結果となったのでは、と予想する。糖・脂質代謝の検討では、SOD1KO マウスでは ChREBP 発現量の低下に伴い、解糖系が抑制される傾向になっていた。

今後は、SOD1KO マウスの肝臓でどの程度酸化ストレスがかかっているのか、あるいはどういった活性酸素種が多く発生しているのかを検討し、ChREBP 発現量が個体レベルでも変化するのかを解析する必要がある。今回の研究では、酸化ストレスと ChREBP 発現量との関係性が培養細胞、個体レベルで示せたので、発現量の変化するメカニズムの解明を行うことも今後の課題である。

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 0 件)

[学会発表](計 10 件)

崎山晴彦、江口裕伸、吉原大作、米岡由佳、藤原範子、鈴木敬一郎、酸化ストレスと転写因子 Carbohydrate Response Element-binding Protein (ChREBP) の活性化について、2015 年 6 月 26-27 日、日本 NO 学会、千里ライフサイエンスセンター(大阪府箕面市)

崎山晴彦、米岡由佳、藤原範子、江口裕伸、吉原大作、鈴木敬一郎、SOD1 KO マウスの肝臓におけるコラーゲン蓄積の検討、2015 年 12 月 1-4 日、第 88 回日本生化学会、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

Haruhiko Sakiyama, Hironobu Eguchi, Noriko Fujiwara, Daisaku Yoshihara, and Keiichiro Suzuki

Involvement of the Maillard reaction product of liver fibrosis by oxidative stress

September 1-4, 2015, IMARS, Ito

International Research Center (Tokyo, Bunkyo-ku)

崎山晴彦、米岡由佳、藤原範子、江口裕伸、吉原大作、鈴木敬一郎、酸化ストレスによる肝線維化のメイラード反応生成物の関与、2014 年 11 月 7-8 日、第 24 回日本メイラード学会年会、熊本市国際交流会館(熊本県熊本市)

崎山晴彦、米岡由佳、藤原範子、江口裕伸、吉原大作、鈴木敬一郎、酸化ストレスと転写因子 ChREBP の活性化について、2014 年 10 月 15-18 日、第 87 回日本生化学会、

国立京都国際会館(京都府京都市)

米岡由佳、崎山晴彦、藤原範子、江口裕伸、吉原大作、鈴木敬一郎、SOD1K0 マウスに発症する肝障害への糖・脂質代謝の関与の検討、2014年10月15-18日、第87回日本生化学会、国立京都国際会館(京都府京都市)

崎山晴彦、米岡由佳、藤原範子、江口裕伸、吉原大作、鈴木敬一郎、2014年9月4-5日、第67回日本酸化ストレス学会、同志社大学良心館(京都府京都市)

米岡由佳、崎山晴彦、藤原範子、江口裕伸、吉原大作、鈴木敬一郎、糖化と酸化ストレスによる脂質代謝異常、2013年11月29日、第24回日本メイラード学会年会、ナレッジキャピタルコングレコンベンションセンター(大阪府大阪市)

崎山晴彦、江口裕伸、吉原大作、米岡由佳、藤原範子、鈴木敬一郎、SOD1K0 マウスの肝臓における糖および脂質代謝の検討、2013年9月11-13日、第86回日本生化学会大会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

米岡由佳、崎山晴彦、藤原範子、江口裕伸、吉原大作、鈴木敬一郎、SOD1K0 マウスの肝臓における糖および脂質代謝の検討、2013年5月18日、第60回生化学会近畿支部例会、大阪大学医学部吹田キャンパス(大阪府吹田市)

〔図書〕(計 4 件)

鈴木敬一郎 他、NAP limited、活性酸素の本当の姿、2014、176

(3,9-13,14-34,35,56,80,95,135,147,170)

アンチエイジングのための100の質問 太田博明監修、山岸晶一 編集 崎山晴彦、鈴木敬一郎、メディカルレビュー社、2014、228 (22-25)

Systems of biology of free radicals and anti-oxidants、Eguchi H., Sakiyama H., Yoshihara D., Fujiwara N., Suzuki K.、Springer-Verlag、2014、4178(3967-3985)

酸化ストレスの医学、吉原大作、藤原範子、鈴木敬一郎、診断と治療社、2014、456(21-29)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況(計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

藤原 範子 (FUJIWARA, Noriko)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 10368532

鈴木 敬一郎 (SUZUKI, Keiichiro)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 70221322

江口 裕伸 (EGUCHI, Hironobu)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 60351798

吉原 大作 (YOSHIHARA, Daisaku)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 00567266