

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2011～2014

課題番号：23126101

研究課題名(和文)新規糖尿病感受性遺伝子による脂肪蓄積制御機構の解明とエピゲノムの意義

研究課題名(英文) Regulation of lipid accumulation by new diabetes susceptible genes and the role of the epigenome

研究代表者

脇 裕典(Waki, Hironori)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：00466765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 53,400,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病・肥満疾患感受性遺伝子としてゲノムワイド関連解析で同定されたCDKAL1は、その発現が脂肪細胞の分化や肥大化や肥満度により制御されており、脂肪蓄積の抑制因子であることを明らかにした。脂肪細胞のアディポネクチンの転写に関わるPPAR のリン酸化との明らかな関連を認めなかったが、PPAR や脂肪分化の抑制因子であるWnt、カテニン経路を活性化した。肥満・脂肪細胞肥大におけるアディポネクチン低下に関わるプロモーター領域を同定した。その領域に転写因子Heb1が結合し、転写制御に関わることを明らかにした。肥満に伴う脂肪細胞内の代謝ストレスシグナルが、Heb1の発現を制御していた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that expression of CDKAL1 - one of susceptible genes for type 2 diabetes and obesity identified in genome-wide association studies - is regulated during adipocyte differentiation, hypertrophy and adiposity. Functionally, CDKAL1 works as a factor that suppresses adipocyte differentiation and lipid accumulation. Mechanistically, we found that CDKAL1 stimulates the Wnt/ -catenin pathway, which suppresses adipocyte differentiation. We also mapped a promoter region responsible for the suppression of adiponectin gene expression in adipocyte hypertrophy. A transcription factor named Heb1 binds and regulates transcription. Expression level of Heb1 itself is regulated by various metabolic stress signals in adipocytes.

研究分野：糖尿病・代謝内科

キーワード：糖尿病 肥満 疾患感受性遺伝子 転写

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームは、我国の死因一位の心血管疾患の主因となっている。この根本的病態は肥満による脂肪細胞肥大とそれに伴うインスリン抵抗性と考えられ、その原因の解明とそれに立脚した根本的な予防や治療法の確立が極めて重要である。

肥満により肥大化した脂肪細胞におけるアディポネクチンの発現・分泌の低下が、メタボリックシンドロームの病態の形成に重要な役割を果たしている。我々はこれまで肥満により肥大化した脂肪細胞におけるアディポネクチン(Ad)の発現・分泌の低下、また標的臓器の受容体 AdipoR の発現の低下が、肥満におけるインスリン抵抗性の増大や、動脈硬化の発症などメタボリックシンドロームの病態の形成に重要な役割を果たしていることを、またアディポネクチンの補充が AMPK や PPAR α 経路を活性化することでこれらの病態の治療手段となる事を示した。しかしながら肥満におけるアディポネクチンの転写量の減少の詳細な分子メカニズムは明らかでない。

脂肪細胞の分化や肥大化と全身の糖脂質エネルギー代謝は密接な関係がある。特に脂肪細胞分化や脂肪蓄積、アディポネクチンなどの脂肪特異的遺伝子の転写の制御において、核内受容体 PPAR γ は重要な役割を果たす。PPAR γ は脂肪細胞分化において必要十分なマスターレギュレーターであり、PPAR γ アゴニストは小型脂肪細胞を増加させ、脂肪細胞におけるアディポネクチンを増加させ、炎症を抑制することで、全身の糖代謝を改善させる。

疾患に関わる遺伝子としてこれまで知られるアディポネクチンや PPAR γ などに加えて、特にゲノムワイド関連解析などのゲノム科学の発展で新しい疾患感受性遺伝子が報告されている。これらの遺伝子は疾患になりやすさの遺伝的な要因を規定するものとして重要と考えられるが、それぞれの遺伝子がどのような機序で疾患を引き起こすかについてはまだ不明であることが多い。2型糖尿病および肥満の疾患感受性遺伝子として報告された CDKAL1 について、これまで膵 β 細胞からのインスリン分泌における役割が示唆されているが、脂肪細胞分化や PPAR γ における転写・エピジェネティックな制御作用はこれまで明らかでなかった。

2. 研究の目的

2型糖尿病の疾患感受性遺伝子として報告された CDKAL1 は、肥満の疾患感受性遺伝子でもあることが示唆されているが、脂肪細胞分化や脂肪蓄積における役割は明らかでない。そこで、CDKAL1 が、脂肪細胞分化・脂肪蓄積に対して役割を果たしているか、について、またその役割の分子メカニズムと病態生理学的意義を転写制御の観点から明らかにする。また、CDKAL1 は cyclin dependent

kinase (CDK)5 の活性を制御する分子 CDK5rap1 とのドメイン構造上の類似性がある。CDK5 は肥満糖尿病の治療薬の抗糖尿病作用に重要な役割を果たす PPAR γ の Ser273 のリン酸化を促進するキナーゼである。CDKAL1 が CDK5 の活性を制御する活性があるかどうか検討する。

高脂肪食などによる環境因子により惹起されるメタボリックシンドロームの病態形成において、アディポネクチン遺伝子の発現や分泌の低下は重要な役割を果たす。アディポネクチンの転写抑制のメカニズムに関わる因子を転写制御の観点から明らかにする。その因子が持つ病態生理学的な役割について検討する。

3. 研究の方法

3T3-L1 脂肪細胞や肥満状態において、CDKAL1 遺伝子の発現がどのように制御されるかを検討する。また、レトロウイルスによる過剰発現系や shRNA/ siRNA を用いたノックダウンの実験系を用いて、CDKAL1 が脂肪細胞分化や脂肪蓄積にどのような作用を持っているかを検討する。マスターレギュレーターである PPAR γ や C/EBP などの転写因子群による転写カスケードへの制御作用を検討する。CDKAL1 は構造上複数のドメインを有しているため、各ドメインの欠失変異体を作成して脂肪細胞分化抑制に必要な領域を同定する。CDKAL1 が CDK5 の活性を制御する活性があるかどうかは、共沈降法を用いたタンパク-タンパク相互作用、Western プロット法で検討する。個体レベルでの作用を検討するために、aP2 プロモーターを用いたトランスジェニックおよび、ノックアウトマウスのコンストラクトを作成し、マウスを作成する。

肥満におけるアディポネクチン遺伝子の転写の抑制のメカニズムを検討するために、3T3-L1 脂肪細胞過肥大の実験系において、遺伝子上流のプロモーター解析を検討する。さまざまな deletion コンストラクトなどを用い、プロモーター内の転写抑制性に作用する領域を同定する。結合因子の解析にはゲルシフト解析を行う。結合因子が脂肪細胞分化や脂肪蓄積の制御作用を有するかどうかは、3T3-L1 脂肪細胞のレトロウイルス感染系による過剰発現および RNAi によるノックダウンにより検討する。肥満状態の脂肪組織や、各種細胞内ストレスシグナルについて、その因子の発現量について検討する。

4. 研究成果

CDKAL1 遺伝子の発現は、3T3-L1 細胞の分化誘導に伴い、経時的に発現が上昇した。長期培養による肥大化ではアディポネクチンと同様に発現が減少した。3T3-L1 細胞にレトロウイルスを用いて CDKAL1 を過剰発現させると脂肪細胞分化が顕著に抑制された。CDKAL1 過剰発現 3T3-L1 細胞において、脂肪細胞分化の初期を制御する C/EBP β 、

C/EBP δ の一過的な発現上昇は対照群と比べて差異がない一方、分化後期に認められるC/EBP α およびPPAR γ やaP2やアディポネクチンなどの脂肪細胞特異的な遺伝子発現が著明に抑制された。その抑制作用はPPAR γ アゴニストでは解除できないがPPAR γ の過剰発現でレスキューされた。部位欠損変異の実験では、N末端側を欠損するとその作用が著明に減弱した。点変異型CDKAL1の実験ではN末端のRadical SAM domainが重要であることが示唆された。CDKAL1はcyclin dependent kinase (CDK)5の活性を制御する分子CDK5rap1とのドメイン構造上の類似性がある。CDK5は肥満糖尿病の治療薬の抗糖尿病作用に重要な役割を果たすPPARのSer273のリン酸化を促進するキナーゼである。CDKAL1がCDK5の活性を制御する活性があるかどうかを、共沈降法を用いたタンパク-タンパク相互作用などで検討したが、CDKAL1とCDK5との明らかな関連を示唆するデータは得られなかった。さらにPPAR γ を抑制する機構を検討する目的でWnt経路におけるCDKAL1の作用を検討したところ、CDKAL1および β カテニンおよび核内の β カテニンのタンパク量を増加させ、標的遺伝子を誘導することから、Cdkal1はWnt経路を介して脂肪細胞分化を負に制御することが示唆された。また、aP2プロモーターを用いた脂肪細胞におけるCDKAL1の過剰発現マウスでは、異なる程度のコピー数を持ち、組織特異的にCDKAL1は過剰発現する複数のラインを確立した。

肥満・脂肪細胞肥大における低アディポネクチン血症の原因であるアディポネクチン遺伝子の転写の抑制のメカニズムを検討するために、3T3-L1脂肪細胞過肥大の実験系において、遺伝子上流のプロモーター解析により検討し、肥大化脂肪細胞において転写を抑制的に作用する領域を同定した。ゲルシフト解析で転写因子Heb1が結合し、3T3-L1脂肪細胞のレトロウイルス感染系による過剰発現およびRNAiによるノックダウンにより、Heb1がこの領域の転写活性化を促進し、実際にアディポネクチン遺伝子の転写を抑制した。肥大脂肪細胞モデルに加えて、肥満の出るマウスの白色脂肪組織においても、Heb1遺伝子の発現量は減少していた。また、阻害剤の検討から、肥満に伴う脂肪細胞内の代謝ストレスシグナルがHeb1遺伝子の転写制御に関わることが示唆された。

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7件)

脇裕典, 山内敏正, 門脇孝. 褐色脂肪細胞と白色脂肪細胞【基礎編】白色脂肪細胞のエピジェネティクス 医学のあゆみ 査読無し 242 (12) 2012年9月 p918-923

脇裕典, 山内敏正, 門脇孝. PPAR γ をめぐる基礎研究の進展 - エピゲノム解析をはじめとして期待されるチアゾリジン薬(改訂版) 査読無し 2013年5月 p309-321

脇裕典, 山内敏正, 門脇孝. 核内受容体PPARと脂肪酸 月刊内分泌・糖尿病・代謝内科 査読無し 36 (6) 2013年6月 p558-564

脇裕典, 山内敏正, 門脇孝. 糖尿病と遺伝子4. 糖尿病とエピゲノム 糖尿病 査読無し 57 (2) 2014年2月 p91-93

脇裕典, 山内敏正, 門脇孝. エピゲノムと肥満症 医学のあゆみ (第5土曜特集 肥満の医学: 臨床と研究の最先端) 査読無し 250 (9) 2014年8月 p797-801

中村正裕, 脇裕典, III プロトコール エピゲノム C. クロマチンアクセシビリティ解析 2. オープンクロマチンを同定する FAIRE-seq 実験医学別冊 次世代シーケンス解析スタンダード 査読無し 2014年9月 p195-203

脇裕典. 褐色細胞組織の機能制御とその破綻 医学のあゆみ (第5土曜特集 糖尿病のすべて 基礎研究の最前線) 査読無し 252 (5) 2015年1月 p415-419

〔学会発表〕(計11件)

武和巳, 脇裕典, 山内敏正, 孫威, 岩部真人, 岩部美紀, 植木浩二郎, 門脇孝
2型糖尿病遺伝子CDKAL1の脂肪細胞における役割の解明
第54回日本糖尿病学会年次学術集会、2011年5月19日、札幌、日本

Kazumi Take, Hironori Waki, Toshimasa Yamauchi, Wei Sun, Jing Yu, Masato Iwabu, Miki Okada-Iwabu, Kohjiro Ueki, Takashi Kadowaki

CDK5 Regulatory Subunit-Associated Protein 1-Like 1 (Cdkal1) Negatively Regulates Adipocyte Differentiation through Activation of the Wnt Pathway
Keystone Symposia, Adipose Tissue Biology (J5) (2013.1.27-2.1, Keystone) 米国

脇裕典, 武和巳, 山内敏正, 孫威, 岩部真人, 岩部美紀, 植木浩二郎, 門脇孝
Cdkal1はWnt経路を介して脂肪細胞分化を抑制する
第56回日本糖尿病学会年次学術総会、2013年5月16日-18日、熊本、日本

Kazumi Take, Hironori Waki, Toshimasa Yamauchi, Wei Sun, Jing Yu, Masato Iwabu, Miki Okada-Iwabu, Kohjiro Ueki, Takashi

Kadowaki.
CDK5 Regulatory Subunit-Associated Protein 1-Like 1 (Cdkal1) Negatively Regulates Adipocyte Differentiation through Activation of the Wnt Pathway
American Diabetes Association 73rd Scientific Sessions (2013.6.23, Chicago, IL) (poster)
Cdkal1 は Wnt 経路を介して脂肪細胞分化を抑制する

武和巳、脇裕典、山内敏正、孫 威、岩部真人、岩部美紀、植木浩二郎、門脇孝
Cdkal1 は Wnt 経路を介して脂肪細胞分化を抑制する
第 18 回アディポサイエンス・シンポジウム、2013 年 8 月、大阪、日本

孫威、武和巳、脇裕典、山内敏正、岩部真人、岩部美紀、植木 浩二郎、門脇 孝
Cdkal1 は Wnt 経路を介して脂肪細胞分化を抑制する
第 34 回日本肥満学会年次学術集会、2013 年 10 月、東京、日本

富岡恵、武和巳、孫威、脇裕典、山内敏正、于静、青山倫久、平池勇雄、岩部真人、岩部美紀、植木浩二郎、門脇孝
Cdkal1 は Wnt 経路を介して脂肪細胞分化を抑制する
第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、2014 年 5 月、大阪、日本

富岡恵、武和巳、孫威、脇裕典、于静、青山倫久、平池勇雄、岩部真人、岩部美紀、植木浩二郎、山内敏正、門脇孝
Cdkal1 は Wnt 経路を介して脂肪細胞分化を抑制する
第 35 回日本肥満学会、2014 年 10 月、宮崎、日本

脇裕典、平池勇雄、于静、中村正裕、青山倫久、孫威、鈴木顕、若林賢一、井上剛、武和巳、富岡恵、三宅加奈、廣田雄輔、岩部真人、岩部美紀、杉山拓也、和田洋一郎、植木浩二郎、堤修一、油谷浩幸、山内敏正、門脇孝
白色・褐色脂肪細胞におけるクロマチン構造変化とエピゲノム制御の役割
第 35 回日本肥満学会、2014 年 10 月、宮崎、日本

脇裕典
白色・褐色脂肪細胞におけるクロマチン構造とエピゲノム制御の役割
第 49 回 糖尿病学の進歩、2015 年 2 月 20 日、岡山、日本

孫 威、武 和巳、脇裕典、于 静、富岡 恵、青山 倫久、平池 勇雄、岩部真人、岩部美紀、植木 浩二郎、山内敏正、門脇 孝
Cdkal1 は Wnt 経路を介して脂肪細胞分化を

抑制する
第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、2014 年 5 月、大阪、日本

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
特になし

6. 研究組織
(1)研究代表者
脇 裕典 (WAKI, Hironori)
東京大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号：00466765

(2)研究分担者
岩部 真人 (IWABU, Masato)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：30557236

岩部 美紀 (IWABU, Miki)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：70392529

(3)連携研究者
山内 敏正 (YAMAUCHI, Toshimasa)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：40372370