

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：12301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06668

研究課題名(和文) 生体内の代謝組織におけるHELZ2の核内受容体を介する機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of HELZ2 for nuclear receptor in vivo

研究代表者

吉野 聡 (YOSHINO, SATOSHI)

群馬大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90786089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：HELZ2のノックアウト(KO)マウスは、肥満抵抗性および脂肪肝抵抗性を示す。しかし、HELZ2の脂肪組織(白色、褐色)での機能などは不明であり、HELZ2の生体内の代謝組織における機能解析を行った。脂肪組織において、KOマウスではピオグリタゾンの効果は減弱していた。またPPAR $\gamma$ のターゲット遺伝子の発現増加を認めなかった。急性寒冷暴露試験では、KOマウスはWTと比較して急性寒冷暴露において体温低下が抑制されていた。マウス肝臓において、Helz2遺伝子は明期に発現が上昇することを確認した。またBATにおいても明期の発現増加傾向を認めた。WATにおいては明期、暗期とは別の発現変化を認めた。

研究成果の概要(英文)：HELZ2 KO mice show the resistance for obesity and fatty liver. However, the function of HELZ 2 in adipose tissue (white adipose tissue, brown adipose tissue) is unknown, and functional analysis of HELZ2 in metabolic tissues was carried out in vivo. In adipose tissue, the effect of the Pioglitazone was attenuated in KO mice. In addition, the expression levels of PPAR $\gamma$  target genes were not increased in Ko mice. In the acute cold exposure test, the body temperature was not decreased in KO mice compared with WT at acute cold exposure. In the mouse liver, it was confirmed that expression level of Helz2 gene was increased in the light phase period. In WAT, expression changes other than the light and dark periods were observed.

研究分野：内分泌糖尿病、肥満代謝学

キーワード：肥満 脂肪組織 核内受容体 転写因子

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 核内受容体 PPAR は、リガンド依存性にその転写を活性化する転写因子であり、その転写活性化には転写共役因子を必要とする。近年私達は、酵母ツーハイブリッド法を用いて PPAR に結合する新規共役因子 HELZ2(helicase with zinc finger 2, transcriptional coactivator)をクローニングし、HELZ2 が培養細胞系において PPAR family の転写活性型共役因子として機能することを報告した(Endocrinology,2006)。

さらに、HELZ2 に結合する蛋白として Mediator 複合体の構成蛋白である thyroid hormone receptor associated protein 3(THRAP3)同定し、THRAP3 が HELZ2 と共役して白色脂肪細胞分化において重要な働きを示すことを報告した(Mol Endocrinol. 2013)。

また近年他のグループから HELZ2 が、ヒト C 型肝炎ウイルス治療薬であるインターフェロンの抗ウイルス作用に関与することも報告されている(GASTROENTEROLOGY 2013)。

(2) 生体内における HELZ2 の詳細な生理的機能は明らかではなかった。そこで、私達は世界に先駆けて HELZ2 ノックアウト(KO)マウスの樹立に成功し、本マウスにおける標準餌 (ND)、あるいは高脂肪食(HFD)下における糖、脂質代謝異常の有無について詳細な解析を行った。その結果、HELZ2 KO マウスは HFD 負荷時に、肝臓におけるレプチン受容体の転写制御を介して肥満抵抗性および脂肪肝抵抗性を示すことを見出し報告した(Endocrinology 2014)。

しかし、HELZ2 の生体内における各代謝組織での核内受容体に関する機能は明らかになっていない。さらに、今までの研究結果より、HELZ2 は肥満や糖尿病の発症や、治療の効果に関与する可能性が高く、HELZ2 の機能解析は肥満や糖尿病治療の臨床に応用できると考えられた。

### 2. 研究の目的

そこで、いままでの HELZ2 の機能解析において明らかになっていないことを念頭に、(1) HELZ2 が核内受容体である PPAR $\alpha$  や PPAR $\gamma$  の転写共役因子としてクローニングされており、培養細胞系において他の核内受容体とも共役する可能性が示唆されていること、

(2) ノックアウトマウスの解析では、核内受容体との関わりがまだ明らかでなく、肝臓や脂肪細胞における核内受容体の関与する機能解析が必要であること、

(3) HELZ2 がサーカディアンリズムに関与する可能性があること、  
以上より生体内の肝臓および脂肪組織におけるさらなる HELZ2 の機能解析を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) ND および HFD 負荷した HELZ2 KO マウスに TZD を投与し表現型を解析する。各種組織から責任臓器を見つけその組織における遺伝子発現を解析する。

(2) ND および HFD 負荷した HELZ2 KO マウスに寒冷刺激を与え表現型を確認する。

(3) ND および HFD 負荷したワイルドタイプ(WT)マウスの肝臓および脂肪組織における HELZ2 遺伝子発現変化の日内変動を qPCR で確認する。

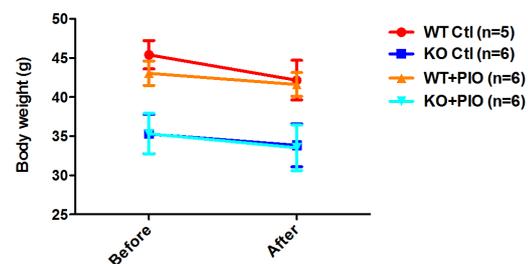
### 4. 研究成果

(1) HFD 下における HELZ2 KO マウスは 16 週令以降より、WT マウスと比較して肥満抵抗性および良好な耐糖能を示すため、18 週令前後の DN 負荷および HFD 負荷行った WT および HELZ2 KO マウスに PPAR のリガンドであり、インスリン抵抗性改善薬として糖尿病治療に使用されているピオグリタゾン(PIO)を 1 週間腹腔内投与した。投与後のマウスの耐糖能およびインスリン感受性を IPGTT, ITT を行い確認した。その結果、ND 負荷したマウスでは、WT, KO マウス間で体重変化および脂肪重量変化は認めなかった。

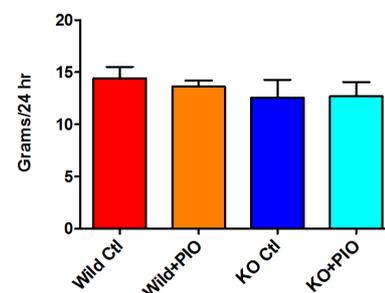
糖負荷試験では、両軍ともピオグリタゾンの効果と思われる血糖値の低下を認めたが、HELZ2 KO マウスではその効果は減弱していた。インスリン負荷試験では結果に有意差を認めなかった。これは、ND 負荷でのマウスでは、インスリン抵抗性は少なく空腹時血糖値がもともと高値でないためと考えられた。

HFD 負荷した HELZ2 KO マウスはもともと WT と比較し肥満抵抗性を示すが、ピオグリタゾン投与で WT, KO マウス間で体重変化および摂餌量に有意差を認めなかった(図 1、2)。

ピオグリタゾン投与後の体重変化(図 1)

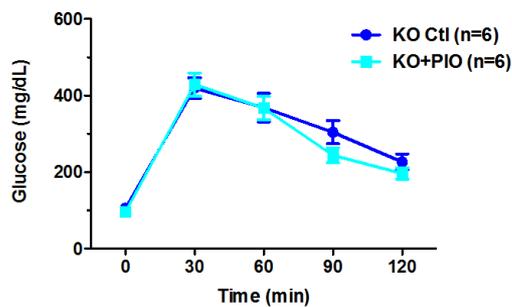
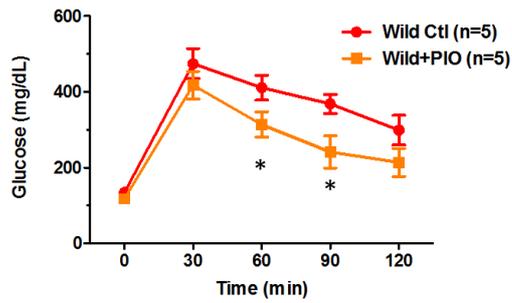


ピオグリタゾン投与後の摂餌量(図 2)



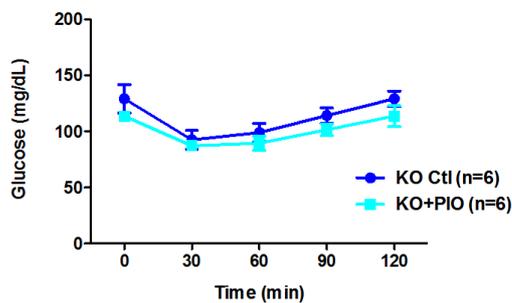
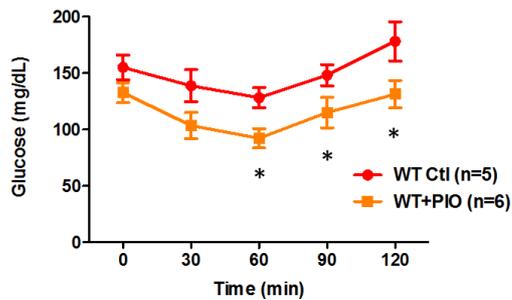
糖負荷試験、インスリン負荷試験ともに、KO マウスでもピオグリタゾンの血糖改善効果は認められたが、その効果は WT の効果と比較し減弱していた (図3, 4)。

糖負荷試験 (図3)



mean ± SEM, \* p<0.05

インスリン負荷試験 (図4)

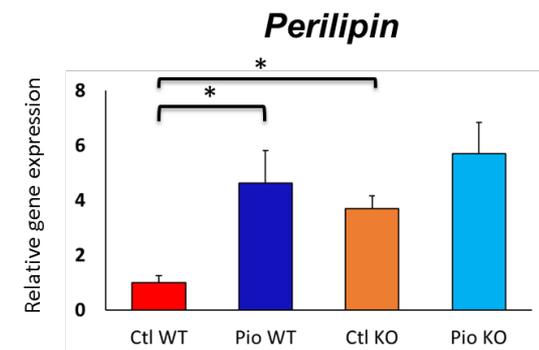
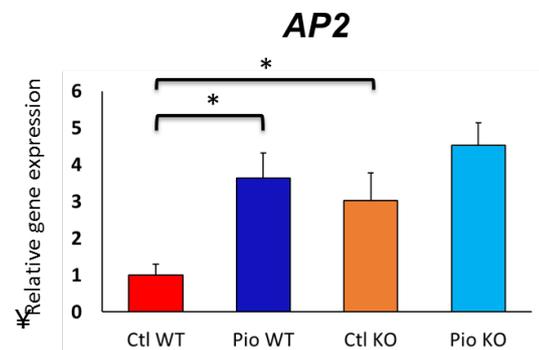
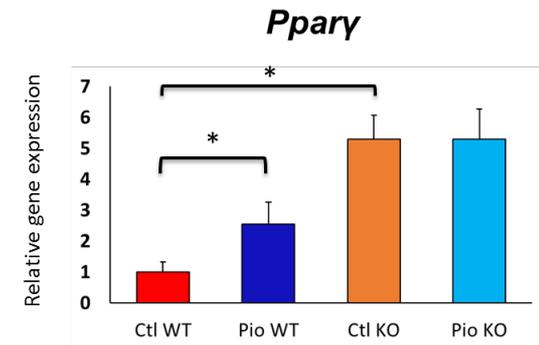


mean ± SEM, \* p<0.05

これらのマウスの性腺周囲の脂肪組織より mRNA を抽出し、PPAR やそのターゲット遺伝子の発現変化を qPCR 法で確認した。結果は WT マウスでは PPAR およびそのターゲ

ット遺伝子である、PERLILIPIN 遺伝子や AP2 遺伝子等の発現増加を認めたが、HELZ2 KO マウスではその増加を認めなかった (図5)。

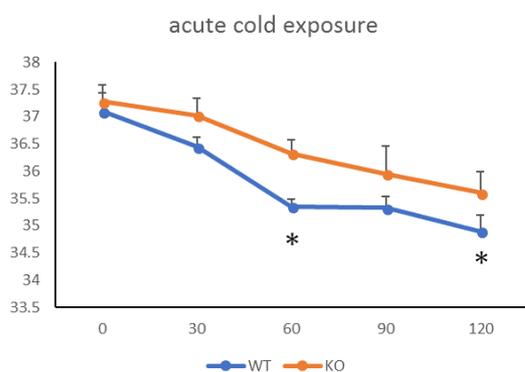
脂肪組織での遺伝子発現変化 (図5)



これらの結果はおおむね予想通りであり、HELZ2 が生体内の HELZ2 が生体内の脂肪組織において PPAR の転写共役因子として働くことが確認できた。

(2) ND 負荷下における WT および HELZ2 KO マウスに、暗期において 4 の寒冷暴露を 4 時間行う急性寒冷暴露試験を行った。KO マウスでは、WT と比較して急性寒冷暴露において体温低下が抑制されていた (図6)。この結果から、HELZ2 は生体内において熱産生に関与する遺伝子であることが確認された。また PPAR を含む PPAR ファミリーおよびそのターゲット遺伝子は熱産生に関与することが報告されており、HELZ2 は PPAR などを通して熱産生に関与することと考えられた。

急性寒冷暴露試験 (図6)



(3) ND 負荷下における WT および HELZ2 KO マウスの肝臓、白色脂肪組織、褐色脂肪組織における HELZ2 の mRNA 発現量の変化の日内変動について qPCR 法を用いて確認した。

マウス肝臓において、Helz2 遺伝子は明期に発現が上昇することを確認した。また BAT においても明期の発現増加傾向を認めた。WAT においては明期、暗期とは別の発現変化を認めた (図7)

マウスにおける Helz2 の遺伝子発現は肝臓で多く、肝臓での Helz2 の欠失が抗肥満に関係することを報告しており、肝臓における Helz2 の日内変動が代謝においても機能があらることが示唆された。

HELZ2 遺伝子の日内変動 (図7)



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](0件)

[学会発表](3件)

吉野 聡

転写因子 HELZ2 によるレプチン受容体遺伝子発現調節機構の解析  
第37回日本肥満学会学術集会  
2016年

Satoshi Yoshino

Protection Against High-fat Diet Induced Obesity in Helz2-Deficient Mice by Enhancing Hepatic Leptin Sensitivity, Despite Central Leptin Resistance  
The 9th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes  
2017

吉野 聡

PPAR の新規転写共役因子である HELZ2 ノックアウト (KO) マウスにおけるチアゾリジン系薬の効果の検討  
第38回日本肥満学会学術集会  
2017年

[図書](計0件)

[産業財産権

出願状況(0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉野 聡 (YOSHINO, SATOSHI)  
群馬大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号: 90786089