

令和元年6月6日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09741

研究課題名(和文) 肝糖代謝の新規調節メカニズムに基づいた創薬基盤の開発

研究課題名(英文) Development of drug discovery platform based on novel regulatory mechanism of hepatic glucose metabolism

研究代表者

滝澤 壮一 (TAKIZAWA, Soichi)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：80456467

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)：高脂肪食で飼育した肝臓特異的プロスタシン過剰発現マウス(LTgマウス)および野生型マウス(WTマウス)の体重、血糖値、血清脂質を経時的に測定し評価した結果、LTgマウスで耐糖能およびインスリン抵抗性の改善、脂肪肝の軽減、血清LDL-コレステロール値の低下していることが確認された。プロスタシンの新たな標的因子を検索するために、肝臓からそれぞれのマウスからRNAを抽出し、DNAマイクロアレイを施行したところ、脂肪酸の取り込みを担う膜蛋白であるCD36(cluster of differentiation 36)がLTgマウスの肝細胞において低下していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満人口の増加と、それに伴う糖・脂質代謝異常は世界的な健康課題となっており、このことは本邦においても例外ではない。肝臓は糖・脂質代謝の中心的役割を担っているが、肥満に伴う肝臓への脂肪蓄積とインスリン抵抗性は糖・脂質代謝異常における重要な病態基盤である。本研究により、プロスタシンがCD36の発現を低下させ、脂肪肝及び糖・脂質代謝異常の改善に寄与している可能性が示唆された。本研究をもとに、プロスタシン関連の新規治療薬が創出された際には、現在の臨床的課題である、肥満人口の増加と、それに伴う糖・脂質代謝異常症患者の増加に対する、肝臓を標的とした効果的な治療法につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：As a result of measuring the weight, the blood sugar level of a liver-specific prostaticin overexpression mouse (LTg mouse) and a wild type mouse (WT mouse) which was fed a high-fat diet, it was confirmed with LTg mouse glucose tolerance and insulin-resistant improvement, reduction of the fatty liver, and decrease of the serum LDL cholesterol level. After extracting RNA from each mouse liver to search a new target factor of prostaticin and analysing by DNA microarray, it became clear that a cell membrane protein CD36(cluster of differentiation 36) which carried the uptake of the fatty acid decreased in the hepatocytes of the LTg mouse.

研究分野：糖尿病

キーワード：糖尿病 脂肪肝 インスリン抵抗性 プロスタシン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プロスタシンは 1994 年に Chao のグループが新規セリンプロテアーゼの精製を目指し、ヒト精液より精製した分子量 40kDa のセリンプロテアーゼである (Yu JX, et al. J Biol Chem 1994)。我々はプロスタシンが腎臓において上皮型 Na チャネル(ENaC)を活性化し、生体内の Na 代謝に大きく関与していることを報告してきた (Uchimura K, et al. Am J Physiol Renal Physiol 2012)。しかし、その他の機能については不明な点が多く残されていた。そこで我々は ENaC の発現が認められないにもかかわらず、腎臓とほぼ同等にプロスタシンが発現している肝臓に着目し、プロスタシンの新規生理的機能の解明を目指した。肝臓におけるプロスタシンの発現は摂食によって約 10 倍増加することが判明し、プロスタシンは代謝に関与しているのではないかと予想し、肝臓特異的プロスタシン遺伝子欠損(LK0)マウスを作製した。その表現型を観察したところ、LK0 マウスはコントロールマウスと比較して体重に変化はみられないが、著明な耐糖能異常を呈した。次に肝臓におけるプロスタシンの発現低下による耐糖能異常発症の機序についてマイクロアレイなどの網羅的な解析を行ったところ、Toll 様受容体 4(TLR4)がプロスタシンの新規標的因子であることが判明した。さらに我々はプロスタシンがヒトおよびマウスで保存されている TLR4 の 560、561 番目のリジン残基を切断することで、その発現をタンパクレベルで制御していることを明らかにした (Uchimura K, et al. Nat Commun 2014)。摂食によって増加するプロスタシンは TLR4 の発現を抑制し、門脈から肝臓へ流入するリポ多糖(LPS)や飽和脂肪酸などのリガンドによって惹起される過剰な炎症反応を予防していることが想定される。さらに、飽食・肥満では小胞体ストレスを介して肝臓のプロスタシン発現が低下しており、プロスタシンによる慢性炎症防御機構の破綻をきたしてインスリン抵抗性へ進展するという病態メカニズムを明らかにすることができた。これらの結果は肝臓におけるプロスタシンの発現増加・活性亢進がインスリン抵抗性を改善する効果を有する可能性を示唆している。プロスタシンの発現および活性調節因子としては、アルドステロンや TGF- β 1 などの液性因子、内因性のセリンプロテアーゼやそのインヒビター、SREBP-1c などの転写因子、DNA メチル化によるエピジェネティックな機構、ER ストレスなどが報告されているが、*in vivo* における生理的機能については詳細な検討がなされていない。そのため本研究により肝臓のプロスタシン発現増加・活性亢進のメカニズムを解明することで糖尿病に対する新規創薬ターゲットとして期待できると考えられる。

2. 研究の目的

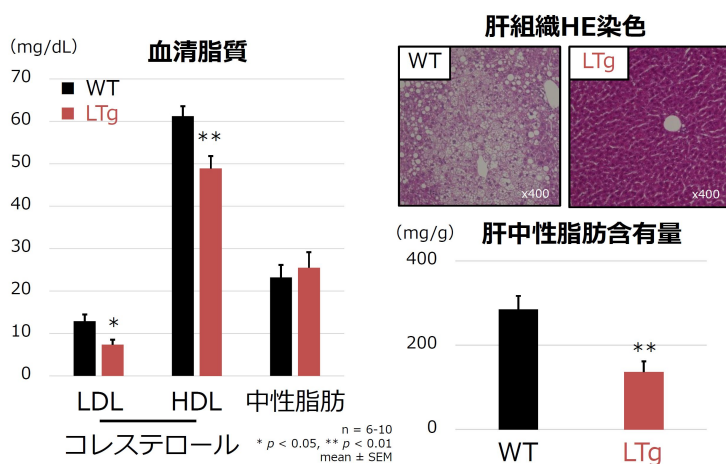
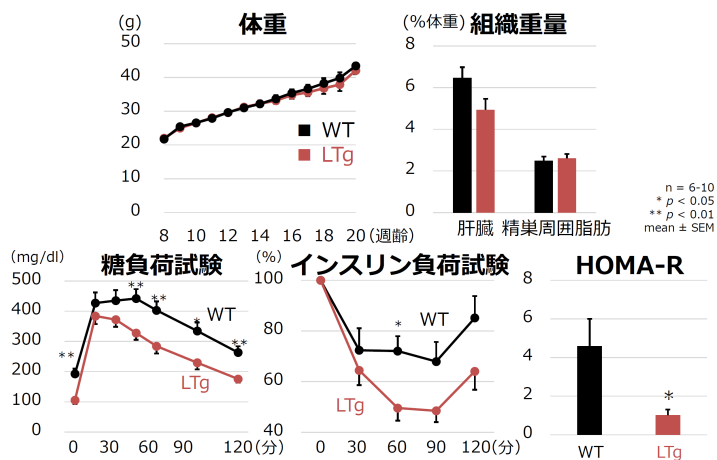
本研究の目的は肝臓特異的プロスタシン過剰発現(LTg)マウスを用いて糖尿病・脂肪肝の発症抑制効果を解析し、肝臓のプロスタシン発現増加・活性亢進を介した糖尿病・脂肪肝に対する新規治療法の開発の分子的基盤を構築することである。

3. 研究の方法

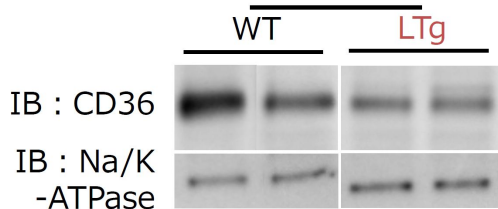
肝臓特異的 PRSS8 過剰発現(LTg)マウスを作成し、高脂肪食給餌下において体重、血糖値、血清脂質を経時的に測定し、耐糖能・糖新生の評価のためブドウ糖負荷試験、インスリン負荷試験、ピルビン酸負荷試験を施行する。さらには、高脂肪食給餌下 LTg マウスおよび野生型マウスの肝臓からそれぞれ RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを行い、糖尿病発症抑制に関わる新たな標的因子を検索する。

4. 研究成果

高脂肪食給餌下 LTg マウスおよび野生型マウスの解析結果から、LTg マウスにおいて耐糖能およびインスリン抵抗性の改善、脂肪肝の軽減、血清 LDL-コレステロール値の低下を確認した。次に肝プロスタシンの新規標的蛋白の同定を試みた結果、肝臓内で脂肪滴の形成に関わる CIDE-A(Cell death-inducing DNA fragmentation factor- β -like effector)と、脂肪酸の取り込みを担う膜蛋白である CD36(cluster of differentiation 36)が LTg マウスの肝細胞において低下していることが明らかとなった。プロスタシンの分子特性より、肝臓において膜蛋白に直接関与している可能性が高いため CD36 に着目した。LTg マウス、野生型マウスの肝細胞の膜分画を抽出し、Western blotting で CD36 のタンパク発現量を比較したところ、LTg マウスで有意に低下していることが確認できた。さらに、ヒト肝細胞モデルである HepG2 にプロスタシンと CD36 を遺伝子導入により過剰発現し解析したところ、HepG2 の膜分画で CD36 の発現が低下しており、プロスタシンが直接あるいは間接的に標的蛋白を切断することにより CD36 の発現を低下させることが示唆された。



肝組織 (膜画分)



HepG2細胞 (膜画分)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1) 関根哲生、滝澤壯一、土屋恭一郎、小林秀俊、古屋文彦、北村健一郎 肝プロスタシンの糖脂質代謝における病態生理的意義の解明 第23回日本病態プロテオーム学会 年次学術集会 2018年

2) 関根哲生、滝澤壮一、土屋恭一郎、小林秀俊、古屋文彦、北村健一郎 肝プロスタシンの糖・脂質代謝における病態生理的意義の解明 第62回日本糖尿病学会 年次学術集会 2019年

〔図書〕(計 0 件)

〔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)研究分担者

研究分担者氏名：北村 健一郎

ローマ字氏名：KITAMURA, Kenichiro

所属研究機関名：山梨大学

部局名：大学院総合研究部

職名：教授

研究者番号(8桁)：10304990

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。