

令和元年6月25日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09753

研究課題名(和文) 転写因子IRF7による肥満・メタボリックシンドローム治療の基礎的基盤の確立

研究課題名(英文) Establishment of research fundation of IRF7 on the treatment of obesity and metabolic syndrome

研究代表者

阪上 浩 (SAKAUE, Hiroshi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授

研究者番号：60372645

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)：肥大化3T3-L1脂肪細胞において発現変動する遺伝子群の得られた遺伝子群のプロモーター領域に結合すると予想される転写因子IRF7を同定した。脂肪細胞においてIRF7の過剰発現によりMCP-1遺伝子の発現が誘導され、IRF7のノックダウンにより長期培養によるMCP-1発現の誘導が抑制された。高脂肪を給餌したIRF7KOマウスはWTマウスと比較して体重増加と脂肪組織での脂肪蓄積が抑制された。また糖負荷試験では血糖値の上昇が有意に抑制されていた。肥満により誘導されるIRF7はMCP-1発現誘導により脂肪組織の炎症に関与するとともに、肥満病態のエネルギー代謝も制御する転写因子であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満形成とその病態発症機構における転写因子IRF7の役割が解明できうるとできたと考えられ、IRF7を分子標的とした新しい肥満・メタボリックシンドローム治療への意義を確立しえた。さらにTLR9-IRF7パスウェイを阻害する小分子化合物や薬剤の探索への基礎的基盤が確立した。TLR9-IRF7パスウェイを活性化するリガンド(DNAなど)を探索し、肥満モデルマウスに対して、受容体阻害薬の効果を検討することで、肥満とそれに伴う生活習慣病の治療に新たなアイデアが提供できたことから、その社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Through the combination of DNA microarray and genomic data analysis to predict DNA binding motif, we have identified the transcription factor, Interferon Regulatory Factor 7 (IRF7) as a possible regulator of the genes related to adipocyte hypertrophy. To clarify the role of IRF7 in adipocytes, we found that enforced expression of IRF7 induced the transcription of Monocyte Chemoattractant Proteoin-1 (MCP-1), a key initial adipokine in chronic inflammation in obesity. CRISPR/Cas9 mediated-suppression of IRF7 led to significant reduction of MCP-1 mRNA. Luciferase assay and ChIP-PCR analysis shows that IRF7 transactivates MCP-1 gene. Taken together, our results suggest that IRF7 trans-activates MCP-1 mRNA in adipocyte, and might be involved in adipose tissue inflammation associated with obesity.

研究分野：代謝栄養学

キーワード：脂肪細胞 肥満 メタボリックシンドローム 転写因子

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

1. 研究開始当初の背景

申請者は脂肪組織での脂肪細胞の増殖機構の解析[Nakamura K, et al. J Biol Chem. 283: 17702-17711 (2008)、Sakai T, et al. J Biol Chem. 282: 2038-2046 (2007)]ならびに脂肪細胞の分化を制御する転写因子やシグナル伝達分子の解析[Kihira Y, et al. PLoS One. 9(e93856) (2014)、Nagare T, et al. J Biol Chem. 286: 37458-37469 (2011)、Mori T, et al. J Biol Chem. 280: 12867-12875 (2005)、Sakaue H, et al. J Biol Chem. 279: 39951-39957 (2005)、Sakaue H, et al. Genes Dev. 16: 908-912 (2002)など]から、細胞増殖阻害薬により脂肪細胞の増殖を抑制することで、肥満や肥満に伴う糖尿病発症を有意に抑制することが可能であることを肥満モデル動物で示した。しかし、このような脂肪細胞の増殖制御機構に作用する薬剤は、いずれも他臓器への影響が大きく、実際ヒトへの応用は難しい。

そこで申請者は、脂肪細胞において肥満で発現が増強する遺伝子を DNA マイクロアレイ解析によって網羅的に解析し、さらにこれら遺伝子の転写因子予測結合領域と遺伝子上流配列の共通領域をゲノムデータの統合解析ツール Galaxy を用いて検討した結果、上記の脂肪細胞に発現する IRF のアイソフォーム IRF7 を同定するに至った。この転写因子 IRF7 は、脂肪細胞が肥大化するときに誘導されるレプチン遺伝子のプロモータ領域に結合し、その発現を誘導すること(未発表)。さらに mRNA および特異抗体を用いた蛋白レベルの解析によって、高脂肪食で誘導される脂肪細胞機能制御分子であることを明らかにした(未発表)。さらに、このような脂肪細胞の肥大化を制御する脂肪蓄積機構の研究は、培養細胞を用いた基礎的研究により明らかとされ、さらにはノックアウトマウスの解析へと進展している。転写因子 IRF7 は Toll 様受容体 (Toll-like receptor; TKR) のアイソフォーム TLR9 によって誘導されることが知られているが、申請者らは TLR9 のノックアウトマウスの解析から脂肪細胞の肥大化における炎症誘導に TLR9 が必須の分子であることを見出し(投稿中)、TLR9-IRF7 が脂肪細胞の肥大化のキープスウェイである可能性が推定され、それら分子を治療標的とした抗肥満薬や抗糖尿病薬開発に展開が期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、

- (1) IRF7 を過剰発現させた培養脂肪細胞並びに IRF7 ノックダウンした脂肪細胞、IRF7 ノックアウトマウスから単離した脂肪細胞を用いて、IRF7 の遺伝子発現と脂肪細胞脂肪蓄積(肥大化)の役割を明らかとし、転写因子 IRF7 の生理的意義を明らかとする。
- (2) 申請者が既に作製した IRF7 ノックアウトマウスを用いて、高脂肪食負荷時のエネルギー過剰状態での生体のエネルギー代謝調節機構における転写因子 IRF7 の生理的意義を明らかとする。
- (3) IRF7 ノックアウトマウスに ob/ob 肥満モデルマウスを交配し、過食に伴うインスリン抵抗性発症機序における転写因子 IRF7 の関与を明らかとする。
- (4) 脂肪細胞での IRF7 によるレプチン発現制御機構を明らかとする。
- (5) 子宮内胎児発育遅延(IUGR)をマウスで再現し、IUGR で観察されるレプチンサージにおける IRF7 の関与を明らかとする。
- (6) Adiponectin-Cre を用いた脂肪細胞特異的 IRF7 ノックアウトマウスを作製し、高脂肪食負荷時のエネルギー過剰状態での生体のエネルギー代謝調節機構における転写因子 IRF7 の生理的意義をより脂肪細胞特異的に明らかとする。
- (7) TLR9-IRF7 パスウェイを活性化するリガンド(DNA など)を探索し、生体での分子

標的としての意義を明らかとする。

3. 研究の方法

(1) 転写因子 IRF7 の生理的意義の解明

脂肪細胞が肥大化するときに誘導される転写因子 IRF7 は、同時に発現誘導されるレプチン遺伝子のプロモータ領域に結合し、その発現を誘導することを申請者は既に見出しているが、脂肪細胞肥大化によって誘導または抑制される遺伝子に対する作用を IRF7 を過剰発現させた培養脂肪細胞、並びに IRF7 ノックダウンした脂肪細胞、IRF7 ノックアウトマウスから単離した脂肪細胞を用いて検討する。具体的には、それぞれの細胞から mRNA を調整し DNA マイクロアレイ解析により糖・脂質代謝に関わる各種遺伝子発現に対する作用を明らかとする。さらに、それぞれの細胞における糖・脂質代謝の変化を、グルコースまたは脂肪酸の取り込み能、脂肪酸の合成能、脂肪分解能から評価し IRF7 の脂肪細胞機能の関与を検討する。また TLR9-IRF7 活性化パスウェイはインスリンシグナルパスウェイへの直接作用も想定されることから、インスリンシグナルも相互作用の観点から検討する。

(2) 高脂肪食給餌および過食誘導 IRF7 ノックアウトマウスの解析

申請者がすでに作製した IRF7 ノックアウトマウスにおいて、糖負荷試験、インスリン感受性試験などの各種負荷試験及び代謝ケージを用いたエネルギー消費量測定試験の実施、脂肪組織における各種シグナル伝達分子の活性化の検討、糖・脂質代謝に関わる各種遺伝子発現変化の検討 (DNA マイクロアレイ解析)、各種アディポサイトカインの濃度変化の有無等の解析を高脂肪食給餌にて行い、肥満発症時のエネルギー代謝調節や肥満病態形成における脂肪細胞での IRF7 の生理的機能を明らかとする。さらに IRF7 ノックアウトマウスに ob/ob 肥満モデルマウスを交配したマウスを用いて同様の検討を行い、過食に伴うインスリン抵抗性発症機序における IRF7 の関与も明らかとする。

(3) IRF7 の脂肪細胞特異的トランスジェニックマウスを作製

個体での IRF7 作用を検討するため、脂肪細胞特異的に IRF7 を発現するトランスジェニックマウスを、脂肪酸結合タンパク質 FABP4/aP2 のプロモータまたは adiponectin プロモータを用いて作製することで、肥満誘導時の IRF7 発現増強と同様な状態を再現し、脂肪組織でのエネルギー代謝調節機構における糖代謝関連分子の発現を DNA マイクロアレイ解析により明らかとする (研究計画平成 29 年度以降の計画(1))

(4) 脂肪細胞特異的 IRF7 トランスジェニックマウスの解析と糖・脂質代謝関連標的分子の同定

脂肪組織における脂肪蓄積の変化が他臓器の代謝に影響を与えるかを調べる。平成 28 年度の研究計画(3)で作成した脂肪細胞特異的 IRF7 トランスジェニックマウスを用いて、肥満誘導時の IRF7 発現増強と同様な状態を個体で再現し、糖負荷試験、インスリン感受性試験などの各種負荷試験及び代謝ケージを用いたエネルギー消費量測定試験の実施、脂肪組織における各種シグナル伝達分子の活性化の検討、糖・脂質代謝に関わる各種遺伝子発現変化の検討、各種アディポサイトカインの濃度変化の有無等の解析を行うと共に、肝臓及び骨格筋でのエネルギー代謝調節機構における糖・脂質代謝関連分子の発現を DNA マイクロアレイ解析にて実施する。同時に IRF7 ノックアウトマウスの肝臓及び骨格筋においても糖代謝関連分子の発現を DNA マイクロアレイ解析にて解析する。

(5) IRF7 によるレプチン発現制御機構の解明と IUGR での機能解析

IRF7 はレプチン遺伝子のプロモータ領域に結合し、その発現を誘導することを申請者は既に

見出しているが、近年の肥満者増加の原因される子宮内胎児発育遅延(IUGR)でのレプチンサージにおける IRF7 の関与を検討する。具体的には、エネルギー制限(60%制限)した母親から生まれた胎児に対して出産後に高脂肪食を給餌する。既に申請者は IUGR マウスからの肥満マウスの作製に成功しており、レプチンサージもすでに確認している。この IRF7 およびレプチン mRNA を高脂肪食給餌 IUGR マウスの脂肪組織から経時的に単離し、それぞれの発現量と肥満との関連を明らかとする。さらに DNA メチル化の影響も考慮されることから、メチル化 DNA 結合蛋白に対する抗体を用いて、脂肪細胞からメチル化 DNA を濃縮し、次世代シーケンサー-HiSeq により DNA メチル化プロファイルを脂肪組織で実施する。

(6) 脂肪細胞特異的 IRF7 ノックアウトマウスの作製と解析

Adiponectin-Cre を用いた脂肪細胞特異的 IRF7 ノックアウトマウスを作製し、高脂肪食負荷時のエネルギー過剰状態での生体のエネルギー代謝調節機構における転写因子 IRF7 の脂肪細胞特異的な意義を計画(1)と同様な方法にて解析する。

(7) TLR9-IRF7 パスウェイを活性化するリガンドを探索

脂肪細胞に対する TLR9-IRF7 パスウェイを活性化する内因性リガンドを明らかとする。申請者は、脂肪細胞が肥大化するときにアポトーシスが誘導されることを確認している。この脂肪細胞アポトーシスにより放出される DNA が TLR9-IRF7 パスウェイを活性化する内因性リガンドと推定される。実際アポトーシスを起こした脂肪細胞の貪食を MFG-E8 シグナルをノックアウトすることで阻害すると脂肪組織に炎症が抑制されインスリン抵抗性が改善した(未発表、これまでに受けた研究費とその成果等の研究種目: 新学術研究)。アポトーシス脂肪細胞に由来する dsDNA や ssDNA などの DNA が脂肪組織での TLR9-IRF7 パスウェイのリガンドとなりうるかを肥満モデル動物で明らかとする。

4. 研究成果

(1) 転写因子 IRF7 の生理的意義の解明

脂肪細胞が肥大化するときに誘導される転写因子 IRF7 は、同時に発現誘導されるレプチン遺伝子のプロモータ領域に結合し、その発現を誘導することを見出した。さらに、IRF7 を過剰発現させた培養脂肪細胞並びに IRF7 ノックダウンした脂肪細胞の DNA マイクロアレイ解析から、新たな標的分子として単球走化性因子 MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1) を同定した。さらに MCP-1 遺伝子上における結合部位を同定し、転写因子 NF- κ B との相互作用を明らかとした。

(2) 高脂肪食給餌 IRF7 ノックアウトマウスの解析

IRF7 ノックアウトマウスは、高脂肪食給餌において肥満抵抗性を示した。通常食飼育では野生型マウスと体重差や成長に差がなく、また摂餌量に野生型マウスと変化がないことから、脂肪摂食時のエネルギー消費量亢進が推定された。一方、TLR9 ノックアウトマウスでの IRF7 の発現は上昇していたことから、TLR9-IRF7 経路とは別の IRF7 の肥満制御機構が推定された。

(3) IRF7 の脂肪細胞特異的トランスジェニックマウスを作製

脂肪細胞特異的に IRF7 を発現するトランスジェニックマウスを作製するための、脂肪酸結合タンパク質 FABP4/aP2 プロモータを用いた発現ベクターを構築した。

(4) 脂肪細胞特異的 IRF7 トランスジェニックマウスの作製・解析と糖・脂質代謝関連標的分子の同定

IRF7 ノックアウトマウスは、高脂肪食給餌において肥満抵抗性を示した。通常食飼育では野生型マウスと体重差や成長に差がなく、また摂餌量に野生型マウスと変化がないことから、脂肪摂食時のエネルギー消費量亢進が推定された。IRF7 の標的分子の探索の結果、

褐色脂肪細胞においてUCP-1が同定された。さらにIRF7機能同定のため脂肪細胞特異的IRF7トランスジェニックマウスを作成中である。

(5) IRF7によるレプチン発現制御機構の解明とIUGRでの機能解析：近年の肥満者の増加の原因として子宮内胎児発育遅延(IUGR)が指摘とされているが、糖尿病などの生活習慣病が急増している社会背景からもIUGRでのレプチンサージにおけるIRF7の関与を検討したところ、IRF7の関与は少ないことが明らかとなった。

(6) 脂肪細胞特異的IRF7ノックアウトマウスの作製と解析：Adiponectin-Creを用いた脂肪細胞特異的IRF7ノックアウトマウスを作製中であり、高脂肪食負荷時のエネルギー過剰状態での生体のエネルギー代謝調節機構における転写因子IRF7の脂肪細胞特異的な意義を次年度に解析する。

(7) TLR9-IRF7パスウェイを活性化するリガンドを探索：IRF7の標的分子としてMCP-1が見出し、脂肪組織炎症の役割を明らかとした。さらにTLR9-IRF7パスウェイを活性化するリガンドとしてLPSを同定したが、この起源として腸内細菌叢が推定された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

Shiuchi T, Miyatake Y, Otsuka A, Chikahisa S, Sakaue H, Sei H. Role of orexin in exercise-induced leptin sensitivity in the mediobasal hypothalamus of mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 18(514) 166-172. 2019 DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.04.145.

Chikugo M, Sebe M, Tsutsumi R, Iuchi M, Kishi J, Kuroda M, Harada N, Nishioka Y, Sakaue H Effect of Janus kinase inhibition by tofacitinib on body composition and glucose metabolism. *The journal of medical investigation* 査読有 65(3.4) 166-170 2018 DOI: 10.2152/jmi.65.166.

Harada N, Hatakeyama A, Okuyama M, Miyatake Y, Nakagawa T, Kuroda M, Masumoto S, Tsutsumi R, Nakaya Y, Sakaue H Breakthrough of ACTN3 577X nonsense mutation produces full-length α -actinin-3 protein. *Biochemical and biophysical research communications* 査読有 502(3) 422-428 2018 DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.05.193

Kurahashi K, Inoue S, Yoshida S, Ikeda Y, Morimoto K, Uemoto R, Ishikawa K, Kondo T, Yuasa T, Endo I, Miyake M, Oyadomari S, Matsumoto T, Abe M, Sakaue H, Aihara KI The Role of Heparin Cofactor II in the Regulation of Insulin Sensitivity and Maintenance of Glucose Homeostasis in Humans and Mice. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 査読有 24(12) 1215-1230 2017 DOI: 10.5551/jat.37739

Okamatsu-Ogura Y, Fukano K, Tsubota A, Nio-Kobayashi J, Nakamura K, Morimatsu M, Sakaue H, Saito M, Kimura K Cell-cycle arrest in mature adipocytes impairs BAT development but not WAT browning, and reduces adaptive thermogenesis in mice. *Scientific reports* 査読有 7(1) 6648 2017 DOI: 10.1038/s41598-017-07206-8.

Harada N, Okuyama M, Yoshikatsu A, Yamamoto H, Ishiwata S, Hamada C, Hirose T, Shono M, Kuroda M, Tsutsumi R, Takeo J, Taketani Y, Nakaya Y, Sakaue H Endoplasmic Reticulum Stress in Mice Increases Hepatic Expression of Genes Carrying a Premature Termination Codon via a Nutritional Status-Independent GRP78-Dependent Mechanism. *Journal of cellular biochemistry* 査読有 118(11) 3810-3824 2017 DOI: 10.1002/jcb.26031.

Miyatake Y, Shiuchi T, Mawatari K, Toda S, Taniguchi Y, Futami A, Sato F, Kuroda M, Sebe M, Tsutsumi R, Harada N, Minokoshi Y, Kitamura T, Gotoh K, Ueno M, Nakaya Y, Sakaue H Intracerebroventricular injection of ghrelin decreases wheel running activity in rats. *Peptides* 査読有 87 12-19 2017 DOI:10.1016/j.peptides.2016.11.005.

Nakaya Y, Fukuda D, Oyamada T, Ogawa K, Harada N, Nakagami H, Morishita R, Sata M, Sakaue H A novel lipoprotein (a) lowering drug, D-47, decreases neointima thickening after vascular injury. *The journal of medical investigation* 査読有 64(1.2) 64-67 2017 DOI:10.2152/jmi.64.64.

Miyake M, Kuroda M, Kiyonari H, Takehana K, Hisanaga S, Morimoto M, Zhang J, Oyadomari M, Sakaue H, Oyadomari S Ligand-induced rapid skeletal muscle atrophy in HSA-Fv2E-PERK transgenic mice. *PLoS one* 査読有 12(6) e0179955 DOI:2017 10.1371/journal.pone.0179955.

[学会発表](計27件)

阪上 浩ほか「肥満から読み解く高齢者栄養の問題点と管理の実際」第19回日本抗加齢医学

会総会 2019年6月14日(金)～6日(日) パシフィコ横浜国際会議場

阪上 浩ほか「脂肪組織における炎症性サイトカイン MCP-1 の発現を制御する新たな転写因子の同定」第62回日本糖尿病学会年次学術集会 2019年5月23日(木)～25日(土) 仙台国際センター

Masashi Kuroda, Yasuyo Kawabata, Rie Tsutsumi, Hiroshi Sakaue Transcription factor IRF7 and energy metabolism Hannover Medical School- Institute of Advanced Medical Sciences in Tokushima University May 14, 2019 Fujii Memorial Institute of Medical Sciences, Central Hall

Masashi Kuroda, Hiroshi Sakaue “Adipose tissue-derived protein, MFG-E8, regulates chronic inflammation and obesity-related liver disease” Asia-Pacific Diabetes and Obesity Study Group symposium 2018, Kobe-city, Hyogo, Japan. (October 2018)

阪上 浩ほか「肥満病態形成におけるIRF7の二つの役割」第39回日本肥満学会 2018年10月7-8日 神戸国際会議場・ポートピアホテル

阪上 浩ほか「白色脂肪組織の炎症を制御する分泌因子 MFG-E8 と転写因子 IRF-7」第38回日本肥満学会 2017年10月7日(金)・8日(土) 大阪国際会議場

Masashi Kuroda, Misa Nishiguchi, Kasumi Nakagawa, Rie Tsutsumi, Nagakatsu Harada, Hiroshi Sakaue “Deletion of MFG-E8 protected mice from diet-induced insulin resistance” (poster) presented at 2016 Keystone Symposia Conference B2: Obesity and Adipose Tissue Biology, Banff, Alberta, Canada. (February 2016)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://taishaeiyo.jimdo.com/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

研究協力者氏名：黒田 雅士

ローマ字氏名：(KURODA, masashi)

研究協力者氏名：堤 理恵

ローマ字氏名：(TSUTSUMI, rie)

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。