

令和元年6月4日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K13044

研究課題名（和文）エネルギー代謝を調節する核内受容体PPAR の新しい活性制御法の構築

研究課題名（英文）Study on the activity of nuclear receptor PPAR delta that regulates energy expenditure

研究代表者

橘 敬祐（Tachibana, Keisuke）

大阪大学・薬学研究科・講師

研究者番号：30432446

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、骨格筋で脂肪燃焼を介したエネルギー消費を亢進する核内受容体PPARについて、以下のことを明らかにした。in vitroにおいてヒトの骨格筋におけるPPAR の機能を解析するために、培養細胞を用いた骨格筋の分化系を構築した。独自に構築したPPAR の活性を指標とするスクリーニング系を用いて天然物由来抽出エキスを評価し、PPAR を活性化するエキスを取得した。PPAR の新たな機能制御機構を明らかにするため翻訳後修飾に着目し、翻訳後修飾部位にてPPAR と相互作用する因子の探索を行なった。これら成果は、PPAR を介したエネルギー消費の調節機構の解明に繋がる、意義深いものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、近年問題となっている肥満・生活習慣病の克服に向けて、骨格筋でエネルギー消費に寄与する核内受容体PPAR の活性制御に関する知見を得た。PPARの機能については、げっ歯類とヒトとの間で種差のあることが知られている。構築したヒト培養細胞を用いた骨格筋分化系は、ヒトでの機能を解析する上で優れたツールになりうる。また、明らかにしたPPAR の翻訳後修飾と活性との関連については、これまででない翻訳後修飾を介した活性制御機構の開発に繋がり意義深い。さらに、同定したPPAR を活性化する天然物抽出エキスやその成分を用いることで、エネルギー消費可能な医薬品等の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPAR ) belongs to the nuclear hormone receptor superfamily. PPAR regulates gene expression in fatty acid oxidation and energy expenditure. In this study, we constructed a skeletal muscle differentiation system using cultured cells for in vitro analysis of the function of PPAR in human skeletal muscle. We also engineered reporter cell lines that can be used to quantify PPAR activity. We then evaluated extracts of natural resources and found various extracts that enhance reporter gene activity. Furthermore, we searched for factors that interact with PPAR . The results of these studies will help to elucidate the regulatory mechanism of energy consumption through PPAR .

研究分野：分子代謝学

キーワード：生活習慣病 核内受容体 PPAR 翻訳後修飾 光クロスリンク リガンドスクリーニング

## 1. 研究開始当初の背景

近年の食生活や運動不足に起因するエネルギー過剰の状態を解消することは、生活習慣病発症の予防に繋がる。骨格筋は糖や脂肪酸の燃焼に深く関わっている最大の臓器であり、骨格筋をターゲットとしたトレーニングによるエネルギー消費の促進や、トレーニング効果が得られる薬剤の開発が健康長寿社会を実現するためには重要である。これまでに我々は、核内受容体 PPAR $\delta$  の活性化が骨格筋で脂肪を燃焼し、エネルギー消費を促進することを世界に先駆け明らかにしてきた (Proc Natl Acad Sci USA 2003)。このように、PPAR $\delta$  が骨格筋の質の規定や骨格筋における脂肪燃焼を介したエネルギー消費の亢進に関与していることから、生活習慣病の予防・改善法を確立する上で、PPAR $\delta$  は理想的なターゲット分子になると考えられた。

PPAR には、PPAR $\alpha$ 、PPAR $\delta$ 、PPAR $\gamma$  の 3 種類のサブタイプが存在する。PPAR $\alpha$  は主に肝臓において脂質の代謝を促し、その活性化剤であるフィブラート系薬剤が高脂血症の治療薬として、また、PPAR $\gamma$  は脂肪組織において脂肪細胞の分化を担っており、そのリガンドであるチアゾリジン系薬剤は 2 型糖尿病治療薬として臨床応用されている。一方、PPAR $\delta$  に関しては申請者らが骨格筋で脂肪を燃焼し、そのリガンドが生活習慣病治療に有効であることを報告したものの、PPAR $\delta$  リガンドが大腸癌を促進または抑制するという相反する報告がなされるなど、その機能には不明な点が多く残されている。従って、PPAR $\delta$  を介したトレーニング効果の期待出来る生活習慣病の予防・改善法を確立するためには、PPAR $\delta$  の活性制御メカニズムの詳細な解析が必要である。

## 2. 研究の目的

一般的に核内受容体は、N 末端側よりリガンド非依存的な転写制御領域、DNA 結合領域、ヒンジ領域、リガンド結合領域よりなり、リガンドあるいは翻訳後修飾などによってその活性が制御されている。PPAR $\delta$  に関しては、それら領域による活性制御機構について、不明な点が残されている。また、PPAR の機能については、げっ歯類とヒトとの間で種差のあることが知られている。そこで本研究では、

- (1) ヒト骨格筋における PPAR $\delta$  の機能を解析するための培養細胞の分化系の構築、
  - (2) 独自に構築した PPAR $\delta$  の活性を評価できるスクリーニング系を用いた活性成分の探索、
  - (3) 翻訳後修飾による PPAR $\delta$  の転写制御機構の解明、
- を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 骨格筋はエネルギー消費において最も重要な役割を担っている臓器である。in vitro における機能解析においてはマウスやラット由来の筋分化可能な細胞株があり、それらを利用した解析がなされてきた。一方、ヒトにおいては骨格筋由来の細胞株に関する研究が遅れている。そこで、ヒト横紋筋肉腫由来の細胞株を用いて、骨格筋への分化系の構築を検討する。

(2) PPAR $\delta$  を活性化する成分を探索するために、PPAR $\delta$  の発現を調節できる細胞株に、PPAR $\delta$  に応答する配列とルシフェラーゼ遺伝子を持つレポーター遺伝子を組み込むことで、PPAR $\delta$  の活性を評価できるスクリーニング系を構築する。本スクリーニング系を用いて、天然物由来抽出エキスの活性の評価を実施する。

(3) PPAR $\delta$  の翻訳後修飾による活性への影響を調べるために、各領域を欠失した種々変異体及びアミノ酸残基に変異を導入した PPAR $\delta$  を作製し、翻訳後修飾を受けるか否かを解析する。また、それら変異体を用いたレポーターアッセイを行い、翻訳後修飾による PPAR $\delta$  の活性への影響を明らかにする。さらに、翻訳後修飾による活性制御機構を解明するために、その領域で相互作用する因子を探索する。

## 4. 研究成果

(1) ヒトの骨格筋における PPAR $\delta$  の機能を解析するために、ヒト胎児横紋筋肉腫由来細胞株を用いた分化系の構築を行った。培養条件に関して、培地に添加する血清についてチャコール・デキストラン処理の有無、及び添加する濃度、並びに、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) の添加の有無等について検討した。また、骨格筋分化マーカーの検討も行った。

その結果、本細胞株においては、ミオシン重鎖 (myosin heavy chain) の発現が分化の指標として有用であることが分かった。また、チャコール・デキストラン処理した血清を終濃度 10% で用い、PMA で刺激することで、5 日後にはミオシン重鎖の発現量が最大に達することが明らかになった (図 1)。

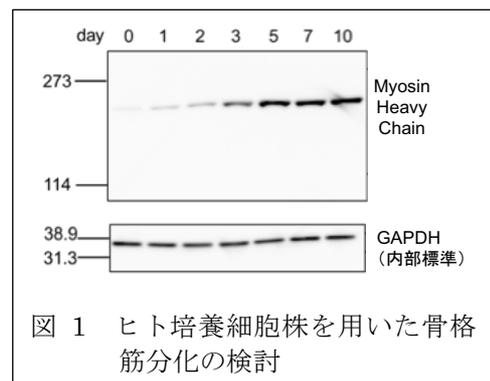


図 1 ヒト培養細胞株を用いた骨格筋分化の検討

以上より、本細胞株を用いることで、効率的かつ簡便に骨格筋へと分化できる *in vitro* 分化系を構築することができた。本細胞を用いた分化系は、*in vitro* でヒト骨格筋細胞における機能を簡便に解析することが可能な優れたツールになると期待される。

(2) これまでに樹立してきた、培地中のテトラサイクリン濃度に応じて PPAR $\delta$  の発現量を調節できる細胞株を用いて (Nucl Recept 2005)、PPAR $\delta$  の活性を評価できるシステムを構築することとした。PPAR $\delta$  に応答する種々のプロモーターをルシフェラーゼ遺伝子の上流に組み込んだレポータープラスミドを複数種作製し、本細胞株を用いてレポーターアッセイを行い、感度のよいプロモーターを選別した。選別したレポーター遺伝子を本細胞株に安定的に導入することで、目的とするレポーター細胞株を樹立した。樹立した細胞株に既存のリガンドを処理して活性を評価した結果、PPAR $\delta$  リガンド特異的かつ濃度依存的に PPAR $\delta$  の活性が上昇することを確認できた。

そこで、本細胞株を用いて 200 種類以上の天然由来抽出エキスの活性を評価した。その結果、既知の強力な合成リガンドの活性 ( $EC_{50} = 1.2$  nM) には及ばないものの、PPAR $\delta$  活性を 1.5 倍以上活性化する抽出エキスを複数種得ることができた。これら抽出エキス、あるいは、その成分を用いることで、PPAR $\delta$  の活性化を介したエネルギー消費ができる医薬品や食品等の開発に繋がることが期待される。

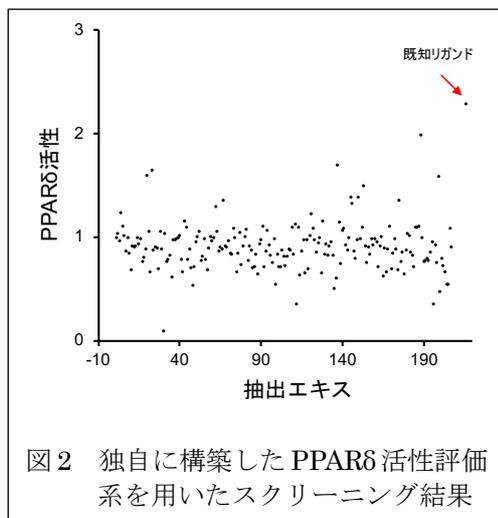


図2 独自に構築した PPAR $\delta$  活性評価系を用いたスクリーニング結果

(3) PPAR $\delta$  の各領域を欠失した変異体を作製・発現させ、SDS-PAGE での泳動度の変化を観察した。その結果、野生型 PPAR $\delta$  では複数のバンドが認められ翻訳後修飾を受けていることが示されたが、欠失変異体では単一のバンドしか認められなかった。この領域を詳細に解析するために、翻訳後修飾を受ける可能性があるアミノ酸残基に変異を入れた変異体を種々作製した。それらを用いて同様の解析を行なった結果、翻訳後修飾を受けるアミノ酸残基を同定するに至った。さらに、これら変異体を用いて PPAR $\delta$  の転写活性を評価した結果、PPAR $\delta$  の転写活性が変化したことから、翻訳後修飾が PPAR $\delta$  の活性を制御している可能性が示唆された (図3)。

次に、翻訳後修飾による PPAR $\delta$  の転写制御機構を明らかにするために、光クロスリンク法を利用してその領域と相互作用する分子の探索を試みた。まず、光クロスリンク可能な非天然型アミノ酸を導入できる PPAR $\delta$  発現ベクターを種々作製し、実際に細胞内で非天然型アミノ酸を持つ PPAR $\delta$  が発現することをウエスタンブロット法により確認した。作製した発現ベクターを用いてクロスリンク実験を行い SDS-PAGE を行いシフトバンドの有無を確認することで、細胞内で複合体を形成する発現ベクターを選別した。選別したクロスリンク可能な非天然アミノ酸を導入した PPAR $\delta$  変異体を細胞に発現させ、免疫沈降実験を行い、PPAR $\delta$  複合体の精製を行なった。得られた PPAR $\delta$  複合体について質量分析装置を用いて解析を行なったところ、PPAR $\delta$  と相互作用する可能性のある候補因子が複数得られた。今後、これら因子による PPAR $\delta$  の機能に及ぼす影響を明らかにすることで、新たな PPAR $\delta$  の活性制御機構が解明されることが期待できる。

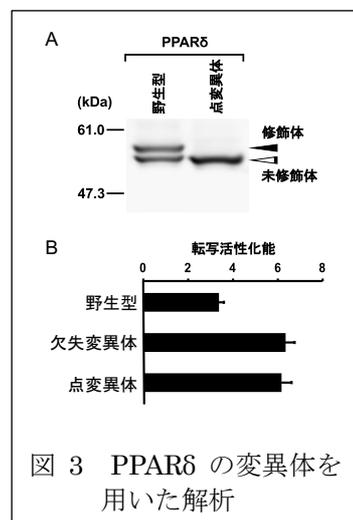


図3 PPAR $\delta$  の変異体を用いた解析

以上、本研究で得られた知見は、PPAR $\delta$  を介したエネルギー消費の調節機構を解明する一端に繋がることから、意義深い研究成果であると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1: **Tachibana K**, Ishimoto K, Takahashi R, Kadono H, Awaji T, Yuzuriha T, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Aoki S, Doi T. Development of a Ligand Screening Tool Using Full-Length Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Expressing Cell Lines to Ameliorate Metabolic Syndrome. *Chem Pharm Bull* (Tokyo). 2019;67(3):199-202, doi: 10.1248/cpb.c18-00627, 査読有。

2: Okuno H, Okuzono H, Hayase A, Kumagai F, Tani S, Hino N, Okada Y, **Tachibana K**, Doi T, Ishimoto K. Lipin-1 is a novel substrate of protein phosphatase PGAM5. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;509(4):886-891, doi: 10.1016/j.bbrc.2019.01.031, 査読有。

3: **Tachibana K**, Yuzuriha T, Tabata R, Fukuda S, Maegawa T, Takahashi R, Tanimoto K, Tsujino H, Nunomura K, Lin B, Matsuura Y, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Kobayashi T, Ishimoto K, Miyachi H, Doi T. Discovery of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) activators with a ligand-screening system using a human PPAR $\alpha$ -expressing cell line. J Biol Chem. 2018;293(26):10333-10343, doi: 10.1074/jbc.RA118.002077, 査読有.

〔学会発表〕(計 8 件)

1: **Keisuke Tachibana**, Tomohiro Yuzuriha, Ryotaro Tabata, Syohei Fukuda, Kazuto Nunomura, Bangzhong Lin, Tadayuki Kobayashi, Masuo Kondoh, Kenji Ishimoto, Hiroyuki Miyachi, Takefumi Doi, Development of novel non-fibrate peroxisome proliferator-activated receptor ligand for treating nonalcoholic steatohepatitis, the 2018 Controlled Release Society Annual Meeting, 2018.

2: **Keisuke TACHIBANA**, Tomohiro YUZURIHA, Ryotaro TABATA, Syohei FUKUDA, Kazuto NUNOMURA, Tadayuki KOBAYASHI, Kenji ISHIMOTO, Hiroyuki MIYACHI, Takefumi DOI, Development of novel non-fibrate PPAR $\alpha$  activator for metabolic diseases, 4th International Symposium of Medicinal Sciences, 2018.

3: **橋敬祐**, 田畑遼太郎, 福田昭平, 布村一人, 土井健史, 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) 克服を目指した新規核内受容体 PPAR $\alpha$  活性化剤の創製, 先導的学際研究機構 創薬サイエンス部門シンポジウム「我が国が切り拓く難病治療の未来」, 2018.

4: **橋敬祐**, 田畑遼太郎, 杠智博, 福田昭平, 前川貴志, 石本憲司, 布村一人, 小林直之, 宮地弘幸, 土井健史, 核内受容体 PPAR $\alpha$  発現細胞株を用いたリガンドスクリーニング系の構築と新規活性化剤の探索, 第 21 回 日本心血管内分泌代謝学会学術総会, 2017.

5: 田畑遼太郎, **橋敬祐**, 杠智博, 前川貴志, 福田昭平, 石本憲司, 小林直之, 田中十志也, 児玉龍彦, 宮地弘幸, 土井健史, 脂質異常症治療薬の開発を目指した新規 PPAR $\alpha$  活性化化合物の薬効と毒性の評価, 日本薬学会 第 137 年会, 2017.

6: 下剛典, 細木華奈, **橋敬祐**, 小比賀聡, 横田俊文, DMD モデル細胞の構築と SSO の活性評価, 日本核酸医薬学会 第 2 回年会, 2016.

7: **橋敬祐**, 杠智博, 田畑遼太郎, 前川貴志, 福田昭平, 石本憲司, 小林直之, 宮地弘幸, 土井健史, 心血管イベントの残余リスクの軽減を目指した新規核内受容体 PPAR $\alpha$  作働薬の開発, 第 1 回 黒潮カンファレンス, 2016.

8: 田畑遼太郎, **橋敬祐**, 杠智博, 前川貴志, 福田昭平, 石本憲司, 小林直之, 田中十志也, 児玉龍彦, 宮地弘幸, 土井健史, 核内受容体 PPAR $\alpha$  を標的とした新規脂質異常症治療薬の開発, 第 15 回 次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム 2016, 2016.

〔その他〕

ホームページ等

<https://seimeijohokaiseki.wixsite.com/tanpaku>

<https://masuo0.wixsite.com/rsphsosauniv>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：樋野 展正

ローマ字氏名：(Hino Nobumasa)

所属研究機関名：大阪大学

部局名：薬学研究科

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：90469916

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：福田 昭平

ローマ字氏名：Syohei Fukuda

※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。