

令和 2 年 7 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04200

研究課題名(和文) 糖・脂質代謝異常及び糖尿病性合併症におけるPin1の関与と治療標的としての応用

研究課題名(英文) Roles of Pin1 and PAR 14 on the metabolic regulations

研究代表者

浅野 知一郎 (Asano, Tomoichiro)

広島大学・医系科学研究科(医)・教授

研究者番号：70242063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々はプロリン異性化酵素Pin1が、過栄養状態のマウスの肝臓、筋肉、脂肪組織で顕著に増加することを見出し、糖・脂質代謝異常への関与について解明を進めた。肝や脂肪細胞では、Pin1は多数のシグナル伝達や転写因子に結合することで、脂肪蓄積や脂肪細胞分化促進の一方、熱産生の抑制因子であることを報告した。具体的な標的タンパクとしては、IRS-1、Crtc2、AMPK、PRDM16、SIK2等の代謝調節に重要な複数のタンパクが含まれ、肝や脂肪細胞では脂肪蓄積や炎症などの代謝異常に不可欠な関与を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

我々の一連の研究結果より、肥満や脂肪感を含めたメタボリックシンドロームの発症にPin1が必須の役割を果たしていることが明らかとなった。実際、Pin1の遺伝子欠損マウスは、これらの疾患の発症に抵抗性である。従って、Pin1の活性を抑制する薬剤が治療方法になりうることを示された。我々は、その目的を目指しており、多数のPin1阻害化合物を開発しており、社会的意義のある成果である。

研究成果の概要(英文)：Prolyl isomerases are divided into three groups, the FKBP family, Cyclophilin and the Parvulin family (Pin1 and Par14). Among these isomerases, Pin1 is a unique prolyl isomerase binding to the motif including pSer/pThr-Pro that is phosphorylated by kinases. Once bound, Pin1 modulates the enzymatic activity, protein stability or subcellular localization of target proteins by changing the cis- and trans- formations of proline. Interestingly, while Pin1 expression is markedly increased by high-fat diet feeding, Pin1 KO mice are resistant to diet-induced obesity, non-alcoholic steatohepatitis and diabetic vascular dysfunction. These phenomena result from the binding of Pin1 to several key factors regulating metabolic functions, which include insulin receptor substrate-1, AMPK, Crtc2 and NF-kappaB p65.

研究分野：生化学

キーワード：Pin1 糖尿病 肥満 代謝 メタボリックシンドローム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プロリン異性化酵素とは、プロリンとそのN端側のアミノ酸と間のペプチド結合を *cis* 体から *trans* 体に変化させることで標的タンパクの機能変化を誘導するユニークな酵素である。我々は、2011年にPin1が脂肪細胞への分化に必須であること、転写因子CREBのco-activatorであるCRTCに結合し細胞質に留めることで肝臓からの糖新生を抑制することを見出し、世界に先駆けて、代謝調節における重要性を報告した。さらに、Pin1はAMPKのサブユニットに結合し、AMPK活性化抑制から脂肪分解を抑制することも判明した。以上の結果から、過栄養状態で増加したPin1は多様な標的タンパクと相互作用し、全身レベルでの代謝異常や慢性炎症の発症に寄与することが解明された。

2. 研究の目的

Pin1は、細胞増殖や神経機能、代謝調節などに重要な役割を果たしていることが示されている。本研究では、DSS投与の大腸炎モデルマウスの腸管においてPin1が顕著に増加していることを見出した。そこで、(1)筋肉、膵細胞、脂肪、腎、網膜において発現増加するPin1の生理的あるいは病的意義の解明、

(2)Pin1が制御する糖・脂質・アミノ酸代謝酵素の同定と、メタボローム解析による代謝の統合的調節作用の解明、(3)過栄養に伴って、Pin1の発現が上昇する分子メカニズムの解明、(4)新規Pin1阻害薬の開発と、これを用いたメタボリックシンドローム治療への応用可能性の検討を進める。肥満や糖・脂質代謝異常に対する新規治療方法としての応用につなげることを、最終的な目的とする。

3. 研究の方法

筋肉特異的Pin1 KOマウスと正常マウスの間で、()PGK1とPKM1の発現量と、細胞内分布(PGK1はミトコンドリア、PKM1は核内への移行に着目)を調べる。()白筋、赤筋の組成やミトコンドリアの量、()安静時および運動時の筋肉におけるグルコース代謝のメタボローム解析や、酸素消費量と乳酸産生、()マウスをトレッドミルで運動させて、筋持久力を測定する。以上から筋におけるPin1の作用を解明する。

白色脂肪細胞における、Pin1が分化に果たしている役割を解明する。ベージュ脂肪細胞や褐色脂肪細胞においてPRDM16と結合することでUCP1の発現量を低下させることの意義を明らかにし、糖・脂質代謝の変化、及び、脂肪細胞からの分泌タンパク(アディポネクチン、レプチン、TNF- α 、IL-6等)の発現制御と分泌におけるPin1の役割について検討する。

膵細胞においてPin1がインスリンの分泌に果たしている役割を明確にするために、膵細胞特異的Pin1 KOマウスや、Pin1 siRNAやPin1阻害薬を処理した各種培養細胞を用い、Ca²⁺流入量の変化や、パッチクランプによる膜脱分極への影響、そしてインスリンの分泌に及ぼす変化を検討する。

腎症に関しては、Pin1 KOマウスを用いて、糖尿病性腎症の発症におけるPin1の役割を解明する。その後、糸球体濾過率、尿中アルブミン量その他、腎組織内のコラーゲンの蓄積や脂質過酸化、アポトーシス率の測定等を行う。

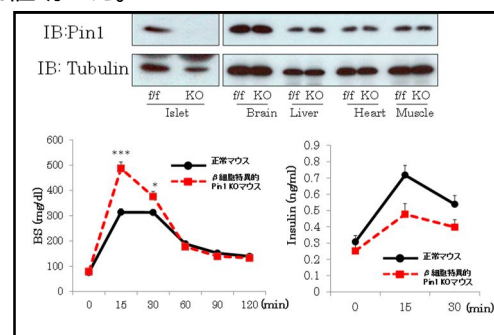
メタボリックシンドロームの治療応用を目指し、東京大学薬学部及び東京薬科大学のグループと共同し、Pin1に特異性が高い強力な阻害薬の開発を進める。

4. 研究成果

プロリン異性化酵素とは、プロリンとそのN端側のアミノ酸とのペプチド結合を、*cis* から *trans* 構造へと変化させることで、標的タンパクの活性、細胞内局在や安定性を変化させる酵素の総称である。我々は、プロリン異性化酵素Pin1が過栄養状態で増加し、メタボリックシンドロームの成因に関与していることを世界に先駆けて証明した。

まず、我々はPin1が、過栄養状態のマウスの肝臓、筋肉、脂肪組織で顕著(5-10倍程度)に増加することを見出し、糖・脂質代謝異常への関与について解明を進めた。肝や脂肪細胞では、Pin1は多数のシグナル伝達や転写因子に結合することで、脂肪蓄積や脂肪細胞分化促進の一方、熱産生の抑制因子であることを報告した。

具体的な標的タンパクとしては、IRS-1、Crtc2、AMPK、PRDM16、SIK2等の代謝調節に重要な複数のタンパクが含まれ、肝や脂肪細胞では脂肪蓄積や炎症などの代謝異常に不可欠な関与をしていることが明らかとなった。さらに、結合タンパクの網羅的解析から、Pin1が、中性脂肪分解酵素のHSLとATGL及び、脂肪合成に関わるACC1に直接、結合することを見出した。特記すべきことに、

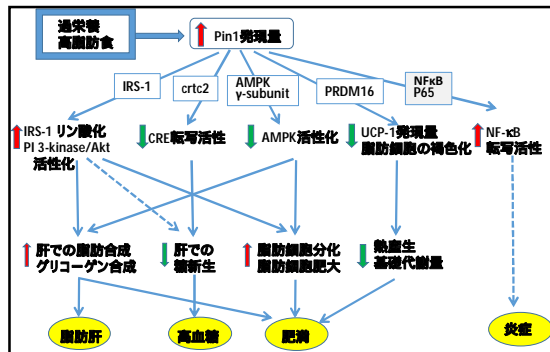


Pin1 は中性脂肪分解酵素である HSL と ATGL に強く結合して分解を促進する一方、脂肪合成に関与する ACC1 に対しては安定化させて発現量を増加させることが判明した。現在、HSL や ATGL 内で Pin1 が結合するために必要なリン酸化修飾やそれに関与するキナーゼの同定を進めている。

膵細胞では、Pin1 は Salt Inducible kinase 2 (SIK2) と結合し、SIK2-p35-CDK5-電位依存性カルシウムチャネルの経路の活性化を介して、インスリン分泌を促進する他、Cyclin D1 の発現量を調節することで膵島の肥大に関与することを報告した。

さらに基礎代謝調節と関係する脂肪細胞からの目熱産生に Pin1 が果たしている役割を解明した。これは、Pin1 が転写共役因子 PRDM16 の分解を促進することで UCP1 発現を抑制し、熱産生を抑制することが新規に明らかとなった。

一方、上記の基礎的研究と並行して、我々は、過栄養で過剰に増えている Pin1 を適切に抑制することによるメタボリックシンドーム治療方法の開発を目指した。Pin1 機能を調節する化合物の開発を、東京大学創薬機構（岡部教授）、東京薬科大学（伊藤教授）の教室と共同して進め果、Pin1 機能を抑制する複数の新規化合物の創出に成功し、3 件の物質特許と 1 件の用途特許を国内及び海外に出願した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 10件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Ueda K, Nakatsu Y, Yamamotoya T, Ono H, Inoue Y, Inoue MK, Mizuno Y, Matsunaga Y, Kushiyama A, Sakoda H, Fujishiro M, Takahashi SI, Matsubara A, Asano T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Prolyl isomerase Pin1 binds to and stabilizes acetyl CoA carboxylase 1 protein, thereby supporting cancer cell proliferation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 1637-1648
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakatsu Y, Matsunaga Y, Yamamotoya T, Ueda K, Inoue MK, Mizuno Y, Nakanishi M, Sano T, Yamawaki Y, Kushiyama A, Sakoda H, Fujishiro M, Ryo A, Ono H, Minamino T, Takahashi SI, Ohno H, Yoneda M, Takahashi K, Ishihara H, Katagiri H, Nishimura F, Kanematsu T, Yamada T, Asano T.	4. 巻 26
2. 論文標題 Prolyl Isomerase Pin1 Suppresses Thermogenic Programs in Adipocytes by Promoting Degradation of Transcriptional Co-activator PRDM16.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 3221-3230
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Inoue MK, Yamamotoya T, Nakatsu Y, Ueda K, Inoue Y, Matsunaga Y, Sakoda H, Fujishiro M, Ono H, Morii K, Sasaki K, Masaki T, Suzuki Y, Asano T, Kushiyama A.	4. 巻 19
2. 論文標題 The Xanthine Oxidase Inhibitor Febuxostat Suppresses the Progression of IgA Nephropathy, Possibly via Its Anti-Inflammatory and Anti-Fibrotic Effects in the gddY Mouse Model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 E3967
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakatsu Y, Matsunaga Y, Ueda K, Yamamotoya T, Inoue Y, Inoue MK, Mizuno Y, Kushiyama A, Ono H, Fujishiro M, Ito H, Okabe T, Asano T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Development of Pin1 inhibitors and their potential as therapeutic agents.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Curr Med Chem	6. 最初と最後の頁 2174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Furuta H, Yoshihara H, Fukushima T, Yoneyama Y, Ito A, Worrall C, Girnita A, Girnita L, Yoshida M, Asano T, Komada M, Kataoka N, Chida K, Hakuno F, Takahashi SI.	4. 巻 9
2. 論文標題 IRS-2 deubiquitination by USP9X maintains anchorage-independent cell growth via Erk1/2 activation in prostate carcinoma cell line.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 33871-33883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ueda K, Nakatsu Y, Yamamotoya T, Ono H, Inoue Y, Inoue MK, Mizuno Y, Matsunaga Y, Kushiyama A, Sakoda H, Fujishiro M, Takahashi SI, Matsubara A, Asano T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Prolyl isomerase Pin1 binds to and stabilizes acetyl CoA carboxylase 1 protein, thereby supporting cancer cell proliferation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 1637-1648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakatsu Y, Matsunaga Y, Yamamotoya T, Ueda K, Inoue MK, Mizuno Y, Nakanishi M, Sano T, Yamawaki Y, Kushiyama A, Sakoda H, Fujishiro M, Ryo A, Ono H, Minamino T, Takahashi SI, Ohno H, Yoneda M, Takahashi K, Ishihara H, Katagiri H, Nishimura F, Kanematsu T, Yamada T, Asano T.	4. 巻 26
2. 論文標題 Prolyl Isomerase Pin1 Suppresses Thermogenic Programs in Adipocytes by Promoting Degradation of Transcriptional Co-activator PRDM16.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 3221-3230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Inoue MK, Yamamotoya T, Nakatsu Y, Ueda K, Inoue Y, Matsunaga Y, Sakoda H, Fujishiro M, Ono H, Morii K, Sasaki K, Masaki T, Suzuki Y, Asano T, Kushiyama A.	4. 巻 19
2. 論文標題 The Xanthine Oxidase Inhibitor Febuxostat Suppresses the Progression of IgA Nephropathy, Possibly via Its Anti-Inflammatory and Anti-Fibrotic Effects in the gddY Mouse Model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E3967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakatsu Y, Matsunaga Y, Ueda K, Yamamotoya T, Inoue Y, Inoue MK, Mizuno Y, Kushiyama A, Ono H, Fujishiro M, Ito H, Okabe T, Asano T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Development of Pin1 inhibitors and their potential as therapeutic agents.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Curr Med Chem.	6. 最初と最後の頁 2174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Furuta H, Yoshihara H, Fukushima T, Yoneyama Y, Ito A, Worrall C, Girnita A, Girnita L, Yoshida M, Asano T, Komada M, Kataoka N, Chida K, Hakuno F, Takahashi SI.	4. 巻 9
2. 論文標題 IRS-2 deubiquitination by USP9X maintains anchorage-independent cell growth via Erk1/2 activation in prostate carcinoma cell line.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 33871-33883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 井上 賢紀, 中津 祐介, 松永 泰花, 山本屋 武, 上田 晃嗣, 井上 由貴, 櫛山 暁史, 浅野知一郎
2. 発表標題 SGLT2阻害薬によるマウス糖尿病性腎障害の改善及び、腎Pin1発現量の是正とAMPK活性化の関与
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 櫛山暁史、菊池貴子、迫田秀之、藤城緑、山本屋武、山崎広貴、中津祐介、浅野知一郎、河津捷二
2. 発表標題 マクロファージにおける糖代謝による活性酸素産生とインスリン抵抗性
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中津 祐介, 山本屋 武, 上田 晃嗣, 井上 賢紀, 井上 由貴, 櫛山 暁史, 浅野知一郎
2. 発表標題 プロリン異性化酵素Pin1による脂肪蓄積制御機構の解明
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤城 緑, 櫛山 暁史, 山口 賢, 渡邊健太郎, 江頭富士子, 岡本真由美, 村瀬 貴代, 中村 敬志, 山本屋 武, 中津 祐介, 浅野知一郎, 石原 寿光
2. 発表標題 2型糖尿病を対象としたキサンチン酸化還元酵素の血管合併症発症および進展に対する影響に関する探索研究
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本屋 武, 中津 祐介, 上田 晃嗣, 井上 賢紀, 迫田 秀之, 藤城 緑, 櫛山 暁史, 石原 寿光, 浅野知一郎
2. 発表標題 Trk-fused gene (TFG) の糖代謝調節における役割の解明
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上賢紀, 中津祐介, 松永泰花, 山本屋武, 上田晃嗣, 井上由貴, 櫛山暁史, 浅野知一郎
2. 発表標題 SGLT2阻害薬によるマウス糖尿病性腎症の改善及び、腎Pin1発現量の是正とAMPK活性化の関与
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榑山暁史、菊池貴子、迫田秀之、藤城緑、山本屋武、山崎広貴、中津祐介、浅野知一郎
2. 発表標題 マクロファージにおける糖代謝による活性酸素産生とインスリン抵抗性
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中津祐介、山本屋武、上田晃嗣、井上賢紀、井上由貴、榑山暁史、浅野知一郎
2. 発表標題 プロリン異性化酵素Pin1による脂肪蓄積制御機構の解明
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤城緑、榑山暁史、山口賢、渡辺健太郎、江頭富士子、岡本真由美、村瀬貴代、中村敬志、山本屋武、中津祐介、浅野知一郎、石原寿光
2. 発表標題 2型糖尿病を対象としたキサンチン酸化還元酵素の血管合併症発症および進展に対する影響に関する探索研究
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本屋武、中津祐介、上田晃嗣、井上賢紀、迫田秀之、藤城緑、榑山暁史、石原寿光、浅野知一郎
2. 発表標題 Trk-fused gene (TFG)の糖代謝調節における役割の解明
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	中津 祐介 (Nakatsu Yusuke) (20452584)	広島大学・医系科学研究科(医)・講師 (15401)	
研究 分担者	山本屋 武 (Yamamotoya Takeshi) (50760013)	広島大学・医系科学研究科(医)・助教 (15401)	