

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19591035
 研究課題名（和文）グルコース感受性転写因子の活性調節による代謝症候群治療法の開発

研究課題名（英文）Exploring the method regulating hepatic ChREBP transactivity.
 研究代表者
 飯塚 勝美（Iizuka Katsumi）
 岐阜大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：40431712

研究成果の概要（和文）：虚血性心疾患の危険因子の集積した病態であるメタボリックシンドローム（Mets）の肝では、ChREBP の活性が亢進している。ChREBP の抑制により Mets 病態が改善することから、ChREBP の機能抑制法の探索を試みた。ChREBP の活性を抑制する DnMlx の過剰発現は耐糖能や中性脂肪含量の減量に有効であった。次に、ChREBP は血糖降下ホルモン *Fgf-21* や時計遺伝子 *Dec1* の発現を調節することを明らかにした。最後に、ChREBP 転写活性調節薬のスクリーニング法を確立した。

研究成果の概要（英文）：Metabolic syndrome is a clustering of major cardiovascular disease (CVD) risk factors. In livers of the patients with metabolic syndrome, ChREBP transactivity is increased. We previously reported that gene deletion of *Chrebp* improves fatty liver, glucose tolerance, and obesity in ob/ob mice. Here, we tried to explore the methods of inhibiting ChREBP transactivity. In this study, we identified dominant negative Mlx (dnMlx) mutants inhibiting ChREBP transactivity. Adenoviral overexpression of dnMlx in 25-week-old male C57BL/6J mice reduced hepatic triglyceride contents and improved glucose intolerance. Next, we identified that glucose induces *Fgf21* and *Dec-1* mRNA expression through ChREBP activation in rat hepatocytes. Finally, we set up the screening system for the drugs inhibiting ChREBP transactivity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：ChREBP, Metabolic Syndrome, *Dec1/Bhlhb2/Stra13/Sharp-2*, Lipogenesis, circadian rhythm, Insulin, FGF-21, *Elovl-6*

1. 研究開始当初の背景

近年、内臓脂肪型肥満を基盤とし、耐糖能障害、脂質異常症、高血圧などを合併した病態はメタボリック症候群（代謝症候群）とよばれ、心血管障害の危険因子として広く知られる。高炭水化物及び高脂肪食により誘発される臓器内脂肪蓄積はインスリン感受性の低下の原因として注目される。この際の脂肪合成はインスリンとグルコースによる相乗効果とされる。近年申請者はグルコース活性化転写因子に注目し、ChREBP の機能抑制が耐糖能、脂肪肝、肥満などの病態が改善することを明らかにした。ChREBP は cAMP および AMP により転写活性が抑制され、肥満糖尿病モデルマウスで脂肪肝が改善することが報告されている。さらに脂肪肝が生じた際に部分的な効果として求心性の迷走神経シグナルを介した脂肪燃焼作の存在が報告されていることから、同病態では肝臓からある種の分泌蛋白が放出されると考えた。

2. 研究の目的

ChREBP の機能抑制はメタボリックシンドロームの病態改善につながることから、本申請計画では ChREBP の活性制御による肥満糖尿病治療法を確立することを目指した。

- (1)ChREBP の転写活性を抑制する新規薬剤の開発
- (2)ChREBP により発現調節をうける分泌蛋白の探索と発現機序の解明

3. 研究の方法

動物実験及び遺伝子組み換え実験は群馬大学および岐阜大学医学部動物実験委員会および組み換え実験委員会の取り決めに従って、おこなった。

4. 研究成果

期間内に得られた成果を具体的に列挙すると以下の通りである。

(1) ChREBP の転写活性調節抑制能を有する Mlx 機能変異体の同定

(K. Iizuka, et al., BBRC, 2009)

MlxはChREBPとヘテロダイマーを形成し、核内でChoRE(Carbohydrate response Element)に結合する。そこで、Mlxの機能変異体はデ

コイとしてChREBPの転写活性抑制をおこなえると考えた。そこでMLXを4つの細胞内ドメインでわけ、変異体のスクリーニングを行ったところ、N端及びDNA結合領域であるbasic領域を欠失させた変異体にChREBP転写活性の抑制作用があることがわかった。同変異体をアデノウイルスにより肝細胞で強発現させたところ、transketolase (ChREBPの活性化物質であるXylulose-5-phosphateの合成酵素)やChREBPのグルコースによる誘導が阻害された。すなわち、グルコースによるChREBPの活性化にはpositive feedback loopが存在することが明らかとなった(K. Iizuka, BBRC, 2009)。また、同変異体を糖尿病予備軍である加齢マウスに過剰発現させたところ、血糖降下作用、中性脂肪減少作用がみられた。その際、肝臓内Elovl-6やglucose-6-phosphataseの発現が低下した(K. Iizuka, BBRC, 2009)。Elovl-6の抑制は肝臓内脂肪組成中の不飽和脂肪酸含量を減少させ、インスリン感受性を改善すること(T. Matsuzaka, Nature Medicine, 2008)やG-6Paseの発現低下は肝臓の糖放出を抑制することから、Elovl-6 およびG-6-Paseの遺伝子の発現抑制は血糖降下作用の一部を説明すると考えられた。

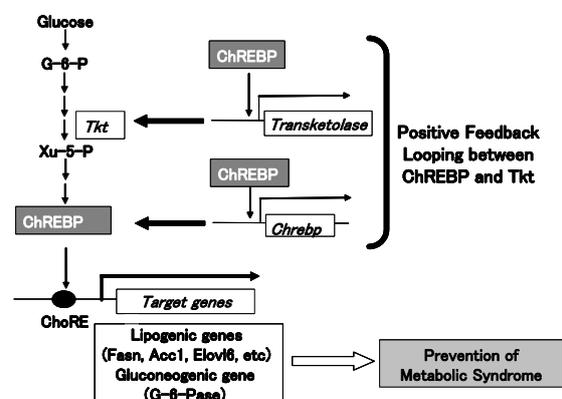


図1. グルコースシグナルによる新規 ChREBP 活性化機構

(2) 脂質合成における ChREBP と Dec1/Bhlhb2 のフィードバック機構の解明

(K. Iizuka, et al., BBRC, 2008)

Dec1/Bhlhb2 は、1) 時計遺伝子としての作用、2) 脂肪細胞分化抑制作用、などが知られている。申請者はDNAマイクロアレイを用いてChREBPの過剰発現マウスの肝とGFP過剰発現マウスの肝で発現する遺伝子の比較を

行い、ChREBPにて増加する遺伝子としてDec1/Bhlhb2 を獲得した。Dec1/Bhlhb2 はラット肝細胞においてグルコース刺激、ChREBP過剰発現により発現が増加した。DEC1 遺伝子のプロモーターアッセイにより、ChREBP結合領域 (ChoRE) を同定し、ChREBPがDec1 の発現を正に調節していることを明らかにした。ChREBPの標的遺伝子である肝型ピルビン酸キナーゼ (LPK)、脂肪酸合成酵素 (FASN)、そしてDec1 遺伝子 (DEC1) のChoREにはDec1 も結合しうることおよび上記LPK, FASN, DEC1 各遺伝子の発現を負に調節することを明らかにした。以上の結果からChREBPとDEC1 は脂肪酸合成系酵素の発現においてフィードバックループを形成することを明らかにした。

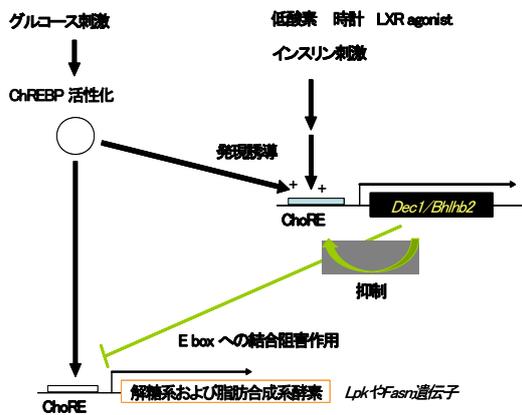


図2. DEC1 と ChREBP のフィードバックループ

(3) ChREBP による血糖降下作用を有する分泌蛋白 FGF21 の発現調節機構の解明

(K. Iizuka, et al, FEBS letters, 2009)
 グルコース活性化転写因子 (Carbohydrate Response Element Binding Protein; ChREBP) は、肝臓における脂肪合成の約 60% を制御する転写因子であり、代謝症候群の肝臓ではChREBPの活性が亢進する。ChREBPの機能抑制は肥満糖尿病の改善につながることから、本申請計画はChREBPの活性制御による肥満糖尿病治療法を確立することを目指した。本年度は、ChREBP過剰発現マウスを用いたDNAマイクロアレイにより発現増加のみられた分泌蛋白を複数獲得した。Fibroblast Growth Factor-21 (FGF-21) は血糖降下作用、肥満改善効果を有しているので、ChREBPとの相互作用について検討した。まず、ラット肝細胞において、グルコース刺激およびChREBPの過剰発現によりFGF-21 の発現が顕著に誘導されること、かつChREBPの転写活性を阻害するdominant negative Mlx (dn-Mlx) の過剰発現によりグルコースによるFGF21 の誘導が阻害されることを明らかにした。さらにマウスFGF-21 プロモーターの機能解析により

FGF21 遺伝子のグルコース反応領域を同定した。次に、FGF-21 発現アデノウイルス感染マウスを作成し、肝臓で強発現させたところ血糖降下作用およびChREBP標的遺伝子の発現レベルが低下した。またFGF21 をラット肝細胞に過剰発現した場合はin vivo での成績と異なり、ChREBPの標的遺伝子の発現レベルは不変であった。従って、ChREBPはFGF21 の発現を転写レベルで制御するが、FGF21 は全身での血糖降下作用により間接的にChREBPの転写活性を抑制することが明らかになった。

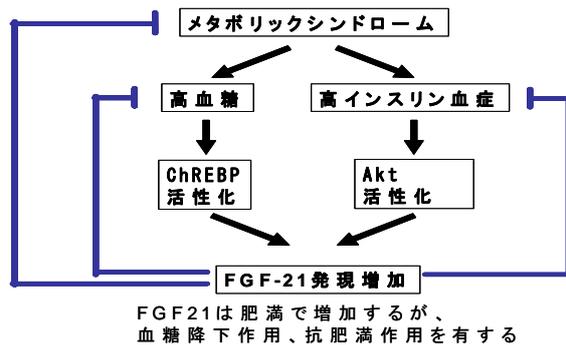


図3. メタボリックシンドロームにおける FGF21 の位置づけ

(4) ChREBP 転写活性抑制薬のスクリーニング法の確立

ChREBPの活性化には、脱リン酸化、Mlxとの結合、核内への移行、標的遺伝子のChoRE (Carbohydrate response Element) への結合の各ステップが必要である。ChREBPに作用する薬剤をスクリーニングする際に、どのステップに作用するかがわかれば、作用機序から副作用をふくめた作用が予想できると考えた。そこで、グルコース反応性遺伝子発現能が保存されているラット膵β細胞株INS-1E細胞を用いて、免疫染色 (核内への移行)、two hybridアッセイ (ChREBPとMlxの分子間結合をみる)、CHIPアッセイ (ChREBPとChoREの結合をみる)、レポーターアッセイ (実際の転写活性) を組み合わせた検出系を構築した。同方法により、ChREBPの転写活性能への影響だけでなく薬剤の作用部位の同定まで系統的にかつ迅速におこなうことが可能となった。

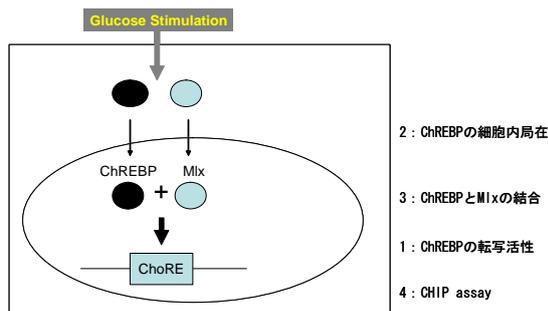


図4. ChREBP 転写活性抑制薬のスクリーニング法

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] (計9件)

- ① K. Iizuka, J. Takeda, Y. Horikawa, Glucose induces FGF21 mRNA expression through ChREBP activation in rat hepatocytes, FEBS Lett, 査読有, 583, 2009, pp.2882-2886.
- ② 飯塚勝美, 堀川幸男, グルコース感受性転写因子--ChREBP (特集 栄養シグナルの感じ方・伝え方--細胞生存,糖尿病,肥満,癌との関わり) -- (栄養感知とシグナル伝達)、細胞工学、査読なし, 28, 2009.
- ③ E. Kuroda, Y. Horikawa, M. Enya, N. Oda, E. Suzuki, K. Iizuka, J. Takeda, Identification of minimal promoter and genetic variants of Kruppel-like factor 11 gene and association analysis with type 2 diabetes in Japanese, Endocr J, 査読有, 56, 2009, pp.275-286.
- ④ K. Iizuka, J. Takeda, Y. Horikawa, Hepatic overexpression of dominant negative Mlx improves metabolic profile in diabetes-prone C57BL/6J mice, Biochem Biophys Res Commun, 査読有, 379, 2009, pp.499-504.
- ⑤ M. Enya, Y. Horikawa, E. Kuroda, K. Yonemaru, N. Tonooka, H. Tomura, N. Oda, N. Yokoi, K. Yamagata, N. Shihara, K. Iizuka, T. Saibara, S. Seino, J. Takeda, Mutations in the small heterodimer partner gene increase morbidity risk in Japanese type 2 diabetes patients, Hum Mutat, 査読有, 29, 2008, E271-277.
- ⑥ K. Iizuka, Y. Horikawa, Regulation of lipogenesis via BHLHB2/DEC1 and

ChREBP feedback looping, Biochem Biophys Res Commun, 査読有, 374, 2008, pp.95-100.

- ⑦ K. Iizuka, Y. Horikawa, ChREBP: a glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome, Endocr J, 査読有, 55, 2008, pp.617-624.
- ⑧ H. Sato H, Y. Horikawa, K. Iizuka, N. Sakurai, T. Tanaka, N. Shihara, A. Oshima, J. Takeda, M. Mikuni, Large-scale analysis of glucocorticoid target genes in rat hypothalamus, J Neurochem, 査読有, 106, 2008, pp.805-814
- ⑨ SC. Burgess, K. Iizuka, NH. Jeoung, RA. Harris, Y. Kashiwaya, RL. Veech, T. Kitazume, K. Uyeda, Carbohydrate-response element-binding protein deletion alters substrate utilization producing an energy-deficient liver, 査読有, J Biol Chem, 283, 2008, 1670-1678.

[学会発表] (計13件)

- ① 飯塚勝美, 堀川幸男, 武田純, グルコース感受性転写因子ChREBPと結合する転写因子Mlxの機能解析、第12回日本病態栄養学会年次学術集会、2010年1月10日
- ② 飯塚勝美, 堀川幸男, 武田純, 転写因子Mlxの肝糖質脂質代謝調節における役割、第52回日本糖尿病学会年次学術集会、大阪、2009年5月22日
- ③ 飯塚勝美, 堀川幸男, 武田純, ChREBPとDEC1/BHLHB2は脂肪合成系酵素の発現調節においてフィードバックループを形成する。第82回日本内分泌学会年次学術集会、2009年4月23日、前橋
- ④ 飯塚勝美, 堀川幸男, 脂肪合成系酵素発現調節における時計遺伝子DEC1の役割、第12回日本病態栄養学会 ワークショップ、京都、2009年1月11日、京都
- ⑤ 飯塚勝美, 堀川幸男, 転写抑制因子Bhlhb2はグルコースセンサーChREBPの標的遺伝子である、第51回日本糖尿病学会年次学術集会、2008年5月23日、東京
- ⑥ 佐藤大仁、堀川幸男, 飯塚勝美, 桜井敬子、田中毅、志原伸幸、大嶋昭彦、武田純、三國雅彦、視床下部グルココルチコイド反応性遺伝子の大規模解析、第51回日本糖尿病学会年次学術集会、2008年5月23日、東京
- ⑦ 黒田英嗣、堀川幸男、塩谷真由美、飯塚勝美、武田純、日本人2型糖尿病患者に

におけるMODY7 遺伝子(KLF11)の検討、
第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、
2008 年 5 月 23 日、東京

- ⑧ **飯塚勝美**、堀川幸男、グルコース感受性
転写因子ChREBPの肥満糖尿病におけ
る役割、第 22 回 日本肥満糖尿病動物
学会 ワークショップ、2008 年 2 月 9
日、東京
- ⑨ **飯塚勝美**、志原伸幸、堀川幸男、カルパ
イン 10 はグルコース応答性インスリン
分泌に関与する、第 80 回日本内分泌学会
年次学術集会、2007 年 6 月 15 日、東京
- ⑩ 佐藤大仁、堀川幸男、**飯塚勝美**、志原伸
幸、大嶋昭彦、**武田純**、三國雅彦、視床
下部グルココルチコイド感受性遺伝子
の網羅的検索、第 80 回日本内分泌学会
年次学術集会、2007 年 6 月 15 日、東京
- ⑪ **飯塚勝美**、堀川幸男、グルコースセンサ
ーChREBPに注目した肥満糖尿病病態
の解析、第 50 回 日本糖尿病学会総会
年次学術集会 シンポジウム、2007 年 5
月 26 日、仙台
- ⑫ **飯塚勝美**、堀川幸男、肝臓特異的
ChREBP過剰発現マウスの解析、第 50
回日本糖尿病学会総会年次学術集会、
2007 年 5 月 26 日、仙台
- ⑬ 志原伸幸、堀川幸男、**飯塚勝美**、**武田純**
ラット睥島発現分泌蛋白の探索、第 50
回日本糖尿病学会総会年次学術集会、
2007 年 5 月 26 日、仙台

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯塚 勝美 (IIZUKA KATSUMI)

岐阜大学・医学部付属病院・講師

研究者番号 : 40431712

(2) 研究分担者

堀川 幸男 (HORIKAWA YUKIO)

岐阜大学・医学部付属病院・准教授

研究者番号 : 10323370

武田 純 (TAKEDA JUN)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 40270855

