

令和 4 年 4 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17986

研究課題名(和文) 小胞輸送関連蛋白TFGの脂肪、小腸、肝細胞における機能と代謝異常症への関与

研究課題名(英文) The functions of TFG in adipocytes, small intestine and hepatocytes and its involvement in metabolic disorders

研究代表者

山本屋 武 (Yamamotoya, Takeshi)

広島大学・医系科学研究科(医)・助教

研究者番号：50760013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Trk-fused gene (TFG) は肥満に伴い白色脂肪においてその発現量が顕著に増加する。脂肪細胞特異的TFG KOマウスでは脂肪細胞機能の低下を反映し、PPAR $\gamma$  活性の低下と異所性脂肪蓄積である脂肪肝が認められる。一方で培養細胞やstromal vascular fraction (SVF) から分化させた脂肪細胞で短期的にTFGを欠失させてもPPAR $\gamma$  活性の低下は見られず、TFGの脂肪細胞機能維持における重要性が細胞サイズ依存である可能性が想定された。また肝細胞特異的TFG KOマウスも脂肪肝を呈するが、これは絶食時のPPAR $\gamma$  標的遺伝子の発現低下に起因す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

過剰な摂取エネルギーを適切に脂肪細胞に蓄えることは、脂肪肝などインスリン抵抗性の原因となる異所性脂肪蓄積を防ぎ、糖尿病の発症を抑えるために重要である。生体における脂肪細胞の適切な肥大に脂肪細胞のTFGが不可欠であること、また脂肪肝の抑制に肝細胞のTFGが重要であることが本研究で明らかとなった。その詳細なメカニズムについては現在検討中であるが、将来的に糖尿病や脂肪肝に対する新規治療薬の開発に繋がる可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The abundance of Trk-fused gene (TFG) in white adipose tissues drastically increases in obesity. In adipocyte-specific TFG knockout mice, adipocyte dysfunction was apparent judging from downregulation of PPAR $\gamma$  activity in adipocytes and subsequent hepatic steatosis. However, short-term TFG deletion in culture cells or in primary adipocytes derived from adipose tissue stromal vascular fraction (SVF) did not result in PPAR $\gamma$  downregulation, which led us consider that the significance of TFG in adipocyte was cell-size dependent. Moreover, we found that hepatocyte-specific TFG knockout mice also displayed hepatic steatosis, which seemed attributable to insufficient induction of PPAR $\gamma$  target genes during fasting.

研究分野：糖尿病

キーワード：糖尿病 脂肪細胞 脂肪肝

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Trk-fused gene (TFG) はもともとチロシンキナーゼ活性を有する TrkA (NGF 受容体) と融合した癌遺伝子として 1995 年に報告された (Greco A, et al. Mol Cell Biol. 1995) が、TFG 自体の機能については長らく不明のままであった。

近年、TFG が小胞体 (ER) から Golgi 体への COP 小胞を介した細胞内小胞輸送に重要であることが明らかになってきた (Witte K, et al. Nat Cell Biol. 2011, Johnson A, et al. EMBO J. 2015)。

またさらに、TFG が近位筋優位遺伝性運動感覚ニューロパチー (HMSN-P)、軸索型 Charcot-Marie Tooth 病、遺伝性痙攣性対麻痺といったいくつかの神経変性疾患の原因遺伝子となることが報告された (Ishiura H, et al. Am J Hum Genet. 2012, Tsai PC, et al. Neurology. 2014, Beetz C, et al. Proc Nat Acad Sci. 2013)。

我々の研究室では、PTEN 結合蛋白の網羅的解析を行った際に TFG を同定し、さらに肥満・糖尿病モデルマウスの代謝標的臓器において TFG の発現量が変化していることを見出した。さらに、前述の TFG 遺伝子異常が原因となる神経変性疾患のうち、HMSN-P では糖尿病・脂質異常症の合併率が高いことが臨床的に知られており (Takashima H, et al. Ann Neurol. 1997)、TFG が糖・脂質代謝において重要な役割を担っている可能性が示唆された。

そこで、我々の研究室では各臓器特異的 TFG KO マウスを作製し、その表現型解析を通じて TFG の各代謝標的臓器における機能の解明を試みることとし、本研究開始時点までに膵細胞では TFG が細胞量・機能双方の維持に重要な役割を担っていることを報告した (Yamamotoya T, et al. Sci Rep. 2017)。一方、脂肪組織では肥満に伴い TFG の発現量が著増すること、また脂肪細胞特異的 TFG KO マウスでは高脂肪食負荷に伴い顕著な脂肪肝を呈することを本研究開始時点までに見出していたが、その分子メカニズムについてはさらなる解明が必要な状況であった。

さらに、TFG は COP II 小胞輸送の中でも、積み荷 (cargo) が一般的なサイズより大きい場合、例えばプロコラーゲンなどの輸送にとりわけ重要であるという報告もなされており (McCaughy J, et al. Cell Rep. 2016)、肝細胞における VLDL の分泌や小腸上皮におけるカイロミクロンの分泌に何らかの影響を及ぼす可能性が予想された。

### 2. 研究の目的

本研究の最終目標は TFG の代謝制御機構を明らかにし、糖尿病・脂肪肝・脂質異常症などの代謝障害に対する新規治療薬としての可能性を探ることである。

本研究期間においては、前述の背景を踏まえ、

- (1) 脂肪細胞における TFG の役割
  - (2) 肝細胞および小腸上皮における TFG の役割
- を解明することを短期目標とした。

### 3. 研究の方法

- (1) 脂肪細胞における TFG の役割

TFG floxed マウス (Yamamotoya T, et al. Sci Rep. 2017) と AdipoqERT2-Cre マウスの交配により、タモキシフェン誘導性に成熟脂肪細胞特異的に TFG を欠失するマウス (以下 AiTFG KO と記載) を作製し、その機能解析を行った。

- (2) 肝細胞および小腸上皮における TFG の役割

まず肝細胞における TFG の機能解析から着手することとし、TFG floxed マウスと Alb-Cre マウスとの交配により、肝細胞特異的 TFG KO マウス (以下 LTFG KO と記載) を作製し、その機能解析を開始した。

### 4. 研究成果

- (1) 脂肪細胞における TFG の役割

AiTFG KO では高脂肪食負荷に伴う adipose expansion が障害され、脂肪肝が増悪する

AiTFG KO では高脂肪食負荷時の体重増加がコントロールと比べて抑制されており、脂肪重量、特に精巣上体周囲脂肪 (epiWAT) の増大が有意に抑制されることが分かった。また KO では肝脂肪蓄積が有意に増加しており、高脂肪食負荷に伴う adipose expansion が障害される結果、異所性脂肪蓄積である脂肪肝が増悪し、結果的にインスリン抵抗性の増大、耐糖能障害の悪化を呈することが分かった。

AiTFG KO では PPAR 発現量およびその下流の遺伝子発現が顕著に抑制されている

AiTFG KO 皮下脂肪 (scWAT) のマイクロアレイ解析の結果、KO では PPAR 標的遺伝子の発現が顕著に抑制されていることが明らかとなった。real-time PCR により AiTFG KO の白色脂肪細胞 (epiWAT, scWAT) で PPAR 標的遺伝子の発現が低下していることが確認された。

培養細胞での短期間の TFG knockdown では PPAR 標的遺伝子の発現は影響を受けない

TFG の PPAR 活性制御の分子メカニズムを検討すべく、3T3-L1 細胞において脂肪細胞への分化後に siRNA による TFG knockdown を行ったが、in vivo で見られたような PPAR 標的遺伝子の顕著な発現抑制は再現できなかった。

一方、TFG floxed マウスの皮下脂肪から単離した stromal vascular fraction (SVF) を脂肪細胞に分化させ、Cre 発現アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) により TFG を欠失させた場合、AAV 感染 4 日後では TFG は欠失しているにも関わらず PPAR 標的遺伝子の発現抑制はやはり認められなかったが、AAV 感染 14 日後の解析では PPAR 標的遺伝子の有意な発現低下が認められた。

これらの結果から、おそらく TFG の PPAR 転写活性への影響は直接的な分子相互作用によるものではなく、何らかの細胞内環境変化を介した二次的な作用による可能性が高いと推察している。さらに in vivo adipocyte に比べ SVF-derived adipocyte における PPAR 標的遺伝子の発現抑制の程度は明らかに軽度であり、in vivo でも褐色脂肪組織 (BAT) では PPAR 標的遺伝子の発現低下が白色脂肪と比較して明らかに軽度であることを加味すると、TFG 欠失による影響は細胞サイズによって左右される可能性がある。以上の仮説に基づき、論文化に向け現在も検討を継続している。

## (2) 肝細胞および小腸上皮における TFG の役割

LTFG KO では肝脂肪蓄積の増悪を認める

肝細胞における TFG の機能を明らかにするため、肝細胞特異的 TFG KO マウス (LTFG KO) を作製し、その解析を開始した。De novo lipogenesis に重要な転写因子 SREBP の活性化には COPII 小胞依存的な Golgi 体への輸送および cleavage が必須であるため、当初 LTFG KO では脂肪肝が緩和されるのではないかと予想していた。しかし予想に反し LTFG KO では通常食負荷下でも顕著な肝脂肪蓄積の増加を認め、培養細胞における検討でも TFG knockdown により明らかな SREBP cleavage の障害は認められなかった。

LTFG KO では絶食時の PPAR 標的遺伝子の誘導が障害されている

LTFG KO での肝脂肪蓄積増加の一因として、絶食時の PPAR およびその標的遺伝子 (Pdk4, Cpt1a, Fgf21) の誘導が障害されていることを見出した。その分子メカニズムについて現在鋭意検討中である。

## 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 7件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Nakatsu Y, Yamamotoya T, Okumura M, Ishii T, Kanamoto M, Naito M, Nakanishi M, Aoyama S, Matsunaga Y, Kushiyama A, Sakoda H, Fujishiro M, Ono H, Asano T.	4. 巻 115
2. 論文標題 Prolyl isomerase Pin1 interacts with adipose triglyceride lipase and negatively controls both its expression and lipolysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Metabolism	6. 最初と最後の頁 154459
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.metabol.2020.154459.	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, Nakatsu Y, Yamamotoya T, Hasei S, Kanamoto M, Naitou M, Matsunaga Y, Sakoda H, Fujishiro M, Ono H, Kushiyama A, Asano T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Pin1 Plays Essential Roles in NASH Development by Modulating Multiple Target Proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1545
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells8121545.	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, Yamamotoya T, Ueda K, Ono H, Inoue MK, Matsunaga Y, Kushiyama A, Sakoda H, Fujishiro M, Matsubara A, Asano T.	4. 巻 470
2. 論文標題 Prolyl Isomerase Pin1 in Metabolic Reprogramming of Cancer Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Lett	6. 最初と最後の頁 106-114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2019.10.043.	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 Mizuno Y, Yamamotoya T, Nakatsu Y, Ueda K, Matsunaga Y, Inoue MK, Sakoda H, Fujishiro M, Ono H, Kikuchi T, Takahashi M, Morii K, Sasaki K, Masaki T, Asano T, Kushiyama A.	4. 巻 20
2. 論文標題 Xanthine Oxidase Inhibitor Febuxostat Exerts an Anti-Inflammatory Action and Protects Against Diabetic Nephropathy Development in KK-Ay Obese Diabetic Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 4680
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20194680.	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, Matsunaga Y, Nakatsu Y, Yamamotoya T, Ueda K, Kushiyama A, Sakoda H, Fujishiro M, Ono H, Iwashita M, Sano T, Nishimura F, Morii K, Sasaki K, Masaki T, Asano T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Possible Involvement of Normalized Pin1 Expression Level and AMPK Activation in the Molecular Mechanisms Underlying Renal Protective Effects of SGLT2 Inhibitors in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Diabetol Metab Syndr	6. 最初と最後の頁 57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13098-019-0454-6.	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 Yamamotoya T, Hasei S, Akasaka Y, Ohata Y, Nakatsu Y, Kanna M, Fujishiro M, Sakoda H, Ono H, Kushiyama A, Misawa H, Asano T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Involvement of neuronal and muscular Trk-fused gene (TFG) defects in the development of neurodegenerative diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 1966
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-05884-7.	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 -

1. 著者名 Yamamotoya T, Nakatsu Y, Kanna M, Hasei S, Ohata Y, Encinas J, Ito H, Okabe T, Asano T, Sakaguchi T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Prolyl isomerase Pin1 plays an essential role in SARS-CoV-2 proliferation, indicating its possibility as a novel therapeutic target	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 18581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-97972-3.	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 -

1. 著者名 Fujishiro M, Ishihara H, Ogawa K, Murase T, Nakamura T, Watanabe K, Sakoda H, Ono H, Yamamotoya T, Nakatsu Y, Asano T, Kushiyama A.	4. 巻 9
2. 論文標題 Impact of Plasma Xanthine Oxidoreductase Activity on the Mechanisms of Distal Symmetric Polyneuropathy Development in Patients with Type 2 Diabetes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 1052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines9081052.	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 -

1. 著者名 Matsunaga Y, Hasei S, Yamamotoya T, Honda H, Kushiyama A, Sakoda H, Fujishiro M, Ono H, Ito H, Okabe T, Asano T, Nakatsu Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Pathological Role of Pin1 in the Development of DSS-Induced Colitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10051230.	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 Hasei S, Yamamotoya T, Nakatsu Y, Ohata Y, Itoga S, Nonaka Y, Matsunaga Y, Sakoda H, Fujishiro M, Kushiyama A, Asano T.	4. 巻 22
2. 論文標題 Carnosic Acid and Carnosol Activate AMPK, Suppress Expressions of Gluconeogenic and Lipogenic Genes, and Inhibit Proliferation of HepG2 Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 4040
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22084040.	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6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山本屋 武、長谷井 竣、中津 祐介、迫田 秀之、藤城 緑、櫛山 暁史、浅野 知一郎
2. 発表標題 脂肪細胞のTrk-fused gene (TFG) はPPAR 発現量およびミトコンドリア機能を調節し, adipose expansionに重要である
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長谷井 竣、山本屋 武、中津 祐介、迫田 秀之、藤城 緑、櫛山 暁史、浅野 知一郎
2. 発表標題 Trk-fused gene (TFG) の骨格筋機能および肥満発症における役割
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeshi Yamamotoya, Yusuke Nakatsu, Akifumi Kushiya, Hisamitsu Ishihara, Tomoichiro Asano
2. 発表標題 Pin1 and Trk-fused gene (TFG): novel regulators for -cell mass and function
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本屋 武、長谷井 竣、中津 祐介、井上 賢紀、迫田 秀之、藤城 緑、櫛山 暁史、浅野 知一郎
2. 発表標題 脂肪細胞のTrk-fused gene (TFG) による代謝制御機構の解明
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本屋 武、長谷井 竣、中津 祐介、井上 賢紀、櫛山 暁史、浅野 知一郎
2. 発表標題 脂肪細胞のTrk-fused gene (TFG) による代謝制御機構の解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本屋 武、長谷井 竣、中津 祐介、大畠 侑乃、迫田 秀之、藤城 緑、櫛山 暁史、浅野 知一郎
2. 発表標題 Trk-fused gene (TFG) の脂肪細胞における代謝制御機構の解明
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 COVID-19の治療剤又は予防剤	発明者 浅野知一郎ほか計7名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-191046	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------