

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08871

研究課題名(和文)キヌレン酸代謝経路を介する糖代謝制御機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of regulatory mechanisms for glucose metabolism through metabolic pathway of kynurenic acid

研究代表者

後藤田 貴也 (Gotoda, Takanari)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：60322062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：メタボリックシンドロームは内臓肥満を基盤として糖代謝・脂質代謝・血圧調節の異常が一個人に重複する病態である。われわれは以前、トリプトファンの代謝物であるキヌレン酸の合成酵素(KAT)の異常がモデル動物におけるメタボリックシンドローム様の表現型と関連することを見出した。本研究におけるより詳細な解析により、KAT欠損マウスではキヌレン酸レベルが低下して糖尿病様の表現型を示す一方、発現実験によりキヌレン酸レベルを増加させた肥満マウスでは肥満に起因する糖尿病様の症状の軽減が認められた。本研究により、キヌレン酸代謝系が糖代謝制御に関わるというキヌレン酸代謝の新しい側面を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トリプトファンの代謝物であるキヌレン酸は、うつや統合失調症といった精神疾患との関連が報告されてきたが、メタボリックシンドロームとの関連に関してはわれわれが遺伝解析により独自に見出した知見以外には報告されていない。今回の研究結果はこの知見をさらに発展させるものであり、キヌレン酸代謝系への介入により糖代謝異常やメタボリックシンドロームを改善する可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：Metabolic syndrome is a pathological condition characterized by the coexistence of diabetes (impaired glucose metabolism), hypertension and dyslipidemia in an individual with visceral obesity. We have previously reported a correlation between abnormality in the synthetic enzyme for kynurenic acid (KAT), a metabolite of tryptophan, and metabolic syndrome-like phenotypes in an animal model. Upon the present further investigation, we found that KAT-deficient mice, which exhibited decreased levels of kynurenic acid, display a phenotype resembling diabetes mellitus. Conversely, it has been shown that the manipulation that increases the levels of kynurenic acid in mice improves the symptoms of obesity-induced diabetes. This study has revealed a new aspect of kynurenic acid metabolism, highlighting its involvement in the regulation of glucose metabolism.

研究分野：代謝学

キーワード：キヌレン酸 糖代謝 ノックアウトマウス

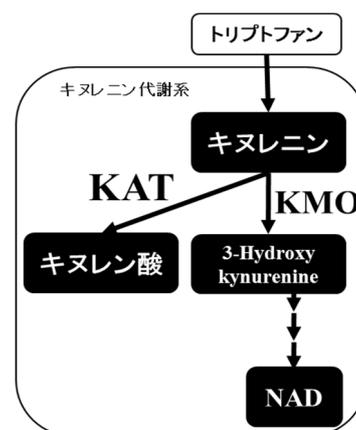
1. 研究開始当初の背景

(1) 近年の食生活の欧米化や運動不足、ストレスなどの影響によりわが国でも生活習慣病の罹患者が増加している。メタボリックシンドロームは、肥満、とくに内臓脂肪型の肥満を背景に生活習慣病のうち糖尿病(糖代謝異常)・高血圧・脂質異常症(脂質代謝異常)が複数重複した病態である。それぞれは軽度であってもこれら動脈硬化の危険因子の数が増えるごとに動脈硬化性疾患(とくに虚血性心疾患)のリスクが高まるとされる。メタボリックシンドロームの発症には、生活習慣の偏りと遺伝素因の関与が知られているが、なぜこれら複数の代謝異常を同一の個人に生じさせ、動脈硬化症のリスクの相乗的な増悪をもたらすのか、そのメカニズムには不明な点が多い。

(2) ヒトにおいては遺伝的な背景や環境などが個々人で大きく異なるため、メタボリックシンドロームのように様々な素因によって引き起こされる疾患についてその遺伝素因を同定することには大きな困難が伴う。一方、モデル動物では各個体の遺伝的な背景や外部環境の均一化が可能となる。高血圧自然発症ラット(spontaneously hypertensive rat; SHR)は本態性高血圧症のモデルラットとして知られている。同時に SHR は高インスリン血症および耐糖能異常、高TG血症と低HDL-C血症、内臓脂肪蓄積、交感神経系の亢進など、メタボリックシンドロームに似た表現型も呈する。われわれはメタボリックシンドロームに関わる新規分子の同定を目的として、そのモデル動物である SHR の遺伝解析を行い、キヌレン酸を合成する酵素である KAT-1(Kynurenine aminotransferase-1)の異常を見出した。すなわち、SHR と野生型である WKY の交配に由来する F2 世代における連鎖解析の結果、SHR の 3 番染色体には血圧、体重、インスリン抵抗性と脂肪分解障害に連鎖する QTL(Quantitative trait locus)が集簇していた。その領域に KAT-1 遺伝子は存在し、SHR には機能的な変異(E61G)が認められることから、われわれはメタボリックシンドロームの原因候補遺伝子として KAT-1 遺伝子を報告してきた。KAT-1 は KAT ファミリーに属するタンパクで、KAT-1~KAT-4 と複数のアイソフォームが知られている。KAT ファミリーはヒト・げっ歯類に広く存在し、トリプトファン代謝物のキヌレニンからキヌレン酸を合成する経路の律速酵素である。キヌレン酸には多彩な生理作用が知られており、グルタミン酸受容体の内因性アンタゴニストとして働き、神経興奮や神経毒性に対して抑制的に作用する他、酸化ストレス抑制などの働きが報告されている。KAT やキヌレン酸の生理的な役割は不明な点が多く、メタボリックシンドロームおよびこれを構成する諸症状とキヌレン酸・KAT との関連は不明である。

(3) キヌレニン代謝系は、タンパク合成に利用されないトリプトファンの 95% がたどる分解経路であり、キヌレニンを経て NAD⁺ の新規合成へと至る。キヌレン酸合成経路は、その副経路に相当し(右図参照) 主にうつや統合失調症といった、精神疾患との関連が報告されてきた。キヌレン酸自体がニューロンの受容体のアンタゴニストとして働き、神経興奮や神経毒性に対して抑制的に作用する。意外なことに、キヌレン酸は脳よりも末梢組織の方が豊富に存在するにも関わらず、それら末梢組織での働きはよくわかっていない。

動物モデルにおいてはいくつかのキヌレン酸の生理作用が認められている。キヌレン酸量を増加させると、アルツハイマー病モデルマウスや急性膵炎モデルマウスの病態を改善させるなど、中枢神経系・炎症系においては治療的効果が報告されている。しかしながら、キヌレン酸とメタボリックシンドロームとの関連については遺伝解析によりわれわれが独自に見出した知見以外には報告されていない。



2. 研究の目的

これらの知見に基づき、本研究では

キヌレン酸代謝系と糖代謝異常との関連
キヌレン酸代謝系への介入が耐糖能を改善させる手段になりうるのか

の2点に焦点を絞って、キヌレン酸が糖代謝に及ぼす影響について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) キヌレン酸合成酵素には複数のアイソフォームが存在する。そのうち KAT-1 および KAT-2 欠損 (KO) マウスを作成し、各臓器のキヌレン酸濃度の測定および耐糖能の評価を行った。高脂肪食飼育下において、グルコース負荷試験やインスリン負荷試験を行うとともに、リアルタイム PCR 法で mRNA の発現量を測定した。さらに、キヌレン酸を欠乏させた状況が糖代謝に及ぼす影響を総合的に評価した。

(2) (1)とは反対に、体内のキヌレン酸レベルを増加させた状況が糖代謝に及ぼす影響を評価した。(1. 研究開始当初の背景(3))の図にあるように、トリプトファン代謝の主経路であるキヌレニンからの NAD 合成の律速酵素は Kynurenine monooxygenase (KMO) であるが、KMO の阻害剤や KMO 欠損マウスの解析から、本酵素の阻害は副経路のキヌレン酸合成系の代謝流量を増加して、体内のキヌレン酸量を増やすことが知られている。そこで KMO を標的とした shRNA 発現組換えアデノウイルスを高脂肪食負荷マウスに接種し、耐糖能やインスリン感受性を評価した。

4. 研究成果

(1) KAT-1 欠損マウスの解析

SHR の遺伝解析により糖代謝異常などの表現型と関連する遺伝子として見出した KAT-1 遺伝子を欠損するマウスの解析を行った。KAT-1 KO マウスについては以前作成した系統を維持していたため、それを繁殖させて実験に供した。KAT-1 KO マウスでは脳および血漿キヌレン酸濃度の有意な減少が認められた(それぞれ-23%、-30%)。しかし本マウスでは普通食下並びに高脂肪食負荷においても野生型マウスと比べて体重に違いは見られなかった。ただし普通食飼育下では若週齢時(5,6週齢時)のみ KAT-1 KO マウスで有意に低体重となることを確認した。耐糖能やインスリン感受性に関しても対照群との有意な差は認められなかった。

(2) その他の KAT 遺伝子との関わり

KAT には KAT-1 以外に KAT-2, KAT-3, KAT-4 が存在する。そのうち KAT-2 および KAT-3 について、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により遺伝子を破壊することで、*in vivo* におけるキヌレン酸合成能に与える影響を評価した。KAT-2 あるいは KAT-3 を標的とした sgRNA 発現組換えアデノ随伴ウイルス(セロタイプは AAV-DJ で主に肝臓に感染)を作製し、C57BL/6J マウスに接種した。その結果、いずれにおいても肝臓において標的遺伝子の破壊とタンパク量の減少を確認した。肝 KAT-2 遺伝子を破壊したマウスでは著しい肝臓および血中キヌレン酸レベルの減少が認められた一方、肝 KAT-3 遺伝子を破壊したマウスではキヌレン酸レベルに変化は認められなかった。そこで、KAT-2 が肝臓および血中のキヌレン酸濃度を規定する主要なアイソフォームであると考えた。

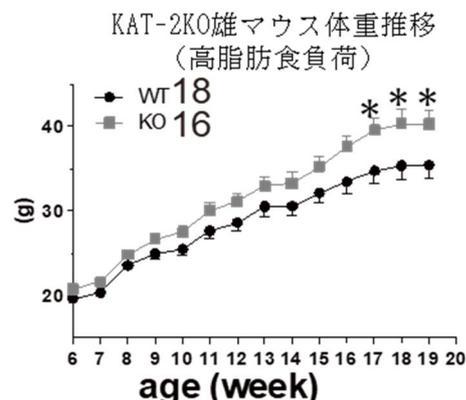
KAT-2 KO マウスの作出

CRISPR/Cas9 システムを利用し、Exon3 を標的としたゲノム編集によって KAT-2 遺伝子のノックアウトマウスを作成した。本法により Exon3 が除かれると、本来 425 アミノ酸である野生型 KAT-2 タンパクではなく、104 アミノ酸からなる短縮した変異型ができ、酵素活性に重大な影響を与えると推察される。作出した 3 系統のいずれにおいても KAT-2 ホモ欠損マウスでは、肝臓における正常な KAT-2 タンパクの発現が認められず、血漿中のキヌレン酸レベルの大幅な減少が認められた。

KAT-2 KO マウスの解析

KAT-2 KO マウスの肝臓や血漿のキヌレン酸濃度は顕著に減少していた(それぞれ-92%、-90%)。一方、精巣周囲の白色脂肪組織、褐色脂肪組織、脳、心臓、小腸のキヌレン酸濃度は野生型マウスと有意な差は認められなかった。普通食飼育下では体重や耐糖能について野生型マウスとの違いは認められなかった。

次に高脂肪食飼育下で同様の評価を行った。7 週齢より高脂肪食負荷を行ったところ、負荷 10 週経過時より KAT-2 KO マウスでは有意な体重の増加が認められた(右下図)。加えて KAT-2 KO マウスでは耐糖能の悪化とインスリン感受性の低下が認められた。25 週齢で解剖したところ、KO マウスでは肝臓、褐色脂肪組織重量の有意な増加が認められた。一方、精巣周囲脂肪重量は野生型マウスと違いは認められなかった。キヌレン酸濃度が著減しており、また重量変化が認められることから、肝臓の脂質重量を調べたところ肝トリグリセリド含量が KAT-2 KO マウスで有意に増加していた。mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で測定したところ、ACC1, ACC2, FAS, GPAT, SCD-1, FAT(CD36)といった脂質合成関連の遺伝子の発現量が KO マウスにおいて有意に亢進していた。ウェスタンブロットで肝 Akt のリン酸化を評価したが Ser473 のリ



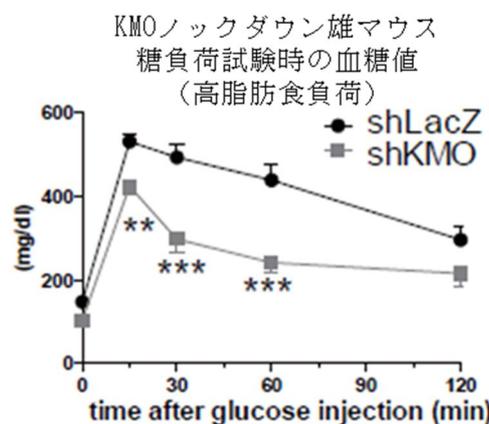
ン酸化を評価したが Ser473 のリ

ン酸化には違いは認められなかった。精巣周囲の白色脂肪組織の遺伝子発現をリアルタイム PCR で測定したところ、KAT-2 KO マウスでは PPAR γ , HSL 遺伝子の発現低下傾向を示し、GLUT-4, FABP4, adiponectin および PEPCK については有意な低下を認めた。血中アディポネクチンは KO マウスではむしろ有意に高値であり mRNA レベルとは矛盾する結果となった。骨格筋においては測定した糖代謝関連の遺伝子発現いずれにも変化は認められなかった。肝臓における脂肪酸分解系の遺伝子発現を測定したがこれも変化は認められなかった。以上のことから、KO マウスにおけるキヌレン酸レベルの低下が肝脂質合成の増加とそれによる肝重量の増加を引き起こしており、肝臓における過剰な脂質蓄積が本 KO マウスのインスリン感受性を低下させている可能性が考えられた。本 KO マウスの脂肪組織重量は野生型マウスと変わらないため、体重増加の原因は白色脂肪組織の増加ではないが、糖代謝関連遺伝子の発現低下を認めたため、脂肪組織のインスリン感受性も影響を受けている可能性が考えられた。

(3) KAT-2 KO マウスでは、肝臓など様々な組織でキヌレン酸レベルが有意に減少していること、また本マウスを高脂肪食下で飼育すると対照群に比してより体重の増加や耐糖能の悪化を来すことが明らかになった。そこで今度は反対に *in vivo* で内因性のキヌレン酸レベルを増加させて、肥満モデル動物における耐糖能への影響を検討した。

内因性キヌレン酸レベルを増加させる方法として shRNA 発現アデノウイルスによる肝 KMO の発現抑制を採用した。KMO はトリプトファン異化代謝の主経路であり、これを遮断することで副経路、すなわちトリプトファンからのキヌレン酸合成への代謝流量の増加が期待できる。野生型 C57BL/6J マウスにおいて KMO に対する shRNA 発現アデノウイルスを接種したところ、肝臓の KMO タンパク発現の抑制および肝臓や血漿などでのキヌレン酸レベルの増加を認めた。

食餌誘発性の肥満モデルマウスで肝 KMO 発現を組換えアデノウイルスを用いて抑制した。対照群に比して摂餌量および体重には変化を認めなかったが、耐糖能の改善(右図)およびインスリン感受性には改善が認められた。解剖時の肝重量、肝トリグリセリド、コレステロール含量には変化は見られなかった。肝グリコーゲン含量は KMO 発現抑制群の方が増加傾向であった。肝臓の糖代謝にかかわる酵素の遺伝子をリアルタイム PCR 法で測定したところ、KMO 発現抑制群では glucokinase(GCK)の発現が増加していた。肝 GCK タンパク量および酵素活性も KMO 発現抑制群で有意な増加が認められた。



食餌誘発性の肥満モデルマウスの肝臓を *in vitro* で模倣する目的で、マウスの初代肝細胞を高グルコース、高インスリン、パルミチン酸存在下で培養した。その状況下でキヌレン酸を投与すると 24h 後の GCK mRNA 発現量の有意な増加が認められた。また同条件下においてキヌレン酸の添加はラット GCK プロモーター活性を有意に増加させた。

以上の検討より、キヌレン酸レベルが低下する KAT-2 欠損マウスにおける結果とは鏡像的に、KMO 発現抑制による内因性キヌレン酸レベルの増加は耐糖能を改善させた。肝グルコキナーゼの活性化剤が肝臓における糖取り込みを増加させ、耐糖能を改善させる効果を示すことはよく知られており、本検討においてもキヌレン酸がグルコキナーゼの活性化を介して糖代謝を制御している可能性が考えられた。これまでキヌレン酸およびその代謝系に関する知見は中枢神経系における役割や神経変性疾患との関りについての知見が多かった。本研究によりキヌレン酸代謝系が肝臓の糖代謝の制御に関わるという新しい側面を明らかにすることができた。

本研究はメタボリックシンドロームの遺伝素因を解明することに端を発している。本研究成果を踏まえてわれわれは、キヌレン酸とその代謝系が、メタボリックシンドロームの最終的な帰結である粥状動脈硬化症の進展に影響を与える可能性を考え、粥状動脈硬化症モデルマウスを用いた検討を準備している段階である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takeuchi F, Liang YQ, Isono M, Tajima M, Cui ZH, Iizuka Y, Gotoda T, Nabika T, Kato N	4. 巻 14
2. 論文標題 Integrative genomic analysis of blood pressure and related phenotypes in rats.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dis Model Mech.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dmm.048090	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 Okazaki H, Gotoda T, Ogura M, Ishibashi S, Inagaki K, Daida H, Hayashi T, Hori M, Masuda D, Matsuki K, Yokoyama S, Harada-Shiba M	4. 巻 28
2. 論文標題 Current Diagnosis and Management of Primary Chylomicronemia. Committee on Primary Dyslipidemia under the Research Program on Rare and Intractable Disease of the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Atheroscler Thromb.	6. 最初と最後の頁 883-904
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5551/jat.RV17054	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 Takashi Yamamoto, Takanari Gotoda	4. 巻 27
2. 論文標題 Polygenic architecture of common severe hypertriglyceridemia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Atheroscler Thromb.	6. 最初と最後の頁 1255-1256
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5551/jat.ED133.	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山本隆史、後藤田貴也
2. 発表標題 キヌレン酸代謝系の介入による糖代謝制御機構の解析.
3. 学会等名 第52回日本動脈硬化学会総会・学術集会.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashi Yamamoto, Takanari Gotoda
2. 発表標題 Genetic intervention in kynurenine pathway alters glucose metabolism in mice.
3. 学会等名 The 19th International Symposium on Atherosclerosis. (国際学会)
4. 発表年 2021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	山本 隆史 (Yamamoto Takashi) (00572033)	杏林大学・医学部・学内講師 (32610)	

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
---------	---------