

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22590973

研究課題名(和文) グルコースによる時計遺伝子発現調節機構に注目した代謝異常症候群予防法の開発

研究課題名(英文) The Role of Crosstalk between ChREBP and Clock-related genes in the Development of Metabolic syndrome

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：メタボリックシンドロームの病態におけるグルコース活性化転写因子ChREBPと時計関連遺伝子群(KLF-10やPPAR)との機能連関を培養細胞系および個体モデル(LRH-1およびChREBPノックアウトマウス)を用いて解析した。ChREBPと時計関連因子群とがお互いの活性を調節する系であるフィードバックループシステムは、糖質や脂質の代謝調節や概日リズム調節に共通した経路であると考えられた。メタボリックシンドロームでは耐糖能障害や脂質異常などの代謝異常に加え概日リズムの異常を伴うことから、ChREBP活性化の抑制は有効な治療と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We studied the role of crosstalk between carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP) and clock-related genes (Klf-10 and Ppara) in the development of metabolic syndrome. Use of the feedback loop between ChREBP and clock-related genes is a common method for regulating both metabolic pathways and the circadian rhythm. Considering disorders in both metabolism and circadian rhythm coexist in metabolic syndrome, suppression of ChREBP transactivities will be beneficial in preventing metabolic syndrome.

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：メタボリックシンドローム ChREBP 概日リズム 時計遺伝子 KLF-10 グルカゴン受容体 PPAR L RH-1

1. 研究開始当初の背景

虚血性心疾患や脳血管疾患の予防は、現代社会における重要課題の一つである。虚血性心疾患や脳血管障害を引き起こす危険因子(肥満、高血圧、耐糖能異常、脂質異常症)の集積した病態として、メタボリックシンドロームが知られている。メタボリックシンドロームの進展予防策として、食事療法や運動療法の励行が挙げられる。食事療法については、食事の質に加えて食事のタイミングが重要である。その根拠として、疫学的に朝食を抜くと肥満やメタボリックシンドロームになりやすいこと、概日リズムを司る時計遺伝子の変異マウスはメタボリックシンドロームに似た病態を呈することなどが挙げられる。食事のタイミングがグルコースやインスリンなどの栄養シグナルを介して概日リズムを調節することは既に知られているが、詳細な分子機構は不明であった。また、われわれはグルコース活性化転写因子 Carbohydrate Response Element Binding Protein (ChREBP) のメタボリックシンドロームに於ける意義を明らかにしてきた。ChREBP により調節される経路は、脂肪合成系酵素、解糖系酵素、ペントースリン酸回路、に加えて、FGF21 等のホルモンなどがあげられる。しかし、これまでグルコースシグナル(特に ChREBP)がいかに概日リズムに影響を及ぼすかは不明であった。

2. 研究の目的

グルコース活性化転写因子 Carbohydrate Response Element Binding Protein (ChREBP) に注目し、グルコースシグナルによる概日リズム調節機構への関与を明らかにし、食習慣是正によるメタボリックシンドローム予防の分子基盤を確立する。

3. 研究の方法

動物実験および組み換え遺伝子実験に関しては、岐阜大学動物実験委員会ならびに組み換え実験委員会の取り決めに従っておこなった。おもに細胞レベルの実験は培養細胞(ラット単離肝細胞、ラットインスリノーマ細胞株 INS-1 細胞、褐色脂肪細胞株 HB2、)を使用し、個体レベルでの解析が必要な実験については ChREBP および LRH-1 ノックアウトマウスを使用した。使用した手法としては、(1)遺伝子発現に関しては real time PCR 法、(2)転写因子の結合領域を同定する目的でレポーターアッセイ法、(3)転写因子の結合を確認する目的で CHIP アッセイ、(4)遺伝子の強制発現の為にアデノウイルスの感染実験、(5)生理学的実験(活動量、酸素消費量、摂餌量、体温)、(6)血中パラメーター(グルコース、インスリン、アディポネクチン、レプチン等)の測定を行なった。

4. 研究成果

研究計画当初の目的である、細胞レベルから個体レベルを含めた ChREBP と時計関連遺伝子群の機能連関を明らかにするため、以下の研究を行なった。すなわち、細胞レベルでの研究(1-3)、個体レベルの研究(4)、それらの成果の意義である(5)を行なった。

(1)グルコース活性化転写因子 ChREBP による時計関連遺伝子 KLF-10 発現調節機構の解明(業績: Iizuka K, et al. BBRC, 2011.)

Kruppel like factor -10 (Klf-10) は若年型糖尿病原因遺伝子のひとつとされる KLF-11 と相同性の高い遺伝子である。Klf-10 ノックアウトマウスでは概日リズムの異常をきたすことがこれまで報告されてきた。Klf-10 は Sp-1 の結合部位に作用し、転写活性を抑制する。時計遺伝子(Per2 や Bmal1)のプロモーター領域には Sp1 結合領域が存在し、Klf-10 はこれらの遺伝子発現調節を介して概日リズムに影響を与えらる。ChREBP の過剰発現により増加する遺伝子を DNA マイクロアレイ法により単離し、その一つとして Klf-10 を同定した。ラット初代培養肝細胞において、Klf-10 は ChREBP 過剰発現もしくはグルコース刺激により誘導された。上記に一致して、ChREBP の転写活性を阻害する dominant negative Mix によりグルコースによる Klf-10 遺伝子誘導は阻害された。さらに、ラット Klf-10 遺伝子プロモーターを用いたデリベーションスタディーおよび CHIP アッセイにより、ラット Klf-10 プロモーターにおける ChREBP 結合領域を同定した。同部位の開始点の上流近傍にあり、多くの報告されている ChREBP コンセンサス配列とほぼ一致していた。さらに、Klf-10 の強制発現によりグルコースによる ChREBP 標的遺伝子の発現誘導が部分的に抑制されることを明らかにした。以上から、ChREBP と Klf-10 には弱いながらも Feedback loop が存在すると考えられた。

(2)ChREBP を介したグルカゴンレセプター遺伝子発現調節機構(業績: Iizuka K, et al. BBRC, 2012.)

血中グルカゴン濃度は正常では空腹時に高く、食後は低い。しかし、糖尿病状態では空腹時食後とも高く、正常でみられるような日内変動がみられなくなり、食前食後の高血糖の要因と考えられている。これまでグルカゴン受容体の発現機構は不明であったが、我々の解析によりグルコースによるグルカゴン受容体発現誘導を明らかにした。すなわち、グルコースにより活性化された ChREBP がグルカゴン受容体プロモーター領域に結合することにより直接グルカゴン受容体の遺伝子発現を調節することを明らかにした。また、

グルカゴン自体は細胞内 cAMP の上昇を介して ChREBP の転写を抑制することから、ChREBP とグルカゴン-グルカゴン受容体との間にフィードバック機構が存在することを明らかにした。

(3) ChREBP と PPAR の機能連関について (業績 : Iizuka K, et al. Endocr J, 2012.)

脂肪合成系に關与する転写因子である ChREBP は時計関連遺伝子の発現調節に關与する。脂肪分解に關わる転写因子である PPAR もまた時計遺伝子の発現調節に關与することが報告されている。褐色脂肪組織では、ChREBP と PPAR のどちらも高発現であることから、同組織における両者の機能連関について検討した。褐色脂肪細胞では、グルコース濃度依存的に ChREBP 標的遺伝子 (fatty acid synthase や ChREBP) の発現が誘導され、Ppara 遺伝子の発現は抑制される。ChREBP を過剰発現した褐色脂肪細胞株や ChREBP ノックアウトマウスの褐色脂肪組織の遺伝子発現解析、ChREBP および PPAR 応答配列を用いたレポーターアッセイから、ChREBP による PPAR 転写抑制が明らかとなった。逆に PPAR 活性化剤である Wy14643 の添加実験により、PPAR により ChREBP 転写活性が抑制されることを明らかにした。以上から、褐色脂肪組織において ChREBP と PPAR が互いの機能を抑制することにより、摂食時には ChREBP が活性化、PPAR は抑制されることで脂肪合成促進へ、空腹時には ChREBP が抑制、PPAR は活性化されることで脂肪分解促進へ働くことを明らかにした。

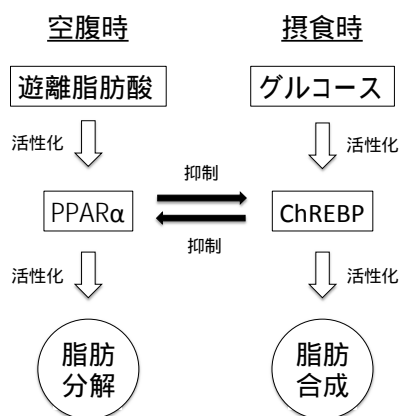


図 ChREBP と PPAR による脂肪合成分解調節機構

空腹時に PPAR は遊離脂肪酸により活性化され、脂肪分解系遺伝子を誘導し、結果脂肪分解へ促す。他方、ChREBP はグルコースにより活性化され、脂肪合成系遺伝子を誘導し、脂肪合成を促す。

(4) 生理学的手法を用いた転写因子 (LRH および ChREBP) の概日リズムに及ぼす影響

(業績 : Hattori et al. Endocr J, 2014.)

(1)-(3)で得られた知見を元に、in vivo での概日リズムに対する ChREBP の寄与を検討する目的で、活動量、摂餌量などの生理学的なパラメータを検討した。マウスはヒトと異なり、夜間に活動しかつ給餌する。そこで、経時的に活動量、酸素消費量、摂餌量などの生理学的パラメータを測定することで in vivo における概日リズムの異常をとらえることができる。ChREBP ノックアウトマウスの繁殖がおくっていたこともあって、まず LRH-1 ヘテロノックアウトマウスを用いて、上記の解析を行なった。LRH-1 は概日リズム調節に關与する SHP により発現調節を受ける。LRH-1 マウスは通常食および高脂肪食で野生型マウスに比べ体重が増加するが、耐糖能、脂質レベル、インスリン感受性に関しては差を認めなかった。さらに、摂餌量、酸素消費量、活動量の総量および日内変動に関しては両群で差を認めなかった。同時におこなった ob/ob マウスに關しての生理学検討については既報と同じ結果が得られたことから、測定系には問題ないと考えられた。上記をふまえて、ChREBP ノックアウトマウスと野生型マウスに關して活動量、摂餌量の総量、日内変動を検討したが、両群では差を認めなかった。おそらくは ChREBP の概日リズムに対する影響は代謝パラメータに限局されるのであろう。

(5) 本研究の意義、位置づけについて (業績 : Iizuka K. Endocr J, 2013.)

本研究により、時計関連遺伝子 (DEC-1, KLF-10, PPAR, FGF-21 など) が ChREBP とフィードバックループを形成し、代謝や概日リズムを調節することを概念づけることが出来た。時計関連遺伝子とされる多くの遺伝子の役割は転写を抑制する方向 (いわばブレーキとして) に働くため、時計遺伝子調節に關わらず、代謝を含めた多くの経路の調節メカニズムとして共通していると思われる。実際、これらの因子は、概日リズムだけでなく代謝調節や細胞増殖で主要な役割を果たすことが既に報告されている。そう考えると、糖尿病やメタボリックシンドロームの発症に概日リズムの異常が指摘されているが、グルコースによる ChREBP と時計関連遺伝子のフィードバック機構の關与が示唆される現象の一つと捉えられるのかもしれない。

結論として本研究を通じて、メタボリックシンドロームの治療において生活習慣の是正が最も重要な治療の基盤であり、ChREBP を過度に活性化させないこと (すなわち食後高血糖をさけること) が重要と考えられた。

以下にまとめの図を示す。

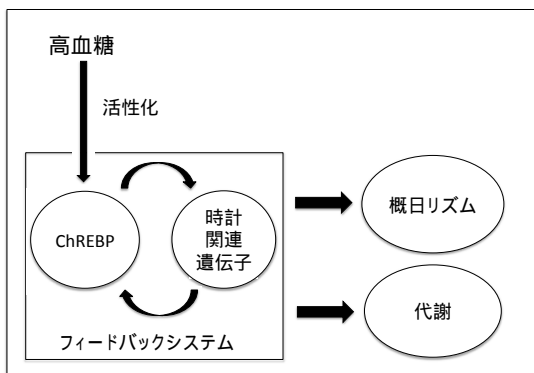


図: ChREBP と時計関連遺伝子とのフィードバックループシステムと概日リズムや代謝との機能連関

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 17 件)

Lizuka K, Niwa H, Takahashi Y, Takeda J (2014) Liraglutide normalised glucose tolerance and the insulin response to glucose in a non-obese patient with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Diabetol Int* In press. 査読有り <http://dx.doi.org/10.1007/s13340-014-0167-x>

Nishimura H, Lizuka K, Takeda J (2014) Protamine-containing insulin but not analog insulin and duration of insulin use are risk factors for the production of insulin autoantibodies in insulin-treated patients with diabetes mellitus. *Endocr J* in press. 査読有り <http://dx.doi.org/10.1507/endocrj.EJ13-0544>

Hattori T, Lizuka K, Horikawa Y, Takeda J (2014) LRH-1 heterozygous knockout mice are prone to mild obesity. *Endocr J* 61:471-480. 査読有り <http://dx.doi.org/10.1507/endocrj.EJ14-0017>

Lizuka K, Wu W, Horikawa Y, Saito M and Takeda J (2013) Feedback looping between ChREBP and PPAR in the Regulation of Lipid Metabolism in Brown Adipose tissues. *Endocr J* 60: 1145-1153. 査読有り <http://dx.doi.org/10.1507/endocrj.EJ13-0079>

飯塚 勝美, 武田 純 (2013) グルカゴン受容体とグルコースによる発現調節-転写因子 ChREBP を介した経路- 生体

の科学 64(5)、page406-407. 査読無し
Lizuka K (2013) Recent progress on the role of ChREBP in glucose and lipid metabolism [Review]. *Endocr J* 60: 543-555. 査読有り <http://dx.doi.org/10.1507/endocrj.EJ13-0121>

Lizuka K, Wu W, Horikawa Y, and Takeda J (2013) Role of glucose-6-phosphate and xylulose-5-phosphate in the regulation of glucose-stimulated gene expression in the pancreatic cell line, INS-1E. *Endocr J* 60: 473-482. 査読有り

<http://dx.doi.org/10.1507/endocrj.EJ12-0413>

Ido-Kitamura Y, Sasaki T, Kobayashi M, Kim HJ, Lee YS, Kikuchi O, Yokota-Hashimoto H, Lizuka K, Accilli D, Kitamura T (2012) Hepatic FoxO1 Integrates Glucose Utilization and Lipid Synthesis through Regulation of ChREBP O-Glycosylation. *PLoS One* 7: e47231. 査読有り <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0047231>.

Lizuka K, Tomita R, Horikawa Y, Takeda J (2012) A case of glycemic instability and insulin allergy due to anti-insulin antibodies in a patient with type 2 diabetes. *Diabetol Int* 3: 233-238. 査読有り <http://dx.doi.org/10.1007/s13340-012-0077-8>

Lizuka K, Tomita R, Horikawa Y, Takeda J (2012) Effectiveness of the glucagon test in estimating islet function for liraglutide treatment in a lean diabetic patient with impaired insulin response to glucose: a case report. *Diabetol Int* 3: 103-108. 査読有り <http://dx.doi.org/10.1007/s13340-012-0068-9>

Lizuka K, Tomita R, Suwa T, Horikawa Y, Takeda J (2012) Normalization of fasting hyperglycemia is beneficial for successful introduction of small amount of the GLP-1 analog liraglutide in an obese patient with type 2 diabetes mellitus *Diabetol Int* 3: 61-64. 査読有り <http://dx.doi.org/10.1007/s13340-011-0052-9>

Lizuka K, Tomita R, Takeda J, Horikawa Y (2012) Rat glucagon receptor mRNA is directly regulated by glucose through transactivation of the carbohydrate response element binding protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 417:

1107-1112. 査 読 有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.12.042>

Iizuka K, Takeda J, Horikawa Y (2011) Krüppel-like factor-10 is directly regulated by carbohydrate response element-binding protein in rat primary hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 412: 638-643. 査読有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.08.016>

飯塚 勝美 (2011) その他の転写因子 (ChREBP ほか) とその役割 *日本臨床* 69(S1):275-278.

Horikawa Y, Enya M, Iizuka K, Chen GY, Kawachi S, Suwa T, Takeda J (2011) Synergistic effect of α -glucosidase inhibitors and dipeptidyl peptidase 4 inhibitor treatment. *J Diabet Invest.* 2: 200 - 203. 査読有
<http://dx.doi.org/10.1111/j.2040-1124.2010.00081.x>

〔学会発表〕(計 17 件)

Iizuka K, Wu W, Hattori T, Horikawa Y, Saito M, Takeda J. Role of ChREBP and PPAR α in the regulation of glucose and lipid metabolism in brown adipocytes. 49th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Septembr23-27, 2013. Barcelona, Spain,

Iizuka K, Wu W, Tsuchida H, Hattori T, Horikawa Y, Saito M, Takeda J. Crosstalk between ChREBP and PPAR in brown adipocytes lipid metabolism American Diabetes Association's 73th Scientific Sessions, June21~25, 2013. Chicago, IL, USA.

Iizuka K, Tomita R, Horikawa Y, Takeda J. Glucagon Receptor and Glucagon-like Peptide-1 Receptor mRNA Expression are Inversely Regulated by Glucose Through ChREBP Activation. American Diabetes Association's 72th Scientific Sessions, June 8 - 12, 2012, Philadelphia, PA.

Iizuka K, Wu W, Tomita R, Tsuchida H, Horikawa Y, Takeda J. Deletion of the small heterodimer partner gene protects against fatty liver and dyslipidemia, but not obesity and glucose intolerance in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. 48th EASD Annual Meeting, October, 1 - 5, 2012, Berlin, Germany.

Iizuka K, Tomita R, Wu W, Horikawa Y, Takeda J. Glucagon receptor and incretin receptors are inversely

regulated by glucose through ChREBP activation. the 9th IDF-WPR Congress&4th AASD Scientific Meeting, November24-27, 2012, Kyoto, Japan.

Iizuka K, Tomita R, Horikawa Y, Takeda J. Role of glucose-6-phosphate in the regulation of glucose stimulated gene expression in the pancreatic beta cell line INS-1E. 47th EASD Annual Meeting, September12-16, 2011, Lisbon, Portugal.

Iizuka K, Horikawa Y, Tomita R, Suwa T, Takeda J. Rat Krueppel-Like Factor 10 (Klf-10) Gene Expression Is Regulated by the Carbohydrate Response Element Binding Protein ChREBP in Primary Rat Hepatocytes. American Diabetes Association's 71st Scientific Sessions, June 24 - 28, 2011, San Diego, California.

〔図書〕(計 1 件)

Iizuka K (2013) Chapter 7 - The Feedforward and Feedback Loop between ChREBP and its Target Genes in the Regulation of Glucose and Lipid Metabolism (pp. 155-168), In *Advances in Medicine and Biology*. Volume 63. 2013. Editors: Leon V. Berhardt, Nova Science Publishers.

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

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

堀川 幸男 (HORIKAWA, Yukio)
岐阜大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：10323370