

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：84420

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659176

研究課題名（和文） 第3のコレステロールセンサーとしてのSIKの機能解明と応用

研究課題名（英文） SIK acts as the third cholesterol sensor

## 研究代表者

竹森 洋 (TAKEMORI HIROSHI)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・プロジェクトリーダー

研究者番号：90273672

研究成果の概要（和文）： 生体に取り込まれたコレステロールの代謝調節において、コレステロールが過剰な場合は、核内受容体のLXRが代謝物を感知しコレステロールの排出経路を活性化させ、反対に少ない場合は、SREBPが活性化されコレステロールの生合成経路が活性化される。一方、生体エネルギーはコレステロールのみでは無く、コレステロールと中性脂質の複数のエネルギー源が過剰な状態や、コレステロールと炭水化物が過剰という複雑な状況が想定される。複数経路の過剰状態では、生体はエネルギー排出・浪費に働くか蓄積に働く必要があり、栄養素を個別に制御するシステムと全体をまとめて制御するシステムの双方が機能する必要がある。塩誘導性キナーゼ3 (SIK3) の遺伝子破壊マウス(KO)を解析することで、コレステロールを中心とした生体エネルギー代謝の複雑な制御を解明した。SIK3-KOマウスにコレステロールのみが多い食事を負荷すると、肝臓にコレステロールの固まりが沈着し肝臓外および体外に排出されなかった。また、脂肪のみが多い食事は肝障害を低減させた。すなわち、コレステロールと中性脂肪の代謝はセットで調節されており、そのバランスをSIK3が制御している。SIK3が欠損した場合は、新規の脂肪合成が低下しているため、外から脂肪を供給すると肝機能が改善されるが、その際にコレステロール代謝が異常（過剰量の負荷）を伴うと、中性脂肪負荷が逆に作用し、肝機能をさらに増悪させるということが判明した。肝機能の悪化は、コレステロールから合成される胆汁酸の排出不全が原因であると考えられるが、SIK3-KOマウスでは胆汁酸の合成・排出制御が、食事に反応していないことも明らかとなった。例えば、胆汁酸は脂肪吸収に必要であるため、高脂肪食負荷時は必要以上の胆汁酸供給は不要となり、胆汁酸の合成が抑制されるが、SIK3-KOマウスではその抑制は観察されない。インスリンが栄養の蓄積・代謝制御の中心分子であるが、SIK3はインスリンと平行して機能するシグナルであり、栄養素間の分配に特に重要であると示唆された。また、これらの現象にはビタミンAの代謝も関わっていることが明らかとなり、SIK3が糖・脂質代謝の中心的制御分子であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）： Salt-inducible kinase 3 (SIK3), an AMP-activated protein kinase-related kinase, is induced in the murine liver after the consumption of a diet rich in fat, sucrose, and cholesterol. To examine whether SIK3 can modulate glucose and lipid metabolism in the liver, we analyzed phenotypes of SIK3-deficient mice. *Sik3*<sup>-/-</sup> mice have a malnourished the phenotype (*i. e.*, lipodystrophy, hypolipidemia, hypoglycemia, and hyper-insulin sensitivity) accompanied by cholestasis and cholelithiasis. The hypoglycemic and hyper-insulin-sensitive phenotypes may be due to reduced energy storage, which is represented by the low expression levels of mRNA for components of the fatty acid synthesis pathways in the liver. The biliary disorders in *Sik3*<sup>-/-</sup> mice are associated with the dysregulation of gene expression programs that respond to nutritional stresses and are probably regulated by nuclear receptors. Retinoic acid plays a role in cholesterol and bile acid homeostasis, whereas ALDH1a which produces retinoic acid, is expressed at low levels in *Sik3*<sup>-/-</sup> mice. Lipid metabolism disorders in *Sik3*<sup>-/-</sup> mice are ameliorated by the treatment with 9-cis-retinoic acid. In conclusion, SIK3 is a novel energy regulator that modulates cholesterol and bile acid metabolism by coupling with retinoid metabolism, and may alter the size of energy storage in mice.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	0	1,700,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	360,000	3,260,000

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： SIK, CRTCL, 糖代謝、脂質代謝、コレステロール、胆汁酸

### 1. 研究開始当初の背景

日本人の死因の第1位は、悪性新生物(がん)で、第2位は心疾患(心臓病)、第3位は脳血管疾患(脳卒中)である。第2位と第3位はどちらも血管系の疾患であり、血管が詰まる・破裂するという病態に起因する。ひと昔前は、血管疾患が圧倒的に1位であったが、この死亡原因率の低下は血圧コントロールを薬で行えるようになった成果と言える。しかし、現状でも血管疾患が悪性新生物と死亡原因において肩を並べており、また、血管疾患が寝たきりなどのQOL低下の最大の原因であることから、さらなる病態制御剤の創製が期待されている。

コレステロールの血管壁への沈着は動脈硬化・血栓症の原因とされ、スタチンに代表される様々なコレステロール低下剤が開発・利用されてきた。血中コレステロールの増加は肝臓からのVLDL・LDLの放出とLDLの回収のバランスの不均衡に起因し、特に、インスリン抵抗性になると顕著化する。一方、コレステロールが過剰となると、コレステロールセンサーである転写因子LXRが活性化され、肝臓では脂肪酸の合成が活性化されると同時に、コレステロールから胆汁酸への合成系が活性化される。また、合成された脂肪酸の一部がコレステロール融解作用を有するリン脂質へと変換されることで、胆汁酸の腸管排出も促進される。一方、血管内皮などの末梢からはコレステロールの逆輸送を担当するHDLの増加をもとに、コレステロールの引き抜き系が活性化される。さらに、消化管ではコレステロールや胆汁酸の吸収が阻害され、総合的にコレステロール低下へと代謝系がシフトする。これらはLXRの遺伝子破壊(KO)マウスを利用することで詳細に分子機構が明らかにされてきた。

興味深いことに、LXR-KOマウスはコレステロ

ール代謝調節不全を引き起こすものの、同時に抗肥満・高インスリン感受性作用も示すことも明らかにされた。さらに、LXRはコレステロールのみならず、糖質センサーとして機能し、脂肪合成系を活性化させることも示された。これらの観点から、LXRを如何に制御するかがメタボリック症候群制御の重要課題として位置づけられ、様々なLXRリガンドが提案されてきた。しかし、LXRを活性化させれば脂肪肝になり、不活性化させれば脂質異常症となる副作用的効果のため有効な薬は未だ創製されていない。

我々は蛋白リン酸化酵素の研究という全く別の観点からコレステロールを感知する新規の機構解明を試み、運良く、高カロリー摂取時にコレステロールを追加負荷すると起動するシグナル(塩誘導性キナーゼ：SIK)を同定できた。SIK3のKOマウスは、余剰なエネルギー(カロリー)を体内に備蓄する能力に欠け、いかなる給餌条件でも全く内臓脂肪が存在しない。その機構として肝臓に特異的なSCAP/SREBP2・LXR/SREBP1経路の修飾の可能性を見いだした。結果として、脂質異常症を伴わないコレステロール低下作用と抗肥満を介したインスリン高感受性の両方がマウスで実現できた。

本研究では、LXR制御とSIK制御の違いをより明確に示すことで、現状でのLXR関連創薬モデルの閉塞状況を打破し、メタボリック症候群に対する創薬の芽を構築するための材料を、新たなコンセプトをもとに提供することを目指すものとする。

### 2. 研究の目的

コレステロールは生体構成材料としてのみならず、シグナル伝達・代謝調節にも重要

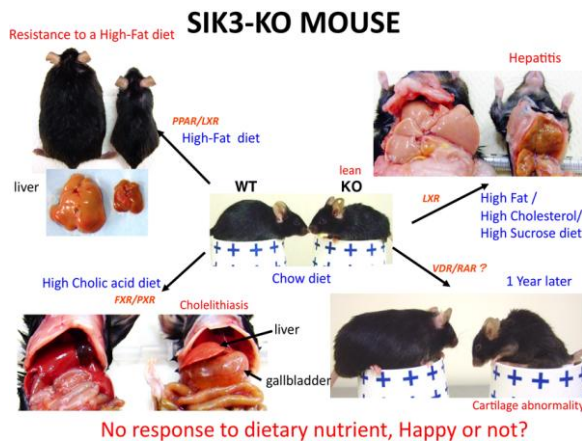
な役割を果たしており、動脈硬化以外にもメタボリック症候群全般の病態制御の鍵として注目されている。我々はマウスを利用して、エネルギーセンサーシグナルとして機能する AMPK ファミリーキナーゼから、発現が肥満度に相関する酵素を絞り込んだ。次に、その中から高カロリー餌にコレステロールを添加した場合に特異的に誘導される酵素として SIK3 が該当する事実を得た。そこで、SIK3 の KO マウスを作成したところ、KO マウスはいかなる食餌環境でも内臓脂肪が付かず、極度のインスリン感受性を示すことが明らかとなった。SIK3-KO は、血中および肝臓中のコレステロールが極端に低く、これまで報告されている脂質代謝異常マウスとは明らかに異なる。本研究では SIK が結びつけるコレステロール代謝調節と糖・脂質代謝調節の接点を解明し、新規創薬モデルとしての可能性を追求し、制御薬の雛形を創製することを目的とする。

### 3. 研究の方法

SIK3-KO マウスは C57BL/6J の遺伝的背景で維持した。野生型 (WT) と KO をそれぞれ、5 もしくは 6 匹のグループで飼育し、12 週以降に、特種配合食 (リサーチダイエツト社) で 4 ヶ月飼育を続けたのち、糖・脂質代謝の試験を行った。

肝臓の遺伝子発現解析はリアルタイム PCR 法で行った。

### 4. 研究成果



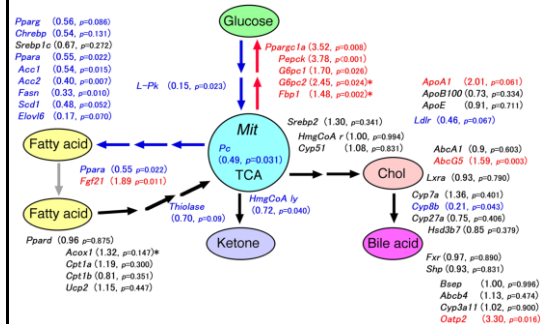
図に示す様に、SIK3-KO マウスは小柄であった。正常マウスは高脂肪食摂取で体重が増加するが、SIK3-KO マウスは全く体重増加が観察されない。一方で、高脂肪に高砂糖と高コレステロールを含むエサで飼育すると、肝臓のコレステロール蓄積が顕著となり肝炎を誘発した。この表現型は LXR 欠損マウスとよく似ているが、SIK3-KO の肝臓内部には LXR 欠損マウスに観察されるコレステロールの脂肪滴は観察されないことから、LXR 欠損とは異なる結論される。

肝障害の原因を検討する目的で血中生化学マ

ーカーを解析したところ、胆管系の異常時に上昇する ALP が SIK3-KO マウスにおいて高値を示していた。そこで、血中胆汁酸濃度を測定したところ、やはり SIK3-KO は血中胆汁酸濃度が高かった。すなわち、胆汁うったいが SIK3-KO マウスの顕著な表現型と言える。

胆汁うったいは、FXR 欠損マウスでも特徴的であり、胆汁酸成分のコール酸負荷で増悪化する。そこで、SIK3-KO マウスにコール酸負荷を行ったところ、肝臓はさらに障害を受け、胆嚢は肥大化していた。

一見、LXR と FXR の両欠損と受け止められるため、肝臓での遺伝子発現を解析した。



図に示すように、Mit (ミトコンドリア) でのエネルギー代謝および糖・脂質代謝を中心に検討した結果、SIK3-KO の肝臓では、解糖系から脂質合成系が落ちており、糖新生が亢進していた。一方、コレステロールから胆汁酸代謝にかけては動いていなかった。これらのことから、やはり LXR と FXR の機能になんらかの異常があると予想された。

LXR や FXR はプロモーター領域に結合する際に、RXR とヘテロダイマーを構成する。RXR は 9cis-レチノイン酸をリガンドとし活性が制御されていることから、9cis-レチノイン酸の生合成経路を検討した。その結果、ビタミン A からレチノイン酸を合成する酵素に発現が極端に低いことが判明した。残念ながら、現在は 9cis-レチノイン酸を定量する技術は開発されていない。そこで、ビタミン A を定量したところ、SIK3-KO マウスの肝臓ではビタミン A が蓄積していることが明らかとなった。

以上のことから、SIK3 は新たな糖・脂質代謝調節分子であり、ビタミン A 代謝とあいまって生体エネルギーの温存 (蓄積) において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- 1) Uebi T, Itoh Y, Hatano O, Kumagai A, Sanosaka M, Sasaki T, Sasagawa S, Doi J, Tatsumi K, Mitamura K, Morii M, Aozasa K, Kawamura T, Okumura M, Nakae J, Takikawa H, Fukusato T, Koura M, Nish M, Hamsten A,

- Silveira A, Bertorello AM, Kitagawa K, Nagaoka Y, Kawahara H, Tomonaga T, Nakal T, Ikegawa S, Tsumaki N, Matsuda J, Takemori H\* *Involvement of SIK3 in glucose and lipid homeostasis in mice.* PLoS ONE (2012) 7 e37803 査読有 DOI ; 10.1371
- 2) Popov S, Venetsanou K, Chedrese PJ, Pinto V, Takemori H, Franco-Cereceda A, Eriksson P, Mochizuki N, Soares-da-Silva P, Bertorello AM. *Increases in intracellular sodium activate transcription and gene expression via the salt-inducible kinase 1 network in an atrial myocyte cell line.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. (2012) in press 査読有 DOI ; 10.1152
- 3) Nakae J, Cao Y, Hakuno F, Takemori H, Kawano Y, Sekioka R, Abe T, Kiyonari H, Tanaka T, Sakai J, Takahashi SI, Itoh H. *Novel repressor regulates insulin sensitivity through interaction with Foxo1.* EMBO J. (2012) 31: 2275-2295 査読有 DOI ; 10.1038
- 4) Sasagawa S, Takemori H, Uebi T, Ikegami D, Hiramatsu K, Ikegawa S, Yoshikawa H, Tsumaki N *SIK3 is essential for chondrocyte hypertrophy during skeletal development in mice* Development (2012) 139: 1153-63 査読有 DOI: 10.1002
- 5) Dietrich JB, Takemori H, Grosch-Dirrig S, Bertorello A, Zwiller J. *Cocaine induces the expression of MEF2C transcription factor in rat striatum through activation of SIK1 and phosphorylation of the histone deacetylase HDAC5.* Synapse (2012) 66: 61-70 査読有 DOI:10.1371
- 6) Liu Y, Poon V, Sanchez-Watts G, Watts AG, Takemori H, Aguilera G *Salt inducible kinase is involved in the regulation of corticotropin releasing hormone transcription in hypothalamic neurons in rats.* Endocrinology (2011) 153:223-33 査読有 DOI: 10.121
- 7) Peeters A, Fraisl P, Berg S, Themaat E, Kampen A, Rider MH, Takemori H, Dijk K, Veldhoven P, Carmeliet P, Baes M *Carbohydrate metabolism is perturbed in peroxisome deficient hepatocytes due to mitochondrial dysfunction, AMP activated protein kinase (AMPK) activation and peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) suppression.* J. Biol. Chem. (2011) 286: 42162-79 査読有 DOI ; 10.1074
- 8) Popov S, Silveira A, Wågsäter D, Takemori H, Oguro R, Matsumoto S, Sugimoto K, Kamide K, Hirose T, Satoh M, Metoki H, Kikuya M, Ohkubo T, Katsuya T, Rakugi H, Imai Y, Sanchez F, Leosdottir M, Syvänen AC, Hamsten A, Melander O, Bertorello AM. *Salt-inducible kinase 1 influences Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in vascular smooth muscle cells and associates with variations in blood pressure.* J Hypertens. (2011) 29: 2395-2403 査読有 DOI: 10.1097
- 9) Kumagai A, Horike N, Satoh Y, Uebi T, Sasaki T, Itoh Y, Hirata Y, Uchio-Yamada K, Kitagawa K, Uesato S, Kawahara H, Takemori H\*, Nagaoka Y *A potent inhibitor of SIK2, 3, 3', 7-trihydroxy-4'-methoxyflavon (4'-O-methylfisetin), promotes melanogenesis in B16F10 melanoma cells* PLoS ONE (2011) 6:e26148 DOI : 10.1371 査読有
- 10) Eneling K, Chen J, Welch LC, Takemori H, Sznajder JL, Bertorello AM. *Salt-inducible kinase 1 is present in lung alveolar epithelial cells and regulates active sodium transport.* Biochem Biophys Res Commun (2011) 409: 28-33 査読有 DOI: 10.1016
- [学会発表] (計 7 件)
- 1) 上尾達也, 伊東祐美, 熊谷彩子, 竹森 洋 SIK3 はコレステロール-胆汁酸代謝の制御因子である 第 34 回日本分子生物学会 (横浜) 平成 23 年 12 月 16 日
- 2) 竹森 洋, 上尾達也, 伊東祐美, 熊谷彩子, 佐野坂真人 塩誘導性キナーゼ SIK3-KO マウスに観察される胆汁うっ滞 第 33 回胆汁酸研究会 (大阪) 平成 23 年 11 月 19 日
- 3) 伊東祐美, 上尾達也, 熊谷彩子, 竹森 洋, 土居純子 塩誘導性キナーゼ SIK3 はコレステロールのクリアランスを制御する 第 50 回日本栄養食糧学会・近畿支部大会 (奈良) 平成 23 年 10 月 15 日
- 4) 伊東祐美, 上尾達也, 熊谷彩子, 竹森 洋 塩誘導性キナーゼ SIK3 はコレステロールのクリアランスを制御する 第 84 回日本生化学会 (京都) 平成 23 年 9 月 23 日

5) 福地守、桑名 由紀、竹森 洋、田淵 明子、津田 正明

PACAPはNMDAレセプター活性化によるカルシニューリン-TORC1-CREB経路を介し

てBDNF遺伝子発現を誘導する

第34回日本神経科学大会 (横浜) 平成23年9月17日

6) 佐々木 勉、竹森 洋、寺崎 泰和、杉山 幸生、大山 直紀、川村 美貴、八木田佳樹、北川 一夫

脳虚血後 SIK2-TORC1-CREB 経路の動態

STROK 2011 (京都) 平成23年8月1日

7) 下野 優子、竹森 洋、長岡 康夫、河原 秀久、山原 年

トキワムシゴケのアセトン抽出物によるメラニン生成抑制機構の解明

第10回日本地衣学会 (神戸) 平成23年7月9日

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

1) 名称：PPAR $\delta$  活性化剤および PPAR $\delta$  活性化剤の製造方法

発明者：河原秀久、長岡康夫、竹森 洋、小出芳栄

権利者：学校法人関西大学、独立行政法人医薬基盤研究所、有限会社 一栄

種類：特願

番号：2011-250865

出願年月日：平成23年11月26日

国内外の別：国内

2) 名称：軟骨疾患治療薬のスクリーニング方法および軟骨疾患治療用改変細胞

発明者：妻木範行、竹森 洋

権利者：国立大学法人大阪大学、独立行政法人医薬基盤研究所

種類：特願

番号：2011-121788

出願年月日：平成23年5月31日

国内外の別：国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

[http://www.nibio.go.jp/part/project/metabolism\\_disease/](http://www.nibio.go.jp/part/project/metabolism_disease/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹森 洋 (TAKEMORI HIROSHI)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・プロジェクトリーダー