

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16422

研究課題名（和文）転写因子FoxO1/PPAR を用いた選択的インスリン抵抗性の病態解明

研究課題名（英文）Uncovering the Pathogenesis of Selective Insulin Resistance through FoxO1 and PPARA Regulation

研究代表者

北本 匠（Kitamoto, Takumi）

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90916173

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、転写因子FoxO1とPPAR が相乗的に肝臓の糖新生を抑制し、インスリン感受性を高めることを明らかにした。G6pc遺伝子を用いたLuciferaseアッセイで、両転写因子がcAMP/Dex存在下で相乗的に糖新生を制御することを示した。共免疫沈降により両転写因子は互いに直接結合しないことが確認されたことから、同一の結合領域に個別に結合すると考えられる。肝細胞特異的FoxO1/PPAR ノックアウトマウスを用いた実験により、インスリン抵抗性下においても両転写因子は糖代謝を相乗的に抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、糖代謝とインスリン感受性の制御におけるFoxO1とPPAR の相乗効果を初めて明らかにし、糖尿病治療の新たな分子標的を示唆する。この成果は、選択的インスリン抵抗性のメカニズム解明に寄与し、糖尿病治療法の開発における重要な一歩となる可能性がある。また、インスリン感受性の改善に向けた新たなアプローチを提供し、社会的に糖尿病患者のQOL向上に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, the transcription factors FoxO1 and PPAR synergistically suppress hepatic glycogenesis and enhance insulin sensitivity. Luciferase assays using the G6pc gene showed that both transcription factors synergistically regulate glycogenesis in the presence of cAMP/Dex. Co-immunoprecipitation confirmed that both transcription factors do not bind directly to each other, suggesting that they bind individually to the same binding region. Experiments using hepatocyte-specific FoxO1/PPAR knockout mice showed that both transcription factors synergistically suppress glucose metabolism even under insulin resistance.

研究分野：代謝および内分泌学

キーワード：糖尿病 脂質異常症 インスリン抵抗性 肥満 FoxO1 PPARA

1. 研究開始当初の背景

インスリン作用障害による高血糖の分子メカニズムは、インスリンによる肝臓での糖新生の抑制不全と骨格筋や脂肪細胞における GLUT4 の発現低下により説明される。このうち肝細胞のインスリン作用障害による糖代謝異常だけが、インスリン作用依存的である (James DE, et al. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021;22(11):751-771)。この点において肝臓はインスリンシグナルの創薬応用に重要な標的となる。健常時、インスリンシグナルは肝臓での糖産生を抑制し、脂肪合成を亢進する。しかし細胞内インスリンシグナルが低下し高血糖を示す 2 型糖尿病発症時期においても脂肪合成は亢進していることが知られている (*Cell Metab.* 2008;7(2):95-6)。この事実は、2 型糖尿病の治療には糖代謝選択的インスリン抵抗性を改善させる必要があることを示している。しかし、この病態メカニズムは未解明のままであり、患者治療に結びついていないのが現状である。この問題を解決するには、生体内肝細胞において糖・脂質代謝へのインスリン感受性は健常時、あるいはインスリン作用障害時にどのように決定されるのか、という問いに答える必要がある。2021 年に申請者らは、生体内肝細胞におけるインスリンによる核内伝達シグナルを介した代謝制御機構について、転写因子 FoxO1 に着目することで以下を明らかにした。(1) 生体内肝細胞において FoxO1 は糖・脂質代謝を Active Enhancer の異なる領域への結合を介して制御する。(2) FoxO1 は結合領域の半数を脂肪酸代謝を制御する転写因子 PPAR α と共有し、これは特に糖代謝制御遺伝子群に多く確認される。一連の研究成果を用いて、FoxO1/PPAR α による糖・脂質代謝の制御機構の違いに着目することで選択的インスリン抵抗性の病態解明を目指すというのが本研究を立案した最大の動機である。

2. 研究の目的

本研究計画の目的は、選択的インスリン抵抗性の病態を解明し、糖代謝特異的な新規標的遺伝子を特定することにある。転写因子 FoxO1 と PPAR α を用いた糖と脂質制御に関する転写ロジックの機能的妥当性を評価することが最も重要な目的となる。

肝細胞特異的 FoxO1 ノックマウスを用いることで、肝細胞のインスリンシグナル異常に伴う高血糖を正常化させることが証明されてきた (*Cell Metab.* 2007;6(3):208-216; *Cell Metab.* 2008;8(1):65-76; *Nat Med.* 2012;18(3):388-395)。一方で肝細胞特異的 PPAR α ノックアウトマウスは脂肪酸合成障害をきたし、肝脂肪蓄積を促進させることが知られている (*Gut.* 2016;65(7):1202-14)。糖代謝及び脂質代謝の制御に大きな影響をもたらすとされるこれら両転写因子について糖代謝において相乗的な効果を検証した研究報告は見られていない。したがって、本研究計画では、この両転写因子による糖代謝制御の相互作用及び、その標的遺伝子群を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

大きく以下の実験を行った。

(1) FoxO1 と PPAR α のタンパク質複合体形成の可能性についての検証

FoxO1 と PPAR α が複合体を形成しクロマチンへ結合する可能性について、HEK293 細胞とプラスミドを用いて、共免疫沈降により検証する。

(2) FoxO1 と PPAR α の相互作用メカニズムの同定

FoxO1 の活性化制御を行うインスリンと、PPAR α を活性化する内因性リガンドである遊離脂肪酸などに各々の転写因子への交差活性があるか評価する。両転写因子が相乗作用を持つ G6PC 遺伝子配列を用いて Enhancer - Promoter のリポーターアッセイを組み立てる。

(3) FoxO1/PPAR α が生体内の糖・脂質代謝制御に与える影響を明らかにする

肝特異的 FoxO1 ノックアウト (LFKO)、PPAR α ノックアウト (LPKO)、FoxO1/PPAR α ノックアウト (LFPKO) マウスを用いて、絶食応答に対する両転写因子の糖・脂質代謝への相乗作用の時系列変化を明らかにする。主に血漿中インスリン、糖、中性脂肪、コレステロール、遊離脂肪酸、ケトン体の 6 つの代謝マーカーなどを評価する。

(4) 糖代謝特異的標的遺伝子群の同定

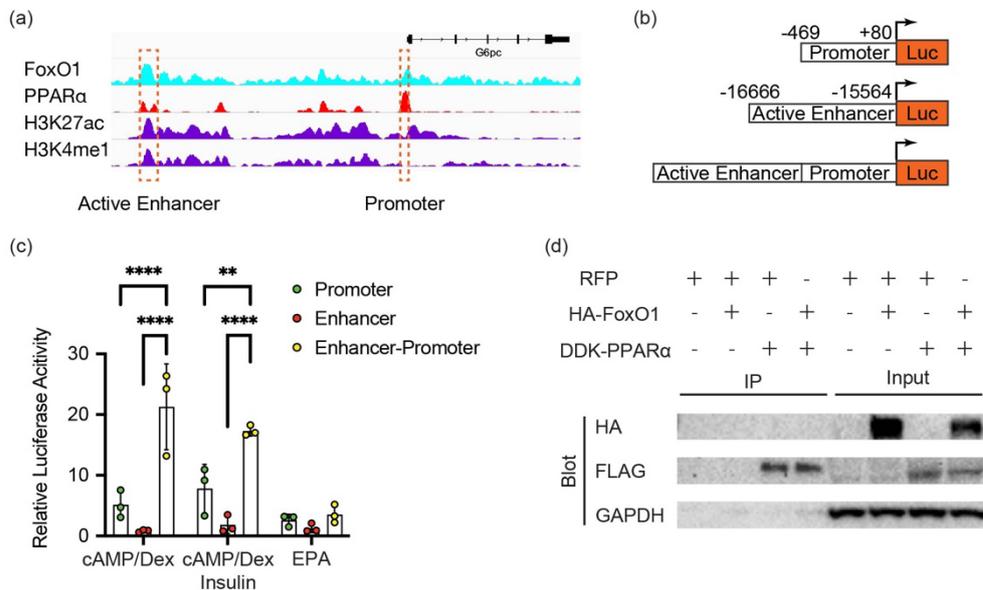
両転写因子による肝組織の標的遺伝子群を RNA-seq により Genome wide に解析する。この結果を FoxO1/PPAR α ChIP-seq データと統合し、両転写因子の糖新生経路に関わる遺伝子制御群を明らかにする。

4. 研究成果

FoxO1 と PPAR α の発現プラスミドを作成した。ウェスタンブロットにより、これらのプラスミドのタンパク発現が各々の転写因子の分子量に相当する 52kDa および 80kDa にブロットされることを確認し、共免疫沈降を行った。その結果、両者は互いに直接結合していないことが確認された。したがって、両転写因子は、同一の結合領域へ個別に結合していると考えられた。続いて、肝糖新生の律速酵素をコードする主要な制御遺伝子である G6pc 上流の配列を用いて Luciferase アッセイへと実験を進めた。先行研究で行った Foxo1 と PPAR α の ChIP-seq のデータから、両者が結合する G6pc の Promoter および Enhancer 領域を同定した (図

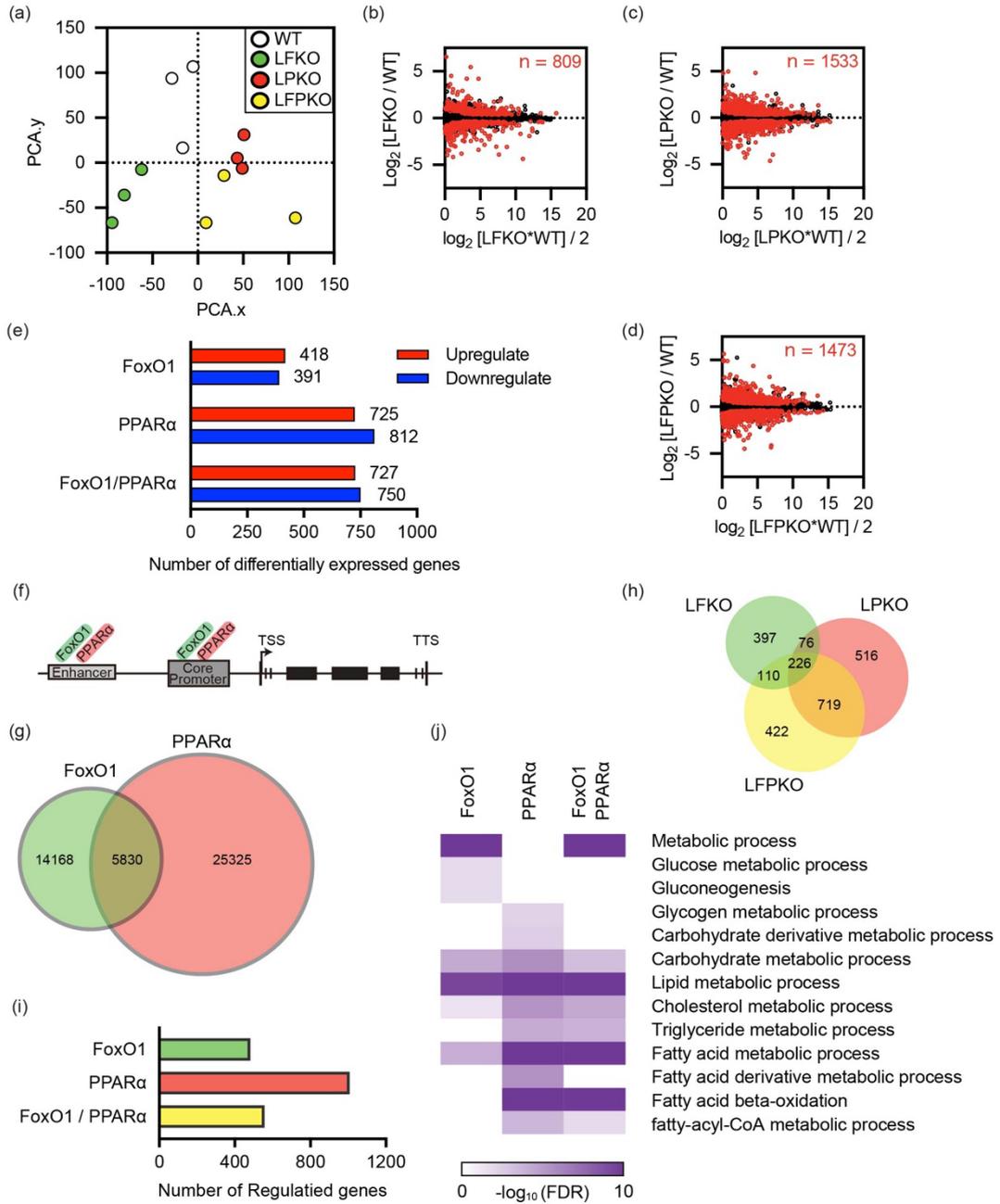
1(a)。それらの配列を用いて、(1) Promoter-pGL4.10, (2) Enhancer-pGL4.10, (3) Enhancer-Promoter-pGL4.10 の3種類の Luciferase assay 用 プラスミドを作成した(図 1(b))。これらに対して、各々のリガンドである cAMP、Dexamethasone (Dex)、インスリン、遊離脂肪酸 (EPA)を用いて刺激を行い、G6pc の発現変化を評価した (図 1(c))。これらのコンストラクトと FoxO1 と PPAR α のコンストラクトを用いて cAMP/Dex 存在下において FoxO1 と PPAR α は G6pc の発現を相乗的に強めることが確認された。また、この効果は Enhancer のみでは認められず、Enhancer と Promoter が揃わなければ得られなかった。

図 1



続いて、LFPKO マウスにおける糖代謝のフェノタイプング及び糖新生関連の制御遺伝子に対する影響の評価を行った。LFPKO マウス、各シングルノックアウトマウス、および対照群を4時間絶食した後に肝組織を採取し、RNA-seq を用いて遺伝子の発現変動を分析した。PCA プロットによると、LFPKO および LPKO マウスは対照群と顕著に異なり、LFPKO マウスはシングルノックアウトの中間的な特性を示していた (図 2(a))。LFPKO, LPKO, LFPKO により、それぞれ 809、1533、1473 の有意な遺伝子発現変動が認められた(図 2(b-e, h))。続いて、Foxo1 および PPAR α の ChIP-seq データを用いて、これら遺伝子のうち、FoxO1 または PPAR α に結合する遺伝子のみを選択(図 2(f-h))した結果、それぞれ 483、1009、557 の遺伝子群に絞られた(図 2(i))。オントロジー解析を行い、これら遺伝子は糖代謝及び脂肪酸代謝において有意な発現変動を示し、特に糖代謝においては両転写因子の相乗的な影響が示唆された(図 2(j))。肝糖新生経路に関わる遺伝子群について詳細に分析したところ、多くが FoxO1 と PPAR α 両者の影響を受けていることが明らかになった。さらに LFPKO マウスから肝細胞を単離し、cAMP/Dex や Insulin の刺激下での両転写因子の影響を検証し、両転写因子のノックアウトは糖新生を相乗的に抑制することが確認された。さらに高脂肪食によるインスリン抵抗性を誘発し、糖負荷試験、ピルビン酸負荷試験、インスリン負荷試験を行ったところ、LFPKO マウスはシングルノックアウトに比較して、耐糖能の改善及びインスリン感受性が向上していることが確認された。以上の研究成果から、FoxO1 と PPAR α は相乗的にマウス個体の糖新生を抑制し、インスリン感受性を高めること、そしてその効果は FoxO1 が活性化している状態においてより顕著であることが確認された。

2年間で得られた一連の研究成果を現在論文報告としてまとめ、投稿準備中である。また、LFPKO の通常状態とインスリン抵抗性状態における RNA-seq のデータ比較を行い、インスリン抵抗性下における糖代謝制御に重要な標的遺伝子を絞り込み、機能解析を進めている状況である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Accili Domenico, Talchai Shivatra C, Bouchi Ryotaro, Lee April Yun Kyoung, Du Wen, Kitamoto Takumi, McKimpton Wendy M, Belvedere Sandro, Lin Hua V	4. 巻 -
2. 論文標題 Diabetes treatment by conversion of gut epithelial cells to insulin producing cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	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） 10.1111/jdi.14175	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Takumi Kitamoto, and Domenico Accili	4. 巻 70 (9)
2. 論文標題 Unraveling the mysteries of hepatic insulin signaling: deconvoluting the nuclear targets of insulin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 851-866
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endocrj.EJ23-0150	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 北本 匠、Diana Kuo、岡部篤史、金田篤志、Domenico Accili、横手幸太郎
2. 発表標題 肝代謝遺伝子転写ロジックから紐解く選択的インスリン抵抗性の病態解明
3. 学会等名 第58回日本臨床分子医学会学術集会(招待講演) (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takumi Kitamoto, Diana Kuo, Atsushi Okabe, Atsushi Kaneda, Domenico Accili
2. 発表標題 インスリン標的遺伝子におけるエンハンサー拡散異常を介した肝糖産生及び脂質合成異常の病態形成モデル
3. 学会等名 第66回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takumi Kitamoto, Hitoshi Watanabe, Yasutaka Miyachi, Makoto Miyabayashi, Rito Nakamura, Domenico Accili, Yoshiro Maezawa, Koutaro Yokote
2. 発表標題 Deciphering the pathogenesis of aberrant hepatic gluconeogenesis and lipid synthesis orchestrated by FoxO1 and PPAR
3. 学会等名 27th Adiposcience Symposium(招待講演)(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takumi Kitamoto
2. 発表標題 Deciphering the pathogenesis of aberrant hepatic gluconeogenesis and lipid synthesis orchestrated by FoxO1 and PPAR
3. 学会等名 Seoul Symposium on Obesity and Diabetes 2024 (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2024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

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