

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591332

研究課題名(和文) 運動による糖脂質代謝改善機構の解明と生活習慣病に対する新規運動効果模倣薬の探索

研究課題名(英文) Molecular mechanism for the beneficial effect of exercise on glucose and lipid metabolism, and search for exercise mimetics

研究代表者

細岡 哲也 (Hosooka, Tetsuya)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60590594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：運動により骨格筋において発現量が著増する転写調節因子PGC1 $\beta$ /cを同定し、ノックアウトマウスを用いた解析により本分子が運動による代謝改善作用を担うことを明らかとした。PGC1 $\beta$ /cの発現を増加させる薬剤は運動模倣効果により生活習慣病に対する新たな治療薬となり得ると考えられ、PGC1 $\beta$ /cプロモーターを活性化する新規化合物の探索を行った。他方、骨格筋においてPGC1 $\beta$ /cと会合する新たな転写因子Xを見出し、転写因子Xの生理的意義を解明するために本転写因子の骨格筋特異的ノックアウトマウスを作製した。本マウスの解析によりエネルギー代謝調節の分子メカニズムが解明されるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We identified novel transcriptional coactivators, PGC1 $\beta$ /c, whose expression in skeletal muscle were markedly upregulated by exercise. The study of PGC1 $\beta$ /c knockout mice demonstrated that these transcriptional coactivators mediate the beneficial effect of exercise on glucose and lipid metabolism, suggesting that PGC1 $\beta$ /c could be a novel therapeutic targets for metabolic disease. In this study, we searched the compounds which increase the expression of PGC1 $\beta$ /c in muscle cells. We also identified transcription factor X interacted with PGC1 $\beta$ /c in skeletal muscle and generated skeletal muscle-specific knockout mice of transcription factor X. The analysis of these knockout mice will reveal the precise mechanism for metabolic regulation.

研究分野：代謝学

キーワード：運動による代謝改善作用 運動効果模倣薬

### 1. 研究開始当初の背景

運動不足は、肥満や2型糖尿病などの生活習慣病の増加の主要な原因となっている。一方、習慣的な運動はこれらの疾患を改善するが、その詳細な分子機構については不明である。PGC1 $\alpha$  はエネルギー代謝に重要な転写コアクチベーターであり、骨格筋では脂肪酸代謝やミトコンドリア量の調節に参与する。このようなことから運動による糖脂質代謝改善作用に PGC1 $\alpha$  が関与する可能性が想定されてきた。しかしながら、PGC1 $\alpha$  を全身あるいは骨格筋特異的に欠損するマウスは、予想に反し、インスリン抵抗性や肥満を認めなかったことから (Lin J et al, Cell, 2004, Handschin C et al, JCI, 2007)、骨格筋の PGC1 $\alpha$  が運動による代謝改善作用に参与するかどうか不明であった。

代表者は、既知 PGC1 $\alpha$  の第1エクソンの上流 15kb に存在する新規エクソンから転写が開始される PGC1 $\alpha$  の新規アイソフォームを同定し PGC1ab 及び PGC1ac として報告した (Miura S et al, Endocrinology, 2008, Yoshioka T et al, BBRC, 2009, 研究業績論文 6)。骨格筋における発現量は、安静時、既知 PGC1 が優位であるが、運動後は新規アイソフォーム PGC1ab/c が著増することにより既知 PGC1 $\alpha$  を上回ることを見出した。代表者は、新規アイソフォーム特異的なノックアウトマウスを作製し、本マウスが肥満とインスリン抵抗性を呈することを示した (論文投稿中)。以上の研究結果より新規アイソフォーム PGC1ab/c が肥満や糖尿病などの生活習慣病の新たな治療標的となり得ることが明らかとなった。

代表者は、さらに、骨格筋細胞において PGC1ab/c と会合する転写因子 X を同定した (未発表データ)。すなわち、転写因子 X は新規アイソフォーム PGC1ab/c と協調してエネルギー代謝調節に参与する可能性が考えられた。

### 2. 研究の目的

骨格筋の新規アイソフォーム PGC1ab/c の発現量の増加は、運動効果を模倣することによって肥満や糖尿病などの生活習慣病に対する新規治療法に資するものと考えられる。本研究では、PGC1ab/c プロモーターを活性化させる新規運動効果模倣薬の探索を行った。さらに、骨格筋細胞において PGC1 b/c と会合する転写因子 X のエネルギー代謝調節における意義の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

(1) 新規 PGC1ab/c プロモーターあるいは既知 PGC1 $\alpha$  プロモーターの制御下にルシフェラーゼを発現するコンストラクトを作製し、培養骨格筋細胞に導入して恒常的細胞株を樹立する。これらの細胞株を用いて新規 PGC1ab/c プロモーターを活性化させる低分子化合物のスクリーニングを行った。

(2) 転写因子 X の組織分布を調べるとともに、骨格筋における転写因子 X がどのような生理的刺激によって発現が制御されるかを検討した。また培養骨格筋細胞に転写因子 X を強発現することにより、本転写因子がどのような遺伝子の発現制御に関与するかを調べた。

(3) Cre-LoxP システムを用いて、転写因子 X の骨格筋特異的ノックアウトマウスを作製し、表現型の解析を行う。

### 4. 研究成果

(1) マウス組織より新規 PGC1ab/c プロモーターをクローニングし、このプロモーターの制御下にルシフェラーゼを発現するプラスミドを作製した。同様に既知 PGC1 $\alpha$  プロモーターの制御下にルシフェラーゼを発現するプラスミドの作製も行った。これらの発現プラスミドを C2C12 細胞にトランスフェクションした後、薬剤によるセレクションを行い、それぞれの恒常的細胞株を樹立した。クレンプテロールは、骨格筋において既知 PGC1 $\alpha$  の発現を誘導することなく新規 PGC1ab/c の発現を特異的に誘導するが、樹立した恒常的細胞株をクレンプテロールで処理したところ、新規 PGC1ab/c プロモーターの制御下にルシフェラーゼを発現する C2C12 においてのみルシフェラーゼ活性の亢進が認められた。すなわち、樹立した恒常的細胞株が、新規 PGC1ab/c プロモーター活性および既知 PGC1 $\alpha$  プロモーター活性の評価に資することが示された。両細胞を用いたハイスループットスクリーニング系により、既知 PGC1 $\alpha$  プロモーター活性を高めることなく、新規 PGC1ab/c プロモーター活性のみを増強する低分子化合物の探索を現在進めている。このような化合物は、運動効果を模倣することにより肥満や2型糖尿病など生活習慣病に対する新たな治療薬となることが期待される。

(2) 骨格筋において新規 PGC1ab/c と会合する転写因子 X の組織分布を検討した。さまざまな組織において発現が認められたが、特に肝臓や骨格筋、脂肪組織などエネルギー代謝調節に重要な組織において高い発現が認められた。転写因子 X は骨格筋において運動により発現の増加が認められたが、絶食時にも発現が増加することが明らかになった。すなわち、本転写因子が運動時や絶食時などのエネルギー代謝調節に参与することが示唆された。

実際に、C2C12 骨格筋細胞において転写因子 X を強発現し、遺伝子発現変化を検討したところ、アミノ酸異化や糖新生に参与する遺伝子、また蛋白の翻訳や合成に参与する遺伝子などエネルギー代謝調節に参与する多くの遺伝子発現が本転写因子により制御されることが明らかとなった。

(3)エネルギー代謝調節における骨格筋の転写因子Xの生理的意義を解明するために、Cre-LoxP システムを用いて本転写因子の骨格筋特異的のノックアウトマウスを作製に着手した。

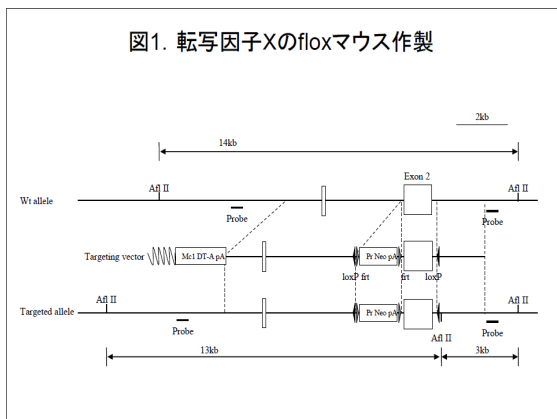


図1に示す targeting vector を構築し、相同組み換えによって転写因子Xの flox マウスを作出した。このマウスを Flp マウスと交配することにより neo 遺伝子を排除した後、骨格筋特異的 Cre マウスと交配することにより骨格筋特異的のノックアウトマウスの作製を完了した。本ノックアウトマウスを用いた解析により、転写因子X - PGC1 $\alpha$ /c を基軸としたエネルギー代謝調節の分子メカニズムが解明されることが期待される。

#### 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 4 件)

Hosooka T, Ogawa W. A novel role for the cell cycle regulatory complex cyclin D1-CDK4 in gluconeogenesis. *J Diabet Invest*. 2015. in press.

Takenaka N, Yasuda N, Nihata Y, Hosooka T, Noguchi T, Aiba A, Satoh T. Role of the guanine nucleotide exchange factor in Akt2-mediated plasma membrane translocation of GLUT4 in insulin-stimulated skeletal muscle. *Cell Signal*. 2014. 26: 2460-2469.

Takenaka N, Izawa R, Wu J, Kitagawa K, Nihata Y, Hosooka T, Noguchi T, Ogawa W, Aiba A, Satoh T. A critical role of the small GTPase Rac1 in Akt2-mediated GLUT4 translocation in mouse skeletal muscle. *FEBS J*. 2014. 281: 1493-1504.

Hosooka T, Nomura K, Ogawa W. VEGF-B as a therapeutic target to prevent ectopic fat deposition. *J Diabet Invest*. 2013. 4: 525-527.

〔学会発表〕(計 14 件)

野村 和弘、水崎 奈央、細岡 哲也、佐々木 努、北村 忠弘、阪上 浩、春日 雅人、小川 渉、骨格筋のアドレナリン抵抗性は PGC1 $\alpha$ 新規アイソフォームの誘導不全により肥満を惹起する、第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、2014 年 5 月 22 日~24 日、大阪

水崎 奈央、野村 和弘、細岡 哲也、春日 雅人、小川 渉、PGC1 $\alpha$ 各種アイソフォームの発現パターンと機能解析、第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、2014 年 5 月 22 日~24 日、大阪

水崎 奈央、野村 和弘、細岡 哲也、春日 雅人、小川 渉、PGC1 $\alpha$ の各種アイソフォームの発現と機能の解析、第 34 回日本肥満学会年次学術集会、2013 年 10 月 11 日~12 日、東京

野村 和弘、水崎 奈央、細岡 哲也、佐々木 努、北村 忠弘、阪上 浩、春日 雅人、小川 渉、肥満病態形成における PGC1 $\alpha$ 新規アイソフォームの役割、第 34 回日本肥満学会年次学術集会、2013 年 10 月 11 日~12 日、東京

水崎 奈央、野村 和弘、細岡 哲也、春日 雅人、小川 渉、Expression patterns and functions of novel variants of PGC1 $\alpha$ 、第 18 回アディポサイエンス研究会、2013 年 8 月 24 日、大阪

野村 和弘、水崎 奈央、細岡 哲也、佐々木 努、北村 忠弘、阪上 浩、春日 雅人、小川 渉、Role of novel variants of PGC1 $\alpha$  in the pathogenesis of obesity、第 18 回アディポサイエンス研究会、2013 年 8 月 24 日、大阪

野村 和弘、細岡 哲也、佐々木 努、北村 忠弘、阪上 浩、春日 雅人、小川 渉、Novel variants of PGC1 $\alpha$  control energy efficiency, body mass and insulin sensitivity、第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013 年 5 月 16 日~18 日、熊本

野村 和弘、細岡 哲也、佐々木 努、北村 忠弘、阪上 浩、春日 雅人、小川 渉、肥満病態形成における PGC1 $\alpha$ 新規アイソフォームの役割、第 86 回日本内分科学会年次学術集会、2013 年 4 月 25 日~27 日、仙台

野村 和弘、細岡 哲也、佐々木 努、北村 忠弘、阪上 浩、春日 雅人、小川 渉、肥満病態形成における PGC1 $\alpha$ 新規アイソフォームの役割、第 50 回日本臨床分子医学会学術集会、2013 年 4 月 12 日~13 日、京都

野村 和弘、細岡 哲也、佐々木 努、北村 忠弘、阪上 浩、春日 雅人、小川 涉、PGC1 $\alpha$ 新規アイソフォームの肥満病態形成における役割、第 24 回分子糖尿病シンポジウム、2012 年 12 月 8 日、東京

野村 和弘、細岡 哲也、佐々木 努、北村 忠弘、阪上 浩、春日 雅人、小川 涉、PGC1 $\alpha$ 新規アイソフォームの肥満病態形成における役割、第 33 回日本肥満学会年次学術集会、2012 年 10 月 12 日～13 日、京都

野村 和弘、細岡 哲也、佐々木 努、北村 忠弘、阪上 浩、春日 雅人、小川 涉、PGC1 $\alpha$ 新規スプライシングバリエーションは運動時の脂肪燃焼制御を通じ脂肪量とインスリン感受性調節する、第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、2012 年 5 月 17 日～19 日、横浜

野村 和弘、細岡 哲也、佐々木 努、北村 忠弘、阪上 浩、春日 雅人、小川 涉、PGC1 $\alpha$ 新規スプライシングバリエーションのエネルギー代謝制御における機能の検討、第 85 回日本内分科学会年次学術集会、2012 年 4 月 19 日～21 日、名古屋

野村 和弘、細岡 哲也、佐々木 努、北村 忠弘、阪上 浩、春日 雅人、小川 涉、PGC1 $\alpha$ 新規スプライシングバリエーションのエネルギー代謝制御における機能の検討、第 49 回日本臨床分子医学会、2012 年 4 月 13 日、京都

〔図書〕(計 9 件)

細岡 哲也、小川 涉、Life-Science Information Center、脂質代謝異常と関連疾患(上巻) - 疾患モデルの作製と利用 -、2015、477 (125-130)

細岡 哲也、小川 涉、医歯薬出版株式会社、糖尿病のすべて、2015、653 (402-408)

細岡 哲也、小川 涉、医歯薬出版株式会社、肥満の医学、2014、450 (755-759)

細岡 哲也、小川 涉、科学評論社、内分泌・糖尿病・代謝内科、2014、478(403-409)

松木 核、細岡 哲也、小川 涉、中外医学社、糖代謝と肝臓、Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌、2014、213 (21-27)

細岡 哲也、小川 涉、文光堂、インスリン抵抗性と NASH NASH・アルコール性肝障害の診療を極める、2013、399 (21-25)

細岡 哲也、小川 涉、日本肥満学会、肥満研究、2013、59 (13-17)

細岡 哲也、小川 涉、ニューサイエンズ社、Medical Science Digest、2013、54(5-6)

細岡 哲也、小川 涉、内分泌・糖尿病・代謝内科、糖尿病と癌、2012、290 (202-207)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

細岡 哲也 (HOSOOKA, Tetsuya)  
神戸大学医学部附属病院・特定助教  
研究者番号：60590594

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：