

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：27102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670791

研究課題名(和文) NF- κ B, p65のリン酸化による新たな脂質代謝調節機構の解明研究課題名(英文) The role of the phosphorylation of NF- κ B, p65 subunit on fat metabolism

研究代表者

自見 英治郎 (Jimi, Eijiro)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：40276598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：内臓脂肪型肥満は糖尿病、高脂血症や高血圧などの生活習慣病に共通の基盤病態であり、特に脂肪組織の慢性的な炎症性変化がその原因と考えられている。近年、NF- κ Bのメインサブユニットであるp65のリン酸化がエピジェネティックな遺伝子発現に関わることが報告されている。我々はp65の536番目のセリン残基(マウスでは534番目)をアラニンに置換した機能抑制型のノックイン(S534A)マウスを作製した。高脂肪食で飼育したところ、1週間後には著明な体重および皮下脂肪の増加と4週間後には脂肪肝が認められ、さらに食欲および飲水量も亢進した。また糖負荷に対する抵抗性が減弱し、インスリンに対する抵抗性を示した。

研究成果の概要(英文)：The visceral fat accumulation is the common clinical condition of lifestyle-related diseases, such as, diabetes, the arteriosclerosis and the high blood pressure, which were caused by the chronic inflammation in fat. Recent reports showed that phosphorylation of p65, a main subunit of NF- κ B involved in epigenetic regulation of gene expression. To better understand the biological role of the phosphorylation of p65 of serine at position 536 (in mouse at 534), we generated mice expressing a p65 mutant bearing an alanine instead of serine at position 534 (S534A) mice. After exposure for 5 weeks to high-fat diet (HFD), HFD increased fat mass in WT mice, with a statistically larger increase in S534A mice. HFD also produced a large increase in liver weight in S534A mice but not in WT mice. Insulin activates Akt in WT mouse embryonic fibroblasts but the phosphorylation of Akt was reduced in S534A MEFs. These results suggest that S534A mutants lead to insulin resistance.

研究分野：分子生物学

キーワード：NF- κ Bのリン酸化 生活習慣病 インスリン抵抗性

1. 研究開始当初の背景

内臓脂肪型肥満を背景として耐糖機能障害、脂質代謝異常、血圧上昇を同時に発症する生活習慣病は、増加の一途を辿っており、生活習慣病の成因の解明と新しい治療戦略の確立は、国民の健康、医療、福祉の向上に不可欠である。生活習慣病の概念は、内臓脂肪蓄積を起点として、脳、脂肪組織、骨格筋、肝臓などの全身臓器の機能不全が平行して進展することから、臓器別の詳細な病態解明とともに臓器代謝ネットワークとその破綻の臓器横断的理解が重要である。

生活習慣病の病態には炎症性サイトカインが関与するが、細菌感染などによる「急性炎症」とは全く異質であり、代謝を含む生理的機能や細胞機能不全を緩やかに引き起こす(慢性炎症)。また、多くの疫学調査や動物実験により、胎児期～新生児期の栄養環境が何らかの形で記憶され(エピゲノム記憶)、これが成人期に発症する生活習慣病の「かかり易さ」に関連する可能性が唱えられている。この様に生活習慣病に共通する分子基盤として「慢性炎症」と「エピジェネティクス」が重要であると考えられる。

転写因子 NF- κ B は、p65 をメインとした5つのサブユニットから構成され、ホモまたはヘテロダイマーを形成して、炎症性サイトカインなどの様々な遺伝子の発現を調節する。p65 は、細胞外の刺激によって核へ移行し、標的遺伝子の発現を調節するが、近年、p65 のセリン残基のリン酸化がエピジェネティックな遺伝子発現に関わることが報告されている。

肥満患者のリンパ球では、NF- κ B が活性化されており、インスリン抵抗性の発症と密接に関係していることや、飽和脂肪酸が Toll 様受容体 4 の内因性リガンドとして脂肪組織内のマクロファージの NF- κ B を活性化して炎症性サイトカインを誘導するなど、NF- κ B の活性化と脂質代謝の関連が注目されている。

2. 研究の目的

本研究では「慢性炎症」と「エピジェネティクス」をキーワードに、我々が作製した S534A マウスを解析することで p65 のリン酸化による脂質代謝の調節機構について明らかにすることを目的とする。

内臓脂肪型肥満は糖尿病、高脂血症や高血圧などの生活習慣病に共通の基盤病態であり、特に脂肪組織の慢性的な炎症性変化がその原因と考えられている。また、疫学調査などから、環境的要因が遺伝子に影響することで、成人期に発症する生活習慣病の「かかり易さ」に関わることも報告されている。

転写因子 NF- κ B は炎症性サイトカインの発現など様々な遺伝子の発現を調節する。近年、NF- κ B のメインサブユニットである p65 のリン酸化がエピジェネティックな遺伝子発現に関わることが報告されている。我々は p65 の 536 番目のセリン残基(マウスでは 534 番目)をアラニンに置換した機能抑制型のノックイン(S534A)マウスを作製した。このマウスは高脂肪食を与えると予想

外に肥満が亢進したことから、このマウスを詳細に解析して、p65 のリン酸化による新たな脂質代謝調節機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

我々は S534A マウスを高脂肪食で飼育すると著明な体重および皮下脂肪の増加と食欲および飲水量も亢進するというプレリミナリーな実験結果を得ている。これらの結果から、S534 のリン酸化が脂質代謝の調節に重要であることが示唆された。これを明らかにするために、慢性炎症特有の緩やかな NF- κ B の活性化を捉えるために簡便かつ定量できるレポーターマウスを作製し、S534 のリン酸化がどの組織で脂質代謝を調節しているのかを明らかにし、その作用機構を解明する。生活習慣病は、内臓脂肪蓄積を起点として、脳、脂肪組織、骨格筋、肝臓などの全身臓器の機能不全が平行して進展することから、分子生物学、生理学、組織学のエキスパートで研究組織を構成し、臓器別の詳細な病態解明とともに臓器代謝ネットワークとその破綻の臓器横断的理解を深めて行く。

1. NF- κ B-Luc/GFP レポーターマウスの作製

前述の様に慢性炎症では、NF- κ B の活性化を明確に捉えることが困難であると予想される。我々は、NF- κ B 結合配列の下流にルシフェラーゼおよび蛍光タンパク質 GFP を融合したレポーター遺伝子(NF- κ B-Luc-GFP)を作製し、培養細胞で NF- κ B の活性化を簡便かつ定量的に測定するシステムを確立した。この NF- κ B-Luc-GFP レポーター遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作製することで、*in vivo* においても NF- κ B の活性化を免疫染色などの手間をかけずに蛍光顕微鏡で GFP 陽性細胞を観察するだけで、NF- κ B の活性化を瞬時に捉えることが可能になる。さらに、蓄積された NF- κ B の活性化をルシフェラーゼ活性として定量化することも可能である。

野生型および S534A マウスを通常食および高脂肪食で飼育し、まず、S534A マウスの表現型の詳細な解析を行なう。すでに S534A マウスは、高脂肪食飼育によって体重増加や脂肪肝を呈することを確認しているが、他の基本的代謝パラメーターや血清中の炎症性サイトカインおよびアディポカインを定量する必要がある。同時に、摂食・飲水中枢(視床下部)と末梢組織(肝臓、筋肉、脂肪組織)における p65 の S534 のリン酸化の役割を明らかにする。

2. S534A マウスの表現型の詳細な解析

同腹の野生型・ヘテロおよびホモマウスに高脂肪食を与え、経時的に体重と血糖値を測定する。

飼育開始2か月後に血清を調製し、トリグリセリド、アルブミンなどの基本的代謝パラメーターとインスリン、TNF α および IL-6 の産生量を ELISA 法を用いて測定する。インスリンおよびレプチン投与、非投与による摂食量を比較する。

糖負荷およびインスリン抵抗性試験をおこない、血糖値の変化を比較する。

3. 摂食・飲水中枢(視床下部)における p65S534 のリン酸化の役割

高脂肪食飼育開始後、経時的に視床下部の組織切片を作製し、内側基底部分における NF- κ B の活性化(GFP 陽性細胞)を蛍光顕微鏡で観察する。

GFP 陽性細胞の局在から、予想される細胞のマーカーの抗体を用いて免疫染色を行い、GFP 陽性細胞を同定する。

インスリンおよびレプチン投与し、それぞれのシグナル伝達に関わる分子(SOCS など)の発現量や活性化(抗リン酸化 SOCS 抗体などを検討する。

4. 末梢組織(肝臓、筋肉、脂肪組織)における p65S534 のリン酸化の役割

各末梢組織の組織切片を作製し、NF- κ B の活性化(GFP 陽性細胞)を蛍光顕微鏡で観察する。必要に応じてルシフェラーゼ活性を測定し、NF- κ B の活性化を定量化する。

各組織より RNA を調製し、炎症性サイトカインおよびアディポカインの発現の変化をリアルタイム PCR で検討する。

炎症性サイトカイン産生細胞と GFP 陽性細胞が一致するか検討し、その細胞を同定する。

4. 研究成果

1. NF- κ B-Luc/GFP レポーターマウスの作製

NF- κ B-Luc/GFP レポーターマウスのコンストラクト作製において GFP の蛍光発光が弱いことが問題となり、Luc と GFP の rotation を変えることによって改善を試みた。しかしながら、GFP の強い蛍光を得ることができず、組織切片上で GFP の蛍光を得ることができない場合、抗 GFP 抗体を用いた免疫染色で対応することにした。レポーターマウスの作製は外部機関に委託し、予定より搬入が遅れたが、レポーターマウスは近日中に九州歯科大学動物実験施設に搬入予定である。

2. S534A マウスの表現型の詳細な解析

同腹の野生型・ヘテロおよびホモマウスに高脂肪食を与え、経時的に体重と血糖値を測定したところ、S534A マウスでは著明な体重増加と血糖値の増加が認められた。さらに肝臓の重量増加が認められ高脂肪食投与10日後には脂肪肝を発症した。血清中の炎症性サイトカイン IL-6 や TNF α の産生の亢進も認められた。さらに S534A マウスではインスリン抵抗性が認められた。

3. 摂食・飲水中枢(視床下部)における p65S534 のリン酸化の役割

野生型マウスを9時間絶食させた後に正常食を与えると3時間後には摂食中枢の存在する

視床下部で p65 S534 のリン酸化が認められた。

4. 末梢組織(肝臓、筋肉、脂肪組織)における p65S534 のリン酸化の役割

肝臓から全 RNA を調製し、IL-6 および TNF α の mRNA の発現を検討したところ、S534A マウスでは野生型マウスと比較して両炎症性サイトカインの発現が上昇した。

野生型および S534A マウスの線維芽細胞を調製し、脂肪分化を誘導すると S534A マウス由来の線維芽細胞で脂肪分化が亢進した。

野生型および S534A マウス由来の線維芽細胞を TNF α で前処理し、インスリンで刺激すると野生型マウスの線維芽細胞では Akt のリン酸化が認められたが、S534A マウス線維芽細胞ではインスリン刺激による Akt のリン酸化が減弱した。また S534A マウス線維芽細胞では SOCS3 の発現が上昇し、一方 IRS-1 の発現が減少した。

以上の結果より、S534A マウスではインスリン抵抗性が亢進し、肥満と糖尿病を誘導すると考えられる。

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 1件)

1. Osawa K, Fukushima H, Jimi E. The role of nuclear factor- κ B signaling in bone formation: One bite provides dual tastes. *J Oral Biosci*. 2015, 57: 14-17.

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[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

<http://www2.kyu-dent.ac.jp/depart/biochem/J/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

自見 英治郎 (EIJIRO JIMI)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：40276598

(2) 研究分担者

小野 堅太郎 (KENTARO ONO)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：40316154

福島 秀文 (HIDEFUMI FUKUSHIMA)

福岡歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：70412624

片岡 真司 (SHINJI KATAOKA)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：80364149

(3) 連携研究者

()

研究者番号：