

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293219

研究課題名(和文) プロリン異性化酵素Pin1, PAR14と含有複合体による代謝調節と治療への展開

研究課題名(英文) Roles of Pin1 and PAR 14 on the metabolic regulations

研究代表者

浅野 知一郎 (Asano, Tomoichiro)

広島大学・その他の研究科・教授

研究者番号：70242063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：プロリン異性化酵素とは、プロリンとそのN端側のアミノ酸と間のペプチド結合をcis体からtrans体に変化させることで標的タンパクの機能変化を誘導するユニークな酵素である。今回、Pin1はAMPKのサブユニットに結合し、AMPK活性化抑制から脂肪分解を抑制することが判明した。さらに、Pin1は、転写共役因子PRDM16に結合し分解を促進することで脂肪細胞におけるUCP1発現を抑制することを見出した。以上から、過栄養状態で増加したPin1は多様な標的タンパクと相互作用し、全身レベルでの代謝異常や慢性炎症の発症に寄与する。

研究成果の概要(英文)：Prolyl isomerases are divided into three groups, the FKBP family, Cyclophilin and the Parvulin family (Pin1 and Par14). Pin1 is a unique prolyl isomerase binding to the motif including pSer/pThr-Pro that is phosphorylated by kinases. We have newly demonstrated Pin1 to be involved in regulating glucose and lipid metabolism. Interestingly, while Pin1 expression is markedly increased by high-fat diet feeding, Pin1 KO mice are resistant to diet-induced obesity, non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and diabetic vascular dysfunction. These phenomena result from the binding of Pin1 to several key factors regulating metabolic functions, which include insulin receptor substrate-1, AMPK, Crtc2 and NF-kappaB p65.

研究分野：代謝学

キーワード：代謝 糖尿病 Pin1 インスリン プロリン異性化酵素 メタボリックシンドローム

1. 研究開始当初の背景

糖尿病、高血圧、高脂血症を合併するメタボリックシンドロームの病態形成にはインスリン抵抗性と慢性炎症が中心的な役割を果たしており、治療薬剤の開発は極めて重要な課題となっている。インスリン作用あるいは栄養状態に応じた代謝調節や慢性炎症の発症には、細胞内において多段階のシグナル伝達を介して引き起こされている。我々は、以前より、代謝や炎症惹起の鍵となるシグナル伝達タンパク群と相互作用する制御タンパク質の同定・機能解析を目指してきた。

その過程で、代表的なプロリン異性化酵素である Pin1 が、過栄養状態のマウスの肝臓、筋肉、脂肪組織で顕著に増加することを見出した。

続けて、Pin1 は インスリン受容体基質 (IRS) -1 に結合し、インスリンシグナルを促進することや、脂肪細胞への分化に必須であることを見出した。また、Pin1 は、転写因子 CREB の co-activator である CRTC に結合し、肝臓からの糖新生を抑制することも報告した。さらに、Pin1 は AMPK のサブユニットに結合することで、AMPK 活性化抑制から脂肪分解を抑制することも判明した。一方、我々の解析から、全身性 Pin1 KO マウスは、肥満、脂質代謝異常、非アルコール性脂肪性肝炎、潰瘍性大腸炎の発症に対して抵抗性を呈することが明らかとなった。以上の結果から、「過栄養状態で増加した Pin1 は多様な標的タンパク質と相互作用し、全身レベルでの代謝異常や慢性炎症の発症に関与する」ことが強く示唆される。しかしながら、臓器間ネットワークの存在により、全身性 KO マウスを用いた解析では、病態の責任臓器を同定することが困難であった。また、Pin1 の KO マウスや siRNA 処理によって Pin1 の発現を抑制された細胞では、Pin1 と構造が類似した PAR14 と名付けられたホモログの発現量が上昇する。Pin1 と PAR14 は N 端付近の構造の違いから標的タンパク質が異なると考えられるものの、機能上は相互に協調する部分も大きいと推測される。そこで、我々は、Pin1 に加え PAR14 についても Cre-loxP システムを用いた臓器特異的な KO マウスを樹立するに至った。メタボリックシンドローム発症には、代謝異常、食欲亢進、動脈硬化、腸管炎症など多くの要因が存在するが、これらの要因に各臓器における Pin1 と PAR14 がどのような役割を果たしているかを、各臓器に特異的な KO マウスを用いることで明らかにする。

さらに、我々は昨年度までの成果として、Pin1 結合タンパクの網羅的同定を行ってきたが、これらの中で、TFG (Trk-fused gene) と LUBAC は、肥満動物で顕著に発現量が変化することを見出している。従って、同定した

多くの Pin1 結合タンパクの中で、代謝や炎症に特に重要である可能性が高いと考え、メタボリックシンドローム発症における意義を解明したいと考えるに至った。

2. 研究の目的

プロリン異性化酵素は、N 端側のアミノ酸とプロリン間のペプチド結合を *cis* 体から *trans* 体に変化させることでタンパクの機能変化を誘導するユニークな酵素である。しかし、プロリンの構造変化を検出する方法が確立していないため、この研究分野には未知の部分が多く残されている。我々は、Pin1 の発現量が過栄養状態で顕著に亢進することや、IRS-1、AMPK、CRTC2、NF B 等と複合体を形成し代謝や炎症に関与していることを報告した。今回、我々は、各臓器のプロリン異性化酵素 Pin1 と PAR14 が果たしている機能を、Cre-loxP システムの KO マウスを用いて解析を行う。また、これと並行して、我々が Pin1 結合タンパクとして新規に同定した TFG 及び LUBAC の複合体構成や活性の調節にも焦点をあて、メタボリックシンドロームの成因となる分子機構を解明する。最終的には、患者臓器における複合体形成の変化や遺伝子変異等に関するデータも得た上で、総合的に判断してメタボリックシンドロームに対する新規の治療ターゲットを見出し、治療薬剤開発への応用に繋げることを目的とする。

3. 研究の方法

1. 臓器ごとのプロリン異性化酵素 Pin1、PAR14 の代謝調節への役割とメタボリックシンドロームへの関与:

PAR14、Pin1 の単独あるいは Pin1 と Par14 のダブル KO マウスを臓器特異的に作成し、膵細胞、脂肪細胞、視床下部、血管、腸管、肝臓等における役割とメタボリックシンドローム発症への関与を明らかにする。

2. Pin1 結合タンパクとして同定された TFG、LUBAC のメボリックシンドローム発症への関与:

TFG 及び LUBAC は、代謝調節や NF B の活性化への関与が示唆され、さらに肥満時に発現量が大きく変化する。この変化がもたらしている病態発症への関与、さらに、これらに Pin1 が結合する意義を明らかにする。

3. 糖尿病患者の臓器における Pin1、PAR14 の発現量と TFG 及び LUBAC 複合体形成異常について検討する。

4. 複合体形成を時空間的に検出するため FRET や BRET のアッセイ系を構築し、複合体形成の調節を作用点とする新規の治療薬剤のスクリーニング系を開発し、最終的には、メタボリックシンドロームにおける複合体形成異常の分子機構の解明から治療方法へ

の応用を目指す。

4. 研究成果

プロリン異性化酵素とは、プロリンとそのN端側のアミノ酸と間のペプチド結合を *cis* 体から *trans* 体に変化させることで標的タンパクの機能変化を誘導するユニークな酵素である。しかし、プロリンの構造変化を検出する方法が確立していないため、この研究分野は遅れており、未知の部分が多く残されている。

以前に、我々は、Pin1がインスリン受容体基質 (IRS) -1に結合することでインスリンシグナルが促進されることや、脂肪細胞への分化に必須であることを報告した。今回、Pin1はAMPKのサブユニットに結合し、AMPK活性化抑制から脂肪分解を抑制することが判明した。さらに、最近、我々は、Pin1が、転写共役因子PRDM16に結合し分解を促進することで脂肪細胞におけるUCP1発現を抑制することを見出している。すなわち、高脂肪食によるPin1の発現量の増加は熱産生を減少させ、ますます肥満しやすくなるメカニズムの一端が明らかになってきた。

一方、Pin1はNF- κ Bの転写活性を上昇させ、炎症性サイトカインの発現量を増加させる。以上の結果から、過栄養状態で増加したPin1は多様な標的タンパクと相互作用し、全身レベルでの代謝異常や慢性炎症の発症に寄与する。

我々は、これらの知見に基づき、Pin1阻害によるNASH治療法の開発を計画するに至った。ただし、臨床使用に可能なPin1阻害化合物は、以前の論文あるいは特許上に見当たらない状況にあった。それは、既知のPin1阻害化合物では、阻害活性が弱いことに加え、他のタンパクにも結合、阻害するなどの弱点があるからである。

Pin1阻害の新規化合物の開発については、東京大学創薬機構（岡部教授）、東京薬科大学（伊藤教授）との共同研究として精力的に進めてきた。その成果として、Pin1阻害効果の強い化合物が複数、選別された。得られたPin1阻害化合物を、NASHモデルマウスを用いて検討したところ、複数の化合物が、NASHに対して強い治療効果を発揮することが確認された。

従って、Pin1がメタボリックシンドロームの発症に寄与する分子メカニズムの解明から、実用化に向けての研究も進行してきており、今後、ますます期待できる状況になっている。

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22件)

1. Yamamotoya, T., Nakatsu, Y., Matsunaga, Y., Fukushima, T., Yamazaki, H., Kaneko, S., Fujishiro, M., Kikuchi, T., Kushiyama, A., Tokunaga, F., Asano, T., Sakoda, H.
Reduced SHARPIN and LUBAC Formation May Contribute to CCL₄- or Acetaminophen-Induced Liver Cirrhosis in Mice.
Int. J. Mol. Sci. 18(2), 326, 2017 査読有
2. Kushiyama, A., Nakatsu, Y., Matsunaga, Y., Asano, T. (10人: 10番目)
Role of uric acid metabolism-related inflammation in the pathogenesis of metabolic syndrome components such as atherosclerosis and non-alcoholic steatohepatitis
Mediators Inflamm. (in press) 2016 査読有
3. Shinjo, T., Iwashita, M., Yamashita, A., Asano, T. (9人: 8番目)
IL-17A synergistically enhances TNF α -induced IL-6 and CCL20 production in 3T3-L1 adipocytes.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 477; 241-6, 2016 査読有
4. Nakatsu, Y., Matsunaga, Y., Yamamotoya, T., Asano, T. (11人: 11番目)
Physiological and Pathogenic Roles of Prolyl Isomerase Pin1 in Metabolic Regulations via Multiple Signal Transduction Pathway Modulations.
Int. J. Mol. Sci. 17; E1495, 2016 査読有
5. Okubo H., Kushiyama, A., Sakoda, H., Nakatsu, Y., Asano, T. (18人: 18番目)
Involvement of Resistin-like molecule β in the development of methionine-choline deficient diet-induced non-alcoholic steatohepatitis in mice
Sci. Reports 6; 20157, 2016 査読有
6. Nakatsu, Y., Iwashita, M., Sakoda, H., Asano, T. (16人: 16番目)
Prolyl Isomerase Pin1 Negatively Regulates AMPK by Associating with the CBS Domain in the γ -subunit.
J. Biol. Chem. 290; 24255-66, 2015 査読有
7. Qing, S., Nakatsu, Y., Seno, Y., Asano, T. (11人: 11番目)
Treatment with the SGLT2 inhibitor luseogliflozin improves nonalcoholic steatohepatitis in a rodent model with diabetes mellitus
Diabetol. Metab. Syndr. 7; 104, 2015 査読有
8. Uno, K., Yamada, T., Ishigaki, Y., Asano, T., Oka, Y., Katagiri, H. (11人: 9番目)
A hepatic amino acid/mTOR/S6K-dependent signalling pathway modulates systemic lipid metabolism via neuronal signals.

- Nat. Commun. 6; 7940, 2015 査読有
9. Shiwa, M., Yoneda, M., Okubo, H., Nakatsu, Y., Asano, T., Kohno, N. (10 人: 9 番目)
Distinct Time Course of the Decrease in Hepatic AMP-Activated Protein Kinase and Akt Phosphorylation in Mice Fed a High Fat Diet.
PLoS One. 10; e0135554, 2015 査読有
10. Matsunaga, Y., Nakatsu, Y., Fukushima, T., Okubo, H., Asano, T. (15 人: 15 番目)
LUBAC Formation Is Impaired in the Livers of Mice with MCD-Dependent Nonalcoholic Steatohepatitis.
Mediators Inflamm. 125380, 2015 査読有
11. Shinjo, T., Nakatsu, Y., Iwashita, M., Sano, T., Asano, T. (10 人: 10 番目)
High-fat diet feeding significantly attenuates anagliptin-induced regeneration of islets of Langerhans in streptozotocin-induced diabetic mice.
Diabetol. Metab. Syndr. 7; 50, 2015 査読有
12. Sano, T., Iwashita, M., Nagayasu, S., Asano, T., Nishimura, F. (11 人: 7 番目)
Protection from diet-induced obesity and insulin resistance in mice lacking CCL19-CCR7 signaling.
Obesity. 23; 1460-71, 2015 査読有
13. Kanaoka, R., Kushiya, A., Seno, Y., Nakatsu, Y., Asano, T. (13 人: 13 番目)
Pin1 Inhibitor Juglone Exerts Anti-Oncogenic Effects on LNCaP and DU145 Cells despite the Patterns of Gene Regulation by Pin1 Differing between These Cell Lines.
PLoS One. 10; e0127467, 2015 査読有
14. Shinjo, T., Nakatsu, Y., Iwashita, M., Sano, T., Asano, T. (13 人: 13 番目)
DPP-IV inhibitor anagliptin exerts anti-inflammatory effects on macrophages, adipocytes, and mouse livers by suppressing NF- κ B activation.
Am. J. Physiol. Endocrinol Metab. 309; E214-23, 2015 査読有
15. Nakatsu, Y., Seno, Y., Kushiya, A., Sakoda, H., Asano, T. (13 人: 13 番目)
The xanthine oxidase inhibitor febuxostat suppresses development of nonalcoholic steatohepatitis in a rodent model.
Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol. 309; G42-51, 2015 査読有
16. Fukushima, T., Yoshihara, H., Nakatsu, Y., Asano, T., Takahashi, S. (16 人: 15 番目)
Nedd4-induced monoubiquitination of IRS-2 enhances IGF signalling and mitogenic activity.
Nat. Commun. 6; 6780, 2015 査読有
17. Okubo, H., Nakatsu, Y., Sakoda, H., Kushiya, A., Asano, T. (14 人: 14 番目)
Mosapride citrate improves nonalcoholic steatohepatitis with increased fecal lactic acid bacteria and plasma glucagon-like peptide-1 level in a rodent model.
Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol. 308; G151-8, 2015 査読有
18. Homma, Y., Kanno, S., Sasaki, K., Asano, T., Mizuno, K. (8 人: 6 番目)
Insulin receptor substrate-4 binds to Slingshot-1 phosphatase and promotes cofilin dephosphorylation.
J. Biol. Chem. 289; 26302-13, 2014 査読有
19. Mori, T., Hidaka, M., Ikuji, H., Asano, T., Uchida, T. (10 人: 8 番目)
A high-throughput screen for inhibitors of the prolyl isomerase, Pin1, identifies a seaweed polyphenol that reduces adipose cell differentiation.
Biosci. Biotechnol. Biochem. 78; 832-8, 2014 査読有
20. Sumita, T., Ono, H., Suzuki, T., Asano, T., Awata, T. (8 人: 6 番目)
Mediobasal hypothalamic PTEN modulates hepatic insulin resistance independently of food intake in rats.
Am. J. Physiol. Endocrinol Metab. 307; E47-60, 2014 査読有
21. Ozoe, A., Sone, M., Fukushima, T., Asano, T., Takahashi, S. (8 人: 6 番目)
Insulin receptor substrate-1 associates with small nucleolar RNA which contributes to ribosome biogenesis.
Front Endocrinol. 5; 1-12, 2014 査読有
22. Hashikata, A., Yamashita, A., Asano, T., Nishimura, F. (15 人: 11 番目)
The inflammation-lipocalin 2 axis may contribute to the development of chronic kidney disease.
Nephrol. Dial. Transplant. 29; 611-8, 2014 査読有
- [学会発表](計 2 1 件)
1. 浅野知一郎 第 4 回山形血管代謝フォーラム(招待講演) 尿酸代謝と動脈硬化及びNASHとの関係 2016年9月7日 山形
 2. 浅野知一郎 第 2 区西北部糖尿病カンファレンス(招待講演) みえたきた SGLT2 阻害薬の可能性 NASH/NAFLD を合併する糖尿病の治療戦略 2016年9月6日 東京
 3. 山崎広貴、櫛山暁史、迫田秀之、藤城緑、山本屋武、菊池貴子、金子直、浅野知一郎 性ホルモン結合グロブリン(SHBG) による脂肪量減少効果と抗炎症効果 2016年5月21日 京都
 4. 中津祐介、森馨一、松永泰花、山本屋武、

- 藤城緑、石原寿光、浅野知一郎 プロリン異性化酵素 Pin1 を介した膵 細胞調節機構の解明 2016 年 5 月 21 日 京都
5. 榊山暁史、菊池貴子、山崎広貴、迫田秀之、藤城緑、浅野知一郎、岩本安彦 肝外キサンチンオキシダーゼのインスリン抵抗性への関与 2016 年 5 月 21 日 京都
 6. 松永泰花、中津祐介、榊山暁史、菊池貴子、山本屋武、鎌田英明、浅野知一郎 Pin1 を介した熱産生調節機構及び肥満との関係解明 2016 年 5 月 20 日 京都
 7. 山本屋武、中津祐介、迫田秀之、藤城緑、山崎広貴、菊池貴子、浅野知一郎、榊山暁史 Trk-fused gene (TFG) の膵 細胞における役割の解明 2016 年 5 月 20 日 京都
 8. 中津祐介、榊山暁史、菊池貴子、山本屋武、鎌田英明、浅野知一郎 Pin1 を介した熱産生調節機構及び肥満との関係解明 2016 年 5 月 20 日 京都
 9. 浅野知一郎 第 2 回 糖尿病フォーラム in 大分(TOF0) (招待講演) SGLT2 阻害薬の基礎研究 2015 年 10 月 21 日 大分
 10. 浅野知一郎 第 4 回 Kyushu Diabetes Research Conference (招待講演) プロリン異性化酵素 Pin1 による代謝調節とメタボリックシンドロームへの関与 2015 年 7 月 25 日 福岡
 11. 浅野知一郎 SGLT2 Forum in MIE (招待講演) SGLT2 阻害剤の創薬と基礎 2015 年 5 月 28 日 三重
 12. 中津祐介、森馨一、松永泰花、山本屋武、迫田秀之、藤城緑、榊山暁史、石原寿光、浅野知一郎 膵 細胞機能におけるプロリン異性化酵素 Pin1 の役割 2015 年 5 月 23 日 下関
 13. 山崎広貴、榊山暁史、迫田秀之、藤城緑、山本屋武、菊池貴子、金子直、浅野知一郎 性ホルモン結合グロブリン (SHBG) の代謝への影響の検討 2015 年 5 月 22 日 下関
 14. 新城尊徳、岩下未咲、中津祐介、鎌田英明、迫田秀之、藤城緑、榊山暁史、浅野知一郎、西村英紀 DPP4 阻害薬 anagliptin はマクロファージ-脂肪細胞共培養系およびマウス肝臓の LPS 誘導性炎症反応を抑制する 2015 年 5 月 22 日 下関
 15. 榊山暁史、菊池貴子、迫田秀之、藤城緑、山本屋武、中津祐介、浅野知一郎、河津捷二 マクロファージにおける糖代謝による活性酸素産生とインスリン抵抗性 2015 年 5 月 21 日 下関
 16. 浅野知一郎、松永泰花、迫田秀之、榊山

- 暁史、藤城緑、山本屋武、鎌田英明、小野啓、中津祐介 高脂肪食負荷による近位筋優位遺伝性運動感覚ニューロパチー原因遺伝子 TFG の発現低下とその病的意義 2015 年 5 月 21 日 下関
17. 山本屋武、迫田秀之、藤城緑、山崎広貴、金子直、菊池貴子、榊山暁史、浅野知一郎 肝臓における LUBAC(linear ubiquitin chain assembly complex)活性低下は Akt-mTOR 経路の亢進および肝での炎症を惹起する 2015 年 5 月 21 日 下関
 18. 松永泰花、中津祐介、迫田秀之、榊山暁史、藤城緑、山本屋武、鎌田英明、新城尊徳、岩下未咲、西村英紀、小野啓、浅野知一郎 キサンチンオキシターゼ阻害剤 Febuxostat による NASH 改善作用の検討 2015 年 5 月 21 日 下関
 19. 浅野知一郎 SGLT2 阻害薬シンポジウム in 浜田(招待講演)新たな糖尿病治療の幕開け～SGLT2 阻害薬の創薬と展望 2015 年 4 月 28 日 浜田
 20. 浅野知一郎、松永泰花、福嶋俊明、山崎広貴、山本屋武、榊山暁史、中津祐介 膵 細胞からのインスリン分泌におけるプロリン異性化酵素 Pin1 の役割 2014 年 5 月 22 日 大阪
 21. 藤城緑、中津祐介、福嶋俊明、松永泰花、迫田秀之、榊山暁史、山本屋武、西村英紀、浅野知一郎 膵キサンチンオキシターゼ阻害剤 Febuxostat による NASH 改善作用の検討 2014 年 5 月 22 日 大阪

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：炎症性腸疾患治療、大腸癌予防、非アルコール性脂肪性肝炎治療等をターゲットとする新規 Pin1 阻害剤

発明者：浅野知一郎(広島大学)、中津祐介(広島大学)、伊藤久央(東京薬科大学)、岡部隆義(東京大学)

権利者：国立大学法人広島大学、学校法人東京薬科大学、国立大学法人東京大学

種類：特願

番号：2016-231875

出願年月日：2016 年 11 月 29 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅野 知一郎 (ASANO TOMOICHIRO)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授
研究者番号：70242063

(2) 研究分担者

中津 祐介 (NAKATSU YUSUKE)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教
研究者番号：20452584

福嶋 俊明 (FUKUSHIMA TOSHIAKI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教
研究者番号：70543552
(平成26年度のみ研究分担者)

(3) 連携研究者

迫田 秀之 (SAKODA HIDEYUKI)
東京大学・附属病院・助教
研究者番号：50376464

藤城 緑 (FUJISHIRO MIDORI)
東京大学・附属病院・助教
研究者番号：50420211

本田 浩章 (HONDA HIROAKI)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授
研究者番号：40245064