

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461365

研究課題名(和文) 転写因子AFF4をターゲットとしたFGF21抵抗性の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Roles of AFF4, a member of the AF4 family of transcription factors, in FGF21 resistance

研究代表者

小森 忠祐 (Komori, Tadasuke)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90433359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： AFF4は、絶食時の視床下部弓状核において、摂食促進作用を持つニューロペプチドであるNPYやAgRP陽性のニューロンに発現していた。また、AFF4ヘテロ欠損マウスの視床下部ではNPYやAgRPの遺伝子発現が減少していた。これらの結果より、AFF4は、絶食時の視床下部において、NPYやAgRPの発現を制御している可能性が示唆された。また、野生型マウスにFGF21を投与し、AFF4の発現変化を検討した。視床下部や肝、脂肪においてFGF21によるAFF4の発現誘導は認められなかった。AFF4ヘテロ欠損マウスにおいて、熱産生量の増加や絶食時の体温低下の抑制、及び絶食時の行動量の減少が認められた。

研究成果の概要(英文)： The expression of AFF4 was observed in NPY/AgRP neurons in the hypothalamus during fasting. Up-regulation of NPY and AgRP observed in the fasted states of WT mice was attenuated in heterozygous AFF4-deficient mice. These results suggest that AFF4 regulates the expression of NPY and AgRP in the hypothalamus during fasting. Next, we investigated the roles of FGF21 on the expression of AFF4 in mice. The expression levels of AFF4 are not changed by the treatment with FGF21 in the hypothalamus, liver, and adipose tissue. During fasting, the body temperature is reduced in WT mice. In heterozygous AFF4-deficient mice, the body temperature in the fasted state was higher than WT mice with more heat production. Furthermore, locomotor activity in heterozygous AFF4-deficient mice was lower compared to WT mice in both fed and fasted states.

研究分野：代謝・内分泌

キーワード：AFF4 転写因子 FGF21 メタボリック症候群 摂食調節 視床下部

1. 研究開始当初の背景

メタボリック症候群(内臓肥満に高血糖、高脂血症、高血圧のうち2つ以上が合併した状態)は、日本人の死因の約3割を占める動脈硬化性疾患の重要な危険因子としてよく知られている。これまでに、様々な代謝調節ホルモン(レプチン、インスリン、アディポネクチンなど)の機能が研究され、メタボリック症候群の治療としての試みがなされてきたが、メタボリック症候群のすべてを改善する治療薬はまだないのが現状である。

線維芽細胞増殖因子(Fibroblast growth factor; FGF)は現在22種類が知られており、それらは細胞の分化、増殖など多岐にわたる作用を持つ。近年、FGF15/19、FGF21、及びFGF23が内分泌因子として機能することが明らかになり、それらは代謝性FGFと呼ばれている。その中でも、FGF21は、主に肝臓より分泌され、白色脂肪、褐色脂肪、肝臓など様々な臓器において糖・脂質代謝を改善する作用を発揮することにより、次世代のメタボリック症候群治療薬として注目を集めている。しかし、メタボリック症候群のモデル動物やヒトにおけるメタボリック症候群患者は、高FGF21血症を呈しているにもかかわらず、肥満や糖尿病、脂肪肝などを来していることより、FGF21が効きにくい状態、すなわち「FGF21抵抗性」の状態であることが分かっている(Zhang et al. Diabetes 2008; Berglund et al. Endocrinology, 2009; Li et al. J Hepatol, 2010; Fisher et al. Diabetes, 2010; Chen et al. Diabetes Care, 2011)。このFGF21抵抗性は、FGF21によるメタボリック症候群の治療において大きな妨げとなると考えられ、その分子メカニズムの解明と対策が急務である。

2. 研究の目的

今回、申請者らが着目したAFF4はAFFファミリーに属する転写因子であり、摂食・エネルギー代謝の中核である視床下部、及び糖・脂質代謝やエネルギー代謝を制御する末梢臓器(白色脂肪、褐色脂肪、肝臓、膵臓、骨格筋など)に発現している。申請者は、平成20年度~平成21年度に科学研究補助金(若手B)を取得し、AFF4が視床下部において、摂食・エネルギー代謝を制御する分子であるAMP-activated protein kinase $\alpha 2$ (AMPK $\alpha 2$)の発現を誘導することを報告した(Komori T, et al. J Biol Chem, 2012)。申請者らは、生体内におけるAFF4の機能の解明を目的として、AFF4欠損マウスを作製したが(Urano A et al, Mol Cell Biol, 2005)、AFF4ホモ欠損マウスは約70%が生後1週間以内に死亡することより、AFF4ヘテロ欠損マウスの解析を行ってきた。現在AFF4ヘテロ欠損マウスにおいて認められる表現型は、1)肝臓に原因のある過

成長(視床下部におけるGHRHや、下垂体におけるGHの発現に変化がなく、肝臓におけるIGF-1の発現増加を示す)、2)グルコース不耐性とインスリン抵抗性、3)トーパー耐性(野生型マウスは絶食によりトーパーの状態に入るが、AFF4ヘテロ欠損マウスは絶食48時間後もトーパーの状態に入らず、体温低下も軽度)である。驚くべきことに、AFF4ヘテロ欠損マウスにおけるこれら1)から3)の表現型は、FGF21トランスジェニックマウスで見られる成長障害、耐糖能の向上、トーパー感受性という表現型と全く逆の表現型であった(上図)。そこで、AFF4ヘテロ欠損マウスにおけるFGF21の血中濃度を測定したところ、野生型と比較してAFF4ヘテロ欠損マウスでFGF21の血中濃度が上昇していた。以上のことより、AFF4ヘテロ欠損マウスはFGF21抵抗性を有するマウスである可能性が示唆された。本研究は、AFF4ヘテロ欠損マウスにおけるFGF21抵抗性のメカニズムを解明することにより、AFF4が全身の糖・脂質代謝やエネルギー代謝に対し担っている役割を明らかにし、FGF21を用いたより効果的な治療へとつなげることを目的とする。

3. 研究の方法

①AFF4ヘテロ欠損マウスにおいて、絶食時の視床下部における摂食調節因子の発現を、リアルタイムPCR法を用いて検討した。
②視床下部におけるAFF4発現ニューロンをin situ hybridization法と免疫染色法の二重染色法によって検討した。
③絶食時の褐色脂肪におけるAFF4の発現を、リアルタイムPCR法を用いて検討した。
④野生型マウスとAFF4ヘテロ欠損マウスにおける熱産生量を、小動物総合モニタリングシステム(CLAMS)を用いて測定した。
⑤AFF4ヘテロ欠損マウスにおける絶食時の行動量について、自発運動量測定装置を用いて測定した。

4. 研究成果

AFF4ヘテロ欠損マウスは絶食後の再摂食量が野生型と比較して低下するため、視床下部における摂食関連分子の発現を検討した。摂食促進作用を持つニューロペプチドY(NPY)やアグーチ関連蛋白(AgRP)の遺伝子発現は、野生型マウスの視床下部において絶食により増加するが、AFF4ヘテロ欠損マウスの視床下部ではそれらの増加量が減少していた(図1)。

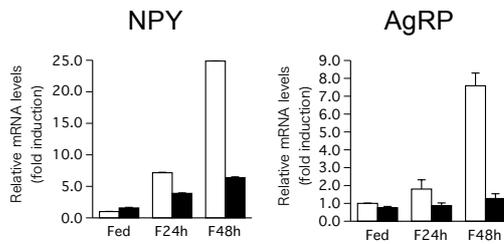


図1 野生型マウス（白）とAFF4ヘテロ欠損マウス（黒）の絶食時の視床下部におけるNPYとAgRPの発現の検討。 Fed; 自由摂食時、F24h; 絶食24時間後、F48h; 絶食48時間後

プロオピオメラノコルチン (POMC) やコカイン・アンフェタミン調節転写産物 (CART) などの摂食抑制作用を有する遺伝子の発現は、野生型マウスとAFF4ヘテロ欠損マウスの視床下部において絶食により同様に減少していた (図2)。

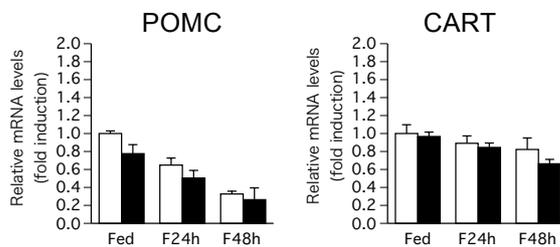


図2 野生型マウス（白）とAFF4ヘテロ欠損マウス（黒）の絶食時の視床下部におけるPOMCとCARTの発現の検討。 Fed; 自由摂食時、F24h; 絶食24時間後、F48h; 絶食48時間後

また、AFF4は絶食時の視床下部弓状核においてNPYを発現しているニューロンに発現していた (図3)。

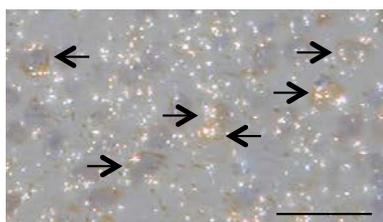


図3 絶食時の視床下部弓状核におけるAFF4の遺伝子発現（白点）とNPY蛋白（茶）の二重染色。 矢印は、AFF4とNPYの共陽性の細胞。

以上のことより、AFF4は、絶食時の視床下部において、NPY/AgRP陽性ニューロンに作用し、NPYやAgRPの発現を制御している可能性が示唆された。

AFF4ヘテロ欠損マウスの褐色脂肪における熱産生関連分子の発現について検討した。野生型マウスを絶食すると、熱産生を促進する分子である脱共役蛋白 (UCP) -1やペルオキシソーム増殖因子活性化受容体コアクチベ

ーター (PGC) -1の発現が褐色脂肪において減少するが、AFF4ヘテロ欠損マウスを絶食してもUCP-1の遺伝子発現に変化は認められず、PGC-1の発現は増加していた。これらの結果より、AFF4ヘテロ欠損マウスの褐色脂肪では、絶食時におけるUCP-1やPGC-1の発現が保持され、それによって熱産生を保っている可能性が示唆された。また、絶食時の褐色脂肪におけるAFF4の発現を検討したところ、その発現が増加したことより (図4)、AFF4は、直接褐色脂肪に作用して熱産生関連遺伝子の発現を制御している可能性が示唆された。

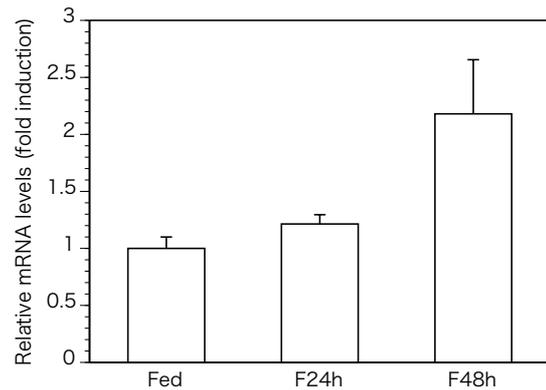


図4 絶食時の褐色脂肪におけるAFF4の発現の検討。 Fed; 自由摂食時、F24h; 絶食24時間後、F48h; 絶食48時間後

AFF4の糖・脂質代謝における影響を検討するために、野生型とAFF4ヘテロ欠損マウスに高脂肪食を給餌し、その表現型を解析した。AFF4ヘテロ欠損マウスに高脂肪食を給餌しても、野生型マウスと比較して体重の増加率に差は認められなかった。また、普通食、及び高脂肪食給餌下においてAFF4ヘテロ欠損マウスの血糖値や血清インスリン値を測定したところ、野生型マウスとAFF4ヘテロ欠損マウスとの間で、血糖値に差は認められなかったが、血清インスリン濃度はAFF4ヘテロ欠損マウスで上昇しており、インスリン抵抗性が示唆された。

FGF21、及びGHによるAFF4の発現誘導の検討を行ったが、視床下部、肝臓、及び脂肪組織など代謝性疾患に関与する諸臓器において、FGF21、及びGHによるAFF4の発現誘導は認められなかった。

野生型とAFF4ヘテロ欠損マウスにおけるエネルギー消費量について検討した。小動物総合モニタリングシステム (CLAMS) を用いて、熱産生量を測定したところ、AFF4ヘテロ欠損マウスにおいて増加が認められた (図5)。しかし、体重あたりの熱産生量に差は認められなかった。

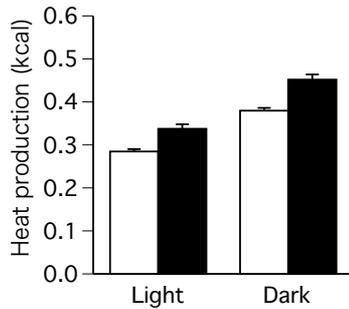


図5 野生型マウス（白）とAFF4ヘテロ欠損マウス（黒）における熱産生量の検討

体内埋め込み式体温計測装置を用いて野生型とAFF4ヘテロ欠損マウスにおける体温について連続的に測定した。AFF4ヘテロ欠損マウスでは絶食後24時間目にはすでに野生型でおこる体温低下が抑制されており、その抑制は絶食後48時間まで持続していた。

AFF4ヘテロ欠損マウスにおける絶食時の行動量について連続的に検討したところ、昼夜間とも行動量の減少が認められた(図6)。

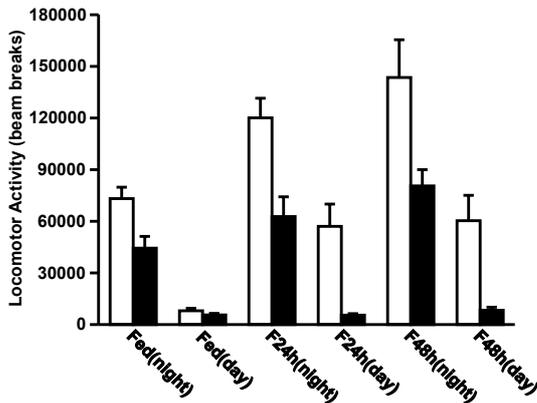


図6 野生型マウス（白）とAFF4ヘテロ欠損マウス（黒）における行動量の検討

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

Komori T, Nosaka T, Kitamura T, Morikawa Y. Roles of AFF4, a fasting-induced transcription factor in the hypothalamus, in the regulation of glucose and energy metabolism in mice. A Keystone Symposium [Diabetes] 2017. 1. 24. Keystone, CO, USA

[図書] (計 1 件)

小森忠祐, 森川吉博: レプチン. 日本臨床増刊号 最新臨床脳卒中学 72(増刊 5): 236-239, 2014.

[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:
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

小森 忠祐 (KOMORI TADASUKE)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 90433359

(2) 研究分担者

森川 吉博 (MORIKAWA YOSHIHIRO)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 60230108

(3) 連携研究者

久岡 朋子 (HISAOKA TOMOKO)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 00398463

古田 浩人 (FURUTA HIROTO)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 90238684

北村 俊雄 (KITAMURA TOSHIO)
東京大学・医学部・教授
研究者番号: 20282527

(4) 研究協力者

()