

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

目 次

文献No	課題番号			
20000937A	21008	血管壁細胞の抗血栓性機能の制御機構の解明と新規抗血栓薬の開発	加藤 久雄	1
938A	21019	組織内脂肪蓄積の予防及びGLUT4の発現増加を目指したインスリン抵抗性治療法の研究	江崎 治	14
939A	21045	慢性呼吸器疾患の発症機構の解明と医療への応用	斎藤 博久	18
940A	21052	閉経後骨粗鬆症の発症機構の解明とその予防と治療薬に関する研究	宮浦 千里	25
942A	21067	細菌感染に關与する病原遺伝子の発現機構の解明とその制御法の開発	渡辺 治雄	33
943A	21073	脳循環障害による神経細胞死の発症機序の解析と治療法の開発	内村 英幸	38
944A	21079	疾患モデルマウスを用いたβ-ガラクトシドシスの病態解析と治療への応用	松田潤一郎	46
945A	21081	精神疾患の分子メカニズムの解明と新しい診断・治療法の開発への応用	西川 徹	53
946A	21086	新しい生体防御調節物質の機能と作用の解析	鈴木 和男	60
948A	21089	感染症が誘発する自己免疫疾患病態の解明とその医療への応用に関する研究	大川原明子	68
949A	21092	生体膜脂質を介する細胞機能調節機構の解明とその医療への応用	西島 正弘	80
950A	21096	免疫・内分泌系による神経系の障害機構の解明とその制御	田平 武	88
951A	21102	移植免疫寛容とマイクロキメリズムに関する基礎的研究	木村 廣光	92
952A	21104	G蛋白質共役型受容体の個体レベルでのゲノム機能評価	辻本 豪三	98
953A	21107	難治性腎疾患の病態解明と医療への応用に関する研究	藤本純一郎	111
954A	21110	食細胞による感染防御機構の解明と医療への応用	網脇 祥子	118
955A	21121	抗酸化機能調節に及ぼす運動と栄養の影響に関する研究	樋口 満	126
956A	21130	神経変性疾患における神経細胞死の分子機構の解析	桃井 隆	134
957A	21142	C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン(IFN)の治療効果を増強する新薬の開発研究	小長谷昌功	144
958A	21150	グリア細胞の機能調節による神経疾患治療法の開発	高坂 新一	149
959A	21166	新規破骨細胞形成抑制因子(OCIF)とそのリガンドである破骨細胞分化因子(ODF)の生理的役割の解明と医療への応用	高橋 直之	160
960A	21177	コレステロール代謝・動脈硬化関連遺伝子の発現調節因子の検索	松本 明世	167
961A	21179	血圧調節物質・動脈硬化起因物質などに関する分子生物学的、生化学的研究	南野 直人	178
964A	21215	アトピー性皮膚炎自然発症(NC)マウスを用いた皮膚搔痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製	廣田 直美	183
965A	21224	ヒト血液細胞情報伝達の解明とオリゴヌクレオチドを用いた治療法の開発	湯尾 明	193
966A	21225	癌化とウイルス感染を制御する細胞内情報伝達分子を標的とする薬剤の探索	松田 道行	200

20000969A	21228	細胞内シグナル伝達の解明による創薬シーズの探索	上原 至雅	……	204
968A	21234	スフィンゴ脂質の情報伝達の研究と抗血栓症薬開発	望月 直樹	……	208
969A	21279	中枢神経系におけるATP受容体の機能の解析と医療への応用	井上 和秀	……	213
941A	22055	宿主の防御機能動態と感染機構の解明と医療への応用	高津 聖志	……	221
949A	22088	ビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の病態解明と治療法の確立に関する研究	水澤 英洋	……	228
962A	22183	炎症・アレルギー性疾患の発症機構の解明と医療への応用	清水 孝雄	……	233
963A	22194	コレステロール代謝を標的とした抗動脈硬化薬開発のための基盤研究	新井 洋由	……	237

組織内脂肪蓄積の予防及びGLUT4の発現増加を目指したインスリン抵抗性治療法の研究

所 属 国立健康・栄養研究所 臨床栄養部
研究者 江崎 治

分担研究者

- (1)三菱東京製薬株式会社 梅津 浩平
- (2)山之内製薬株式会社 下川 晃彦
- (3)㈱ビー・エム・エル 服部 浩明

要 旨

UCP2を脂肪組織に軽度（トランスジェニックマウス）、及び著明（CLA投与）に発現するマウスを作成し、フェノタイプを分析した。この結果、脂肪組織での軽度のUCP2の過剰発現が肥満／糖尿病を予防する上で有効であることが示された。又、GLUT4の発現調節領域が狭められ、ゲルシフト、フットプリント法により運動、T3、及び高脂肪食に反応するシスエレメントの分析が進んだ。

1. 研究目的

生体膜の主要構成成分である脂質の変化や細胞内の脂質代謝異常は、糖尿病や高脂血症などの生活習慣病の発症に関与することが想定されている。褐色脂肪組織に存在するUncoupling protein-1 (UCP1) は、エネルギー消費／熱産生を高め肥満を予防することが知られている。しかし、ヒトでは褐色脂肪組織の存在量が少ないことからその機能が疑問視されてきた。一方、UCP2は広範な組織に発現し、ヒトでも発現が認められていることから注目されているが、未だにin vivoにおける機能は解明されていない。本研究では、in vivoでUCP2の機能を解明するため脂肪組織特異的にUCP2を過剰発現するトランスジェニックマウスを作成し、肥満および糖尿病の発症を防止できるか否か解析する。又、次に共役リノール酸の投与によりUCP2を高度に発現するマウスを作成した。共役リノール酸 (Conjugated linolein acid, CLA) はリノール酸の異性体であり、反芻動物の肉や乳製品に存在している脂肪酸である。CLAは体脂肪を減少させることが知られているが、その機序は解明されていない。すなわち、脂肪組織におけるUCP2の発現レベルを変えることにより、どのようなフェノタイプの変化が生じるか検討した。

近年の栄養摂取過剰の傾向により、肥満、糖尿病、高脂血症のいわゆる生活習慣病が増加してきている。この原因として脂肪摂取量の増加が疑われている。今までの研究により、この高脂肪食による糖尿病の発症が糖輸送体 (GLUT4) の筋肉組織での2倍程度の過剰発現により完全に防止できることを示した (ProNAS, 1995)。実際、運動がGLUT4の発現量を筋肉組織で増加させ糖尿病を改善することからGLUT4を増加させる重要なトランスエレメントの存在は明白である (ProNAS, 1995)。運動のできない糖尿病患者でも、薬物治療によりGLUT4量を増加することができれば、運動をしなくても運動と同じ効果が得られ、非常に有用と思われる。このため、GLUT4蛋白の発現機序が明らかにし、GLUT4量を増加させる方法を見出すことを試みる。又、甲状腺ホルモンは、GLUT4 mRNAを増加することが知られている。この反応に関与するシスエレメントの同定を試みる。今までの研究で転写開始点より-7396、-3238、-2001、-1001、-701、-551、-442及び-423の8種類のGLUT4ミニジェニックマウスを作成した。今年度は新たに-582、-506のトランスジェニックマウスを作成し、より細かく重要なシスエレメントの分析を行った。

2. 研究方法

A) UCP2のcDNAを脂肪組織特異的なαP2エンハンサーに組み入れたコンストラクトを作成し、マウスの受精卵にマイクロインジェクションしてトランスジェニックマウスを作成した。外因性UCP2のmRNA発現量はノーザンブロット法を用いて測定した。11週齢のトランスジェニックマウスとその同腹ノン

トランスジェニックマウスに高脂肪食（脂肪エネルギー比 60%）または、高炭水化物食（脂肪エネルギー比 10%）を与え約6ヶ月間飼育した。飼育期間中、糖負荷試験、インスリン負荷試験を行った。

B) 7週齢のC57BL/6マウスを2群に分け、対照群として高炭水化物食（脂肪エネルギー比10%）、CLA添加群として高炭水化物食に1%のCLA(W/W)を添加した食餌を与え19週間飼育した。飼育期間中、インスリン負荷試験、酸素消費量の測定を行った。TNF α 、UCPs、GLUT4 mRNA発現量はノーザンブロット法で解析した。

C) 7週齢C57BL/6Jマウスを3群に分け、対照群を高炭水化物食（脂肪エネルギー比10%）とし、高脂肪食群（脂肪エネルギー比60%）として高サフラワー油食、高魚油食を2日間摂取させた後、コラゲナーゼ灌流法により肝実質及び非実質細胞を分離・採取した。次に、8週齢C57BL/6Jマウス及び7週齢SD系ラットを3群に分け、対照群を高炭水化物食とし、高魚油食、高炭水化物食にフィブレードを添加（0.5%, wt/wt）したフィブレード添加食を2日間摂取させた後、組織（肝臓）及び細胞を分離・採取し実験に用いた。さらに、初代培養肝細胞（ラット、マウス）にPPAR α のリガンドであるWY14643を添加し、24時間培養の後UCP2mRNA発現量をNorthern blotにより定量した。

D) GLUT4遺伝子の運動及び甲状腺ホルモンに反応するシスエレメントと高脂肪食に反応するシスエレメントを明らかにするため、転写開始点より-7396、-3238、-2001、-1001、-701、-551、-442及び-423の8種類のGLUT4ミニジントランスジェニックマウスと新しく作成した-582、-506のトランスジェニックマウスを用いた。同定された領域のフラグメント（オリゴヌクレオチド）をP³²でラベルし、マウスの筋肉や脂肪組織より抽出した核蛋白を用いて、フットプリント法にて蛋白の結合する領域を狭め、次にゲルシフト法にてその領域に結合している蛋白質が、運動、高脂肪食により異なるか調べた。

3. 研究成果

A) トランスジェニックマウスとその同腹ノントランスジェニックマウスに高脂肪食（脂肪エネルギー比 60%）または、高炭水化物食（脂肪エネルギー比 10%）を与え約6ヶ月間飼育した。高脂肪食摂取下ではノントランスジェニックマウスで肥満およびインスリン抵抗性が認められたのに対し、UCP2過剰発現トランスジェニックマウスでは体重増加の抑制、脂肪組織重量の減少、インスリン抵抗性の改善傾向が認められた。酸素消費量もトランスジェニックマウスで増加していた。また、血中レプチン、中性脂肪、FFA、ケトン体値は、高脂肪食摂取のノントランスジェニックマウスで高値を示していたが、トランスジェニックマウスでは有意な改善が認められた。

B) CLAの摂取により、白色脂肪組織（WAT）重量の減少、褐色脂肪組織（BAT）の消失が認められた。WATおよびBATの減少はアポトーシスによるものであった。アポトーシスとの関与が示唆されているTNF α 、UCP2のmRNA発現量はCLA添加群のWATおよびBATで5~10倍に増加していた。また、酸素消費量はCLA摂取により有意に増加した。しかしCLA添加群では著しい肝臓肥大およびインスリン抵抗性も認められた。血中レプチンレベル、WATおよびBATのGLUT4 mRNAレベルも減少していた。以上の結果から、UCP2はin vivoにおいてもエネルギー消費亢進に寄与している可能性が強く示唆された。UCP2はヒトでの発現が認められていることから、UCP2を軽度増加させることはヒトの肥満・糖尿病・高脂血症発症の予防に有効であると考えられた。しかし高度のUCP2の発現はATP量を低下させ脂肪細胞のアポトーシスを生じることが示唆された。

C) UCP2mRNA発現量は、マウス、ラット両者において実質細胞に比し非実質細胞で多く発現していた（6~12倍）が、魚油摂取によりマウスにおいてUCP2mRNA発現量の増加は実質細胞で8倍多く発現し、フィブレード添加食摂取では18倍とさらに顕著な増加がみられた。非実質細胞では、ほとんど変化がみられなかった（サフラワー油食による肝実質細胞での増加は1.5倍程度だった。ラットにおいては、組織（肝臓）全体でみた場合、魚油食、フィブレード添加食摂取によるUCP2mRNA発現量の増加はほとんどみられなかったが、細胞レベルでみると、魚油摂取により肝実質細胞で1.8倍、フィブレード添加食で4倍増加していた。非実質細胞においては魚油、フィブレード添加食摂取で50%に減少していた。初代培養肝細胞において、PPAR α のリガンドであるWY14643添加により5~6倍のUCP2の発現増加がみられた。

D) ミニジーンGLUT4の発現の組織特異性を検討した。-7396、-3238、-2001、-1001、-701、-551のトランスジェニックマウスでは、内因性と同様に、骨格筋・脂肪組織（白色・褐色）・心筋において

発現が認められた。しかし、-506、-442、-423のトランスジェニックマウスでは、骨格筋・脂肪組織（白色）・心筋においては発現が認められたが、褐色脂肪組織での発現が認められなかった。よって、-551と-506の間に褐色脂肪組織に特異的なエンハンサーが存在することがわかった。-423では、筋肉における発現に必要であるとされるMEF2を含まないにも関わらず、筋肉での発現が認められた。

次に、運動に反応するシスエレメントの同定を行った。トランスジェニックマウス（各コンストラクト2系統づつ）にスイミング（30分間、4回/日）を約2週間行わせ、腓腹筋におけるミニジーン発現への運動の効果を、RNase protection法にて、ミニジーンGLUT4mRNAと内因性GLUT4mRNAとの比較により検討した。-7396、-3238、-2001、-1001、-701、-551のトランスジェニックマウスでは、内因性GLUT4mRNA、ミニジーンGLUT4mRNAの両方の増加が認められた。しかし、-442、-423のトランスジェニックマウスでは内因性GLUT4mRNA量は運動によって増加したが、ミニジーンGLUT4mRNA量は増加しなかった。さらに、この領域内で、F1：-551~-527、F2：-531~-502、F3：-506~-470、F4：-476~-438の4つのフラグメントを作成し、マウスの筋肉から抽出した核蛋白を用いてゲルシフト・競合アッセイを行った。その結果、F1とF2では弱い、F3とF4には強く結合する特異的な蛋白質が存在することが分かった。現在、-506トランスジェニックマウスがT3や運動により、どのように反応するか調べている。又、これらのトランスジェニックマウスを用いて、高脂肪食に反応するシスエレメントの同定を行った。各トランスジェニックマウスをそれぞれ2群に分けて、高炭水化物食（脂肪エネルギー比10%）、高脂肪食（サフラワー油、脂肪エネルギー比60%）で3カ月間飼育し、ミニジーンGLUT4mRNAと内因性GLUT4mRNAを別々に定量した。脂肪組織におけるGLUT4mRNA量の低下は、-7396、-3238、-2001、-1001、-701のトランスジェニックマウスでは、内因性GLUT4mRNA、ミニジーンGLUT4mRNAともに認められた。しかし、-551、-442のトランスジェニックマウスでは、内因性GLUT4mRNA量が低下していたにも関わらず、ミニジーンGLUT4mRNA量は低下しなかった。よって、高脂肪食に反応するシスエレメントが-701と-551の間に存在することがわかった。次に、高脂肪食に反応するシスエレメントが存在している-700~-442の領域内で、F1：-750~-551（200bp）とF2：-593~-394（200bp）の2つのフラグメントを作成し、マウスの脂肪組織から抽出した核蛋白を用いてフットプリントを行ったところ、F1のWF1：-706~-681とWF2：-675~-653に蛋白質の結合領域が認められた。この部位は以前報告されたNF1結合部位に相当した。更に、ゲルシフトアッセイ法を行い、WF4：-621~-582、WF5：-585~-546のオリゴヌクレオチドを用いると、特異的に結合するタンパク質を見出した。このため、現在NF1部位にミューテーションを入れたコンストラクトとWF5のタンパク結合部位にミューテーションを入れたコンストラクトを作成し、トランスジェニックマウスを作成中である。

4. 考 察

魚油による肝臓での脂肪酸の β 酸化の亢進はUCP2の発現増加と相まって、脂質の燃焼に役立っていると考えられる。ではPPAR α の強力な活性化剤であるフィブレートも脂肪の β 酸化に伴い体重減少を生じているのであろうか？PPAR α のノックアウトマウスでは長期間飼育すると肥満が認められることが報告された。又、人での研究でも1報ではあるがフィブレートと食事療法により体重減少が認められている。人ではマウスに比べPPAR α の量が少ないためマウスほどに体重減少は認められないと考えられるが、長期投与すると抗肥満効果が認められる可能性もある。

今後の研究から魚油摂取による肝臓でのUCP2mRNA発現の増加は、肝実質細胞での発現増加によることがマウス、ラットにおいて認められた。ラット肝での魚油摂取によるUCP2発現増加がみられないのは非実質細胞での減少によることが分かった。また、核内受容体Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α (PPAR α)のリガンドであるフィブレート摂取によりUCP2mRNAの顕著な発現増加がみられたこと、また肝細胞へのWY14643添加によるUCP2mRNA発現増加が確認できたことから、魚油摂取によるUCP2発現増加はPPAR α を介するのであろう。

ミトコンドリアにおける熱産生の増加は、その組織での脂肪蓄積を防止し肥満を予防する可能性が考えられる。組織中でのUCP2の増加は、エネルギー基質の要求性を高め、糖質/脂質の代謝を活性化させる可能性も考えられるため、肥満のみならず糖尿病の発症予防に関しても直接的な関与が推察される。実際に本研究の結果から、UCP2を脂肪組織に過剰発現させる事は、その組織の脂肪蓄積量を減少させる事が明らかとなった。これは、UCP2がin vivoにおいて実際に脱共役能を持ち、熱産生亢進に寄与している可能性を強く示唆している。また、UCP2トランスジェニックマウスにおけるインスリ

ン抵抗性の改善効果は、脂肪組織重量の減少による影響と糖質利用亢進の影響との両面からの可能性が考えられる。僅か2倍程度の軽度過剰発現により、このような表現型が認められた事は肥満/糖尿病の治療効果から考えても大変有効である。又、CLAの摂取によりUCP2を脂肪組織に過剰発現させると、その組織の脂肪蓄積量を大幅に減少させる事が明らかとなった。これは、UCP2がin vivoにおいて実際に脱共役能を持ち、熱産生亢進に寄与している可能性を強く示唆している。しかし、著明なUCP2の増加は脂肪組織重量の極端な減少を生じ、lipodystrophy（脂肪萎縮性糖尿病）を惹起することが明らかとなった。これは、高度のUCP2の発現増加がATP量を低下させ脂肪細胞のアポトーシスを惹起し、低レプチン血症が生じた結果と推察される。レプチンの皮下投与によってインスリン抵抗性のみならず、脂肪肝を部分的に改善した事から、食事性に誘発されるlipodystrophyにおいてもレプチン療法が有効である事も明らかとなった。

GLUT4の研究から、-423ミニジーンGLUT4の中に、筋肉及び白色脂肪組織特異的なシスエレメントが存在することがわかった。褐色脂肪組織特異的なエンハンサーが-551と-506の間に存在することがわかり、筋肉特異的なエレメントと分離された。褐色脂肪組織の特異的発現調節エレメントに関して、UCP1の研究からサイクリックAMP-反応エレメント（CRE）とBAT-Specific-エレメント（BRE）が報告されている。BREは-CCTTCC-モチーフを持ち、よく似たエレメントがGLUT4遺伝子上流部の-CCTTAA-（-526~-520）と-CCTTGC-（-509~-503）に存在する。-506トランスジェニックマウスで褐色脂肪組織にミニジーンGLUT4の発現が認められなかったのは、-CCTTGC-のこれらのエレメントが無かったためと考えられる。運動に反応するエレメントが-551と-442の間に存在することがわかり、転写因子を同定するためのシスエレメントをin vivoにおいて同定できることが明らかになった。又、高脂肪食によるGLUT4のdown-regulationは-701から-551の間のエレメントによることが推定された。ゲルシフト法により、NF1結合部位-621~-582（WF4）及び-585~-546（WF5）部位にタンパクが結合し、これらのオリゴヌクレオチドに対する核蛋白の結合量は高脂肪食により低下することが示された。

5. まとめ

UCP2を脂肪組織に軽度（トランスジェニックマウス）、及び著明（CLA投与）に発現するマウスを作成し、フェノタイプを分析した。この結果、脂肪組織での軽度のUCP2の過剰発現が脂肪を予防する上で非常に有効であることが示された。又、PPAR α の活性化剤は肝実質細胞に於いてUCP2を過剰発現させROSの発生を抑制していることを示した。又、GLUT4の発現調節領域が狭められ、ゲルシフト、フットプリント法により運動、T3、及び高脂肪食に反応するシスエレメントの分析が進んだ。

6. 研究発表

1) Tsuboyama-Kasaoka N, **Ezaki O.** (2001) Mitochondrial uncoupling protein 3 (UCP3) in skeletal muscle. *Front Biosci.* Mar 1;6:D570-D574.

2) Kim K, Seo E, Lee Y, Lee T, Cho Y, **Ezaki O,** Kim C. (2000) Effect of dietary Platycodon grandiflorum on the improvement of insulin resistance in obese Zucker rats. *J Nutr Biochem.* Sep 1;11(9):420-424.

3) Nobuyo Tsuboyama-Kasaoka, Mayumi Takahashi, Kentaro Tanemura, Hyoun-Ju Kim, Tsuyoshi Tan ge, Hitoshi Okuyama, Masaaki Kasai, Shinji Ikemoto, and **Osamu Ezaki.** (2000) Conjugated Lin oleic Acid Supplementation Reduces Adipose Tissue by Apoptosis and Develops Lipodystrophy in Mice. *Diabetes.*, 49, 1534-1542

4) Nobuyo Tsunoda, Kayo Maruyama, David W. Cooke, Daniel M. Lane, and Osamu Ezaki (2000) L ocalization of exercise- and denervation-responsive elements in the mouse GLUT4 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 267, 744-751

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社