

細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明 と新規治療薬への応用

所属 独立行政法人国立健康・栄養研究所 生活習慣病研究部
研究者 江崎 治

研究要旨：適度の運動や魚の摂取は、抗肥満作用を示し、生活習慣病を予防する。
これらの機序分子レベルで明らかにし、創薬のターゲットとなる遺伝子の同定を試みた。

分担研究者

- | | |
|------------------|-------|
| (1) 山之内製薬株式会社 | 後藤 正英 |
| (2) 株式会社ビー・エム・エル | 服部 浩明 |
| (3) 持田製薬株式会社 | 矢野 崇 |

A. 研究目的

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。実際、高脂肪食により肥満とインスリン抵抗性が生じることはよく知られている。

糖尿病発症予防には、糖/脂質代謝を亢進する必要があるが、その方法として筋肉や脂肪組織における糖の取込みおよび脂質代謝を盛んにすること、肝臓における中性脂肪の合成を抑制し、末梢組織への供給量を減らすことなどが考えられる。

筋肉における糖の取込みおよび脂質代謝を盛んにする方法として運動がある。運動は筋肉における血中からの糖の取り込みを増加させること、さらにミトコンドリアにおける β -酸化を促進し、脂質代謝を亢進することが知られている。PGC-1は運動によるこれら作用に深く関与していることが考えられている。

PGC-1 α 過剰発現マウスを作製し、ミトコンドリアの機能及びエネルギー代謝について研究を行った。PGC-1 α マウスのエネルギー代謝亢進に基づく抗肥満効果及び老化の影響を調べた。また、PGC-1 α の遺伝子発現制御メカニズムを探り、その発現を制御する遺伝子領域、さらにはその発現を制御する因子の探索から新規治療薬の創製の目的で、細胞のエネルギー代謝、細胞の分化に深く関与することが知られるレチノ酸を用いて PGC-1 α 発現制御領域の同定・絞込みを試みた。

運動と反対に、寝たきり等により筋肉を使わない状態が続くと、筋量が減少し、骨格筋の機能が低下する(廃用性筋萎縮)。しかし、この廃用性筋萎縮の

生じるメカニズムは不明である。筋萎縮に於けるFOXO1の役割を理解するため、骨格筋で特異的にFOXO1を生理的な範囲で過剰発現するトランスジェニックマウス(FOXO1マウス)を作成した。

肥満は脂肪細胞のサイズが増大する肥満と数が増加する肥満の2つのタイプに分けられる。脂肪細胞のサイズの増大が2型糖尿病、動脈硬化、高血圧及び高脂血症の主な原因となっていることから、肥満被検者の脂肪細胞のサイズを把握することが肥満に関連しておこる疾患に対して有効な対策が期待できる。本研究では細胞の肥大化のマーカー同定を目指した。

魚の摂取はVLDL分泌を減少させ、抗肥満作用を示す。VLDL合成に関与するDGATsの機能を肝で調べ、魚油の生活習慣病予防に関与する遺伝子となっているかどうか調べた。

B. 研究方法

1) 骨格筋の組織化学的検討；マウス骨格筋の凍結切片を、HE、Gomori Trichrome 変法、cytochrome c oxidase (COX)活性、およびsuccinate dehydrogenase (SDH)活性により染色した。Gene Chip解析；マウス骨格筋よりtotal RNAを抽出し、Affimetrix社のMOE430チップを用いて解析した。酸素消費量、エネルギー消費量の測定；酸素消費量は代謝チャンバー中でマウスを飼育し、チャンバーへ供給される酸素量と排出される酸素量の差から求めた。エネルギー消費量は、マウスを24時間絶食させた時の体重減少量から求めた。

2) 高脂肪食負荷実験；8週齢のマウスに高炭水化物食、高脂肪食を17週間与え、DEXAにより体脂肪量、除脂肪体重、骨密度を測定し、また解剖時に各組織重量を測定した。耐糖能試験；一晚絶食後、血糖値を測定後、グルコースを1mg/g体重になるように経口投与し30、60、90、120分後に血糖値を測定した。インスリン抵抗性試験；摂食下、血糖値を測

定後、インスリンを 0.75 mU/g 体重になるように腹腔内投与し 15、30、60、90、120 分後に血糖値を測定した。筋肉 PI3 キナーゼ活性の測定；一晩絶食後、門脈よりインスリンを 1 U/g 体重になるように投与し、2 分後に筋肉を採取した。ホモジネート後の酵素液 1 mg protein に抗 IRS-1 抗体を添加し、4℃で一晩攪拌した後、Protein G で IRS-1 結合 PI3 キナーゼを回収した。IRS-1 結合 PI3 キナーゼ活性は、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 存在下で、L- α -phosphatidylinositol (PI) を基質として反応させた後、TLC にて ^{32}P -PI を分離してその放射活性を測定することにより求めた。

3) PGC-1 α 遺伝子上流領域の解析；取得した約 5.2kb の上流領域から、その 3' 末端側約 2.2kb、約 1.0kb、約 0.5kb、約 0.2kb、約 0.1kb の DNA 領域を調製した。これらを λ ファージベクターに導入し、PGC-1 α プロモーターベクター (hPGC1-Luc) を構築した。これら λ ベクターをラット筋芽細胞 L6 に導入し、細胞において内在性 PGC-1 α の発現を誘導することが知られる λ ファージの応答領域について同定を試みた。

4) トランスジェニックマウスの作出；C57BL6 マウスの受精卵に直鎖状にした FOXO1 cDNA pEH114 plasmid をインジェクションして作出した。mRNA 発現量の定量；mRNA 発現量は Northern blot 法により測定した。インスリン抵抗性試験；摂食下、血糖値を測定後、インスリンを 0.75 mU/g 体重になるように経口投与し 15、30、60、90、120 分後に血糖値を測定した。

5) C57BL/6 マウスに高炭水化物食 (Carb.) あるいは高脂肪食 (HF) (エネルギー比で 60%) を 4 週、10 週間投与し、白色脂肪細胞から RNA を抽出し、Mest の発現量を調べた。遺伝性肥満である db/db マウスの各組織での Mest の発現量をノザンプロット法で調べた。遺伝性肥満である db/db マウスにピオグリタゾン添加食を投与し、脂肪細胞のサイズを組織固定後測定し、又 Mest の発現量をノザンプロット法で調べた。3T3-L1 細胞にレトロウイルスを用いて Mest を過剰発現させ、脂肪に分化させた時の aP2、CEBP α 、PPAR γ 、ob 遺伝子の発現量を測定した。aP2 プロモーターを用いて脂肪細胞特異的に Mest を過剰発現させたトランスジェニックマウスを作成し、脂肪細胞のサイズを測定した。

6) DGAT1、DGAT2 を肝臓で特異的に発現するマウスをアデノウイルスを用いて作製し、電顕で VLDL の合成が亢進しているかどうか調べた。

(倫理面への考慮)

研究所の動物管理規約に従い研究を行なっている。また、動物に苦痛を与えないため、ネンブータル麻酔下で解剖を行なった。

C. 研究結果

1) PGC-1 α マウス (16 週齢) 骨格筋の凍結切片を組織化学的に検討したところ、筋線維径の大小不同を認めた。Gomori Trichrome 変法による染色ではミトコンドリア量の著明な増加を認め、それに伴い cytochrome c oxidase (COX) 活性および succinate dehydrogenase (SDH) 活性の著しい亢進を認めた。電子顕微鏡で観察すると、ミトコンドリア量と Z 線の厚さが増加し赤筋化を示す所見を得たが、その他の形態学的な異常は認めなかった。

Gene Chip を用いて遺伝子発現変化の網羅的な解析を行ったところ、PGC-1 α マウスでは GLUT4 をはじめとする糖代謝系酵素の遺伝子発現量は著しく低下していたのに対し、脂肪酸の β 酸化系の酵素や、TCA サイクル、電子伝達系の遺伝子の発現量は著明に増加していた。また、PGC-1 α マウスは自発運動量が少ないにもかかわらず、酸素消費量やエネルギー消費量が上昇していた。

2) PGC-1 α マウスに高脂肪食負荷を行ったところ、体重増加の抑制、体脂肪量の減少が認められた。肝臓への脂肪の蓄積も抑制された。しかし、筋肉量の減少を伴う除脂肪体重の減少が認められた。PGC-1 α マウスの抗肥満効果は大きく、また高脂肪食負荷による筋肉のインスリン情報伝達障害 (PI3 キナーゼ活性を指標) も改善されていたが、耐糖能やインスリン抵抗性の改善は軽微なものであった。

遺伝性肥満マウスの KKAY に PGC-1 α マウスを交配させ、得られた産仔の体重変化と糖代謝変化について検討した。KKAY マウスに比べ、PGC-1 α を骨格筋に過剰発現した KKAY マウスは体重増加量が有意に少なく、筋肉のインスリン情報伝達障害も改善されていたが、耐糖能は完全には改善されなかった。

PGC-1 α マウスを 25 週齢まで飼育すると、筋線維の著しい萎縮と脂肪組織の浸潤を認めた。電子顕微鏡で観察すると、ミトコンドリア量の著しい増加と筋原線維の崩壊、さらに多くの自己食空胞を認めた。しかしクリステの異常増殖などのミトコンドリアの構造異常は認めなかった。

3) 1 μ M の λ ファージで各 λ ベクターを導入した L6 細胞を処理し、24 時間後に λ ファージ活性を測定した。その結果、L6 細胞において、上流 0.2~5.2kb 領域を含む hPGC-1 α プロモーターベクターは λ ファージ処理により最大約 2.5 倍に増加し、 λ ファージによって内在性 PGC-1 α 遺伝子の発現が誘導されるという報告と一致する結果が得られた。一方、上流 0.1kb 領域は活性を示さなかった。

4) FOXO1 マウスは野生型のコントロールマウスに比べ体重が少なく、骨格筋の量が減少しており、また筋肉が白色化していた。マイクロアレイ解析により、タイプ I 筋肉繊維 (遅筋、赤筋) の構造蛋白に関連する遺伝子の発

現が増加していることが明らかになった。組織染色を行なうと、FOXO1 マウスの骨格筋でタイプ I とタイプ II (速筋、白筋) の両方の繊維のサイズが小さくなり、さらにタイプ I 繊維の数が減少していることが観察された。FOXO1 マウスを回転カゴに入れると自発的活動量がコントロールマウスに比べ減少していた。また、FOXO1 マウスはブドウ糖経口投与後およびインスリン注射後の糖代謝能が悪化していた。すなわち FOXO1 マウスは持久運動能力、耐糖能およびインスリン感受性が低下していることが示された。カテプシン L は骨格筋のアトロフィーの時に発現増加するリソソーム蛋白分解酵素であるが、そのカテプシン L の発現量が FOXO1 マウスの骨格筋で増加していたため、蛋白分解が活発になり、骨格筋のアトロフィーが生じていることが示唆された。一方、トランスジェニックでない普通のマウスの片脚をギプス固定すると、筋量と赤筋の構造蛋白の発現量の減少と共に、FOXO1 の発現誘導が認められた。

5) C57BL/6 マウスに高炭水化物食あるいは高脂肪食を投与すると、高脂肪食群のみ肥満が生じる。また高脂肪食の摂取期間が長くなるに従い肥満の程度は著しくなり、脂肪細胞の Mest の発現量も増加した。遺伝性肥満である db/db マウスの脂肪細胞においては Mest の発現が著しく、その発現は白色脂肪細胞において特異的であった。遺伝性肥満である db/db マウスにピオグリタゾン添加食を投与すると、脂肪細胞のサイズの小型化が認められ著しかった Mest の発現が低下した。本来 3T3-L1 細胞には Mest は発現していないが、レトロウイルスにより過剰発現させると脂肪合成に関連する aP2、CEBP α 、PPAR γ 、ob 遺伝子の発現を増加し、脂肪の分化を促した。aP2 プロモーターを用いて脂肪細胞特異的に過剰発現させたトランスジェニックマウスを作成した。このマウスでは脂肪細胞においてのみ外来性 Mest の発現がし、脂肪細胞の肥大化が認められた。更に、このトランスジェニックマウスにおいては脂肪合成に関連する aP2、ob、CD36、resistin の発現が増加していた。

6) DGAT1 過剰発現マウスに於いて、roughER の肥大化、ゴルジ領域での VLDL の分泌顆粒の増加が認められ、DGAT1 は VLDL の分泌に関与している分子であることがわかった。

D. 考 察

1) 今回の実験で、PGC-1 α 過剰発現によるミトコンドリア合成亢進は、予想通り骨格筋でのエネルギー代謝を促進した。

2) 今回の実験で、PGC-1 α 過剰発現によるミトコンドリア合成亢進は、予想通り骨格筋でのエネルギー代謝を促進して、高脂肪食や過食による肥満を抑制

することを明らかにした。しかし、PGC-1 α の発現量が生理的範囲を超えていたことから、様々な予想でできなかった現象が表れた。そのうちの一つは既に報告済みであるが、GLUT4 発現量の減少である。今回判明した現象では、脂肪組織の浸潤を伴う筋萎縮が顕著であった。

臨床的には、1962 年 Luft らによって初めて指摘されたミトコンドリア機能異常の症例に類似している。Luft 病と呼ばれているこの症例は、基礎代謝率が 140-200% と亢進し、やせ、多汗、多飲、発熱などを主症状とする。生化学的にはミトコンドリアの機能異常が認められる。

いわゆるミトコンドリア・ミオパチーでは、生化学的には呼吸鎖機能異常が、形態学的にはミトコンドリア数の増加、巨大化、クリステの増殖が認められる。しかし、ミトコンドリア・ミオパチーで認められる進行性の筋力低下や筋萎縮が生じる機序は不明である。我々の作製した PGC-1 α マウスはミトコンドリア数の増加と筋萎縮が認められ、ミトコンドリア病の新たなモデル動物として利用出来る可能性がある。また、COX や SDH 活性、ミトコンドリア内部の構造に異常を認めなかったことから、ミトコンドリア病の筋症状の少なくとも一部は、ミトコンドリア数の増加による筋原線維の崩壊が、その原因となっている可能性が示唆された。今後、PGC-1 α マウスのミトコンドリア機能に異常が認められないのか、もし異常が無いとすると何が筋萎縮の直接の原因となっているのかを検討していく予定である。近い将来、PGC-1 α の発現増加をターゲットとした生活習慣病治療薬が開発された場合、その副作用として今回認められた筋萎縮や、糖代謝系遺伝子の発現低下などが起こる可能性が考えられ、薬剤の用量・用法の設定には十分な注意が必要である。

3) 種々の長さの上流領域のうち、0.2kb から 5.2kb の領域において、その β ヘリ酸応答性の亢進が認められた。一方、上流 0.1kb 領域においては、その β -ター活性が失われることから、 β ヘリ酸による PGC-1 α 遺伝子の発現誘導には上流 0.1~0.2kb の領域が必須であることが明らかとなった。

4) FOXO1 は骨格筋の量とタイプ I 繊維の遺伝子発現を負に制御し、そのため骨格筋の機能を損なっていることが示唆された。また、FOXO1 の活性化は廃用性筋萎縮に関与することが示唆された。PGC-1 α は赤筋形成に機能することが知られるが、FOXO1 は PGC-1 α の作用の一部を阻害している可能性が考えられる。

5) Mest は脂肪細胞の肥大化する機能があると考えられた。

6) 魚油は VLDL を低下させるが、この機序として DGAT1 が関与する可能性が示された。DGAT2 は肝での中性脂肪の蓄積に関与していることがわかった。

E. 結 論

1) 運動によるミトコンドリア数の増加は、PGC-1 α の増加を介していることが想定された。

2) 筋肉特異的に PGC-1 α を過剰発現させたマウスは、ミトコンドリア量が増加してエネルギー代謝が亢進した。それに伴い肥満を予防し、インスリン抵抗性が部分的に改善された。しかし、著しいミトコンドリア・ミオパチー様の筋肉所見が認められた。

3) 細胞内在性 PGC-1 α の遺伝子発現を誘導するレチノ酸に関して、PGC-1 α 発現調節に重要なプロモーター領域約 100b を明らかにした。

4) 骨格筋特異的に FOXO1 を過剰発現するトランスジェニックマウスを作出したところ、骨格筋量および筋肉中の赤筋繊維の割合の低下とそれに伴うインスリン抵抗性を認めた。

5) 脂肪細胞のサイズを実際に測定することなく肥満被検者の脂肪細胞のサイズを簡便に把握する蛋白 Mest を見出したことは、臨床における肥満機能診断に有効なものと考えられた。

6) 魚油は VLDL を低下させるが、この機序として DGAT1 が関与する可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahashi M, Kamei Y, **Ezaki O.** (2005) Mest/Peg1 imprinted gene enlarges adipocytes and is a marker of adipocyte size. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288(1): E117-E124.
- 2) Miura S, Tsunoda N, Ikeda S, Kai Y, Cooke DW, Lane MD, **Ezaki O.** (2004) Nuclear factor 1 regulates adipose tissue-specific expression in the mouse GLUT4 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 325: 812-818.
- 3) Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Yano W, Suzuki R, Ueki K, Takamoto I, Satoh H, Maki T, Kubota T, Moroi M, Okada-Iwabu M, **Ezaki O.** Nagai R, Ueta Y, Kadowaki T, Noda T. (2004) Insulin receptor substrate 2 plays a crucial role in beta cells and the hypothalamus. *J Clin Invest.* 114: 917-927.
- 4) Wu J, Wang X, Chiba H, Higuchi M, Nakatani T, **Ezaki O.** Cui H, Yamada K, Ishimi Y. (2004) Combined intervention of soy isoflavone and moderate exercise prevents body fat elevation and

bone loss in ovariectomized mice. *Metabolism.* 53: 942-948.

- 5) Kamei Y, Miura S, Suzuki M, Kai Y, Mizukami J, Taniguchi T, Mochida K, Hata T, Matsuda J, Aburatani H, Nishino I, **Ezaki O.** (2004) Skeletal muscle FOXO1 (FKHR)-transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated type I (slow twitch / red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. *J. Biol. Chem.* 279: 41114-41123.
- 6) Kasaoka S, Tsuboyama-Kasaoka N, Kawahara Y, Inoue S, Tsuji M, **Ezaki O.** Kato H, Tsuchiya T, Okuda H, Nakajima S. (2004) Histidine supplementation suppresses food intake and fat accumulation in rats. *Nutrition.* 20: 991-996.
- 7) Yajima H, Ikeshima E, Shiraki M, Kanaya T, Fujiwara D, Odai H, Tsuboyama-Kasaoka N, **Ezaki O.** Oikawa S, Kondo K. (2004) Isohumulones, bitter acids derived from hops, activate both peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) and and reduce insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 279 33456-33462.

2. 学会発表

- 1) 筋肉特異的 PGC-1 α 過剰発現による GLUT4 発現低下；三浦進司、**江崎治**；第 47 回日本糖尿病学会，2004.05.14，東京国際フォーラム（東京）
- 2) 骨格筋特異的 PGC-1 α 過剰発現によるミトコンドリア増加と筋萎縮；三浦進司、西野一三、埜中征哉、**江崎治**；日本ミトコンドリア研究会第 4 回年会，2004.12.17，東京大学鉄門講堂（東京）

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 発明名称：肥満関連疾患診断方法、Mest 発現調節因子検査方法及び Mest 発現調節因子のスクリーニング方法

発明者：高橋真由美、亀井康富、**江崎治**

出願日：出願番号：特願 2004-201895 で平成 16 年 7 月 8 日に出願

出願人：HS 財団 T L O

- 2) 発明名称：DGAT1 または DGAT2 の活性を変化させる被試験物質のスクリーニング方法

発明者：山崎聖美、三浦進司、**江崎治**

出願日：出願番号:特願 2004-365203 で平成 16
年 12 月 17 日に出願
出願人：H S 財団 T L O

2. 実用新案登録
該当なし

3. その他
該当なし