

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（I）

目 次

課題番号		
KH11001	バイオフィotonicsを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 …… 1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 …… 16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 21
KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発	望月直樹 …… 30
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 …… 40
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 …… 100
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 …… 126
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 …… 144
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 …… 154
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 …… 168
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 181
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 …… 196
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 …… 208
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 …… 221
KH21015	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	江崎 治 …… 235
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山耕造 …… 247
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出利光 …… 262
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島正弘 …… 286
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木哲朗 …… 300
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西正孝 …… 310
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤準一 …… 318

KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 344
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 …… 358
KH31025	生薬及び漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 …… 373
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 …… 390
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 …… 402
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 …… 417
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 …… 435
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクス的手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 449
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 …… 466
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 481
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ …… 494
KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田 恵理子 …… 509
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 525
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井 洋士 …… 537
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	網脇 祥子 …… 551
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍兒 …… 566
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名 和 行文 …… 576

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 基礎栄養プログラム
研究者 江崎 治

研究要旨: 転写共役因子 PGC-1 α は細胞内エネルギー代謝を制御する主要な分子である。 $\beta 2$ 受容体刺激薬を投与すると、筋肉での PGC-1 α 発現量が 30 倍以上に増加した。 β 遮断薬の前投与は、 $\beta 2$ 受容体刺激薬の PGC-1 α 発現増加作用を抑制した。運動による PGC-1 α 発現増加は交感神経を介すると思われた。高果糖食による血清 TG の上昇がエイコサペンタエン酸 (EPA) により抑制された。この血清 TG の上昇は、VLDL 画分の TG 上昇によってもたらされており、EPA はこの画分の TG 上昇を抑制した。共役リノール酸、CLA は細胞内エネルギー代謝を亢進させる脂肪酸である。しかし、CLA は少量の投与でも脂肪細胞でのアポトーシスを生じ、肝臓および脾臓の重量が増加した。CLA は細胞内エネルギー代謝を亢進させる分子と不相当であり、EPA は適当な分子であると思われた。

分担研究者

- (1) アステラス製薬株式会社 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

メタボリックシンドローム予防には、糖/脂質代謝を亢進する必要があるが、その方法として考えられるのは、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。

筋肉における糖や脂質代謝を盛んにする有力な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、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 α 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 は PPAR α coactivator-1 に結合する転写共役因子として褐色脂肪細胞から単離された。それ以外の組織では、骨格筋、心臓、腎臓、脳に発現している。PGC-1 は、核内受容体と結合し、標的遺伝子の転写を活性化する。核内受容体以外にも、NRF-1 や MEF2C との結合も報告されている。PGC-1 α 発現量は代謝状態によって大きく変動し、寒冷暴露、絶食、運動、 $\beta 3$ アゴニスト投与によって発現が増加することが明らかにされている。PGC-1 α の生理的役割として、ミトコンドリア生合成の促進、脂肪酸酸化促進、肝臓での糖新生亢進、RNA の修飾が報告されて

いる。これまでに、骨格筋特異的に PGC-1 α を過剰発現させたトランスジェニックマウス (PGC-1 α マウス) を作製し、このマウスの筋肉に於いては予想通りミトコンドリア量が増加してエネルギー代謝が亢進することを確認した。その一方で、脱共役に伴う ATP の減少が原因と考えられる筋萎縮が認められている。

本年度は PGC-1 α 発現調節について、交感神経の関わりを明らかにした。又、PGC-1 α 過剰発現トランスジェニックマウスでのミトコンドリアの2次元電気泳動法により、脱共役に関連する蛋白の同定を試みた。

PGC-1 α 、PGC1 β や FOXO1 は、脂質代謝に重要な PPAR α の転写能を制御する。PPAR α 遺伝子の多型と日本人の肥満との相関を、PPAR α の Gly395Arg 多型に注目し「インベーター法」により検出する方法を確立した。エイコサペンタエン酸 (EPA) は魚油に含まれる脂肪酸で、高脂血症の治療に用いられている。

血中トリグリセリド (TG) の増加と脂肪蓄積との関連について検討した。Wistar ラットに高果糖食を負荷すると肝 TG 含量が増加し、血中 TG が上昇する。高果糖食を負荷すると同時に EPA を投与し、肝 TG 含量の減少と、血中 TG、肥満への影響を調べた。

共役リノール酸 (CLA) は脂肪細胞のアポトーシスを生じ、抗肥満作用を示す脂肪酸である。しかし、同時に脂肪肝、糖尿病 (リポジストロフィー) を大量摂取は副作用を生じる。C57BL/6 マウスを用いて低用量の CLA 摂取の抗肥満効果と安全性を検討した。

B. 研究方法

a) アドレナリン受容体刺激薬、 β 遮断薬投与による PGC-1 α 発現変化

α 、 β 1、 β 2、 β 3 刺激薬を皮下投与し、投与4時間後の筋肉を採取した。リアルタイム PCR 法で PGC-1 α 発現量を調べた。 β 遮断薬のプロプラノロールを皮下投与し、投与1時間後に β 2 刺激薬を0? 5 mg/kg 体重ずつ皮下投与し、PGC-1 α 発現量を調べた。

b) 骨格筋由来ミトコンドリア画分の調製

14 週齢の野生型マウス、PGC-1 α 過剰発現マウスの骨格筋を摘出し、Optiprep (第一化学薬品) を用いてミトコンドリア画分を精製した。調製したミトコンドリア画分を一次元目ゲル IPG ReadyStrip pH3-10 NL, 二次元目ゲル 10-16% グラジエントゲルにて二次元電気泳動し、画像解析ソフト ProFINDER 2D を使用してディファレンシャル解析を行った。スポットの MALDI-TOF MS による PMF 解析を行った。

c) PPAR α 遺伝子の多型の判定

日本人、約 700 人の血液サンプル (白血球) よりゲノム DNA を調製した。インベーター法を確立し、PPAR α 遺伝子の多型を判定した。

d) EPA のラットへの効果

雄性 Wistar ラットの S 群にはスターチ食を、F 群および FE 群には高果糖食を 4 週間与えた。その間、FE 群にはエイコサペンタエン酸エチル (EPA-E) 1000mg/kg を、他の 2 群には 5%アラビアゴム水溶液を 1 日 1 回経口投与し、2 週間ごとに眼窩静脈叢より採血して血清 TG を測定した。最終投与の翌日、腹部大動脈より採血して血清を分離し、肝臓、精巣上体脂肪および皮下脂肪を摘出した。また、肝臓の一部は、TG 含量を測定した。

e) CLA のマウスへの影響

7 週齢 C57BL/6 マウスに高炭水化物食摂取下で低用量の CLA 添加群、CLA 非添加群の 2 群に分けて 5 ヶ月間および 10 ヶ月間飼育した。CLA の添加は飼料中 0.1% (W/W) とした。解剖は実験食開始 5 ヶ月後および 10 ヶ月後に行い、脂肪組織重量、肝臓重量、脾臓重量、血中インスリン値、インスリン抵抗性 (インスリン負荷試験)、GOT、GPT、レプチン等を測定した。体脂肪率は骨密度測定装置を用いて DEXA 法で測定した。

(倫理面への考慮)

研究所の規約に従い研究を行なっている。書面によるインフォームドコンセントを得た後に、採血および問診を行った。また、動物に苦痛を与えないため、ネンプタル麻酔下で解剖を行なった。

C. 研究結果

a) アドレナリン受容体刺激薬のうち、 β 2 受容体刺激薬を投与した場合、筋肉での PGC-1 α 発現量が 30 倍以上に増加した。 β 遮断薬の前投与は、 β 2 受容体刺激薬の PGC-1 α 発現増加作用を抑制した。

b) 野生型マウスと PGC-1 α マウスの各骨格筋ミトコンドリア画分での蛋白質発現変化を比較した。PGC-1 α マウスで著しく増加していたスポット 1 個、減少していたスポット 2 個につき質量分析を行ったところ、増加していたスポットは NADH-ubiquinone oxidoreductase 13 kDa-A subunit, mitochondrial precursor であった。減少していた 2 スポットは、myosin heavy chain IIB と alpha actin であった。

c) インベーター法で PPAR α 遺伝子の Gly395Arg 多型を検出した。日本人 729 人の検体は全て Gly(G) 型であり、Arg(C) 型は全く検出されなかった。

d) F 群は S 群と比較しての血清 TG が上昇しており、高果糖食が血清 TG の上昇をもたらすことが確認された。これに対して、FE 群の TG は S 群とほぼ同程度であり、高果糖食による血清 TG の上昇が EPA により抑制された。リポ蛋白分析の結果、F 群における血清 TG の上昇は、VLDL 画分の TG 上昇によってもたらされており、EPA はこの画分の TG 上昇を抑制していた。肝 TG 含量も同様の傾向で、S 群と比較して F 群で増加し、FE 群では S 群と同程度まで低下していた。

e) 低用量の CLA を 5 ヶ月間摂取しても肝臓肥大、脾臓肥大、インスリン抵抗性は生じなかった。しかし、10 ヶ月間飼育すると、有意に肝臓および脾臓の重量が増加した。血中 GPT 値も 5 ヶ月間の CLA 摂取では増加しなかったが、10 ヶ月間の CLA 摂取により増加傾向を示した。血中インスリン値は 10 ヶ月 CLA 摂取により軽度な増加を示していた。体脂肪率、子宮周囲脂肪組織重量および後壁腹脂肪組織重量は 10 ヶ月摂取でも有意な減少は認められなかったが、皮下脂肪組織のみ対照群と比較して 10 ヶ月 CLA 摂取群で有意な減少が認められた。

D. 考察と結論

筋肉に存在するβ受容体の約90%がβ2であることから、β2受容体刺激のみが筋肉でのPGC-1α発現を著明に増加させたと考えられる。先行研究で、PGC-1αのプロモーター解析がされており、運動によるPGC-1α発現増加にMEF2結合配列と、cAMP反応領域(CRE)が必要であることが示されている。β受容体刺激は細胞内のセカンドメッセンジャーであるcAMP濃度を増加させ、cAMP依存性プロテインキナーゼを活性化させる。このプロテインキナーゼの基質の一つにCRE結合蛋白(CREB)があり、CREBがリン酸化されるとCREに結合して標的遺伝子の発現を増加させることが知られている。β2受容体刺激によるPGC-1α発現増加にも、CREBのCREへの結合が関与していることが考えられる。

PGC-1α過剰発現によって増加するミトコンドリアは、脱共役呼吸が亢進しており、ATP合成能が著しく低下し、筋組織にATP欠乏をもたらす。今回、PGC-1α発現による脱共役呼吸亢進の理由を探るため、PGC-1αミトコンドリアで増加している蛋白質の分析を行った。PGC-1αミトコンドリアで著しく増加したNADH-ubiquinone oxidoreductase 13 kDa-A subunit, mitochondrial precursorは、ミトコンドリア呼吸鎖の複合体Iの構成蛋白質である。この蛋白質に他の蛋白質と共通した機能性ドメインがないか検索すると、COG4391というバクテリアの蛋白質で保存されている機能不明ドメインがあることがわかったが、脱共役呼吸亢進を説明できるような機能は見いだせなかった。

PPARα遺伝子のGly395Argという多型の頻度は人種によって多様であり、日本人では極めて稀であることが明らかとなった。今後は、日本人で割合の多い、別の遺伝子多型を解析し、生活習慣病のなりやすさとの相関を調べていく予定である。特に、PGC1β遺伝子に関しては確立したインベダー法を用いて、遺伝子型と肥満および生活習慣病との相関を明らかにする必要がある。

高果糖食の負荷により、肝TGの増加と血清TGの上昇が認められ、血清TG上昇は、主にVLDL画分のTG上昇によりもたらされていた。このことから、高果糖食の負荷によって肝におけるTG合成が活性化し、VLDL分泌が亢進した結果、血清のTGが上昇したものと推察された。しかし、脂肪組織の重量は、高果糖食負荷による変化はなく、血中TGの上昇に伴う脂肪蓄積の増加は認められなかった。高果糖食を8週間負荷すると、精巣上体脂肪重量が増加することが報告されており、本研究における4週間の負荷期間が不十分である可能性が考えられた。一方、高果糖食負荷と同時にEPAを投与することにより、肝、

VLDL画分および血中TGの上昇は抑制され、EPAが高果糖食の負荷によってもたらされるTG代謝の異常を改善することが明らかとなった。

CLAに関しては、低用量でも10ヶ月におよぶ長期間の慢性的なCLA摂取は、高用量のCLA摂取と同様の副作用を生じる可能性が認められた。低用量の長期間CLA摂取は、高用量のCLA摂取に比べて副作用の程度は小さいが、慢性的に長期間CLAのサプリメントを摂取することは好ましくないと考えられた。

CLAは細胞内エネルギー代謝を亢進させる分子と不相当であり、EPAは適当な分子であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Taurine deficiency creates a vicious circle promoting obesity. Tsuboyama-Kasaoka N, Shozawa C, Sano K, Kamei Y, Kasaoka S, Hosokawa Y, Ezaki O: *Endocrinology* : 147(7): 3276-3284, 2006.7
- 2) Overexpression of peroxisome proliferators-activated receptor γ co-activator-1 α leads to muscle atrophy with depletion of ATP. Miura S, Tomitsuka E, Kamei Y, Yamazaki T, Kai Y, Tamura M, Kita K, Nishino I, Ezaki O: *Am J Pathol* : 169(4): 1129-1139, 2006.10
- 3) Peg1/Mest in obese adipose tissue is expressed from the paternal allele in an isoform-specific manner. Kamei Y, Suganami T, Kohda T, Ishino F, Yasuda K, Miura S, Ezaki O, Ogawa Y: *FEBS Lett.* : 581(1): 91-96, 2007.1.9

2. 学会発表

- 1) 「生活習慣病予防のための食事・運動療法の作用機序に関する研究」学会賞受賞講演
江崎治: 日本栄養・食糧学会 大会: 2006.5.19: 静岡コンベンションアーツセンター グランシップ (静岡県)
- 2) 運動しても体脂肪が減らないマウス
三浦進司, 甲斐裕子, 勝又阿貴, 田村真弓, 亀井康富, 江崎治: 第60回日本栄養・食糧学会大会: 2006.5.20: 静岡県立大学 (静岡県)
- 3) タウリンの抗肥満作用メカニズム
笠岡(坪山)宜代, 所澤千香子, 佐野佳代, 細川優, 江崎治: 第60回日本栄養・食糧学会大会: 2006.5.21: 静岡県立大学 (静岡県)
- 4) AMP-Activated Protein Kinase in Skeletal Muscle Is Required for a Reduction of Fat Mass

by Exercise Training.

Miura S, Kamei Y, Ezaki O: American Diabetes Association, the 66th Scientific Sessions: 2006.6.12: Wahington, D.C.

- 5) **Increased Peg1/Mest mRNA in Obese Adipose Tissue is Expressed from Paternal Allele in an Isoform-Specific Manner**

Kamei Y, Suganami T, Kohda T, Ishino F, Ezaki O, Ogawa Y: The 11th Adipo Science Symposium: 2006.8.19: 千里阪急ホテル (大阪)

- 6) **Taurine deficiency creates a vicious circle promoting obesity**

笠岡(坪山)宜代、所澤千香子、佐野佳代、亀井康富、笠岡誠一、細川優、江崎治: 第10回国際肥満学会: 2006.9.5: オーストラリア (シドニー)

- 7) **肥満の脂肪組織におけるインプリンティング遺伝子 Peg 1 / M e s t の発現制御機構**

亀井康富、菅波孝祥、幸田尚、石野史敏、江崎治、小野佳宏: 第27回日本肥満学会 : 2006.10.28: 神戸国際会議場 (兵庫県)

G. 知的所有権の取得状況

1 特許取得

- 1) 「肝臓トリグリセリド濃度低下剤」
山崎聖美、江崎治: 特願番号: 2007-19573 で
平成19年1月30日に出願

2 実用新案登録

該当なし

3 その他

該当なし

平成18年度
政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19年7月31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