

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關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品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
研究期間 平成16年4月～平成19年3月

研究要旨：細胞内エネルギー代謝制御分子 PGC-1 α 、PGC-1 β 、FOXO1 をそれぞれ筋肉に過剰発現させたマウスを作出し、エネルギー代謝制御分子の筋肉での役割を推定した。PGC-1 α 過剰発現マウスは、筋肉でのミトコンドリア量が増加し、個体でのエネルギー代謝亢進が認められた。ミトコンドリアでは、脱共役呼吸が亢進し、ATP 合成能が著しく低下し、筋の萎縮が認められた。FOXO1 を過剰発現マウスでは、骨格筋量および筋肉中の赤筋繊維の割合の低下を認めた。FOXO1 が筋萎縮に関与する重要な分子であることが示された。又、交感神経刺激により、PGC-1 α の発現量が著明に増加することを見いだした。更にこれらエネルギー代謝に関連する遺伝子、ERR 遺伝子の多型 ESRRA23 が日本人の肥満と関連した。

脂肪細胞のサイズを簡便に把握する蛋白 Mes1 を見い出した。肝臓 DGAT1 過剰発現マウスは VLDL の分泌を増強し、内臓脂肪の量を増加させるので魚油の VLDL 低下作用には肝臓での DGAT1 が関与する可能性が示された。実際、エイコサペンタエン酸 (EPA) の投与は高果糖食による肝 TG の増加と血清 TG の上昇を抑制した。低用量の共役リノール酸 CLA 摂取 (0.1%, w/w) は、肝肥大、インスリン値の増加を生じた。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が、CLA は細胞内エネルギー代謝を亢進させる分子としては不適當であり、EPA は適当な分子であると考えられた。

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

筋肉における糖の取込みおよび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。転写共役因子 PGC-1 α は運動によるこれら作用に深く関与している。

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 α 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、 β 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。本研究では PGC-1 α 関連分子の役割をトランスジェニックマウスを用いて、明らかにした。

I. エネルギー代謝をコントロールする分子群

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。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) に認められた筋萎縮の原因を探るため PGC-1 α マウス骨格筋のミトコンドリア機能、とくに呼吸鎖機能について研究を行った。また、PGC-1 α の遺伝子発現制御領域を探り、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ノイン酸を用いて PGC-1 α 発現制御領域の同定・絞込みを試みた。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。

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。

PGC-1 α の「コアダクター」としてPGC-1 β が「クロニク」され、エネルギー代謝への関与が注目されている。PGC-1 β 遺伝子の上流配列から、その発現を制御するプロモーター領域の同定を試みた。ERR1はオーファン核内受容体であり、エネルギー消費の高い能力をもつ組織で傑出して発現しており、エネルギー代謝と肥満に関係することが示唆される。ERR1はPGC1 β と相互作用してその機能を発揮する。ERR1遺伝子プロモーター中にポリモルフィズム(多型)が同定されている。ESRRA23と名付けられた23bpのシーケンスがERR1遺伝子プロモーターに存在し、ヒト染色体で1-4コピー見つかることが示されている。しかしながら、この多型と肥満との関連は調べられていなかった。そこで、日本人のサンプル(約700人分)で、肥満に及ぼすESRRA23多型の影響を調べた。さらにPGC1 β 遺伝子、FOXO1遺伝子の多型に関して検索を行った。

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。

II 臓器間の脂質の流れから見たメタボリックシンドロームの予防

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、その他の方法として考えられるのは、筋肉での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、脂肪の体内での流れを変え、脂肪組織への脂肪の流れを抑制する方法もある。最初に、脂肪細胞の肥大化のマーカー同定を目指し、MESTと呼ばれる蛋白が脂肪細胞のサイズマーカーとして使用できることを見いだした。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、肥満被験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。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。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。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が、多量の摂取はマウスに於いて、レプチン濃度を著明に減少させ、脂肪肝を生じる。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

I. エネルギー代謝をコントロールする分子群

PGC-1 α 過剰発現マウスの基本的解析: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。マウス骨格筋よりtotal RNAを抽出し、Gene Chipで解析した。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。

PGC-1 α 過剰発現マウスのミトコンドリア分析:

調製したミトコンドリア画分のsuccinate dehydrogenase(SDH)活性、succinate-ubiquinone oxidoreductase(SQR)活性、NADH-ubiquinone reductase活性、NADH-oxidase活性、NADH-cytochrome c reductase活性、succinate-cytochrome c reductase活性、ubiquinol-cytochrome c reductase活性、cytochrome c oxidase活性、citrate synthase活性を、既存の方法にて測定した。Biological oxygen monitor 5300(YSI)に、Clark型酸素電極を装着して測定した。100 μ gのミトコンドリア画分の酸素消費量を、rotenone(5 μ g/ml)の存在下でsuccinateを基質として測定した。State 3の呼吸は200 μ M ADPを添加することにより測定した。脱共役呼吸の測定は、2.5 μ g/mlのoligomycin存在下で測定した。骨格筋中のATPおよびAMP量をHPLC法により測定した。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。

PGC-1 α 過剰発現マウスの高脂肪食負荷実験:

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、筋肉PI3キナーゼ活性の測定も行った。

PGC-1 α 遺伝子上流領域の解析: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 β インテリンの応答領域について同定を試みた。

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。

トランスジェニックマウスの作出:C57BL/6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、その表現型を分析した。

PGC-1 β 遺伝子上流領域の解析:PGC-1 β 遺伝子の約1kbpの塩基配列を決定し、解析したところ、ここにはAP-1、CREB、SREBP、GATA1、Sp1、MyoDなど各種転写因子が結合する可能性が示された。この配列を λ ファージベクターに導入し、PGC-1 β プロモーターベクターを構築した。この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 β の発現を誘導することが知られるフォルスコリンとデキサメタゾンに対する応答性を検討した。

遺伝子多型の判定: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、PCR法により、目的遺伝子を増幅させ、電気泳動により大きさを検出し、多型を判定した。インベーター法で多型を判定した。

II 臓器間の脂質の流れから見たメタボリックシンドロームの予防

脂肪細胞のサイズマーカーの発見: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。

肝臓でのDGAT1、DGAT2の役割: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。

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。

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で低用量のCLA添加群、CLA非添加群の2群に分けて5ヵ月間および10ヵ月間飼育した。CLAの添加は飼料中0.1%(W/W)とした。解剖は実験食開始5ヵ月後および10ヵ月後に行い、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、ネブタール麻酔下で解剖を行なった。

C. 研究結果

I. エネルギー代謝をコントロールする分子群

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による解析で、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のにもかかわらず、酸素消費量やエネルギー消費量が上昇していた。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。

筋肉より調製したミトコンドリア画分の酸素消費量を測定した。PGC-1 α マウスでは、ミトコンドリア画分のタンパク量あたり2-3倍のState 3酸素消費量亢進が認められた。しかし、ミトコンドリア数のマーカーであるcitrate synthase活性で補正すると、酸素消費量に野生型との差は認められなくなり、ミトコンドリアあたりの呼吸にはPGC-1 α の影響はなかった。野生型ではその60%がoligomycinで阻害される「共役呼吸」であったのに対し、PGC-1 α マウスではそのほとんどがoligomycinで阻害されない「脱共役呼吸」であった。PGC-1 α によって増加したミトコンドリアは、ATP合成能の少ない、プロトンリークしやすいものであった。呼吸鎖を構成する各複合体の酵素活性を測定したが、ミトコンドリア数のマーカーであるcitrate synthase活性で補正すると、複合体I、II、IIIにはPGC-1 α 過剰発現による影響は認められなかった。複合体IVにのみ約2倍の活性亢進が認められた。ミトコンドリア呼吸の測定より、PGC-1 α マウス骨格筋のミトコンドリアは、ATP合成能が低いことが示唆されたので、実際に骨格筋中のATP量を測定した。その結果、PGC-1 α マウスで著しいATP量の減少(約80%)と、それに伴うAMP量の増加(5-7倍)が認められた。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。

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のみ、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。

PGC-1 α マウスに高脂肪食を摂取させると、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(P13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。

1 μ Mの β ニフィン酸で各 β - γ - δ - ϵ を導入したL6細胞を処理し、24時間後に β ニフェラーゼ活性を測定した。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 β - γ - δ - ϵ は β ニフィン酸処理により最大約2.5倍に増加し、 β ニフィン酸によって内在性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。

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減少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。

インベーター法で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。日本人682人(男324人、女358人)について、ESRRA23の遺伝子型を調べた。ESRRA23の2,3型を有する人のグループは2,2遺伝子型を有するグループに比べ、有意

に太っていた (Body mass index の値が大きかった)。PGC1 β 遺伝子には Ala203Pro という遺伝子多型が存在する。そこで我々は、インベーター法によりヒト DNA サンプルより Ala203Pro 多型を検出する系を独自に確立した。また、FOXO1 遺伝子に関しては、少なくともアミノ酸をコードする領域には多型は存在しなかった。

II 臓器間の脂質の流れから見たメタボリックシンドロームの予防

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、高脂肪食群で肥満が生じる。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。

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。

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。

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

I. エネルギー代謝をコントロールする分子群

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。PGC-1 α 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、筋組織が萎縮したと想定された。PGC-1 α 発現による脱共役呼吸亢進の理由を探るため、PGC-1 α 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-1 α 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。

今回の新しい発見は PGC-1 α の発現が交感神経刺激により、著明に増加することを見いだしたことである。筋肉に存在する β 受容体の約 90% が $\beta 2$ であることから、 $\beta 2$ 受容体刺激のみが筋肉での PGC-1 α 発現を著明に増加させたと考えられる。先行研究で、PGC-1 α のプロモーター解析がされており、運動による PGC-1 α 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。 $\beta 2$ 受容体刺激による PGC-1 α 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。

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。FOXO1 が筋萎縮に関与する重要な分子であることが推定された。

これらエネルギー代謝に関連する遺伝子群の日本人でのミューテーションとの関連について調べた。

ERR 遺伝子の多型 ESRRA23 の 2, 3 型を有する人のグループは 2, 2 遺伝子型を有するグループに比べ、有意に太っていた (Body mass index の値が大きかった)。この結果から ESRRA23 はヒト肥満の遺伝的要因のひとつであると考えられた。又、PPAR α 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、PGC1 β 遺伝子に関しては確立したインベーター法を用いて、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。

II 臓器間の脂質の流れから見たメタボリックシンドロームの予防

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 を見いだしたことは、臨床における肥満機能診断に有効なものと考えられた。

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。肝臓 DGAT1 過剰発現マウスは VLDL の分泌を増強し、内臓脂肪の量を増加させる。内臓脂肪では皮下脂肪に比べ、VLDL-receptor が多い。これが VLDL の分泌増強が皮下脂肪でなく内臓脂肪の量を増加させる原因と考えられた。

高果糖食は、肝 TG の増加と血清 TG の上昇をもたらす。EPA 投与により、肝、VLDL 画分および血中 TG の上昇が抑制され、魚油の成分の一つ 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を示した。

共役リノール酸 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 摂取時に認められるリポジストロフィーを生じた。低用量の長期間 CLA 摂取は、高用量の CLA 摂取に比べてこれらの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。

以上のように、魚油、特に EPA は、肝臓から内臓脂肪への脂肪の流れを減少させ、抗肥満効果を示すことが考えられた。トランス脂肪酸の一つである CLA は脂肪の流れを肝臓で止めてしまい、脂肪肝、インスリン抵抗性を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miura S, Tsunoda N, Ikeda S, Kai Y, Cooke DW, Lane MD, **Ezaki O**. Nuclear factor 1 regulates adipose tissue-specific expression in the mouse

GLUT4 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 325: 812-818, 2004

- 2) Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Yano W, Suzuki R, Ueki K, Takamoto I, Satoh H, Maki T, Kubota T, Mori M, Okada-Iwabu M, **Ezaki O**, Nagai R, Ueta Y, Kadowaki T, Noda T. Insulin receptor substrate 2 plays a crucial role in beta cells and the hypothalamus. *J Clin Invest.* 114: 917-927, 2004
- 3) Wu J, Wang X, Chiba H, Higuchi M, Nakatani T, **Ezaki O**, Cui H, Yamada K, Ishimi Y. Combined intervention of soy isoflavone and moderate exercise prevents body fat elevation and bone loss in ovariectomized mice. *Metabolism.* 53: 942-948, 2004
- 4) Kamei Y, Miura S, Suzuki M, Kai Y, Mizukami J, Taniguchi T, Mochida K, Hata T, Matsuda J, Aburatani H, Nishino I, **Ezaki O**. 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, 2004
- 5) Kasaoka S, Tsuboyama-Kasaoka N, Kawahara Y, Inoue S, Tsuji M, **Ezaki O**, Kato H, Tsuchiya T, Okuda H, Nakajima S. Histidine supplementation suppresses food intake and fat accumulation in rats. *Nutrition.* 20: 991-996, 2004
- 6) Yajima H, Ikeshima E, Shiraki M, Kanaya T, Fujiwara D, Odai H, Tsuboyama-Kasaoka N, **Ezaki O**, Oikawa S, Kondo K. Isohumulones, bitter acids derived from hops, activate both peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) and reduce insulin resistance. *J Biol Chem.* 279: 33456-33462, 2004
- 7) Takahashi M, Kamei Y, **Ezaki O**. Mest/Peg1 imprinted gene enlarges adipocytes and is a marker of adipocyte size. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288: E117-E124, 2005
- 8) Nogusa Y, Yanaka N, Sumiyoshi N, Kaseda Y, Tsuboyama-Kasaoka N, **Ezaki O**, Kato N. Short-term feeding of fish oil down-regulates the expression of pyruvate dehydrogenase E1 alpha subunit mRNA in mouse brain. *Biosci Biotechnol Biochem.* 69: 301-306, 2005
- 9) Yamazaki T, Sasaki E, Kakinuma C, Yano T, Miura S, **Ezaki O**. Increased VLDL secretion and gonadal fat mass in mice over-expressing liver acyl CoA: Diacylglycerol acyltransferase 1. *J Biol Chem.* 280: 21506-21514, 2005
- 10) Kamei Y, Suzuki M, Miyazaki H, Tsuboyama-Kasaoka N, Wu J, Ishimi Y, **Ezaki O**. Ovariectomy in Mice Decreases Lipid Metabolism-Related Gene Expression in Adipose Tissue and Skeletal Muscle with Increased Body Fat. *J Nutr Sci Vitaminol.* 51: 110-117, 2005
- 11) Yajima H, Noguchi T, Ikeshima E, Shiraki M, Kanaya T, Tsuboyama-Kasaoka N, **Ezaki O**, Oikawa

- S, Kondo K. Prevention of diet-induced obesity by dietary isomerized hop extract containing isohumulones, in rodents. *International Journal Obesity*. 29: 991-997, 2005
- 12) Nakatani T, Katsumata A, Miura S, Kamei Y, **Ezaki O**. Effects of fish oil feeding and fasting on LXR α /RXR α binding to LXRE in the SREBP-1c promoter in mouse liver. *Biochim Biophys Acta*. 1736: 77-86, 2005
 - 13) Kamei Y, Lwin H, Saito K, Yokoyama T, Yoshiike N, **Ezaki O**, Tanaka H. The 2.3 genotype of ESRR23 of the ERR α gene is associated with a higher BMI than the 2.2 genotype. *Obes Res*. 13: 1843-1844, 2005
 - 14) Watanabe M, Houten SM, Matak C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, Messaddeq N, Harney JW, **Ezaki O**, Kodama T, Schoonjans K, Bianco AC, Auwerx J. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature*: 439: 484-489, 2006
 - 15) Tsuboyama-Kasaoka N, Shozawa C, Sano K, Kamei Y, Kasaoka S, Hosokawa Y, **Ezaki O**. Taurine deficiency creates a vicious circle promoting obesity. *Endocrinology*. 147: 3276-3284, 2006.
 - 16) Miura S, Tomitsuka E, Kamei Y, Yamazaki T, Kai Y, Tamura M, Kita K, Nishino I, **Ezaki O**. Overexpression of peroxisome proliferators-activated receptor γ co-activator-1 α leads to muscle atrophy with depletion of ATP. *Am J Pathol*. 169: 1129-1139, 2006.
 - 17) 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: 91-96, 2007.
- ## 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
 - 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
 - 3) 慢性運動効果への AMP キナーゼの関与 ; 三浦進司, **江崎治** 第 48 回日本糖尿病学会年次学術集会, シンポジウム 5、運動療法の今日的課題 (基礎的研究成績と臨床面の問題点) 2005.05.12 神戸ポートピアホテル
 - 4) 食事性ヒスチジンは脳内でヒスタミンに変換されたのち摂食量を低下させる
笠岡誠一, 後藤浄子, 浅見悦子, 小川真紀子, 笠岡(坪山)宜代, **江崎治**, 土屋隆英, 中島滋 第 59 回日本栄養・食糧学会 2005.05
 - 5) VLDL 増加による内臓肥満 ; 食事成分の影響 ; 山崎聖美, **江崎治** 第 26 回日本肥満学会 2005.10.14 ホテルロイトン札幌
 - 6) 骨格筋における FOXO1 の発現増加は筋量 (赤筋) の減少をひき起こす ; 亀井康富, 三浦進司, **江崎治** 第 59 回日本栄養・食糧学会 2005.5.17
 - 7) Mest/Peg1 imprinted gene enlarges adipocytes ; 亀井康富, 高橋真由美, 小川佳宏, **江崎治** 第 10 回アディポサイエンス研究会シンポジウム 2005.8.19
 - 8) インプリンティング遺伝子 Mest/Peg1 : 新しい脂肪細胞肥大促進遺伝子 ; 亀井康富, 高橋真由美, 小川佳宏, **江崎治** 第 26 回日本肥満学会 2005.10.13 ホテルロイトン札幌
 - 9) 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: The 35th International Congress of Physiological Sciences. ; Kamei Y, Miura S, **Ezaki O**. 2005.4.2, San Diego, USA
 - 10) 「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
 - 11) 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
 - 12) 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
 - 13) 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 Washington, D.C.
 - 14) 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 大阪千里阪急ホテル
 - 15) 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
 - 16) 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 / Mest* 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

G. 知的所有権の取得状況

1 特許取得

- 1) 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
高橋真由美、亀井康富、江崎治
特願 2004-201895 で 16 年 7 月 8 日に出願
出願人：HS 財団 T L O
- 2) *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
山崎聖美、三浦進司、江崎治
特願 2004-365203 で 16 年 12 月 17 日に出願
出願人：HS 財団 T L O
- 3) 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 (国際特許)
高橋真由美、亀井康富、江崎治
PCT/JP2005/011810 で 17 年 6 月 28 日に出願
- 4) AMPK 活性低下マウス及びその使用方法
三浦進司、江崎治
特願 2005-278412 で 17 年 9 月 26 日に出願
- 5) 血中 VLDL-TG 低下剤及びその使用方法
山崎聖美、江崎治
特願 2005-299414 で 17 年 10 月 13 日に出願
- 6) *PGC-1a* 発現促進剤及び *PGC-1a* 発現抑制剤、並びにそれらの使用方法
三浦進司、江崎治
特願 2006-041387 で 18 年 2 月 17 日に出願
- 7) 肝臓トリグリセリド濃度低下剤
山崎聖美、江崎治
特願 2007-19573 で 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