

473.12
Y79
④

基盤研究 (B)

課題番号 16390260

メタボリックシンドロームの病態モデル動物の作成と
その分子基盤の網羅的解析

山田 信博

筑波大学大学院人間総合科学研究科教授

平成18年3月

寄贈
山田信博氏

06003693

は し が き

糖尿病、高脂血症、高血圧などの生活習慣病は、終局的には虚血性心疾患や脳卒中などの動脈硬化性疾患を生じて、日本人の QOL および生命予後を著しく悪化させている。高カロリー、高脂肪、高単純糖質さらに運動不足の欧米型の生活習慣では、インスリン抵抗性や肥満を基軸として、加齢とともにいつの間にか、糖尿病のみならず高脂血症、高血圧などの動脈硬化危険因子を重積する場合が多い。メタボリックシンドロームの共通の病態として、肥満やインスリン抵抗性が注目されているが、その病態は単一ではなく、特定の遺伝子変異というよりは儉約遺伝子などの関連遺伝子機能の調節ないしは発現異常として捉えるべきであり、私達は遺伝子転写調節の視点、すなわち糖脂質代謝におけるエネルギー過剰あるいは消費不足に対する病的破綻状態という視点からエネルギー代謝制御機構の研究を展開してきた。メタボリックシンドロームの共通病態のひとつとして注目されているインスリン抵抗性について、肝臓における脂質合成転写因子 SREBP-1c が直接関与していることが最近明らかにした。SREBP-1c の IRS-s 抑制の分子機序を明らかにするためにヒト IRS-2 プロモーターの解析を行ったところ、IRS-2 プロモーター上に報告されているインスリン応答性配列(IRE)にオーバーラップして、SREBP の結合配列(Sterol Regulatory Element, SRE)を見出した。詳細な検討の結果、SREBP はこの SRE に結合し、IRE 結合する活性化因子の締め出しを行う結果、プロモーター活性が低下することを見出した。さらに SREBP-1c は、Foxo による IRS-2 プロモーター活性が低下することを見出した。さらに SREBP-1c は、Foxo による IRS-2 プロモーター活性の増加を競合的に抑制することを示した。この SREBP-1c と Foxo 間の転写拮抗ネットワークによる IRS-s の発現制御の解明は、SREBP-1c による肝臓インスリン抵抗性の機序のみならず、肝臓における栄養関連遺伝子の発現抑制機構をよく説明した。

研究組織

研究代表者：山田 信博（筑波大学人間総合科学研究科教授）

研究分担者：島野 仁（筑波大学人間総合科学研究科助教授）

研究分担者：豊島 秀男（筑波大学人間総合科学研究科講師）

研究分担者：曾根 博仁（筑波大学人間総合科学研究科講師）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	8,900	0	8,900
平成17年度	5,500	0	5,500
総計	14,400	0	14,400

研究発表

英文原著論文

1. Ide T, Shimano H, Yahagi N, Matsuzaka T, Nakakuki M, Yamamoto T, Nakagawa Y, Takahashi A, Suzuki H, Sone H, Toyoshima H, Fukamizu A, Yamada N. SREBPs suppress IRS-2-mediated insulin signalling in the liver. *Nat Cell Biol.* 6:351-7,2004
2. Yamamoto T, Shimano H, Nakagawa Y, Ide T, Yahagi N, Matsuzaka T, Nakakuki M, Takahashi A, Suzuki H, Sone H, Toyoshima H, Sato R, Yamada N. SREBP-1 interacts with HNF-4alpha and interferes with PGC-1 recruitment to suppress hepatic gluconeogenic genes. *J Biol Chem.* 279:12027-35,2004
3. Sone H, Yoshimura Y, Ito H, Ohashi Y, Yamada N; Japan Diabetes Complications Study Group. Energy intake and obesity in Japanese patients with type 2 diabetes. *Lancet.* 363:248-9,2004
4. Sekiya M, Osuga JI, Okazaki H, Yahagi N, Harada K, Shen WJ, Tamura Y, Tomita S, Iizuka Y, Ohashi K, Okazaki M, Sata M, Nagai R, Fujita T, Shimano H, Kraemer FB, Yamada N, Ishibashi S. Absence of hormone-sensitive lipase inhibits obesity and adipogenesis in Lepob/ob mice. *J Biol Chem.* 279:15084-90,2004
5. Sone H, Yoshimura Y, Ito H, Ohashi Y, Yamada N; Japan Diabetes Complications Study Group. Energy intake and obesity in Japanese patients with type 2 diabetes. *Lancet.* 363:248-9,2004
6. Sone H, Mizuno S, Ohashi Y, Yamada N. Type 2 diabetes prevalence in Asian subjects. *Diabetes Care.* 27:1251-2,2004
7. Tamura Y, Osuga J, Adachi H, Tozawa R, Takanezawa Y, Ohashi K, Yahagi N, Sekiya M, Okazaki H, Tomita S, Iizuka Y, Koizumi H, Inaba T, Yagyu H, Kamada N, Suzuki H, Shimano H, Kadowaki T, Tsujimoto M, Arai H, Yamada N, Ishibashi S. Scavenger receptor expressed by endothelial cells I (SREC-I) mediates the uptake of acetylated low density lipoproteins by macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Biol Chem.* 279:30938-44,2004
8. Sone H, Shimano H, Shu M, Nakakuki M, Takahashi A, Sakai M, Sakamoto Y, Yokoo T, Matsuzaka K, Okazaki H, Nakagawa Y, Iida KT, Suzuki H, Toyoshima H, Horiuchi S, Yamada N. Statins downregulate ATP-binding-cassette transporter A1 gene expression in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 316:790-4,2004
9. Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Tomita S, Sekiya M, Hasty A, Nakagawa Y, Sone H, Toyoshima H,

- Ishibashi S, Osuga J, Yamada N. Insulin-independent induction of sterol regulatory element-binding protein-1c expression in the livers of streptozotocin-treated mice. *Diabetes*. 53:560-9,2004
10. Yahagi N, Shimano H, Matsuzaka T, Sekiya M, Najima Y, Okazaki S, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Inoue N, Nakagawa Y, Takeuchi Y, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Kadowaki T, Ishibashi S, Osuga J, Yamada N. p53 involvement in the pathogenesis of fatty liver disease. *J Biol Chem*. 279:20571-5,2004
 11. Sone H, Yamada N, Mizuno S, Aida R, Ohashi Y. Alcohol use and diabetes mellitus. *Ann Intern Med*. 141:408-9,2004
 12. Wang Y, Suzuki H, Yokoo T, Tada-Iida K, Kihara R, Miura M, Watanabe K, Sone H, Shimano H, Toyoshima H, Yamada N. WGEF is a novel RhoGEF expressed in intestine, liver, heart, and kidney. *Biochem Biophys Res Commun*. 324:1053-8,2004
 13. Sone H, Yamada N, Mizuno S, Ohashi Y, Ishibashi S, Yamazaki Y. Requirement for hypertension and hyperlipidemia medication in U.S. and Japanese patients with diabetes. *Am J Med*. 117:711-2,2004
 14. Kikuchi H, Kawakami Y, Kakihana K, Kawai K, Murayama Y, Iizuka Y, Suzuki S, Suzuki H, Sone H, Toyoshima H, Shimano H, Yamada N. Plasma chloride concentration as a new diagnostic indicator of insulin insufficiency. *Diabetes Res Clin Pract*. 67:137-43,2005
 15. Sone H, Mizuno S, Fujii H, Yoshimura Y, Yamasaki Y, Ishibashi S, Katayama S, Saito Y, Ito H, Ohashi Y, Akanuma Y, Yamada N. Is the diagnosis of metabolic syndrome useful for predicting cardiovascular disease in asian diabetic patients? Analysis from the Japan Diabetes Complications Study. *Diabetes Care*. 28:1463-71,2005
 16. Takahashi A, Motomura K, Kato T, Yoshikawa T, Nakagawa Y, Yahagi N, Sone H, Suzuki H, Toyoshima H, Yamada N, Shimano H. Transgenic mice overexpressing nuclear SREBP-1c in pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 54:492-9,2005
 17. Nakagawa Y, Aoki N, Aoyama K, Shimizu H, Shimano H, Yamada N, Miyazaki H. Receptor-type protein tyrosine phosphatase epsilon (PTPepsilon) is a negative regulator of insulin signaling in primary hepatocytes and liver. *Zoolog Sci*. 22:169-75,2005
 18. Sone H, Mizuno S, Yamada N. Vascular risk factors and diabetic neuropathy. *N Engl J Med*. 352:1925-7,2005
 19. Takahashi A, Shimano H, Nakagawa Y, Yamamoto T, Motomura K, Matsuzaka T, Sone

- H, Suzuki H, Toyoshima H, Yamada N. Transgenic mice overexpressing SREBP-1a under the control of the PEPCK promoter exhibit insulin resistance, but not diabetes. *Biochim Biophys Acta*. 1740:427-33,2005
20. Suzuki M, Kakuta H, Takahashi A, Shimano H, Tada-Iida K, Yokoo T, Kihara R, Yamada N. Effects of atorvastatin on glucose metabolism and insulin resistance in KK/Ay mice. *J Atheroscler Thromb*. 12:77-84,2005
21. Yatoh S, Mizutani M, Yokoo T, Kozawa T, Sone H, Toyoshima H, Suzuki S, Shimano H, Kawakami Y, Okuda Y, Yamada N. Antioxidants and an inhibitor of advanced glycation ameliorate death of retinal microvascular cells in diabetic retinopathy. *Diabetes Metab Res Rev*. 2005 May 12; [Epub ahead of print]
22. Yahagi N, Shimano H, Hasegawa K, Ohashi K, Matsuzaka T, Najima Y, Sekiya M, Tomita S, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Nagai R, Ishibashi S, Kadowaki T, Makuuchi M, Ohnishi S, Osuga J, Yamada N. Co-ordinate activation of lipogenic enzymes in hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer*. 41:1316-22,2005
23. Najima Y, Yahagi N, Takeuchi Y, Matsuzaka T, Sekiya M, Nakagawa Y, Amemiya-Kudo M, Okazaki H, Okazaki S, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Kadowaki T, Ishibashi S, Yamada N, Osuga JI, Shimano H. High mobility group protein-B1 (HMGB1) interacts with sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) to enhance their DNA binding. *J Biol Chem*. 2005 Jul 29;280(30):27523-32
24. Inoue N, Shimano H, Nakakuki M, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Yamamoto T, Sato R, Takahashi A, Sone H, Yahagi N, Suzuki H, Toyoshima H, Yamada N. Lipid synthetic transcription factor SREBP-1a activates p21 WAF1/CIP1, a universal cyclin-dependent kinase inhibitor. *Mol Cell Biol*. 2005 Oct;25(20):8938-47.
25. Amemiya-Kudo M, Oka J, Ide T, Matsuzaka T, Sone H, Yoshikawa T, Yahagi N, Ishibashi S, Osuga JI, Yamada N, Murase T, Shimano H. Sterol Regulatory Element-binding Proteins Activate Insulin Gene Promoter Directly and Indirectly through Synergy with BETA2/E47. *J Biol Chem*. 2005 Oct 14;280(41):34577-34589.
26. Sone H, Mizuno S, Yamada N Vascular risk factors and diabetic neuropathy. *N Engl J Med*. 2005 May 5;352(18):1925-7

研究成果

○はじめに

肝臓におけるインスリン抵抗性は、メタボリックシンドローム、糖尿病における病態形成において極めて重要である。肝臓におけるインスリンシグナルにおいて IRS-2 はキイプレイヤーであり、転写レベルで発現が調節されており、またインスリン抵抗性においては発現が低下している。IRS-2 発現抑制によるインスリン抵抗性の惹起因子として脂質合成転写因子 SREBP-1c が注目されるが、最近、IRS-2 の発現活性化因子として、Foxo ならびに新規転写因子 TFE3 が発見され、インスリン抵抗性改善作用を含めて代謝に対する広汎な作用が認められ治療標的として期待される。

○目的

肝臓は、個体の脂質代謝、糖代謝いずれについても中心的な臓器であり。インスリンは、そのいずれにも支配的な制御を行う。インスリンは、インスリン受容体に結合後、各伝達物質のリン酸化カスケードを介して、糖代謝、脂質代謝、タンパク代謝に同化作用を発揮する。その分子メカニズムは詳細にわかっている。肝臓におけるインスリン作用は、糖新生の抑制、糖放出の抑制、グリコーゲンの合成、脂質合成 (lipogenesis) の活性化などからなる。IRS は、インスリン受容体の直下のキイシグナル分子であるが、肝臓においては、IRS-2 が IRS-1 よりもむしろ重要である。従来から糖尿病は肝臓の病気であるといわれる程、肝臓における異常がその病態に重要な役割を果たしていることがいわれていた。事実、肝臓特異的インスリン受容体ノックアウトマウスは、重度のインスリン抵抗性と耐糖能異常を示す。したがって肝臓におけるインスリン作用の障害すなわちインスリン抵抗性も、他のインスリン感受性組織同様に、糖尿病の発症、悪化の機序として重要である。肝臓におけるインスリン抵抗性は、肥満、脂肪肝、高トリグリセリド血症、高レムナント血症を伴うことが多く、メタボリックシンドロームの病態とも深く関連する。

本研究では、肝臓のインスリン感受性に関与する転写因子を特に IRS-2 の転写調節に視点をおいて解析を展開した。

○結果および考察

脂質合成転写因子 SREBP-1c の肝臓における栄養制御、インスリン感受性制御

SREBP-1c は肝臓において栄養状態に応じて脂肪酸、トリグリセリド合成を支配する転写因子である。マウスの肝臓においてSREBP-1cの発現は、絶食で消失し、摂食状態で活性化される。SREBP-1c は インスリン抵抗性や肥満モデルにおいて活性化し、脂肪肝の形成に関与する事が示されている。SREBP-1c は脂肪の合成のみならず、肝臓のインスリンシグナルメディエーターIRS-2 の発現抑制を介して、インスリンシグナルの栄養制御にも関わっている。

絶食時においては、FOXO が糖新生系を活性化し血糖維持をし、IRS-2 が高いため摂食に伴いインスリン作用は効率良く行われる。過食が進むと SREBP-1c が徐々に活性化し IRS-2 の発現を抑制し、グリコーゲン合成は低下しリポジェネシスが開始される。このSREBP-1cとFOXO間の転写拮抗によるIRS-2の発現制御は、肝臓における栄養関連遺伝子の発現の生理的制御のみならず、過栄養状態におけるインスリン抵抗性、脂肪肝も説明する。SREBP-1cの活性化とインスリン抵抗性の関連がレプチン欠損肥満モデルob/obマウス、IRS-2欠損マウスなど種々のインスリン抵抗性モデルにおいて観察されている。SREBP-1cの肝臓における過剰発現は肝臓のインスリン抵抗性を惹起する。

FOXOは、インスリン作用がないと核内に存在し、G6PaseやPEPCKの遺伝子プロモーターのIREを介して発現を活性化し血糖を上昇させる。インスリンが作用するとPI3K/Aktによるリン酸化を受け核外へ移動し、上記の誘導が起こらず血糖が下がると考えられている。このSREBP-1cとFOXO間の転写拮抗によるIRS-2の発現制御は、SREBP-1cによる肝臓インスリン抵抗性の機序のみならず、肝臓における栄養関連遺伝子の発現の生理的制御もよく説明する。すなわち、絶食時においては、FOXOが糖新生系を活性化し血糖維持をし、IRS-2が高いため摂食に伴いインスリン作用は効率良く行われる。過食が進むとSREBP-1cが徐々に活性化しIRS-2の発現を抑制し、グリコーゲン合成は低下しリポジェネシスが開始される。

SREBP-1cとメタボリックシンドローム

インスリン抵抗性状態にあつては、FOXO 蛋白はリン酸化を受けず核内に常在し血糖増加に傾け、SREBP-1cも持続的に活性化し、脂質合成を亢進し、脂肪肝に関与する。インスリン抵抗性においてはこのように核内にFOXOとSREBP-1cが共存するが、IRS-2に対する作用はSREBP-1cの抑制作用が優り、IRS-2の発現は低下のままインスリン抵抗性は持続する。肝臓インスリン抵抗性におけるSREBP-1cの活性化は、その本来の機能である脂肪酸合成、トリグリセリド合成の上昇の結果、脂肪肝を形成するとともに血中にトリグリセリドリッチなリポ蛋白の合成、分泌を高める。これらは、高レムナント血症、低HDL血症とも関連し、メタボリックシンドロームの病因を形成する。インスリン抵抗性は血糖上昇に傾

かせ、高血糖は肝臓の SREBP-1c の活性化を助長し、ここに SREBP-1c を介した肝臓インスリン抵抗性の悪循環が成立する。したがって、治療的視点からは、肝臓の SREBP-1c は抑制することが好ましいが、著者らは多価不飽和脂肪酸が SREBP-1c を抑制し、ob/ob マウスにおけるインスリン抵抗性の改善を観察している。インスリン抵抗性における SREBP-1c の活性化機序は血糖(活性化)、レプチン(抑制)、atypical PKC λ (活性化)、Akt (活性化)、SOCS3(活性化)の関与の可能性が示唆されているが、今後の検討を要する。

新規インスリン感受性亢進転写因子 TFE3

SREBP-1c とは逆に IRS-2 の発現を亢進させインスリン抵抗性を改善させる転写因子として我々は新たな bHLH タンパク TFE3 を発見し、解析した。

TFE3 は、IRS-2 プロモーターの SREBP 結合部位に含まれる E-box に結合し、近傍の IRE に結合する Foxo1 とタンパクタンパク結合により相乗的に活性化する。アデノウイルスを用いた TFE3 の過剰発現により 培養肝細胞ならびにマウスの肝臓において IRS-2 や Akt の発現を上昇させインスリンシグナルを活性化する。Akt や GSK-3 のリン酸化活性化に示されるように、インスリンシグナルの増強が認められ グリコーゲン合成も著明に増加した。さらにヘキソキナーゼ II や Insig1 の発現も活性化した。これらの変化は正常マウスのみならず、糖尿病モデルマウスの血糖を改善させた。

詳細な IRS-2 プロモーター解析の結果をふまえ、IRS-2 の発現が増加する絶食時は、TFE3, Foxo1 が相互作用しながら IRS-2 プロモーターに結合し、おそらくコアクターである PGC 1 α をリクルートすることにより、IRS-2 の転写を誘導する。摂食後は、Foxo1 は核外に移動するとともに SREBP-1c が誘導され、IRS-2 プロモーターの結合部位を占拠し、転写が抑制される。インスリン抵抗性でも同様に SREBP-1c が核内で高いため、IRS-2 のプロモーター活性が抑制される。すなわち、TFE3, Foxo1, SREBP-1c の栄養制御に応じた IRS-2 の発現調節を介して、肝臓のインスリン感受性が制御されることが示唆された。

TFE3 が生理的にどのように制御され栄養代謝に関わっているかは今後の検討課題であるが、TFE3 の活性化は、インスリンシグナルの増強による糖代謝の改善のみならず、脂質、タンパク代謝にも好影響を与え、生活習慣病やメタボリックシンドロームの病態に対して包括的な治療効果を発揮した。このように肝臓の転写因子が、インスリン感受性を制御しメタボリックシンドロームや糖尿病の病態に関与することが示され、治療標的としての可能性が示唆された。