

抗生活習慣病活性を持つ化合物の標的因子の同定

生活習慣病に対する創薬研究チーム（課題番号：117114）

研究期間：平成 23 年 7 月 22 日～平成 26 年 3 月 31 日

研究代表者：松末公彦 研究員：小迫知弘、藏元佑嘉子（平成 25 年 3 月 31 日まで）

【研究背景・目的】

ガン、糖尿病等の生活習慣病に対して治療効果を有する既知の医薬品の中には、どのような標的因子に作用してその薬効を発揮しているのか不明なものが多い。この状況は副作用などに対する迅速な対処の弊害となり、また当該医薬品の的確な投与・治療計画を妨げる可能性がある。本研究では、抗生活習慣病活性を有する医薬品として、チアゾリジン誘導体であるロジグリタゾンにフォーカスした（Fig. 1）。本医薬品はインスリン抵抗性改善効果を持ち、2型糖尿病の治療薬として知られている。ロジグリタゾンの作用メカニズムは不明な部分が多いものの、少なくとも直接的な標的として核内受容体 peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) との結合が報告されている。しかしながら PPAR γ は転写因子であるため、ロジグリタゾンによるインスリン抵抗

性改善効果に対する直接的なエフェクターとは考えがたい。そこで、本研究では PPAR γ により制御され、ロジグリタゾンの薬効に関与しうる新しい標的因子の同定を試みた（Fig. 1）。

【研究成果】

1. PPAR γ により発現制御される fat specific protein 27 の同定

2型糖尿病・肥満モデルマウスである *ob/ob* マウスは、およそ5週齢から肝臓に脂肪が蓄積し始め、10-12週齢でシビアな脂肪肝を発症し、その脂肪肝においては PPAR γ の発現が上昇する。我々は、*ob/ob* マウスにロジグリタゾンを投与することにより、脂肪肝の悪化すなわち肝脂肪レベルが劇的に増加する事を見出した。さらに、

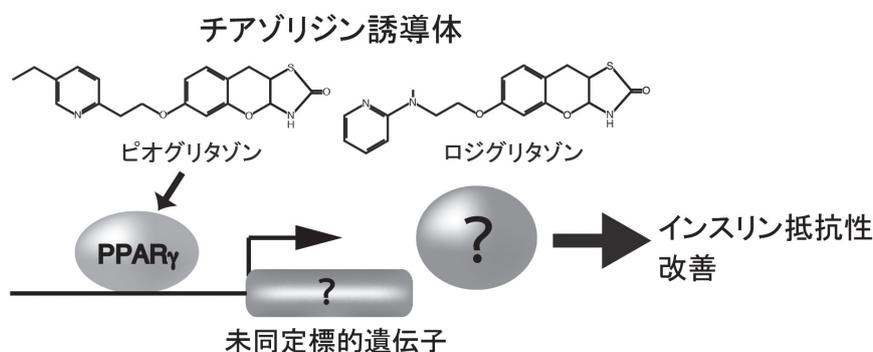


Figure 1 未同定な標的因子を介したロジグリタゾンの作用メカニズム

チアゾリジン誘導体は、核内受容体 PPAR γ に特異的及び強固に結合することが知られている。本研究では、PPAR γ を介したロジグリタゾンの新しい標的遺伝子を同定した。

このロジグリタゾンによる脂肪肝の悪化は、肝臓特異的に PPAR γ が欠損した *ob/ob* マウスの肝臓では認められなかった。これらの結果は、ロジグリタゾンによる脂肪の蓄積に肝 PPAR γ が関与していることを強く裏付けるものである。

我々は、PPAR γ の発現が上昇している *ob/ob* マウスの脂肪肝を利用してロジグリタゾンの新しい標的因子の同定を試みた。すなわち PPAR γ により発現制御され、ロジグリタゾンによる脂肪肝形成に直接関与するエフェクタータンパクを単離するため、*ob/ob* マウス及び PPAR γ が欠損した *ob/ob* マウスの肝臓によるサブストラクショナルスクリーニングを行った。この結果、*fat specific protein 27 (fsp27)* 遺伝子の単離に成功した。*Fsp27* 遺伝子の発現はロジグリタゾン処理により *ob/ob* マウスの脂肪肝に著しく誘導されるが、PPAR γ 欠損 *ob/ob* マウスの肝臓では認められない。この結果は、*fsp27* がロジグリタゾンの標的因子であることを強く示唆する (Fig. 2)。また *fsp27* は *ob/ob* マウスの脂肪肝においては高発現しているが、正常肝では発現していない脂肪肝特異的遺伝子であった。

2. *Fsp27* の発現は、肝細胞において脂肪の蓄積を促す。

Fsp27 は脂肪細胞に特異的に発現するタンパクとして早くに見出されていたものの、その生理機能については全くの未解明であった。そこで我々は、肝実質細胞における *fsp27* タンパクの生理機能を明らかにするために、マウス初代肝細胞に *fsp27* 発現アデノウイルスを感染させ、*fsp27* タンパクを強制発現させた。*Fsp27* 発現肝細胞はコントロール肝細胞に比べ、無数の球状空胞がサイトソルに認められた。脂質特異的な染色法により、これらの空胞は脂肪滴であることが証明された。また *fsp27* 発現肝細胞の脂肪レベルはコントロール肝細胞に比べ、有意に上昇した。これらの結果より、*fsp27* タンパクの発現は肝細胞に脂肪レベルの上昇を引き起こし、脂肪滴

の増加を促すことが明らかになった。

3. *Fsp27* の発現誘導は、脂肪肝の発症要因に依存する。

既述したように、*fsp27* 遺伝子は *ob/ob* マウスの脂肪肝から単離され、脂肪肝で高発現する脂肪肝特異的な発現性を示す。それゆえ、発症要因が異なる他の脂肪肝モデルにおける *fsp27* の発現を確かめた。用いた脂肪肝モデルは、アルコール、高脂肪食及びコリン-メチオニン欠損食誘導性脂肪肝である。ちなみにコリン-メチオニン欠損食で誘導される脂肪肝は、肝細胞への脂肪の蓄積のみならず、肝炎も併発する非アルコール性脂肪肝炎のモデルとして知られている。これらの脂肪肝における *fsp27* 遺伝子の発現を調べた結果、*fsp27* 遺伝子の発現はコントロール群に比べ高脂肪食及びコリン-メチオニン欠損食誘導性脂肪肝において有意な誘導が認められたが、アルコール誘導性脂肪肝では認められなかった。この結果より、*fsp27* の発現誘導は全ての脂肪肝に共通して認められるものではなく、脂肪肝の発症要因に依存していることが明らかになった。

4. 考察

我々は、抗生活習慣病活性を持つロジグリタゾンの標的因子の1つとして新たに *fsp27* の同定に成功した。ロジグリタゾンの生理活性の一部は、転写因子 PPAR γ を介して *fsp27* により発揮されているのかもしれない (Fig. 2)。但し、現状ではロジグリタゾンをはじめとするチアゾリジン誘導体のインスリン抵抗性改善効果が、どのように *fsp27* による肝脂肪蓄積と関連しているのかについては明らかではない (Fig. 2)。脂肪肝に誘導される *fsp27* は、ロジグリタゾンのインスリン抵抗性改善効果よりもむしろ副作用に関連している可能性は否定できない。チアゾリジン誘導体の薬効と *fsp27* の生理機能との関連性の解明は今後の課題である。

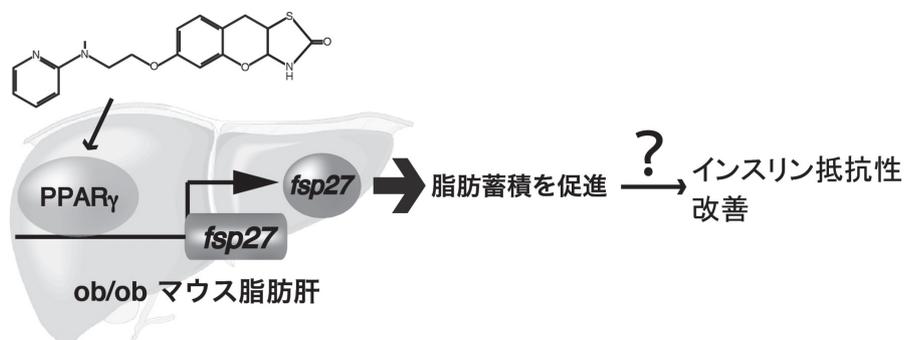


Figure 2 *Fsp27* はロジグリタゾンの新しい標的因子

チアゾリジン誘導体は、PPAR γ を介して *fsp27* の発現を誘導する。誘導された *fsp27* は、肝臓で脂肪の蓄積を促す。現状では、*fsp27* の脂肪蓄積とロジグリタゾンの薬効との関連性は不明。

【研究業績】

1. D. Aibara, K. Matsusue, K. Matsuo, S. Takiguchi, F.J. Gonzalez, S. Yamano, Expression of hepatic fat-specific protein 27 depends on the specific etiology of Fatty liver, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 36 (2013) 1766-1772.
2. Y. White, M. Yoshimitsu, T. Kozako, K. Matsushita, C. Koriyama, K. Uozumi, S. Suzuki, H. Kofune, N. Arima, Effects of exogenous interleukin-7 on CD8 (+) T-cell survival and function in human T-cell lymphotropic virus type 1 infection, *Leukemia & lymphoma*, 54 (2013) 2243-2250.
3. M. Akimoto, S. Yunoue, H. Otsubo, T. Yoshitama, K. Kodama, K. Matsushita, Y. Suruga, T. Kozako, S. Toji, S. Hashimoto, K. Uozumi, T. Matsuda, N. Arima, Assessment of peripheral blood CD4+ adenosine triphosphate activity in patients with rheumatoid arthritis, *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association*, 23 (2013) 19-27.
4. K. Uno, T. Yamada, Y. Ishigaki, J. Imai, Y. Hasegawa, J. Gao, K. Kaneko, K. Matsusue, T. Yamazaki, Y. Oka, H. Katagiri, Hepatic peroxisome proliferator-activated receptor- α -fat-specific protein 27 pathway contributes to obesity-related hypertension via afferent vagal signals, *European Heart Journal*, 33 (2012) 1279-1289.
5. S. Takiguchi, Y. Nishino, K. Inoue, M. Ikeda, Y. Kataoka, K. Matsusue, K. Nishiyama, H. Iguchi, The bisphosphonate incadronate inhibits intraperitoneal dissemination in an in vivo pancreatic cancer model, *Oncology reports*, 28 (2012) 111-116.
6. K. Matsusue, A Novel Mechanism for Hepatic Lipid Accumulation: A Physiological Role for Hepatic PPAR γ -fsp27 Signal, *Yakugaku zasshi*, 132 (2012) 823-829.
7. T. Kozako, N. Matsumoto, Y. Kuramoto, A. Sakata, Vaso-hibin induces prolyl hydroxylase-mediated degradation of hypoxia-inducible factor-1 α in human umbilical vein endothelial cells, *FEBS letters*, 586 (2012) 1067-1072.
8. T. Kozako, Arima, Yoshimitsu, Honda, Soeda, Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on ocular targets, *International Journal of Nanomedicine*, 8 (2012) 495-503.
9. T. Kozako, A. Aikawa, T. Shoji, T. Fujimoto, High expression of the longevity gene product SIRT1 and apoptosis induction by sirtinol in adult T cell leukemia cells, *Journal of Cancer*, 139 (2012) 2044-2055.
10. S. Honda, T. Kozako, H. Shimeno, S. Soeda, N. Harada, LIM-Homeodomain Transcription Factor, Lhx2, is involved in Transcriptional Control of Brain-Specific Promoter/Exon 1f of the Mouse Aromatase Gene, *Journal of Neuroendocrinology*, 24 (2012) 1367-1374.