

課題番号 : 28指1203

研究課題名 : 生活習慣病創薬のための分子標的の同定に資する新規代謝制御エピジェネティクスの解明

主任研究者名 : 松本 道宏

分担研究者名 : 該当なし

キーワード : 創薬標的、糖尿病、メタボリックシンドローム、エピジェネティクス、長鎖非コード RNA

研究成果 : 2型糖尿病や肥満症などの生活習慣病で認められる後天的な代謝障害の多くは、その制御遺伝子の転写調節障害に起因する。これまでの我々は、2型糖尿病の“転写病”としての側面に注目した研究を行い、糖尿病の高血糖が肝臓におけるエピジェネティクス制御系の異常によってもたらされること、本制御系においてヒストンアセチル化酵素 GCN5、転写調節分子 CITED2、A キナーゼなどから構成される新規代謝調節モジュールが中心的な役割を果たすことを見いだした (Nat. Med. 18:612-7, 2012, Nat. Commun. 7:13147, 2016)。

本研究では、肝臓においてこのモジュールにより制御される代謝調節性非コード RNA (ncRNA) を同定し機能を解明する。加えて、先行研究より同定した本モジュールにより発現制御を受ける酵素 X、タンパク Y の代謝調節における役割を解明する。これらの解析から GCN5-CITED2-PKA モジュールを介した代謝調節機構と病態への関与の全容を解明し、糖尿病創薬のための分子標的の同定をめざす。平成 28 年度の本研究について研究項目毎に以下に報告する。

①酵素 X の代謝調節における役割の解明

ゲノム編集技術を用いて全身性 X 欠損マウスを作製した。ホモ欠損マウスは本遺伝子の機能喪失変異をホモで有する患者と同様の代謝異常を呈し、目的の遺伝子改変がなされていることが確認された。ホモ欠損マウスは特定の栄養素を除去した飼料飼育下では交配出産が可能であり、対照となる野生型と共にホモ欠損マウスの系統を樹立した。また X ならびに X に対する short hairpin RNA (shRNA) を発現するアデノウイルスベクターの作製を行った。強発現ベクターは作製を完了し、shRNA については、15 種類の標的配列に対するベクターを作製し、85%以上のノックダウン効率を得られる配列を探索中である。X のホモ欠損マウスから調製した初代培養肝細胞における遺伝子発現解析を行い、対照肝細胞と比べて絶食応答性遺伝子の発現には差を認めなかったが、解糖系関連酵素の発現に大きな変化を認めた。本酵素が肝臓における糖取り込みを制御する可能性が示唆された。

②エピゲノム修飾酵素ドメイン含有タンパク Y の代謝調節における役割の解明

タンパク Y の全身性ならびに肝臓特異的な欠損マウスを作製した。全身性 Y 欠損マウスは部分的胎生致死であり、水頭症様の形態異常を呈した。肝臓特異的な欠損マウスは明らかな形態等の異常を示さなかった。Y 欠損初代培養肝細胞は、対照細胞と比べてグ絶食応答関連遺伝子の発現が低下しており、Y が絶食応答の制御分子であることが示唆された。shRNA による Y のノックダウンでも同様のより強い変化が起きたことから、本変化は Y の欠損に基づくものであり、急性の機能欠損系の方が表現型を得るのに適していると考えられた。

③肝臓における代謝調節性 ncRNA の同定と機能解析

肝細胞におけるホルモン応答性、GCN5-CITED2-PKA モジュールや PGC-1 α による制御、マウス肝臓における絶食-摂食、非肥満-肥満などの代謝環境の違いやホルモン応答性を指標に網羅的発現解析を行い、代謝調節性 ncRNA の複数の候補を得た。さらに核内への局在等を加味して、絶食時あるいは摂食時の代謝調節に関与することが想定される各 6 種の ncRNA を得た。in silico にてゲノム上のシンテニー等を指標にヒトオーソログの存在が示唆されるものを選択し解析に供することとした。CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術を用いてこれらの欠損マウスの作製に着手した。

Subject No. : 28S1203

Title : Elucidation of the interplay between metabolism and epigenetics to identify drug targets for treatment of lifestyle-related diseases

Researchers : Michihiro Matsumoto

Key word : drug target, diabetes mellitus, metabolic syndrome, epigenetics, lncRNA

Abstract : Impaired metabolic gene transcription frequently causes metabolic derangement in obesity-related diseases such as type 2 diabetes. We have previously shown that the GCN5-CITED2-PKA signaling module (GCP module) is assembled in the fasted/diabetic liver, integrates transcription coactivator activation and epigenetic changes on gluconeogenic gene promoters, and therefore activates the gluconeogenic program and prevents fasting hypoglycemia or induces hyperglycemia in diabetes (Nat Med. 18:612-7,2012; Nat Commun.7:13147,2016). We recently identified two enzymes (X and Y) whose expressions are transcriptionally induced through the GCP module. In this study, we seek to elucidate the physiological and pathophysiological roles of the enzymes in the regulation of energy metabolism *in vitro* and *in vivo*. Additionally, we explore non-coding RNAs (ncRNAs) that transcriptionally regulate hepatic metabolism through GCP module-mediated gene transcription. We reveal the epigenetic regulation of energy metabolism mediated by the GCP module, and finally identify novel drug targets for treating lifestyle-related diseases. The progress of this research in 2016 is as follows:

1. Elucidation of the role of enzyme X in the regulation of hepatic metabolism

We generated mice lacking X systemically by CRISPR/Cas9-mediated gene editing. The mice that are homozygous for the knockout allele are phenocopies of patients carrying the homozygous loss-of-function mutated allele of this gene, suggesting successful gene editing. Gene expression analysis of hepatocytes revealed that deletion of X affects the expression of glycolytic genes, but not gluconeogenic genes, suggesting that X regulates hepatic glucose flux.

2. Elucidation of the role of epigenome-modifying enzyme Y in the regulation of liver metabolism

We generated mice lacking Y either systemically or specifically in the liver. The former exhibited partial embryonic lethality with hydrocephalus, but the latter were normal in gross appearance. We are conducting phenotypic analyses of these mice. In Y knockout hepatocytes compared to that in control hepatocytes, induction of fasting response genes by glucagon-cAMP signaling was impaired, indicating that Y regulates the fasting response. Similar, rather pronounced, changes were observed in shRNA-mediated Y knockdown hepatocytes, indicating that Y directly regulates such gene transcription, and its acute Y depletion is optimal to disrupt its function.

3. Identification and characterization of ncRNAs that regulate hepatic metabolism

We explored ncRNAs whose expressions are regulated by hormones, nutrients, feeding status, body mass, and the GCP module, and obtained 12 candidates in mouse liver and isolated hepatocytes. From among these candidates, we selected several ncRNAs that might have human orthologs, and generated mice lacking each of them systemically or liver-specifically.

Researchers には、分担研究者を記載する。

生活習慣病創薬のための分子標的同定に資する 新規代謝制御エピジェネティクスの解明

2型糖尿病や肥満症などの生活習慣病で認められる後天的な代謝障害の多くは、その制御遺伝子の転写調節障害に起因する。これまでの我々は、2型糖尿病の“転写病”としての側面に注目した研究を行い、糖尿病の高血糖が肝臓におけるエピジェネティクス制御系の異常によってもたらされること、本制御系においてヒストンアセチル化酵素GCN5、転写調節分子CITED2、Aキナーゼなどから構成される新規代謝調節モジュールが中心的な役割を果たすことを見いだした(Nat Med. 2012, Nat Commun. 2016)。本研究では、肝臓においてこのモジュールにより制御される代謝調節性非コードRNA(ncRNA)を同定し機能を解明する。加えて、先行研究より同定した本モジュールにより発現制御を受ける酵素X、タンパクYの代謝調節における役割を解明する。これらの解析からGCN5-CITED2-PKAモジュール (GCAモジュール)を介した代謝調節機構と病態への関与の全容を解明し、糖尿病創薬のための分子標的の同定をめざす。平成28年度の本研究について研究項目毎に以下に報告する。

GCPモジュールにより制御される酵素の 肝代謝調節における役割の解明

マウス初代培養肝細胞においてcAMP処理により発現が誘導され、CITED2やGCN5によって発現がさらに増強する遺伝子はGCPモジュールの標的となる絶食制御分子の候補と考えられる。こうした候補遺伝子を網羅的発現解析により探索し、酵素Xを得た。本酵素はヘキソース代謝系の酵素のひとつであり、ヒトにおける本酵素活性の障害により稀な先天性代謝疾患を引き起こすことが知られている。しかし絶食応答における役割は不明であり、解析を進めている。CRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集によりノックアウトマウスを作製し、表現型解析に着手している。また強発現/ノックダウンのための各種ベクターを作製し細胞レベルの解析を行っている。

エピゲノム修飾酵素ドメイン含有タンパクYの代謝調節における役割の解明

本タンパクも酵素Xと同様のプロセスにより得ており、エピゲノム修飾酵素として遺伝子転写を介して絶食応答を制御することを想定し、解析を進めている。全身性ならびに肝臓特異的な欠損マウスを作製した。前者は部分的胎生致死であり、水頭症様の形態異常を呈した。後者は明らかな形態等の異常を示さなかった。Y欠損初代培養肝細胞は、対照細胞と比べてグ絶食応答関連遺伝子の発現が低下しており、Yが絶食応答の制御分子であることが示唆された。

肝臓における代謝調節性ncRNAの同定と機能解析

肝細胞におけるホルモン応答性、GCAモジュールやPGC-1 α による制御、マウス肝臓における絶食-摂食、非肥満-肥満などの代謝環境の違いやホルモン応答性を指標に網羅的発現解析を行い、代謝調節性ncRNAの複数の候補を得た。さらに核内への局在等を加味して、絶食時あるいは摂食時の代謝調節に関与することが想定される各6種のncRNAを得た。in silicoにてヒトオーソログの存在が示唆されるものを選択し解析に供することとした。CRISPR/Cas9システムによるゲノム編集技術を用いてこれらの欠損マウスの作製に着手した。

<業績>

招聘講演

第31回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会(研究賞受賞講演)、第37回日本肥満学会 日本肝臓学会・日本肥満学会合同シンポジウム、第89回日本生化学会大会シンポジウム、第59回日本糖尿病学会年次学術集会シンポジウム

学会発表等

第53回 臨床分子医学会学術集会 2題、第89回日本内分泌学会学術総会 1題、第59回日本糖尿病学会年次学術集会総会 3題、第89回日本生化学会大会 1題、第37回日本肥満学会 1題、第39回分子生物学会 1題、第28回分子糖尿病学シンポジウム 1題、第31回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会 1題

受賞

日本糖尿病・肥満動物学会研究賞(松本道宏)

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：28指1203

研究課題名：生活習慣病創薬のための分子標的同一性に資する新規代謝制御エピジェネティクスの解明

主任研究者名：松本 道宏

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Proteomic analysis of serum biomarkers for prediabetes using the Long-Evans Agouti rat, a spontaneous animal model of type 2 diabetes mellitus.	Takahashi E, et al	J Diabetes Investig.	Epub ahead of print	2017
Dietary Mung Bean Protein Reduces Hepatic Steatosis, Fibrosis, and Inflammation in Male Mice with Diet-Induced, Nonalcoholic Fatty Liver Disease.	Watanabe H, et al	J Nutr.	147(1):52-60	2017
The GCN5-CITED2-PKA module controls glucose metabolism through a cAMP-induced substrate switch.	Sakai M, et al	Nat Commun.	7:13147	2016
HIF-1 α in Myeloid Cells Promotes Adipose Tissue Remodeling Toward Insulin Resistance.	Takikawa A, et al	Diabetes.	65(12):3649-3659	2016
p38 α activates purine metabolism to initiate hematopoietic stem/progenitor cell cycling.	Karigane D, et al	Cell Stem Cell.	9(2):192-204	2016
絶食時のエネルギー代謝とヒストンアセチル化制御.	松本道宏 酒井真志人	実験医学増刊「遺伝子制御の新たな主役 栄養シグナル」	34(15) : 102-109	2016

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
遺伝子改変マウスを用いた肝臓における代謝調節とその障害の分子機構の解明（研究賞受賞講演）	松本道宏	第31回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会	横浜	2017. 2. 10
Dyrk1Bによる肝糖新生制御機構の解明	満島 勝 他	第31回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会	横浜	2017. 2. 10
メタボリックシンドローム関連キナーゼDYRK1Bによる肝糖新生制御機構の解析	満島 勝 他	第28回分子糖尿病学シンポジウム	富山	2016. 12. 3
細胞周期関連キナーゼDyrk1は肝糖新生を制御する	満島 勝 他	第39回分子生物学会	横浜	2016. 12. 1
肥満・2型糖尿病合併NAFLDと脂肪酸合成酵素	松本道宏 八木 孝	第37回日本肥満学会 日本肝臓学会・日本肥満学会合同シンポジウム	東京	2016. 10. 8
CITED2 結合性キナーゼDyrk1による肝糖新生制御機構の解析	松本道宏 他	第37回日本肥満学会	東京	2016. 10. 8

研究発表及び特許取得報告について

肝臓における新規血糖調節モジュールと糖尿病治療標的	松本道宏 酒井真志人 満島 勝	第89回日本生化学会大会シンポジウム	仙台	2016. 9. 26
細胞周期関連キナーゼDyrk1による肝糖新生制御機構の解析	満島 勝 他	第89回日本生化学会大会	仙台	2016. 9. 26
A Fasting - Inducible Gluconeogenic Module in Liver as a Novel Therapeutic Target for Type 2 Diabetes Mellitus,	松本道宏	第59回日本糖尿病学会年次学術集会シンポジウム	京都	2016. 5. 21
代謝シグナル応答性メチル化酵素の同定と機能解析	松本道宏 他	第59回日本糖尿病学会年次学術集会	京都	2016. 5. 21
メタボリックシンドローム関連キナーゼDyrk1は肝糖新生を制御する	満島 勝 他	第59回日本糖尿病学会年次学術集会	京都	2016. 5. 21
絶食応答性プロイン水酸化酵素の同定と機能解析	矢野宏行 他	第59回日本糖尿病学会年次学術集会	京都	2016. 5. 21
代謝シグナル応答性メチル化酵素の同定と機能解析	松本道宏 他	第89回日本内分泌学会学術総会	京都	2016. 4. 22
新規CITED2結合キナーゼDYRK1による肝糖新生制御機構の解析（若手研究奨励賞（YIA）審査口演）	満島 勝 他	第53回日本臨床分子医学会学術集会	東京	2016. 4. 15
代謝シグナル応答性メチル化酵素の同定と機能解析	酒井真志人 他	第53回日本臨床分子医学会学術集会	東京	2016. 4. 15

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。
 ※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと