

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790856

研究課題名（和文） 新規ミトコンドリア機能調節因子Aの発現低下と糖尿病発症の関係

研究課題名（英文） The relationship between lowered expression level of novel mitochondrial regulator-A and onset of diabetes mellitus

研究代表者

森野 勝太郎 (MORINO KATSUTARO)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：90444447

研究成果の概要（和文）：

インスリン抵抗性被検者ではミトコンドリア密度の低下があるにもかかわらず PGC-1 とその下流分子の mRNA 発現には低下を認めなかったことから、PGC-1 以外の因子によってミトコンドリア密度が調節されている可能性が示唆されたため DNA micro array により新規ミトコンドリア機能調節因子 A (lipoprotein lipase) を同定した。この調節因子の発現が、インスリン抵抗性被検者の骨格筋で低下していたため、プロモーター領域の SNP 検索を行った。この結果、2つの SNP が糖尿病患者で有意に多いとの結果を得た。このため、SNP 周辺の遺伝子配列をクローニングし、ルシフェラーゼアッセイを行った結果、SNP によりプロモーター活性に差があることが明らかとなった。しかしながら、被患者の数を増やした上で GWAS により再検討した結果、同部位の SNP は糖尿病発症と直接関係ないとの結果を得た。次に、新規ミトコンドリア機能調節因子 A が PPAR $\delta$  を介してミトコンドリア密度を調節することを見出した。PPAR $\delta$  の活性化剤はインスリン抵抗性の改善や、持久的運動能力を高める事が知られる。我々の実験結果でも、多価不飽和脂肪酸や PPAR $\delta$  の活性化剤が脂肪酸酸化に関連した CPT1b や PDK4 の転写を活性化する事、PPAR $\delta$  ノックダウンはミトコンドリア密度を低下させることが観察された。

研究成果の概要（英文）：

Recent studies reveal a strong relationship between reduced mitochondrial content and insulin resistance in human skeletal muscle, although the underlying factors responsible for this association remain unknown. To address this question, we analyzed muscle biopsy samples from young, lean, insulin resistant (IR) offspring of parents with type 2 diabetes and control subjects by microarray analyses and found significant differences in expression of ~512 probe pairs. We then screened these genes for their potential involvement in the regulation of mitochondrial biogenesis using RNA interference and found that mRNA and protein expression of lipoprotein lipase (LPL) in skeletal muscle was significantly decreased in the IR offspring and was associated with decreased mitochondrial density. Then we screened single polynucleotide polymorphism in LPL promoter lesion and found that two SNP are a potentially associated with diabetes onset. However, we have repeated analysis of these SNP in GWAS, we found no significant relationship. Then, we observed that LPL knockdown decreased mitochondrial content by effectively decreasing fatty acid delivery and subsequent activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\delta$ . Taken together, these data suggest that decreased mitochondrial content in muscle of IR offspring may be due in part to reductions in LPL expression in skeletal muscle resulting in decreased PPAR- $\delta$  activation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：エネルギー、糖質代謝異常、ミトコンドリア機能

1. 研究開始当初の背景

糖尿病発症において、極めて重要な役割を果たすと考えられるインスリン抵抗性は「インスリン標的臓器において生理的インスリン濃度による反応性の低下した状態」で定義される。骨格筋におけるインスリン抵抗性の発症機構として、骨格筋細胞内に蓄積した脂肪代謝物によるセリン・スレオニンリン酸化の亢進を介したインスリン受容体情報伝達経路の抑制が提唱されている。細胞内脂肪代謝物の蓄積は高脂肪食や運動不足といった環境因子に起因することは以前より知られていたが、近年ミトコンドリアによる酸化リン酸化の低下によって細胞内に脂肪が蓄積している可能性が示唆され、その分子機構解明が hot topic となっている (Petersen et al. Science 2003)。

2型糖尿病の家族歴を有する症例では核磁気共鳴スペクトロスコピー (MRS) を用いて測定した ATP 合成速度は約 30%低下していた(下図左: Petersen et al NEJM 2004)。そこで我々はミトコンドリア密度の低下がどのような機構により生じているかを明らかにするために、大腿四頭筋から筋生検を行い詳細な検討を行った。2型糖尿病の家族歴を有する若年非肥満インスリン抵抗性患者は約 37%ミトコンドリア密度が低いこと(下図右)、約 50%ミトコンドリア蛋白の発現が低下している事を発見した (Morino et al JCI 2005)。

PPAR $\gamma$  coactivator-1(PGC-1)は寒冷により褐色脂肪細胞でミトコンドリアを増やす因子として発見され、他の転写因子と共同して Nuclear respiratory factor (NRF-1)、mitochondrial transcription factor A (mtTFA)等の転写を促進するミトコンドリアバイオジェネシスの key player と考えられている。近年、PGC-1 とその下流分子の遺伝子発現の異常が糖尿病患者や糖尿病を家族

歴に持つ被検者で低下している事が報告されており、MRS で得たミトコンドリア機能異常とインスリン抵抗性の関連を支持する結果といえる(Patti, PNAS 2003, Mootha, Nature Genetics 2003)。

インスリン抵抗性被検者の骨格筋を Gene chip で解析した所、他の報告に反して PGC-1 遺伝子群に差を認めなかった。しかし、別の 512 遺伝子に有意な差を認めた。これらの遺伝子発現の変化はインスリン抵抗性による 2 次的変化や機能未知な遺伝子を数多く含んでおり、従来のバイオインフォマティクスを用いた方法ではインスリン抵抗性・ミトコンドリア機能低下の原因遺伝子同定は困難であると思われた。

そこで我々は昨年度までに科研費や他の助成金の補助を得て、培養筋細胞を用いた 250 遺伝子に対する siRNA を使ったミトコンドリア密度・蛋白発現の網羅的スクリーニングにより新規調節遺伝子 A を同定した。この遺伝子はインスリン抵抗性被検者において発現が低下していることが RTqPCR 及び western blot 法により確認された。

2. 研究の目的

インスリン抵抗性の分子メカニズムとしてミトコンドリア機能異常の存在が示唆されている。我々は糖尿病家族歴を有するインスリン抵抗性被検者でミトコンドリア密度が低下する事を見出した。その原因を検索するために行ったマイクロアレイ及び網羅的スクリーニングにより新規調節因子 A (lipoprotein lipase: LPL)の発現低下が関与している事を見出した。本研究では、新規調節因子 A の単塩基多型やプロモーター領域の検討により、新規調節因子 A の遺伝的な役割を検証する。また、新規調節因子 A の発現調節を後天的に行っている事が示唆される脂肪酸流入に注目し、ミトコンドリアの調節

機構をこれまでとは違った角度で検討することが目的である。

### 3. 研究の方法

①新規調節因子 A の一塩基多型 (SNP) と糖尿病の関係を検討する。

新規調節因子 A 遺伝子は最近のゲノムワイド関連解析 (GWAS) によって糖尿病発症に関連することが報告された遺伝子には含まれないものの、糖尿病・高血圧家系の連鎖解析により LOD スコア 3 前後として複数の報告が存在している。そこで、理化学研究所 前田士郎博士らの協力の下、新規調節因子 A 近傍の SNP を検索し、2つの糖尿病疾患感受性アリルを見出した。

方法) 2つの SNP はいずれも新規調節因子 A の intron-1 に存在し、コンピュータによる予測によりプロモーターあるいはエンハンサー活性を有する部位に存在する事が示唆されている。そこで SNP 周辺の DNA 断片及びプロモーター領域をクローニングし、プロモーター活性を検討する。SNP によるプロモーター活性の差を変異株を用いて検討する。SNP 部位に結合する転写因子についてはクロマチン免疫沈降法 (Chip assay) にて検討を行う。

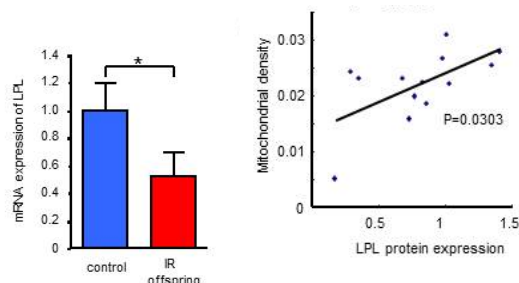
②新規調節因子 A に対する脂肪酸の効果の検討

これまでの骨格筋培養細胞を用いた基礎検討より、新規調節因子 A はメEDIUM中への脂肪酸添加により発現が促進する事が示唆されている。細胞内に入った脂肪酸が転写調節のシグナル分子として機能していることより、peroxisome proliferator receptor (PPAR) family を介した経路と、介さない経路の重要性を想定している。骨格筋に発現の多い PPAR $\delta$  と PPAR $\alpha$  に対する RNAi による遺伝子ノックダウン、PPAR 活性化剤による新規調節因子 A の糖代謝・脂質代謝における役割を主に培養細胞とノックアウトマウスを用いて検討する。

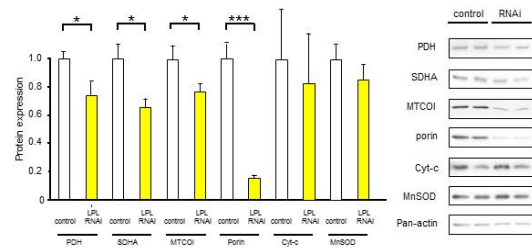
### 4. 研究成果

(1) 新規ミトコンドリア機能調節因子 A は糖尿病家族歴を有するインスリン抵抗性被検者の骨格筋で発現が低下している。

①インスリン抵抗性被検者とコントロール被検者の骨格筋生検標本を用いたスクリーニングにより新規ミトコンドリア機能調節因子 A (lipoprotein lipase: LPL) を同定した。インスリン抵抗性被検者の骨格筋では LPL の発現が有意に低下していた。また LPL の発現量は電子顕微鏡で観察したミトコンドリア密度と正に相関していた。



②骨格筋培養細胞で LPL を RNAi するとミトコンドリア蛋白質の発現に低下が観察された。



(2) 糖尿病家族歴を有するインスリン抵抗性被検者の LPL 発現低下が LPL の一塩基多型 (SNP) と関係があるかどうかを検討する。

①SNP の同定

新規調節因子 A 遺伝子は最近のゲノムワイド関連解析 (GWAS) によって糖尿病発症に関連することが報告された遺伝子には含まれないものの、糖尿病・高血圧家系の連鎖解析により LOD スコア 3 前後として複数の報告が存在している。そこで、理化学研究所 前田士郎博士らの協力の下、新規調節因子 A 近傍の SNP を検索し、2つの糖尿病疾患感受性アリルを見出した。

2型糖尿病被検者 1601 名とコントロール被検者 949 名を用いたスクリーニングにより LPL 遺伝子のイントロン 1 領域に含まれる rs3779787, rs3779788 がそれぞれ有意に糖尿病で多い事が分かった。

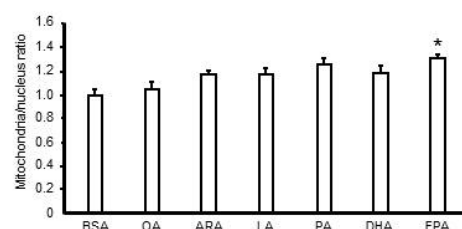
②SNP のプロモーター活性への影響

特に rs3779787 はエンハンサー領域に存在しており、LPL 発現調節に関与する可能性が考えられたため SNP を含有する約 1500bp の領域を用いてルシフェラーゼ発現ベクターを作成し検討した結果、SNP によりプロモーター活性が異なることを見出した。

しかしながら、GWAS の情報が続出する中、我々の SNP についてもより多い被検者により再検討をした結果、2型糖尿病で必ずしも多くないとの結果を得た。このため、この部分の研究は中止する事とした。

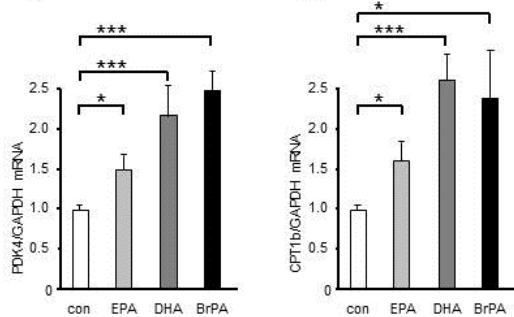
(3) 新規調節因子 A (LPL) と脂肪酸の関係を検討する。

飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸など、各種の脂肪酸がそれぞれミトコンドリアバイオジェネシスにはたす役割を検討するために L6 骨格筋細胞のメEDIUM中に投与して、その反応性を比較した。



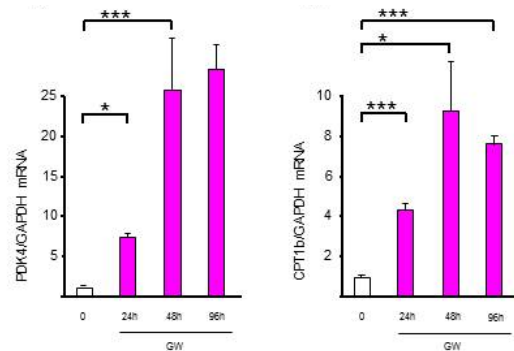
その結果多価不飽和脂肪酸であるEPAが蛍光色素で定量したミトコンドリア密度を上昇させることが確認された。

EPA等のN3系多価不飽和脂肪酸はPPARの内因性のリガンドであることが知られる。そこで脂肪酸酸化に関連した遺伝子について検討した。



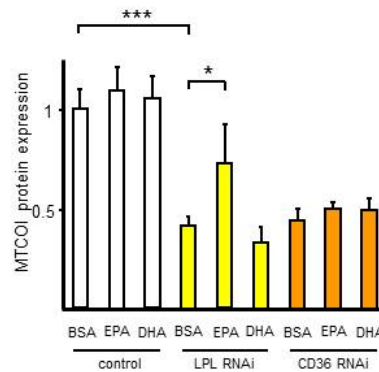
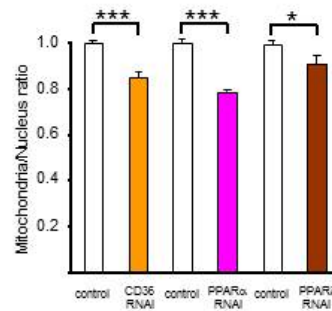
EPAやDHAはPDK4, CPT1bの発現を誘導する事、細胞内で酸化されない飽和脂肪酸誘導体であるBr-PA (ブロモパルミチン酸)も同様にPDK4, CPT1bの発現を誘導する事が確認された。

これらの事実から脂肪酸がPPARの活性化を介して脂肪酸燃焼を調節している可能性が考えられたため、PPARの特異的活性化剤であるGWを用いて同様の検討を行った。



GW投与はEPA, DHA同様にPDK4, CPT1bの発現を誘導する事が確認された。

次にPPARをL6骨格筋細胞でRNAiによりノックダウンする事によりミトコンドリア密度が低下する事を確認した。同様に、細胞内に脂肪酸を取り込むトランスポーターであるCD36のノックダウンでもミトコンドリア密度は低下した。



また、LPLのノックダウンやCD36のノックダウンはミトコンドリア蛋白質であるMTCOIのタンパク発現を減少する事、EPAのMediumへの投与がpartialにMTCOIの発現を改善させる事を見出した。

今後の課題として筋特異的PPARノックアウトマウスを用いたin vivoでの検討を行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

### ① Morino K. et al

Regulation of mitochondrial biogenesis by lipoprotein lipase in muscle of insulin-resistant offspring of parents with type 2 diabetes. *Diabetes*, 61, 877-888, 2012, 査読あり

### ② Petersen KF., Dufour S., Morino K. et al.

Reversal of muscle insulin resistance by weight reduction in young, lean, insulin-resistant offspring of parents with type 2 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 109, 8236-8240, 2012, 査読あり

### ③ Yoshizaki T., Kusunoki C., Kondo M., Yasuda M., Kume S., Morino K. et al.

Autophagy regulates inflammation in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.*, 417, 352-357, 2012, 査読あり

④ Kondo M, Ugi S, Morino K, et al.  
Postprandial activation of protein kinase  
C $\mu$  regulates the expression of  
adipocytokines via the transcription factor  
AP-2 $\beta$ . Int J Mol Med., 28, 95-100, 2011,  
査読あり

⑤ Miyazawa I, Araki S, Obata T,  
Yoshizaki T, Morino K et al.  
Association between serum soluble TNF $\alpha$   
receptors and renal dysfunction in type 2  
diabetic patients without proteinuria.  
Diabetes Res Clin Pract., 92, 174-180,  
2011, 査読あり

⑥ Ishikado A, Nishio Y, Morino K et al.  
Low concentration of 4-hydroxy hexenal  
increases heme oxygenase-1 expression  
through activation of Nrf2 and  
antioxidative activity in vascular  
endothelial cells. Biochem Biophys Res  
Commun., 402, 99-104, 2010, 査読あり

⑦ Kondo K, Morino K et al.  
Effects of a fish-based diet on the serum  
adiponectin concentration in young,  
non-obese, healthy Japanese subjects. J  
Atheroscler Thromb., 18, 628-637, 2010,  
査読あり

⑧ Meng X, Kondo M, Morino K et al.  
Transcription factor AP-2 $\beta$ : a negative  
regulator of IRS-1 gene expression.  
Biochem Biophys Res Commun., 392,  
526-532, 2010, 査読あり

⑤ Ugi S, Nishio Y, Yamamoto H, Ikeda  
K, Kobayashi M, Tsukada S, Kondo M,  
Morino K et al.  
Relation of the expression of  
transcriptional factor TFAP2B to that of  
adipokines in subcutaneous and omental  
adipose tissues. Obesity (Silver Spring),  
18, 1277-1282, 2010, 査読あり

[学会発表] (計 33 件)

① 森野勝太郎

魚油、N3 多価不飽和脂肪酸は血管内皮細胞に  
おいて PPAR $\alpha$  依存性に eNOS タンパクを  
増加させる、第 25 回 日本糖尿病合併症  
学会、2010. 10. 22、滋賀

② 森野勝太郎

高純度 EPA 製剤、ピタバスタチン、エゼチミ  
ブの血管内皮機能に対する影響、第 53 回  
日本糖尿病学会年次学術集会、2010. 5. 27、  
岡山

[その他]

ホームページ等

<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqmed3/snai/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森野 勝太郎 (MORINO KATSUTARO)

滋賀医科大学・医学部・医員

研究者番号：90444447

(2) 連携研究者

前田 士郎 (MAEDA SHIRO)

独立行政法人理化学研究所・内分泌・代  
謝疾患研究チーム

研究者番号：50314159