

受賞者

渡辺 光博

慶應義塾大学 医学部 分子代謝システム医学講座

研究テーマ

メタボローム・プロテオーム・トランスクリプトームによる 生体内胆汁酸機能網羅的解析から創薬研究・治療法への展開

1. はじめに

日本人の三大死因は、悪性新生物・心疾患・脳血管疾患であり、これら疾患の上流に位置すると考えられる内臓肥満を改善する治療法を開発することは、国民の健康な生活と、医療費の節減や有効利用において重要である。申請者らは食事とリンクし大量に体内を循環する胆汁酸に着目し、数年前まで単なる脂質の消化吸収に関する分子として考えられてきた胆汁酸が、代謝における生体内シグナル伝達分子として代謝・エネルギー代謝調節に重要であり、胆汁酸代謝に関与する化合物、遺伝子改変マウスが代謝に大きく影響を与えることを明らかにしてきた (J. Clin. Invest. 2004., Nature. 2006., EMBO J. 2006)。 (図1)

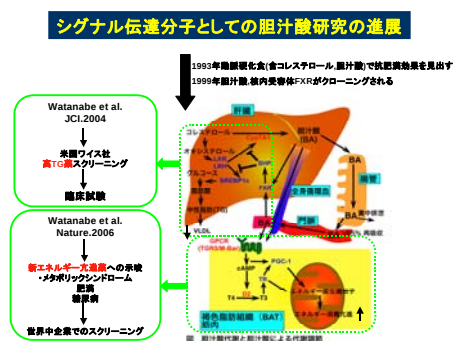


図1. シグナル伝達分子としての胆汁酸

本研究では、オミックス解析を用いて生体内シグナル伝達分子としての胆汁酸の役割を網羅的に探索し、新規代謝経路・新規代謝調節メカニズムを解明する。これらを基礎情報とし、メタボリックシンドローム・動脈硬化・癌などの合理的な新規治療法の開発・創薬基礎研究・予防診断への利用・個別化医療への発展を目指し、科学の発展・人類の健康に貢献していくことを目的とする。

2. 方法、結果

2. 1 胆汁酸、FXR アゴニストの脂肪細胞における代謝への検討

胆汁酸・FXR アゴニストは、生体内において共に FXR のリガンドとなり、様々な遺伝子発現をコントロールする。近年、FXR は糖・脂質代謝改善薬の標的因子として注目され、研究開発が進められている。FXR アゴニストは、脂肪細胞においてインシュリンシグナル

を増加させ脂肪細胞の分化を誘導するとの報告があり、我々は NIH3T3-L1 細胞を用い、胆汁酸、FXR アゴニストの脂肪細胞分化に対する影響を検討した。

前駆脂肪細胞をコンフルエントからさらに 3 日培養し、IBMX、デキサメサゾン、インシュリンを含む分化誘導培地で 2 日培養し、10 μ M FXR アゴニスト、10mM ケノデオキシコール酸 (CDCA) をそれぞれ添加したインシュリンを含む分化培地にて 1 週間培養し、サンプルとして用いた。細胞への脂肪蓄積はそれぞれにおいて変化しなかった。mRNA を抽出し脂肪細胞への分化の際、発現誘導される遺伝子マーカー (PPAR γ 、FAS、GLUT4、ACC1、ACC2) を定量 PCR にて測定した。その結果、いずれの遺伝子も胆汁酸や FXR アゴニストにより変化せず、既報とは異なる結果であった (図2)。

また、我々のマウスを用いた基礎検討結果では、胆汁酸は脂肪蓄積を抑制し、エネルギー代謝を亢進させ、肥満・糖尿病を改善したが、FXR アゴニストにはその効果が認められなかった。FXR アゴニストと胆

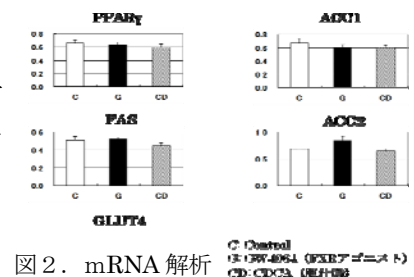


図2. mRNA 解析
C: Control
G: FXR アゴニスト
CD: CDCA (胆汁酸)

胆汁酸の差を解明するために、我々は、通常食、高脂肪食、高脂肪食+胆汁酸、高脂肪食+FXR アゴニストを2週間投与し解剖し、血液・各組織を採取し、遺伝子発現解析、代謝産物の解析を行った。代謝産物はCE-TOF/MSを用いてメタボローム解析を行い、遺伝子発現解析はDNA マイクロアレイを用いてトランスクリプトーム解析を行い、定量PCRを用いてその確認を行った。

2. 2 DNA マイクロアレイを用いた解析

胆汁酸によるmRNA発現への影響を網羅的に解析する目的で、上記サンプルを用い、DNA マイクロアレイを行った。マウスにおいてエネルギー代謝に重要な臓器である褐色脂肪組織(BAT)をサンプルにした。対象とした24841遺伝子について、遺伝子発現レベルの比較は「高脂肪食・胆

汁酸投与群」、「高脂肪食・合成FXR アゴニスト投与群」の間で実施し、信号強度の2倍以上の変化を以て発現の増減あり、5%以内の変動を以て有意な変化なしと判断した。

2. 2. 1 「高脂肪食・胆汁酸投与群」と「高脂肪食・合成FXR アゴニスト投与群」の比較

通常食群では胆汁酸投与で変化なく、高脂肪食群で胆汁酸および合成FXR アゴニスト (GW4064) の投与により発現が増加したものとして13遺伝子が(図3-a)、発現が減少したものとして24遺伝子が(図3-b)、高脂肪食群で胆汁酸投与により発現増加・GW4064投与により発現減少したものとして40遺伝子(うち2遺伝子は通常食群で胆汁酸投与により変化しないもの)が(図3-c)、高脂肪食群で胆汁酸投与により発現減少・GW4064投与により発現増加したものとして45遺伝子(うち4遺伝子は通常食群で胆汁酸投与により変化しないもの)が(図3-d)、それぞれ抽出された。

抽出された遺伝子群はいずれも興味深く、例えば高脂肪食群で胆汁酸および合成FXR アゴニスト (GW4064) の投与により発現が増加したものとして見出された Secreted frizzled-related protein 2 (SFRP 2) は、細胞死の制御などに関連するシグナル伝達系である Wnt シグナルを伝える受容体 Frizzled pritein (Fz) の分泌型であるが、同じ family に属する SFRP 1 と拮抗し Wnt シグナルの伝達を調節していることが知られている (*J Cell Sci* 121: 737 2008)。高脂肪食群で胆汁酸および合成FXR アゴニスト (GW4064) の投与により発現が減少したものとして見出された24遺伝子には、やはり細胞骨格の形成や細胞内輸送に関与する遺伝子である Tubulin tyrosine ligase-like (TTLL) 9やKinesin family member 26Aが含まれる。Tubulinは細胞骨格を形成するうえで重要な分子であり、TTLL 9が属するTTLL familyはtubulinの機能制御、特に翻訳後の修飾に深く関与し(*J Bio Chem* 281:30707 2006)、またkinesin familyがdyneinとともに細胞の形態維持や細胞内輸送の中心的役割を担っていることはよく知られており、興味深い。高脂肪食群で胆汁酸投与により発現増加・GW4064投与により発現減少したものとして抽出された遺伝子として、著名なものでは Inhibitor of κ B kinase gamma (IKK γ)がある。炎症などに深く関与する遺伝子として知られているNF- κ Bの活性はI κ Bにより制御されているが、本遺伝子の産物はそのI κ Bの活性をリン酸化により調節する(*Cell* 132: 344 2008)。脂肪組織における炎症性サイトカインのプロファイルがメタボリック症候群の病態形成に大きな影響を与えることと関連して、このような遺伝子が見出されたことは特筆に価する。高脂肪食群で胆汁酸投与により発現減少・GW4064投与により発現増

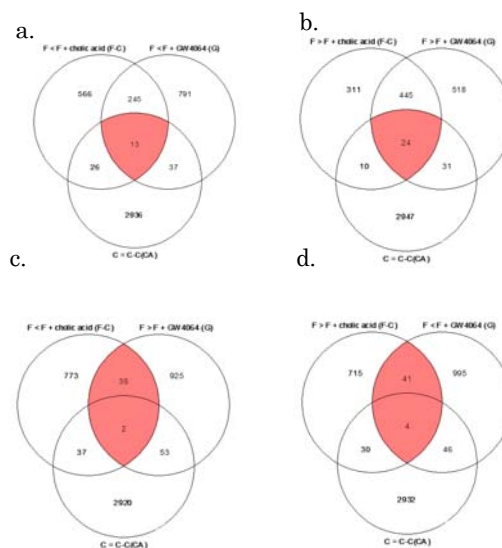


図3. DNA マイクロアレイ解析結果

加した遺伝子も多岐にわたるが、例えば局所の炎症や細胞死への関与が指摘されている nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat (NLR) family (*Nat Rev Immunol* 8:372 2008) などが認められた。

2. CE-TOF/MS による解析

上記と同様に、通常食または高脂肪食を負荷したマウスに胆汁酸を混餌投与したマウス（それぞれ CA, FA）の BAT をサンプルとし、代謝産物の動態を網羅的に検討する目的で、CE-TOF/MS によるメタボローム解析を行った。図4に示すようなクロマトチャートが得られ、各代謝産物の m/z、migration time より代謝産物を同定し、IS 比により定量を行った(図5)。

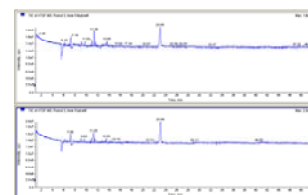


図4. CE-TOF/MS 結果

その結果、胆汁酸投与においてアミノ酸代謝の変動が確認された(図6)。アミノ酸代謝はエネルギー代謝に深く関与していると考えられるが、網羅的に検討した報告例は多くない。今後、胆汁酸代謝がアミノ酸代謝に与える影響を明確にし、エネルギー代謝への影響のメカニズムを解明していきたい。将来的には、特定バイオマーカーを同定し、臨床との共同研究により臨床血清サンプルでの検証を行ない、ヒト臨床診断・体質診断に発展させていきたい。

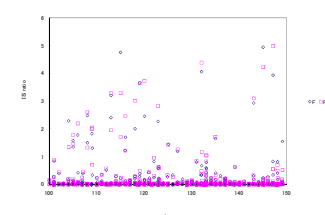


図5. CE-TOF/MS の解析

考察

我々は、胆汁酸代謝がエネルギー代謝調節に関与しているのではないかと考え研究を進めているが、本研究においては、mRNA や代謝産物からの解析を行った。FXR アゴニストは、脂肪細胞においてインシュリンシグナルを増加させ脂肪細胞の分化を誘導するとの報告があるが、我々の結果は、既報と異なり脂肪細胞への分化の際、発現誘導される遺伝子マーカー (PPAR γ 、FAS、GLUT4、ACC1、ACC2) 等の発現に変化が確認されなかった。

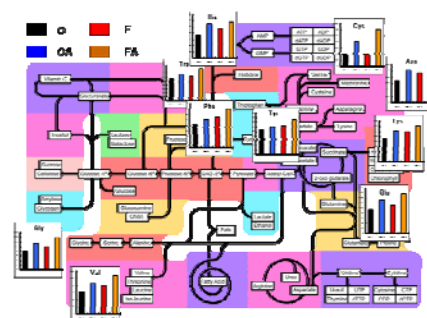


図6. 胆汁酸投与によるアミノ酸代謝への影響

また、アレイを用いた解析では、代謝に関与することが報告されている遺伝子のほかにも、炎症、細胞増殖やアポトーシスに関与する遺伝子などが多数検出され、今後、それぞれの遺伝子発現がエネルギー代謝制御にどのような影響を及ぼすか解析を進めることが重要である。メタボローム解析では、BAT において胆汁酸がアミノ酸代謝に深く関与していることが示唆され、胆汁酸代謝ーアミノ酸代謝ーエネルギー代謝の関係解明を今後検討していく。現在、メタボリックシンドロームの早期診断治療マーカーを抽出する目的で血清サンプルのメタボローム解析を行っている。将来的には、特定バイオマーカーを同定し、臨床血清サンプルでの検証を行ない、ヒト臨床診断・体質診断に発展させていき、予防医療も視野に入れたい。

文献

1. Houten, S.M.^a, M. Watanabe^a, J. Auwerx. Endocrine functions of bile acids. Review. **EMBO J.** 25: 1419-1425, 2006 a: contributed equally
2. Watanabe, M., S. M. Houten, C. Matakai, M. A. Christoffolete, B. W. Kim, H. Sato, N. Messaddeq, J. W. Harney, O. Ezaki, T. Kodama, K. Schoonjans, A. C. Bianco, J. Auwerx. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. **Nature.** 439: 484-489. 2006.
3. Watanabe, M., S. M. Houten, L. Wang, A. Moschetta, D. J. Mangelsdorf, R. A. Heyman, D. D. Moore, J. Auwerx. Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. **J. Clin. Invest** 100:1408-1418. 2004.