

第 6 回万有医学奨励賞 – 生活習慣病領域 – 研究成果報告書（追加助成） <概要>

所 属	筑波大学医学医療系内分泌代謝・糖尿病内科
氏 名	武内 謙憲
研究テーマ	KLF15 の新機能-糖代謝と脂質代謝の新たな接点-ならびに発現制御メカニズムの解明

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを 1 ページにまとめてください。（図表、写真などの貼付を含む）

【研究目的】

肝臓における脂質合成系の調節は主に転写因子 SREBP-1c により調整されており、その mRNA 量は絶食時には抑制され再摂食時には顕著な発現上昇が見られる。しかし絶食ならびに摂食という生体特有の現象は細胞などを用いた in vitro 系で再現するのは難しく、生体での発現調節機構は未解明のままであった。そこで申請者は摂食での発現調節メカニズムを生きたマウスを用いて詳しく解析するため in vivo Ad-luc 法という画期的なプロモーター解析手法を確立し、生体における SREBP-1c の詳細な発現調節メカニズムを初めて解析可能にした。（Takeuchi Y et al. *J. Biol. Chem.* 285: 11681-91, 2010.）さらに、この解析手法に加え申請者の研究グループにて開発したマウス転写因子発現プラスミドライブラリー-TFEL（Transcription Factor Expression Library）を用いて研究を進めた結果、肝臓において絶食時に誘導される KLF15 がコリプレッサー-RIP140 による LXR の抑制を介して SREBP-1c の発現を抑制することを見出した (Fig.1)。（Takeuchi Y et al. *Cell Reports* 16: 2373-2386, 2016.）KLF15 は糖代謝や窒素代謝に関与し、絶食時に発現が亢進することは知られているが、その調節機構は未だ解明されていない。そこで、本研究では栄養状態の変化が KLF15 の発現調節に与える影響を解明することを目的とした。

【研究手法】

KLF15 遺伝子には、肝臓で主に高発現している KLF15-1a と、様々な臓器で発現がみられる KLF15-1c という exon1 のみが異なる 2 つの isoform が確認されている。そこで、KLF15-1a プロモーター領域にルシフェラーゼレポーター遺伝子を繋げたアデノウィルス（Ad-KLF15-1a-luc）を作製し、肝臓での絶食における発現調節に重要なプロモーター領域の同定を in vivo Ad-luc 法を用いて行った (Fig.2)。さらにその領域の活性を調節する転写因子を、TFEL 等を用いて探索を行った。

【研究成果】

絶食時の肝臓において Ad-KLF15-1a-luc の活性が上昇することを in vivo Ad-luc 法にて確認後、様々な Ad-KLF15-1a-luc の作成と解析により絶食時に重要な働きを担うゲノム領域の絞り込みに成功した。そしてその領域の活性を調節する候補転写因子を同定した。現在、さらなる絶食における発現調節に重要な領域の詳細な絞り込みとその領域に作用する候補因子の選定を精力的に進めている。本研究結果より、in vivo Ad-luc 法と TFEL による一連の解析手法は栄養状態により発現の変動する様々な遺伝子の発現調節解析に広く効果的に用いることができると考えられる。

Fig.1

KLF15は絶食時に脂質合成を抑制する

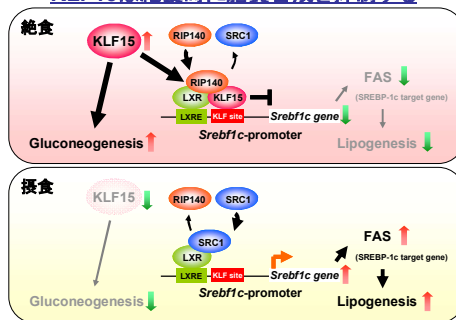
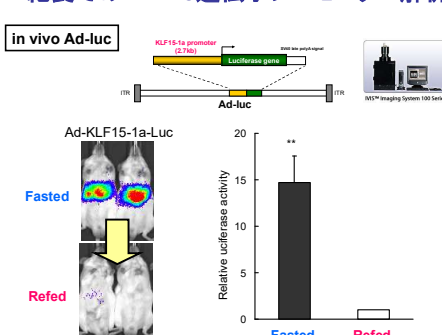


Fig.2

絶食でのKLF15遺伝子プロモーター解析



第 6 回万有医学奨励賞 – 生活習慣病領域 –
研究成果報告書（追加助成） <詳細>

所 属	筑波大学医学医療系内分泌代謝・糖尿病内科
氏 名	武内 謙憲
研究テーマ	KLF15 の新機能-糖代謝と脂質代謝の新たな接点-ならびに発現制御メカニズムの解明

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

【背景・目的】

近年、先進諸国において糖尿病、高脂血症などの生活習慣病が増加し続けており、その成因には栄養代謝恒常性の破綻があると考えられている。申請者らは、以前より生体内での栄養代謝調節、特に中性脂肪合成系の調節機構の研究を一貫して続けてきている。特に、肝臓における中性脂肪合成系の調節には、転写因子 SREBP-1c (sterol regulatory element-binding protein-1c) が重要な働きをしていることを明らかにしてきた。(Shimano H et al. *Nat Rev Endocrinol.* 13: 710-730, 2017.)

(Matsuzaka T et al. *Nature Medicine* 13: 1193-1202, 2007.) (Yahagi N et al. *J. Biol. Chem.* 277: 19353-19357, 2002.)

SREBP-1c の発現は、摂食時に上昇し絶食時には顕著な抑制が見られるが、摂食という生体特有の現象を *in vitro* で解析するのは難しく、その発現調節メカニズムは未解明のままであった。申請者はこの問題を解決するため、生体内での SREBP-1c プロモーター活性を可視化する手法、*in vivo* Ad-luc 法を独自に確立し、その詳細な転写調節メカニズムを初めて明らかにした。(Takeuchi Y et al. *J. Biol. Chem.* 285: 11681-91, 2010.)

in vivo Ad-luc 法ともに申請者らは、発現調節メカニズムの網羅的解析ツールとして、マウスゲノム上に存在する大部分の転写因子を含む転写因子発現プラスミドライブラリー-TFEL (Transcription Factor Expression Library) を開発した。この TFEL と *in vivo* Ad-luc 法の結果から、KLF15 が SREBP-1c の発現を抑制 *in vivo* Ad-luc 法を用いることで、初めて、肝臓において糖代謝を調節し、絶食時に発現が誘導されることが知られる KLF15 が脂質代謝をも直接制御していることを見出した。

さらに KLF15KO マウスでの解析を行ったところ、肝臓においては短期的な絶食では SREBP-1c の発現は抑制されなかった。しかし長期的な絶食時には SREBP-1c の発現は野生型と同程度まで低下した。そこで *in vivo* Ad-luc 法を用いて KLF15KO マウスの肝臓での SREBP-1c プロモーター解析を行ったところ、長期的な絶食時には KLF15KO の肝臓における PKA の活性が上昇することにより、LXR の Co-repressor である N-CoR が PKA 経路を介して SREBP-1c プロモーターにリクルートされ KLF15 非依存的に SREBP-1c の発現を抑制していることも明らかとなった。(Takeuchi Y et al. *Cell Reports* 16: 2373-2386, 2016.)

以上の結果から KLF15 は糖代謝と同時に脂質代謝を制御する転写因子であることが示唆され、脂質代謝に関する治療のターゲットとなる可能性があるため、KLF15 の発現調節メカニズムを解明することが重要であることが示された。KLF15 は絶食時に発現が亢進することは知られているが、その調節機構は未だ解明されていない。そこで、本研究では *in vivo* Ad-luc 法と TFEL を用いて栄養状態の変化が KLF15 の発現調節に与える影響を解明することを目的とした。

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

【研究方法】

生体内での肝臓における SREBP-1c プロモーター解析と同様に、絶食における KLF15 の発現調節機構の解析を、in vivo Ad-luc 法を用いて行った。KLF15 遺伝子には、肝臓で主に発現している KLF15-1a と、様々な臓器で発現がみられる KLF15-1c という exon1 のみが異なる 2 つの isoform があることが知られている。そこで、KLF15-1a 転写開始点から上流の Exon1c までのゲノム領域を、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を繋げたアデノウイルス (Ad-KLF15-1a-luc) を作製した (Fig.3)。

Ad-KLF15-1a-luc をベースとして様々な Ad-KLF15-1a-luc コンストラクトを作製し、in vivo Ad-luc 法による解析を進め、絶食における発現調節に重要な領域の絞り込みを試みた。

【結果】

絶食時の肝臓において Ad-KLF15-1a-luc の活性が上昇することを in vivo Ad-luc 法にて確認後、様々な Ad-KLF15-1a-luc を作成しそれらの網羅的な解析により絶食時に重要な働きを担うゲノム領域の詳細な絞り込みに成功した (Fig.4)。その重要な領域は KLF15-1a 転写開始点から上流の Exon1c までの 2.7kb のゲノム領域内において 2 つの領域に分かれており、それらを合わせた領域を“Core”と名付けた。実際、Core 領域を用いた Ad-KLF15-1a-Core-luc は KLF15-1a 上流全 2.7kb を含む Ad-KLF15-1a-luc とほぼ同じ絶食時におけるレポーター活性の変動を示した (Fig.4)。

マウス転写因子発現プラスミドライブラリー-TFELを用いて Core 領域に作用する発現調節因子を探索した結果、複数の転写調節因子を同定した。現在、これらの転写調節因子の過剰発現アデノウイルスベクターやノックダウン shRNA 発現アデノウイルスベクターを作成し、肝臓での KLF15 遺伝子発現に与える影響の検討を行っている。

一方、骨格筋や脂肪細胞においては KLF15 の発現調節に核内受容体 Glucocorticoid Receptor (GR) が関与することが報告されている。(Shimizu N et al. *Cell Metabolism* 13: 170-182, 2011.) (Asada M et al. *Laboratory Investigation* 91, 203-215, 2011.) Core 領域には 2 つの GR 結合配列 GRE が存在することがすでに報告されているため、その 2 つの GRE に変異を導入した Ad-KLF15-1a-GREm-luc を作成し絶食時におけるレポーター活性の変動を検討した。その結果、Ad-KLF15-1a-GREm-luc は Ad-KLF15-1a-Core-luc に比べ、レポーター活性の変動が有意に低下した (Fig.4)。この結果より、絶食時の KLF15-1a 発現調節には 2 つの GRE が重要であることが示唆された。

Fig.3

絶食時の各組織でのKLF15遺伝子発現

KLF15遺伝子構造

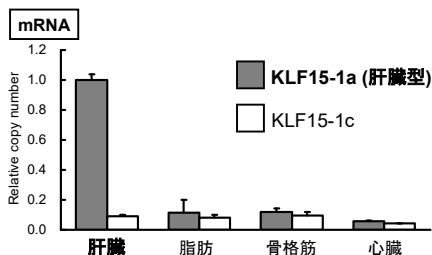
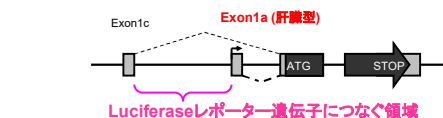
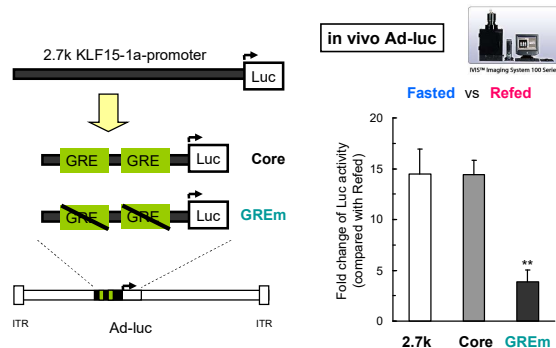


Fig.4

絶食時のKlf15発現調節におけるGREの重要性



目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

引き続き GR の重要性を調べるため GR リガンドに関する検討を行った。マウスの GR の内因性リガンドとしては副腎から分泌されるコルチコステロンが主なものであることが知られている。そこで絶食時の血中コルチコステロン濃度の測定と、副腎摘出モデルマウス(Adrenalectomy)を用いた解析を行った。その結果、絶食時には有意に血中コルチコステロン濃度が上昇することが確認でき、副腎摘出モデルマウス(Adrenalectomy)においては絶食時の肝臓における KLF15 の発現上昇が有意に低下した (Fig.5)。

さらにコルチコステロンの血中濃度は日内変動が存在することが知られている。そこで日内変動における血中コルチコステロン濃度と肝臓での KLF15 発現の詳細な検討を行うため、AM5:00 から PM7:00 までは明期、PM7:00 から AM5:00 までは暗期での飼育下において自由摂食をさせたマウスから 3 時間ごとに肝臓と血しょうサンプルを採取し解析を行った。その結果、肝臓における KLF15 発現のピークは血中コルチコステロン濃度のピークよりも先行することが確認された (Fig.6)。

【考察・今後の課題】

in vivo Ad-luc 法にて絶食時の肝臓における KLF15 発現調節に重要な働きを担うゲノム領域の詳細な絞り込みに成功した。そして TFEL を用いた探索により、その領域の転写活性を調節する候補転写因子も複数見出されている。そこで、さらなる絶食における発現調節に重要な領域の 1 塩基までの解像度での絞り込みとそこに作用する候補因子の選定を進めている。本研究結果より、in vivo Ad-luc 法と TFEL による一連の解析手法は栄養状態により発現の変動する様々な遺伝子の発現調節解析に広く効果的に用いることができると考えられる。

また、KLF15-1a プロモーター領域に存在する 2 つの GRE に変異を導入したレポーターアデノウィルスを用いた in vivo Ad-luc 法での解析結果や副腎摘出マウスの解析結果より、絶食時の KLF15 遺伝子発現には GR ならびに GR リガンドが関与していることが示唆された。一方、日内変動における血中コルチコステロン濃度と肝臓での KLF15 発現解析からは、GR リガンド非依存的な発現調節メカニズムが存在することが示唆された。絶食時における SREBP-1c 発現調節には KLF15 依存的・非依存的な様々な経路が存在することが申請者によって明らかにされたように、KLF15 発現調節にも様々な経路が存在することが考えられる。

今後は、KLF15 遺伝子の制御メカニズムを軸とした分子から生体レベルまでの詳細な解析結果をもとに、肝臓での絶食シグナルと遺伝子発現をつなぐ経路の全体像と、絶食時間の各段階でのそれぞれの経路が担う生理学的役割を明らかにするとともに、絶食シグナルの各経路の治療効果的意義の解明も目標として意欲的に研究を進めていきたい。

Fig.5

Klf15発現調節におけるGR ligandの重要性

GR ligand DexamethasoneがKLF15の発現を調節する

Shimizu N et al. *Cell Metab.* 2011.
Teshigawara K et al. *BBRC* 2005.

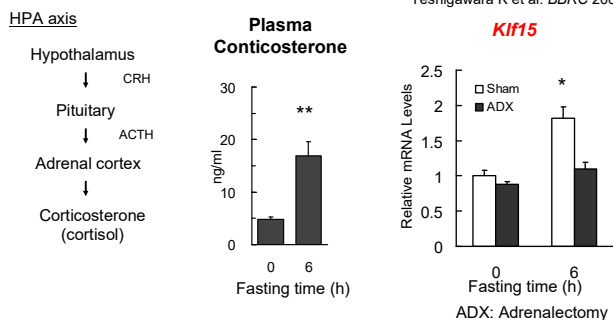
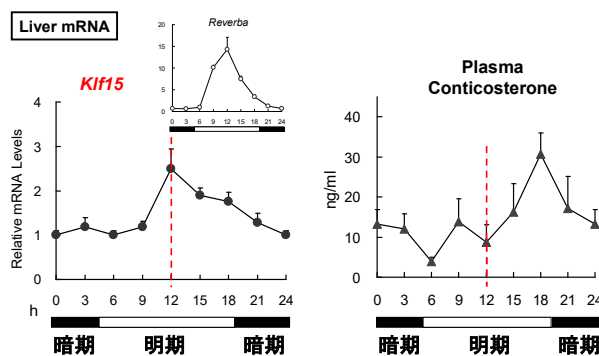


Fig.6

日内変動における肝臓でのKlf15発現調節は血中GR ligand濃度に先行する



第 6 回万有医学奨励賞 – 生活習慣病領域 –

研究成果報告書（追加助成） <発表実績/予定一覧>

所 属	筑波大学医学医療系内分泌代謝・糖尿病内科
氏 名	武内 謙憲

1. 論文発表実績	
<ul style="list-style-type: none"> ・ 掲載年次順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。 ・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。 ・ 国内外雑誌を問わない。 ・ 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 	
① <論文 PDF 添付あり>	
1	<p>Takashi Matsuzaka, Motoko Kuba, Saori Koyasu, Yuta Yamamoto, Kaori Motomura, Sundaram Arulmozhiraja, Hiroshi Ohno, Rahul Sharma, Takuya Shimura, Yuka Okajima, Song-iee Han, Yuichi Aita, Yuhei Mizunoe, Yoshinori Osaki, Hitoshi Iwasaki, Shigeru Yatoh, Hiroaki Suzuki, Hirohito Sone, <u>Yoshinori Takeuchi</u>, Naoya Yahagi, Takafumi Miyamoto, Motohiro Sekiya, Yoshimi Nakagawa, Masatsugu Ema, Satoru Takahashi, Hiroaki Tokiwa, Hitoshi Shimano</p> <p>Hepatocyte Elovl6 determines ceramide acyl-chain length and hepatic insulin sensitivity in mice</p> <p><i>Hepatology</i> in press 2019 査読有</p>
2	<p>Takehito Sugasawa, Kai Aoki, Koichi Watanabe, Koki Yanazawa, Tohru Natsume, Tohru Takemasa, Kaori Yamaguchi, <u>Yoshinori Takeuchi</u>, Yuichi Aita, Naoya Yahagi, Yasuko Yoshida, Katsuyuki Tokinoya, Nanami Sekine, Kaoru Takeuchi, Haruna Ueda, Yasushi Kawakami, Satoshi Shimizu, Kazuhiro Takekoshi</p> <p>Detection of Transgenes in Gene Delivery Model Mice by Adenoviral Vector Using ddPCR.</p> <p><i>Genes</i> 10, 436, 2019 査読有</p>
3	<p>Rahul Sharma, Takashi Matsuzaka, Mahesh K. Kaushik, Takehito Sugasawa, Hiroshi Ohno, Yunong Wang, Kaori Motomura, Takuya Shimura, Yuka Okajima, Yuhei Mizunoe, Yang Ma, Zahara M. Saber, Hitoshi Iwasaki, Shigeru Yatoh, Hiroaki Suzuki, Yuichi Aita, Song-iee Han, <u>Yoshinori Takeuchi</u>, Naoya Yahagi, Takafumi Miyamoto, Motohiro Sekiya, Yoshimi Nakagawa, Hitoshi Shimano</p> <p>Octacosanol and policosanol prevent high-fat diet-induced obesity and metabolic disorders by activating brown adipose tissue and improving liver metabolism.</p> <p><i>Scientific Reports</i> 9, 5169, 2019 査読有</p>

4	<p>Yuki Murayama, Naoya Yahagi, <u>Yoshinori Takeuchi</u>, Yuichi Aita, Zahra Mehrazad Saber, Nobuhiro Wada, EnXu Li, Xianying Piao, Yoshikazu Sawada, Akito Shikama, Yukari Masuda, Makiko Nishi-Tatsumi, Midori Kubota, Yoshihiko Izumida, Takafumi Miyamoto, Motohiro Sekiya, Takashi Matsuzaka, Yoshimi Nakagawa, Yoko Sugano, Hitoshi Iwasaki, Kazuto Kobayashi, Shigeru Yatoh, Hiroaki Suzuki, Hiroaki Yagyu, Yasushi Kawakami, Hitoshi Shimano</p> <p>Glucocorticoid receptor suppresses gene expression of Rev-erba (Nr1d1) through interaction with the CLOCK complex</p> <p><i>FEBS Letters</i> 593, 423-432, 2019 査読有</p>
5	<p>Hiroshi Ohno, Takashi Matsuzaka, Nie Tang, Rahul Sharma, Kaori Motomura, Takuya Shimura, Aoi Satoh, Song-iee Han, <u>Yoshinori Takeuchi</u>, Yuichi Aita, Hitoshi Iwasaki, Shigeru Yatoh, Hiroaki Suzuki, Motohiro Sekiya, Yoshimi Nakagawa, Hirohito Sone, Naoya Yahagi, Nobuhiro Yamada, Yoshikazu Higami, Hitoshi Shimano</p> <p>Transgenic Mice Overexpressing SREBP-1a in Male ob/ob Mice Exhibit Lipodystrophy and Exacerbate Insulin Resistance</p> <p><i>Endocrinology</i> 159, 2308-2323, 2018 査読有</p>
6	<p>Xianying Piao, Naoya Yahagi, <u>Yoshinori Takeuchi</u>, Yuichi Aita, Yuki Murayama, Yoshikazu Sawada, Akito Shikama, Yukari Masuda, Makiko Nishi-Tatsumi, Midori Kubota, Yoshihiko Izumida, Motohiro Sekiya, Takashi Matsuzaka, Yoshimi Nakagawa, Yoko Sugano, Hitoshi Iwasaki, Kazuto Kobayashi, Shigeru Yatoh, Hiroaki Suzuki, Hiroaki Yagyu, Yasushi Kawakami, Hitoshi Shimano</p> <p>A candidate functional SNP rs7074440 in TCF7L2 alters gene expression through C-FOS in hepatocytes</p> <p><i>FEBS Letters</i> 592, 422-433, 2018 査読有</p>
<p>② <論文 PDF 添付なし></p>	

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ・ 発表年順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ・ アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。 ・ 国内外を問わない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2019年12月	IDF(International Diabetes Federation) Congress 2019(国際) <u>Yoshinori Takeuchi</u> Hepatic KLF15 is involved in lipogenesis via inhibitory effect on SREBP-1c promoter during fasting.
2	2019年7月	第51回日本動脈硬化学会総会・学術集会(国内) <u>武内謙憲</u> SNP rs7074440 は肝細胞において転写因子 C-FOS との結合を介して TCF7L2 遺伝子発現を調節している機能性 SNP である
3	2018年12月	APNNO(Asia Pacific Nutrigenomics Nutrigenetics Organisation) 2018 Biennial Conference(国際) <u>Yoshinori Takeuchi</u> Hepatic KLF15 modulates lipogenesis via inhibition of LXR activity by recruiting corepressor RIP140 on SREBP-1c promoter during fasting.
4	2018年10月	The 6th International Conference on Biology and Pathobiology of KLF/Sp Transcription Factors (KLF-2018)(国際) <u>Yoshinori Takeuchi</u> Hepatic KLF15 modulates lipogenesis via inhibition of LXR activity by recruiting corepressor RIP140 on SREBP-1c promoter during fasting.
3. 投稿、発表予定（投稿中の論文も含める）		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1		
2		
3		