

課題番号 : 26指301

研究課題名 : 2型糖尿病の創薬のための分子標的の同定に資する転写共役因子CITED2を中心とした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 : なし

キーワード : 2型糖尿病、創薬標的、治療、エピジェネティクス、CITED2、絶食応答、肝糖新生、遺伝子転写、肥満

研究成果 :

我が国の糖尿病の患者数は316万人にも上り、その合併症の発症・進展を阻止するためには発症早期からの高血糖の是正が不可欠である。肥満によって起こる“インスリン抵抗性”により、肝臓ではブドウ糖の産生（糖新生）の増加が、筋肉ではブドウ糖取り込み障害が起こり、2型糖尿病の高血糖が惹起される。これらの代謝障害に対する治療薬は少なく、新規治療薬の開発が急務となっている。報告者らは、転写共役因子 CITED2 (CBP- and p300-interacting transactivator with glutamic acid- and aspartic acid-rich COOH-terminal domain 2)が肝糖新生に必須の分子であり、2型糖尿病マウスモデルの肝臓における本分子の機能抑制により、糖新生が抑制され高血糖が改善することを見いだした (Nature Medicine. 18:612-617, 2012)。この課程で、1) CITED2 が骨格筋においても代謝調節に関与すること、2) CITED2 は、各種ヒストン修飾酵素の活性を調節し代謝系遺伝子の発現を制御する、いわゆる代謝制御エピジェネティクス (Epigenetics: DNA の塩基配列の違いによらない遺伝子発現の多様性を生み出す仕組み) に関与すること、を示唆する知見を得た。そこで本研究では、

① 骨格筋の代謝調節における CITED2 の役割の解明

② CITED2 結合性ヒストン修飾酵素 GCN5 の肝臓における代謝制御エピジェネティクスの解明

③ 肝臓における代謝制御エピジェネティクスを担う CITED2 制御性分子の同定と機能の解明

ならびに、これらの解析から得られた新規代謝関連分子の糖尿病創薬シーズとしての可能性の検証を目指した。以下に、研究成果の概要を研究計画のサブテーマごとに詳述する。

① 骨格筋の代謝調節における CITED2 の役割の解明

報告者らが作製した骨格筋特異的 CITED2 欠損マウス (mCITED2KO マウス)は、通常食飼育下で骨格筋において核内受容体 NR4A、C2Cd4a,b、Pck1 の発現亢進と Myh3, 7, Myl2, 3, 10 などのミオシン重鎖、軽鎖などの発現低下を認めた。これらの遺伝子発現の変化は培養筋管細胞における short hairpin RNA を用いた CITED2 のノックダウンでも再現され、CITED2 欠損による1次的な変化と推察された。しかし、体重、血糖値、行動量・呼吸代謝や筋肉の量、質（筋線維のタイプなど）、運動耐用能に対照と差を認めなかった。肥満・糖尿病の病態への筋肉の CITED2 の関与を想定し、高脂肪食飼育下で同様の解析を行うも特異な表現型を得られなかった。

② CITED2 結合性ヒストン修飾酵素 GCN5 の肝臓における代謝制御エピジェネティクスの解明

報告者らは以前、CITED2 の発現が肝臓においてグルカゴンによって誘導されること、本分子が転写共役因子 PGC-1 α を活性化することにより絶食時の糖新生系酵素の発現を増強させること、その活性化機構として CITED2 が絶食時に GCN5 と複合体を形成することにより、GCN5 による PGC-1 α のアセチル化が抑制され、活性化が起こることを見いだした (Nature Medicine. 18:612-7, 2012)。このように GCN5 は PGC-1 α のアセチル化酵素として糖新生系酵素の転写を負に制御する一方、HAT 活性を有する転写コアクチベーターとして遺伝子転写を活性化することも知られていた。そこで絶食時に CITED2 と複合体を形成する GCN5 が HAT として糖新生系酵素の転写に関与することを想定し解析を行った。

GCN5 のノックダウンにより初代培養肝細胞では cAMP による糖新生系酵素の発現誘導は低下し、糖産生が抑制された。マウスの肝臓におけるノックダウンでも、絶食時の糖新生系酵素の発現低下による血糖値の低下を認めた。これらの結果から、GCN5 は糖新生系酵素の発現誘導における負の制御因子というよりは、むしろ必須の分子であると考えられた。また GCN5 は肝細胞において CITED2 と共に強発現させると、cAMP による糖新生系酵素の発現誘導を増強し、本作用にはアセチル基転移酵素活性が必要であった。また ChIP-qPCR (クロマチン免疫沈降-定量的 PCR)法による検討から、GCN5 は糖新生系酵素遺伝子プロモーターにおいてヒストンアセチル化酵素(HAT)として機能していることが明らかとなった。以上の結果より、GCN5 は糖新生系酵素遺伝子の発現誘導に必須の HAT であり、本機能のためには cAMP と CITED2 が必要であることが明らかとなった。これまでの知見と合わせ、GCN5 には摂食時に PGC-1 α をアセチル化し糖新生を抑制する機能と、絶食時に cAMP/CITED2 依存的にヒストンをアセチル化し糖新生を誘導する機能とがあることが示唆された。

そこでこの相反する 2 つの機能が、cAMP/CITED2 の存在下で GCN5 が基質を PGC-1 α からヒストン H3 にスイッチすることを想定し、CITED2-GCN5 複合体に着目した解析を行った。その結果、GCN5 は絶食時に CITED2、PKA と共に 3 者複合体 (モジュール) を形成すること、本モジュール内で cAMP により活性化された PKA により GCN5 の 275 番目のセリン残基 (Ser275) がリン酸化を受けること、本リン酸化により GCN5 がその基質を PGC-1 α からヒストン H3 にスイッチすることを見いだした。この結果、PGC-1 α の脱アセチル化による活性化が起こり HNF-4 α や FoxO1 が活性化されると共に、ヒストン H3K9 のアセチル化が起こる。GCN5 によるヒストン H3K9 のアセチル化は、CBP によるヒストン H3K27 のアセチル化 (18) やヒストン H3K4 のトリメチル化と並んで転写活性化と相関し active histone mark と呼ばれている。筆者らの ChIP-qPCR 法による検討より、糖新生系酵素のプロモーターにおいて cAMP 刺激により、GCN5・CBP のリクルートとヒストン H3K9・H3K27 のアセチル化ならびに H3K4 のトリメチル化が起こることが示された。GCN5 のリクルートを阻害するとこれらの変化がすべて障害されることから、GCN5 は糖新生系酵素遺伝子プロモーターにおいて転写活性化に必要な一連のエピゲノム修飾を起こすために必須の HAT であると考えられる。

絶食時に形成される GCN5-CITED2-PKA モジュールにおける cAMP 依存的な GCN5 の基質のスイッチ機構により、GCN5 が肝糖新生系酵素の発現を絶食時に促進し、摂食時に抑制することが可能になる。加えて本機構により、グルカゴン-cAMP シグナル応答性のエピジェネティックな変化とコアクチベータの活性化による転写複合体形成との統合も可能となる。肥満・糖尿病モデル動物の肝臓では GCN5 タンパクの発現のみならず、Ser275 のリン酸化も亢進していた。本モデルの肝臓で CITED2 をノックダウンし GCN5-CITED2-PKA モジュールの形成を阻害すると、GCN5 のノックダウンと同様の糖新生系酵素の発現抑制より高血糖が著明に改善した。これらの知見は、GCN5-CITED2-PKA モジュールが糖尿病創薬の治療標的となることを示唆する。

本成果は論文化し投稿中である。また糖尿病創薬標的としての GCN5 については特許出願を、新たに同定したモジュールや分子間相互作用についても、創薬シーズとしての導出を検討中である。なお本研究の要旨は次の国内・国際学会等で報告した。

第 51 回 日本臨床分子医学会学術集会、第 87 回 日本内分泌学会学術総会、第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、第 14 回日本蛋白質科学学会年会、9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress (MSDA)、自然科学研究機構 生理学研究所研究会、第 29 回日本糖尿病合併症学会、第 37 回日本分子生物学会、第 26 回分子糖尿病学シンポジウム、第 29 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、第 52 回日本臨床分子医学会学術集会、第 88 回日本内分泌学会学術総会、第

58 回日本糖尿病学会年次学術集会、The 8th Asia-Oceania Conference on obesity、The 46th NIPS International Symposium

③ 肝臓における代謝制御エピジェネティクスを担う CITED2 制御性分子の同定と機能解析

核内において CITED2 と相互作用する分子ならびに CITED2 により発現が制御される分子の網羅的探索を行い、前者として Retinoblastoma 蛋白 (pRb) を、後者としてリジンメチル化酵素領域である SET domain を有する SetU と、 α -ケトグルタル酸と Fe^{2+} 依存性のジオキシゲナーゼ DioxY を同定し、機能解析を行った。

肝細胞ならびにマウスにおける検討から、SetU は絶食時にグルカゴン-cAMP シグナルにより発現が誘導され、肝糖新生系酵素や脂肪酸酸化関連分子などの絶食応答遺伝子の発現誘導に必須の分子であること、*in vitro* で自身に対するメチル化活性を有することを明らかにした。加えて SetU が PKA によるリン酸化を受け、絶食応答で中心的な役割を果たすサーチュインファミリーの脱アセチル化酵素 X と相互作用し活性化することも見いだした。興味深いことに X の活性化は、メチル化酵素活性を欠損した変異 SetU で強く認められた。これらの結果より、SetU は PKA によるリン酸を受けると不活性型となり、脱アセチル化酵素 X を活性化することが示唆された。本研究により SetU が絶食応答性の新規メチル化酵素であり、遺伝子転写を介した絶食応答の制御分子であることが示された。またサーチュインの活性化分子でもあり、SetU は代謝のみならず、サーチュインが制御する寿命・記憶・神経変性疾患・炎症性疾患等の病態・治療への関与が想定される。

CITED2 の相互作用分子として同定した pRb は、細胞周期回転を静止させ細胞増殖を抑制する癌抑制遺伝子産物として知られていた。各種サイクリンやサイクリン依存性キナーゼも CITED2 結合タンパクであったことと合わせて、CITED2-pRb 複合体が細胞増殖・分化を制御することが想定された。そこで、CITED2 と本分子との相互作用が脂肪細胞分化や肥満の進展に果たす役割の解析を行った。前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化系である 3T3-L1 細胞における CITED2 の機能欠損実験から、CITED2 は分化誘導後の前駆脂肪細胞の一過性増殖と分化に必須の分子であることが示唆された。そのメカニズムとして、CITED2 がサイクリン-サイクリン依存性キナーゼによる pRb のリン酸化・不活化を仲介し、前駆脂肪細胞の増殖、ならびに成熟脂肪細胞へ分化の master regulator である PPAR γ の発現を誘導することも明らかとなった (投稿準備中)。本研究の要旨は次の国内・国際学会等で報告した。9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress (MSDA) (Poster Award 受賞)、第 35 回日本肥満学会、第 29 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、International Symposium for the Study of Obesity、第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会、The 8th Asia-Oceania Conference on obesity、The 46th NIPS International Symposium。

DioxY はグルカゴン-cAMP シグナルにより発現が誘導され、肝細胞における機能欠損実験より絶食応答遺伝子群の発現制御・インスリン情報伝達障害・炎症関連遺伝子の発現抑制に必須の分子であることが示唆された。

受賞

本研究を含めたこれまでに NCGM で行った研究が高い評価をいただき、酒井 真志人 (室長) が第 26 回分子糖尿病学シンポジウム・研究奨励賞(平成 26 年 12 月 6 日) 松本 道宏 (部長) が第 18 回日本臨床分子医学会学会賞(平成 27 年 4 月 11 日) を受賞しました。国際医療研究開発費により私共の研究を支援いただきましたことを、心より感謝申し上げます。

Subject No. : 26S301

Title : Elucidation of CITED2-related epigenetics in the regulation of metabolism to identify molecular targets for development of anti-diabetic drugs

Researchers : Michihiro Matsumoto

Key word : type 2 diabetes, drug target, epigenetics, CITED2, fasting response, gluconeogenesis, gene transcription, obesity

Abstract :

The number of diabetic patients and potential patients has reached almost 3.16 million in Japan. The improvement of glycemic control in the early stage of diabetes is critical to prevent such patients from diabetic complications. Although unrestrained hepatic gluconeogenesis due to obesity-induced insulin resistance is a major cause of diabetic hyperglycemia, remedies for this pathological state are still not satisfactory, and thus there is an urgent need to develop this class of drugs.

We have previously shown that transcriptional coregulator CITED2 (CBP- and p300-interacting transactivator with glutamic acid- and aspartic acid-rich COOH-terminal domain 2) is a critical inducer of hepatic gluconeogenesis through the activation of PGC- α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α) (Nature Medicine 18: 612-617, 2012). We have revealed that CITED2 activates PGC-1 α -dependent gluconeogenic gene induction via suppression of acetylation-mediated inactivation of PGC-1 α by acetyltransferase GCN5 (general control non-repressed protein 5). As CITED2 deletion in the liver of diabetic animals ameliorates hyperglycemia, manipulation of CITED2-related regulation of metabolic gene transcription might provide therapeutic strategies for metabolic disorders such as type 2 diabetes. Our preliminary findings suggest the following possibilities: (1) CITED2 regulates skeletal muscle metabolism; (2) CITED2 is involved in the epigenetic regulation of metabolic gene transcription through the modulation of various histone modifying enzyme activities. In this research project, we aimed to investigate the following CITED2-related issues:

- ① Elucidation of the role of CITED2 in skeletal muscle metabolism
- ② Elucidation of the role of CITED2-associated acetyltransferase GCN5 in the epigenetic regulation of hepatic metabolism
- ③ Identification and functional analysis of novel CITED2-regulated molecules that epigenetically regulate metabolism in the liver

We also sought to verify whether the metabolic regulators newly identified through this investigation have potential as drug discovery seeds. The results of this project are summarized below.

- ① Elucidation of the role of CITED2 in skeletal muscle metabolism

Researchers には、分担研究者を記載する。

To investigate the role of CITED2 in the regulation of skeletal muscle metabolism, we generated and analyzed skeletal muscle-specific CITED2 knockout (mCITED2KO) mice. In CITED2-depleted skeletal muscle compared with that of control mice, expression levels of NR4A, C2Cd4a,b, and Pck1 were upregulated, while expression levels of various myosin chains (Myh3/7, Myl2/3/10) were downregulated. These changes were also observed in C2C12 myotubes depleted of CITED2 by short hairpin RNA, suggesting that the changes in gene expression are primary effects of CITED2 depletion. We also carried out phenotypic analysis of mCITED2KO mice fed a chow or high-fat diet. However, we could not observe any differences between mCITED2KO and control mice in metabolic parameters such as body weight, blood glucose and plasma insulin levels, respiratory metabolism, muscle volume and fiber types, and exercise tolerance.

② Elucidation of the role of CITED2-associated acetyltransferase GCN5 in the epigenetic regulation of hepatic metabolism

Hepatic gluconeogenesis is induced by pancreatic glucagon during fasting to maintain glucose homeostasis, a process whose dysregulation in diabetes results in fasting hyperglycemia. Gluconeogenic gene induction via the cAMP–PKA (protein kinase A) pathway requires epigenetic changes and assembly of transcriptional machinery at the corresponding promoters. Although various components of this machinery have been identified, how glucagon triggers epigenetic changes has remained unclear. The histone acetyltransferase (HAT) GCN5 acetylates PGC-1 α and thereby suppresses its transcriptional coactivator activity. We have previously shown the transcriptional coregulator CITED2, which is induced by glucagon, binds to and suppresses this function of GCN5 and thereby activates PGC-1 α (Nature Medicine 18: 612-617, 2012). The precise role of GCN5 in the regulation of gluconeogenesis has remained unknown, however.

In this study we show that GCN5 functions as a PKA-regulated acetyltransferase that integrates epigenomic modification and transcriptional coactivation to control gluconeogenesis. The abundance of GCN5 was found to be increased in the liver of diabetic animal models and in cAMP-treated hepatocytes. Depletion of hepatic GCN5 attenuated, whereas its coexpression with CITED2 increased, cAMP-induced gluconeogenic gene expression and glycemia. GCN5 recruitment to gluconeogenic gene promoters was induced by cAMP-PKA signaling, and its inhibition attenuated epigenetic changes associated with active gene transcription. In response to cAMP accumulation, PKA phosphorylates GCN5 at serine-275, thereby increasing its HAT activity and attenuating its PGC-1 α acetyltransferase activity. This substrate switch concomitantly promotes both epigenetic changes associated with transcriptional activation as well as PGC-1 α –mediated coactivation, thereby triggering the gluconeogenic program. Our results have thus revealed the GCN5-CITED2-PKA module and an associated GCN5 substrate switch as a key driver of a hormone-regulated pathway that integrates epigenetic changes and transcriptional coactivation for efficient metabolic gene induction. Disruption of this module suppresses gluconeogenesis in diabetic mice and is therefore a potential strategy for the treatment of type 2 diabetes.

③ Identification and functional analyses of novel CITED2-regulated molecules to epigenetically regulate metabolism in the liver

Our preliminary data suggest that in the liver, CITED2 promotes not only gluconeogenesis, but also other fasting responses such as fatty acid oxidation, amino acid catabolism, and steroidogenesis via transcriptional activation of enzymes involved in this pathway in a GCN5-dependent manner. We hypothesized that CITED2-related molecules might include novel metabolic regulators related to the fasting response. We comprehensively explored proteins that associate with or are transcriptionally regulated by CITED2, and identified retinoblastoma protein (pRb) as a former candidate, and SET domain-containing protein (SetU) and α -ketoglutarate/Fe²⁺-dependent dioxygenase (DioxY) as latter candidates, and carried out functional analyses of these proteins.

SetU mRNA expression was induced by the glucagon-cAMP-PKA axis in a CITED2-dependent manner in primary hepatocytes and increased during fasting in the mouse liver. Depletion of SetU suppressed while its overexpression promoted fasting response gene expression in the hepatocytes. These data suggest that SetU is a critical regulator in the fasting response. Our analyses also revealed that SetU has methyltransferase activity in vitro, was phosphorylated by PKA, and interacted with and activated NAD⁺-dependent deacetylase X, a member of the sirtuin family, named Sirtuin X. These findings suggest that SetU is a novel fasting-inducible methyltransferase that regulates fasting response gene expression via activation of Sirtuin X. SetU as well as Sirtuin X might play pleiotropic roles in the regulation of longevity and memory, and pathogenesis of metabolic diseases.

Our CITED2 depletion experiments in preadipocytes revealed that CITED2 is essential for preadipocyte proliferation and subsequent differentiation into mature adipocytes. The mechanistic analyses suggested that CITED2 interacted with pRb, cyclin, and CDK (cyclin-dependent kinase), and enhanced the phosphorylation of pRb by the cyclin-CDK complex, resulting in pRb inactivation and promotion of preadipocyte proliferation and subsequent differentiation. We also investigated the effect of CITED2 loss-of-function in adipose tissue expansion in obesity by using mice that were heterozygous for a null allele of the CITED2 gene and were fed on a high-fat diet (hetKO mice). The adipose tissue from hetKO mice exhibited a decrease in preadipocyte number along with a reduced expression of genes involved in cell cycle progression. Thus, the hetKO mice were protected from diet-induced obesity. Thus, we concluded that CITED2 loss-of-function impairs adipogenesis by inhibiting preadipocyte proliferation in vitro and in vivo, suggesting that CITED2 contributes to diet-induced adipose tissue expansion.

DioxY was also induced by the glucagon-cAMP-PKA axis in fasting liver. DioxY depletion in hepatocytes exhibited suppression of gluconeogenic gene expression and insulin signaling, and increased inflammatory gene expression. This dioxygenase may integrate glucose metabolism, insulin sensitivity, and the anti-inflammatory response. The detailed mechanism of Diox Y's function is currently under investigation.

2型糖尿病の創薬のための分子標的の同定に資する転写共役因子 CITED2を中心とした代謝制御エピジェネティクスの解明

報告者らは平成23年度まで国際医療研究開発費(21指116)による助成を受け、転写共役因子CITED2がグルカゴンによる肝糖産生誘導に必須の分子であること、モデル動物における検討から2型糖尿病の高血糖に本分子の発現増加が病因的役割を果たしていることを見いだした(*Nature Medicine*. 18:612-7, 2012)。本先行研究の中でCITED2が、肝臓においてヒストン修飾酵素GCN5の機能調節を介して糖代謝をエピジェネティックに制御している可能性、ならびに肝臓以外の臓器においても代謝調節に重要な役割を果たす可能性が示唆された。CITED2を制御する、あるいはCITED2によって制御される分子の同定は、代謝調節臓器におけるCITED2の機能の全容解明とともに、新規糖尿病治療薬の開発のための分子標的の同定に繋がるものと考えられた。

そこで本研究では、

1. 骨格筋の代謝調節におけるCITED2の役割の解明
2. CITED2結合性ヒストン修飾酵素GCN5の肝臓における代謝制御エピジェネティクスの解明
3. 肝臓における代謝制御エピジェネティクスを担うCITED2制御性分子の同定と機能の解明

をサブテーマに解析を進め、得られた新規代謝関連分子の糖尿病創薬シーズとしての可能性の検証を目指した。以下にサブテーマごとに研究結果を報告する。

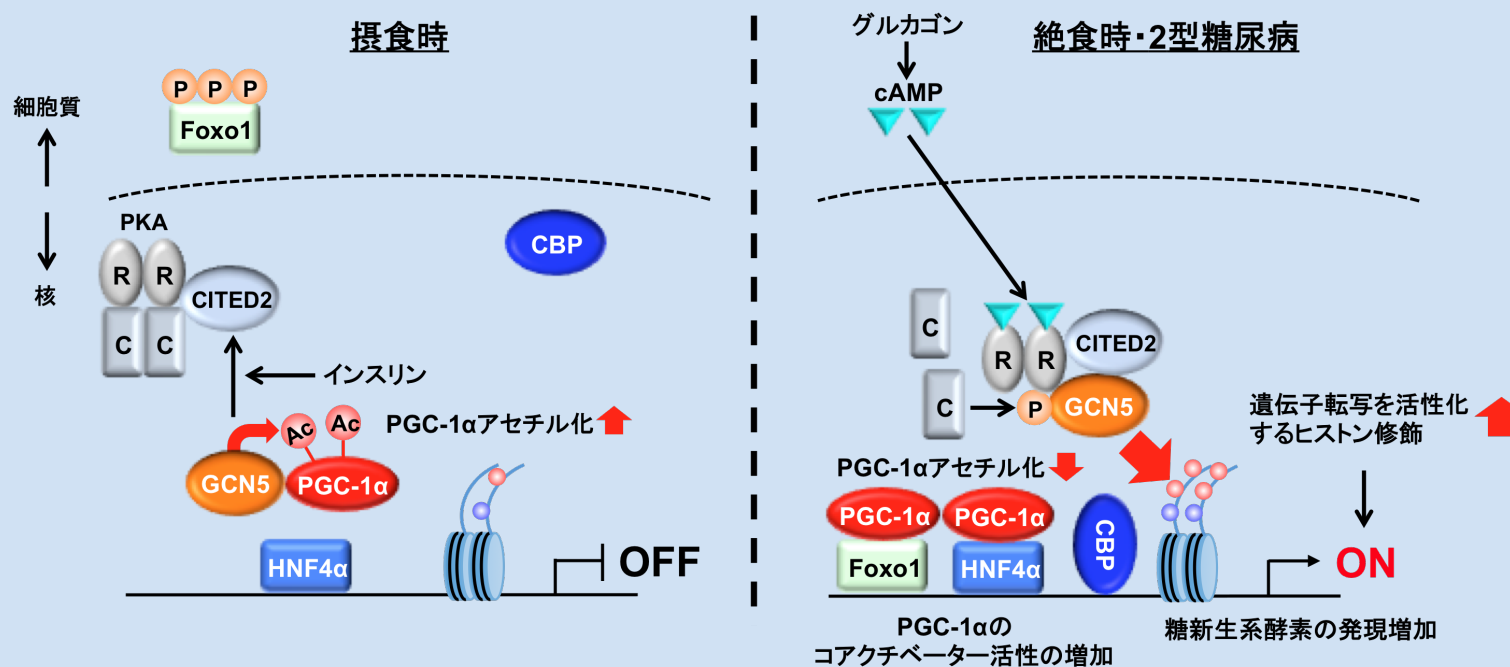
1. 骨格筋の代謝調節におけるCITED2の役割の解明

—骨格筋特異的CITED2欠損マウスを用いて—

Cre-loxPシステムを用いて骨格筋特異的CITED2欠損マウスを作製し、通常食ならびに高脂肪食飼育下で代謝表現型解析を行った。骨格筋における遺伝子発現解析では、NR4As、Pck1、各種ミオシンなどの発現の変化を認めしたが、週齢の進行とともに差が消失した。体重、血糖値、行動量・呼吸代謝や筋肉の量、質(筋線維のタイプなど)、運動耐用量に对照と差を認めなかった。トレーニング(有酸素運動や無酸素運動)による骨格筋の量や質の変化に対しても、CITED2の欠損は影響を与えなかった。現在、構築した筋萎縮の誘導・評価系を用いてCITED2の欠損による影響を検証中である。

2. CITED2結合性ヒストン修飾酵素GCN5の肝臓における代謝制御エピジェネティクスの解明

アセチル化酵素GCN5はグルカゴンによって活性化され、絶食時の肝臓からの糖新生に不可欠であること、本活性化にはGCN5-CITED2-PKAで構成される機能モジュールとGCN5の基質指向性の変化が重要であること、今回同定した糖新生制御分子・調節機構は糖尿病の治療標的となることを明らかにした。本研究成果は論文化し、現在 **in revision** である。また糖尿病創薬標的としてのGCN5については特許出願を、新たに同定したモジュールや分子間相互作用についても、創薬シーズとしての導出を検討中である。



GCN5-CITED2-PKAモジュールによる糖新生系酵素の転写制御

摂食時にはCITED2の発現は減少し、CITED2とGCN5の相互作用はインスリンによって抑制されている。GCN5はPGC-1αに結合してアセチル化し、PGC-1αのコアクチベーター活性を抑制する。絶食時にはグルカゴン/cAMPによって、GCN5-CITED2-PKAモジュール内のPKAが活性化してGCN5をリン酸化する。GCN5はリン酸化を受けるとPGC-1αへのアセチル化活性は抑制され、HAT活性が増強する。PGC-αのコアクチベーター活性の増加と、遺伝子転写の活性化に必要なヒストン修飾の増加が協調的に糖新生系酵素遺伝子の発現を誘導する。2型糖尿病ではGCN5 Ser275のリン酸化の増加が、肝糖新生の亢進の一因となっている。(R: PKA調節サブユニット、C: 触媒サブユニット)

3. 肝臓における代謝制御エピジェネティクスを担う CITED2制御性分子の同定と機能の解明(1)

核内においてCITED2と相互作用する分子ならびにCITED2により発現が制御される分子の網羅的探索を行い、前者としてRetinoblastoma蛋白 (pRb)を、後者としてリジンメチル化酵素領域であるSET domainを有するSetUと、 α -ケトグルタル酸と Fe^{2+} 依存性のジオキシゲナーゼDioxYを同定し、機能解析を行った。以下に各分子ごとに研究結果を報告する。

3-1. CITED2-pRb相互作用を介した脂肪組織量の制御機構の解明

CITED2の相互作用分子として同定したpRbは、細胞周期回転を静止させ細胞増殖を抑制する癌抑制遺伝子産物として知られていた。各種サイクリンやサイクリン依存性キナーゼもCITED2結合タンパクであったことと合わせて、CITED2-pRb複合体が細胞増殖・分化を制御することが想定された。そこで、CITED2と本分子との相互作用が脂肪細胞分化や肥満の進展に果たす役割の解析を行った。前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化系である3T3-L1細胞におけるCITED2の機能欠損実験から、CITED2は分化誘導後の前駆脂肪細胞の一過性増殖と分化に必須の分子であることが示唆された。そのメカニズムとして、CITED2がサイクリン-サイクリン依存性キナーゼによるpRbのリン酸化・不活化を仲介し、前駆脂肪細胞の増殖、ならびに成熟脂肪細胞へ分化のmaster regulatorであるPPAR γ の発現を誘導することも明らかとなった。 (**Manuscript in preparation**)

3. 肝臓における代謝制御エピジェネティクスを担う CITED2制御性分子の同定と機能の解明(2)

3-2. 代謝調節における肝臓のSetUの役割の解明

肝細胞ならびにマウスにおける検討から、本分子の発現はCITED2の強発現により促進され、ノックダウンにより抑制されたことから、CITED2の標的分子と考えられた。肝糖新生系酵素や脂肪酸酸化関連分子などの絶食応答遺伝子の発現誘導に必須の分子であること、*in vitro*で自身に対するメチル化活性を有することを明らかにした。加えてSetUがPKAによるリン酸化を受け、絶食応答で中心的な役割を果たすサーチュインファミリーの脱アセチル化酵素Xと相互作用し活性化することも見いだした。興味深いことにXの活性化は、メチル化酵素活性を欠損した変異SetUで強く認められた。これらの結果より、SetUはPKAによるリン酸を受けると不活性型となり、脱アセチル化酵素Xを活性化することが示唆された。本研究によりSetUが絶食応答性の新規メチル化酵素であり、遺伝子転写を介した絶食応答の制御分子であることが示された。またサーチュインの活性化分子でもあり、SetUは代謝疾患のみならず、サーチュインが制御する寿命・記憶・神経変性・炎症等の病態・治療への関与が想定される。(Manuscript in preparation)

3-3. 代謝調節における肝臓のDioxYの役割の解明

CITED2とグルカゴンによって遺伝子転写が誘導される分子として α -ケトグルタル酸と Fe^{2+} 依存性のジオキシゲナーゼY (DioxY)を同定した。本分子は、肝細胞における機能欠損により、絶食応答遺伝子群の発現抑制・インスリン情報伝達障害・炎症関連遺伝子の発現亢進が起こることを見出だした。肝臓特異的DioxYマウスの代謝表現型解析では、予備的データではあるが食餌性の非アルコール性脂肪肝炎が対照に比べて強く誘導された。本分子はNASHの病態の発症・進展の抑制に寄与する可能性があり、現在更に詳細な解析を進めている。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：26指301

研究課題名：2型糖尿病の創薬のための分子標的の同定に資する転写共役因子CITED2を中心とした代謝制御エピジェ.

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
Central Insulin Action Activates Kupffer Cells by Suppressing Hepatic Vagal Activation via the Nicotinic Alpha 7 Acetylcholine Receptor.	Kimura K, Tanida M, Nagata N, Inaba Y, Watanabe H, Nagashimada M, Ota T, Asahara S, Kido Y, Matsumoto M, Toshinai K, Nakazato M, Shibamoto T, Kaneko S, Kasuga M, Inoue H.	Cell Rep.	14(10):2362-74	2016
Hepatocyte β -Klotho regulates lipid homeostasis but not body weight in mice.	Kobayashi K, Tanaka T, Okada S, Morimoto Y, Matsumura S, Manio MC, Inoue K, Kimura K, Yagi T, Saito Y, Fushiki T, Inoue H, Matsumoto M, Nabeshima Y.	FASEB J.	30(2):849-62	2016
Paternal allelic mutation at the Kcnq1 locus reduces pancreatic β -cell mass by epigenetic modification of Cdkn1c.	Asahara SI, Etoh H, Inoue H, Teruyama K, Shibutani Y, Ihara Y, Kawada Y, Bartolome A, Hashimoto N, Matsuda T, Koyanagi- Kimura M, Kanno A, Hirota Y, Hosooka T, Nagashima K, Nishimura W, Inoue H, Matsumoto M, Higgins MJ, Yasuda K, Inagaki N, Seino S, Kasuga M, Kido Y.	Proc Natl Acad Sci U S A.	112(27):8332-7	2015
A Mutant Allele Encoding DNA-Binding-Deficient Foxo1 Differentially Regulates Hepatic Glucose and Lipid Metabolism.	Cook JR, Matsumoto M, Banks AS, Kitamura T, Tsuchiya K, Accili D.	Diabetes.	64(6):1951-65	2015

研究発表及び特許取得報告について

Gadd34 regulates liver regeneration in hepatic steatosis.	Inaba Y, Furutani T, Kimura K, Watanabe H, Haga S, Kido Y, Matsumoto M, Yamamoto Y, Harada K, Kaneko S, Oyadomari S, Ozaki M, Kasuga M, Inoue H.	Hepatology.	61 (4) : 1343-56	2015
---	--	-------------	------------------	------

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
脂肪肝合併2型糖尿病の病態における肝臓の脂肪酸合成酵素の役割の解明	八木孝, 酒井真志人, 辻村-早川知子, 矢野宏行, 満島勝, 長島洋二, 南史郎, 春日雅人, 松本道宏	第27回分子糖尿病学シンポジウム	東京	2015年12月
GCN5-CITED2-PKAモジュールを介した肝糖新生制御メカニズム	松本道宏, 酒井真志人	第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会ワークショップ	神戸	2015年12月
肝臓における糖代謝調節の分子機構	松本道宏, 酒井真志人, 八木孝	第2回肝臓と糖尿病・代謝研究会シンポジウム	下関	2015年5月
肝臓における代謝調節作用とその障害の分子機構の解明-新規糖尿病治療薬の開発を目指して-	松本道宏	第52回日本臨床分子医学会学術集会(学会賞受賞講演)	京都	2015年4月
CITED2-GCN5 複合体による肝糖新生調節機構の解明	酒井真志人, 辻村-早川知子, 山地大介, 八木孝, 満島勝, 矢野宏行, 春日雅人, 松本道宏	第26回分子糖尿病学シンポジウム	高知	2014年12月
ヒストンアセチル化酵素GCN5はCITED2依存的に基質指向性を変化させ肝臓の糖新生を制御する	松本道宏, 酒井真志人	第37回日本分子生物学会ワークショップ	東京	2014年11月
ヒストンアセチル化酵素GCN5による肝臓の糖新生調節機構の解明	酒井真志人, 辻村-早川知子, 山地大介, 八木孝, 矢野宏行, 満島勝, 春日雅人, 松本道宏	第29回日本糖尿病合併症学会ワークショップ	東京	2014年10月
肝臓特異的な脂肪酸合成酵素の欠損はob/obマウスの脂肪肝と耐糖能を改善するが随時高血糖を惹起する	八木孝, 酒井真志人, 内田亨, 辻村-早川知子, 山地大介, 矢野宏行, 満島勝, 長嶋洋治, 南史郎, 春日雅人, 松本道宏	第29回日本糖尿病合併症学会ワークショップ	東京	2014年10月
CITED2-GCN5複合体による肝糖新生調節機構	松本道宏, 酒井真志人, 春日雅人	第14回日本蛋白質科学会年会ワークショップ	横浜	2014年6月

研究発表及び特許取得報告について

CITED2-GCN5複合体による肝糖新生調節機構の解明	酒井真志人, 春日雅人, 松本道宏	第87回日本内分泌学会学術総会若手研究者シンポジウム	福岡	2014年4月
肝臓における代謝調節の分子メカニズムの解明ー糖尿病・NAFLDの治療をめざしてー	松本道宏	Treatment Strategy of Diabetes in Chiba	千葉	2016年2月
肝臓における新たな糖代謝調節メカニズム	松本道宏	新学術創成研究機構セミナー	金沢	2016年1月
肝臓における代謝調節とその破綻の分子機構ー肝糖新生亢進と脂肪肝を中心にー	松本道宏	The 14th Meeting of Cardiovascular Research Conference,	東京	2015年11月
絶食応答性エピゲノム修飾酵素による代謝調節機構の解明	松本道宏, 酒井真志人	新学術領域研究 平成27年転写代謝システム班会議	熊本	2015年6月
CITED2-GCN5複合体を介して糖新生制御機構の解明	松本道宏	自然科学研究機構生理学研究所研究会	岡崎(名古屋)	2014年9月
2型糖尿病の肝代謝障害の分子機構～脂肪肝と糖新生亢進を中心に～	松本道宏	4th Annual Diabetes Conferences for Clinicians by Clinicians (DCCC)	東京	2014年7月
過栄養による脂肪肝・糖尿病における肝臓の de novo lipogenesis 亢進の病態生理学的意義の検討	八木孝, 酒井真志人, 辻村-早川知子, 山地大介, 春日雅人, 松本道宏	第1回肝臓と糖尿病・代謝研究会	東京	2014年7月
インスリン抵抗性による肝代謝障害の分子機構-肝糖新生と脂肪肝を中心に-	松本道宏	The 9th Atherosclerosis & Cardiovascular Research Conference	東京	2014年5月
CITED2結合性キナーゼDyrk1による肝糖新生制御機構の解析	満島勝, 酒井真志人, 辻村-早川知子, 八木孝, 矢野宏行, 長沼孝雄, 飯田智, 高峰英, 春日雅人, 松本道宏	第30回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会(若手研究奨励賞審査)	大宮	2016年3月
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, 酒井真志人, 満島勝, 辻村-早川知子, 八木孝, 矢野宏行, 長沼孝雄, 飯田智, 高峰英, 春日雅人	第30回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会	大宮	2016年3月
肝臓特異的な脂肪酸合成酵素の欠損は食餌誘導性非アルコール性脂肪肝の進展を抑制する	八木孝, 酒井真志人, 辻村-早川知子, 満島勝, 矢野宏行, 飯田智, 長沼孝雄, 高峰英, 長嶋洋治, 南史朗, 春日雅人, 松本道宏	第30回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会	大宮	2016年3月

研究発表及び特許取得報告について

肝臓特異的な脂肪酸合成酵素の欠損は食餌誘導性非アルコール性脂肪肝炎の進展を抑制する	八木孝, 酒井真志人, 辻村-早川知子, 満島勝, 矢野宏行, 飯田智, 長沼孝雄, 高峰英, 南史朗, 春日雅人, 松本道宏	第19回日本病態栄養学会年次学術集会	横浜	2016年1月
CITED2-GCN5複合体による肝糖新生調節機構の解明	酒井真志人, 辻村-早川知子, 山地大介, 八木孝, 満島勝, 矢野宏行, 春日雅人, 松本道宏	第58回日本糖尿病学会年次学術集会	下関	2015年5月
転写調節分子CITED2は癌抑制遺伝子産物Rbの不活化を介して前駆脂肪細胞の増殖を誘導し脂肪細胞分化を促進する	松本道宏, 早川-辻村知子, 酒井真志人, 山地大介, 八木孝, 矢野宏行, 満島勝, 南史朗, 春日雅人	第58回日本糖尿病学会年次学術集会	下関	2015年5月
肝臓特異的な脂肪酸合成酵素の欠損はob/obマウスの脂肪肝と耐糖能を改善するが随時高血糖を惹起する	八木孝, 酒井真志人, 辻村-早川知子, 山地大介, 矢野宏行, 満島勝, 内田亨, 長嶋洋治, 南史朗, 春日雅人, 松本道宏	第58回日本糖尿病学会年次学術集会	下関	2015年5月
CITED2-GCN5複合体による肝糖新生調節機構の解明	酒井真志人, 辻村-早川知子, 山地大介, 八木孝, 満島勝, 矢野宏行, 春日雅人, 松本道宏	第88回日本内分泌学会学術総会	東京	2015年4月
肝臓特異的な脂肪酸合成酵素の欠損はob/obマウスの脂肪肝と耐糖能を改善するが随時高血糖を惹起する	八木孝, 酒井真志人, 辻村-早川知子, 山地大介, 矢野宏行, 満島勝, 内田亨, 長嶋洋治, 南史朗, 春日雅人, 松本道宏	第88回日本内分泌学会学術総会(若手研究奨励賞(YIA)審査口演)	東京	2015年4月
肝臓特異的な脂肪酸合成酵素の欠損はob/obマウスの脂肪肝と耐糖能を改善するが随時高血糖を惹起する	八木孝, 酒井真志人, 内田亨, 辻村-早川知子, 山地大介, 矢野宏行, 満島勝, 長嶋洋治, 南史朗, 春日雅人, 松本道宏	第52回日本臨床分子医学会学術集会	京都	2015年4月
CITED2-GCN5複合体による肝糖新生制御機構の解明	酒井真志人, 辻村-早川知子, 山地大介, 八木孝, 満島勝, 矢野宏行, 春日雅人, 松本道宏	第52回日本臨床分子医学会学術集会	京都	2015年4月

研究発表及び特許取得報告について

肝臓特異的な脂肪酸合成酵素の欠損はob/obマウスの脂肪肝と耐糖能を改善するが随時高血糖を惹起する	八木孝, 酒井真志人, 辻村-早川知子, 山地大介, 矢野宏行, 満島勝, 内田亨, 長嶋洋治, 南史郎, 春日雅人, 松本道宏	第29回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会 (若手研究奨励賞審査)	京都	2015年2月
CITED2-GCN5 複合体による肝糖新生調節機構の解明	酒井真志人, 辻村-早川知子, 山地大介, 八木孝, 満島勝, 矢野宏行, 春日雅人, 松本道宏	: 第29回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会	京都	2015年2月
転写調節分子CITED2は癌抑制遺伝子産物Rbの不活化による前駆脂肪細胞の増殖を誘導し脂肪細胞分化を促進する	辻村-早川知子, 酒井真志人, 山地大介, 八木孝, 矢野宏行, 満島勝, 春日雅人, 松本道宏	第29回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会	京都	2015年2月
肝臓特異的な脂肪酸合成酵素の欠損はob/obマウスの脂肪肝と耐糖能を改善するが随時高血糖を惹起する	八木孝, 酒井真志人, 内田亨, 辻村-早川知子, 山地大介, 矢野宏行, 満島勝, 長嶋洋治, 南史郎, 春日雅人, 松本道宏	第18回日本病態栄養年次学術集会	京都	2015年1月
肝臓特異的な脂肪酸合成酵素の欠損はob/obマウスの脂肪肝と耐糖能を改善するが随時高血糖を惹起する	八木孝, 酒井真志人, 内田亨, 辻村-早川知子, 山地大介, 矢野宏行, 満島勝, 長嶋洋治, 南史郎, 春日雅人, 松本道宏	第35回日本肥満学会 (YIAプレゼンテーション)	宮崎	2014年10月
転写調節分子CITED2は癌抑制遺伝子産物Rbの機能調節を介して脂肪細胞分化を制御する	松本道宏, 早川-辻村知子, 酒井真志人, 山地大介, 八木孝, 矢野宏行, 満島勝, 井上啓, 南史郎, 春日雅人	第35回日本肥満学会	宮崎	2014年10月
Gadd34は脂肪肝での肝再生障害を改善する	稲葉有香, 松本道宏, 春日雅人, 井上啓	第35回日本肥満学会 (YIAプレゼンテーション)	宮崎	2014年10月
転写調節分子CITED2は癌抑制遺伝子産物Rbの不活化による前駆脂肪細胞の増殖を誘導し脂肪細胞分化を促進する	辻村知子, 酒井真志人, 山地大介, 八木孝, 矢野宏行, 井上啓, 南史郎, 春日雅人, 松本道宏	第19回アディポサイエンスシンポジウム	大阪	2014年8月
肝臓特異的な脂肪酸合成酵素の欠損はob/obマウスの脂肪肝と耐糖能を改善するが随時高血糖を惹起する	八木孝, 酒井真志人, 内田亨, 辻村-早川知子, 山地大介, 矢野宏行, 満島勝, 長嶋洋治, 南史郎, 松本道宏	第19回アディポサイエンスシンポジウム	大阪	2014年8月

研究発表及び特許取得報告について

転写調節分子CITED2は癌抑制遺伝子産物Rbの機能調節を介して脂肪細胞分化を制御する	松本道宏, 辻村知子, 酒井真志人, 山地大介, 八木孝, 井上啓, 春日雅人	第57回日本糖尿病学会年次学術集会	大阪	2014年5月
脂肪酸合成酵素FASの脂肪肝・インスリン抵抗性における機能の解析	八木孝, 酒井真志人, 辻村-早川知子, 山地大介, 内田亨, 楢谷三四郎, 井上啓, 春日雅人, 南史郎, 松本道宏	第57回日本糖尿病学会年次学術集会	大阪	2014年5月
ヒストンアセチル化酵素GCN5による肝臓の糖新生調節機構の解明	酒井真志人, 辻村-早川知子, 山地大介, 八木孝, 春日雅人, 松本道宏	第57回日本糖尿病学会年次学術集会	大阪	2014年5月
ヒストンアセチル化酵素GCN5による肝臓の糖新生調節機構の解明	酒井真志人, 辻村-早川知子, 山地大介, 八木孝, 春日雅人, 松本道宏	第51回日本臨床分子医学会学術集会	東京	2014年4月
肝臓の脂肪酸合成酵素は肥満・糖尿病の病態において肝脂肪蓄積の促進と高血糖の抑制に寄与する	八木孝, 酒井真志人, 辻村-早川知子, 山地大介, 内田亨, 楢谷三四郎, 春日雅人, 南史郎, 松本道宏	第51回日本臨床分子医学会学術集会	東京	2014年4月
The GCN5-CITED2-PKA module controls glucose metabolism via a cAMP-induced substrate switch	Sakai M, Kasuga M, Matsumoto M.	Keystone Symposia, Diabetes: New Insights into Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies	Kyoto	2015年10月
The transcriptional coregulator CITED2 regulates adipocyte differentiation by interacting with retinoblastoma protein.	Matsumoto M, Tsujimura-Hayakawa T, Sakai M, Yamaji D, Mitsushima M, Yagi T, Yano H, Kasuga M	The 8th Asia-Oceania Conference on Obesity	Nagoya	2015年10月
The histone acetyltransferase GCN5 regulates hepatic gluconeogenesis through CITED2-dependent substrate switch	Mashito Sakai M, Kasuga M, Matsumoto M.	The 8th Asia-Oceania Conference on Obesity	Nagoya	2015年10月
The transcriptional coregulator CITED2 regulates adipose tissue mass by enhancing preadipocyte proliferation and PPAR γ expression through Rb inactivation.	Matsumoto M.	The 46th NIPS International Symposium	Nagoya	2015年10月
Transcriptional coregulator CITED2 stimulates adipogenesis by enhancing preadipocyte proliferation and PPAR γ expression through Rb inactivation.	Matsumoto M.	International Symposium for the Study of Obesity	Miyazaki	2014年10月

研究発表及び特許取得報告について

Histone acetyltransferase GCN5 regulates hepatic gluconeogenesis through CITED2-dependent substrate switch	Sakai M, Kasuga M, Matsumoto M.	9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabertes and Atherosclerosis Congress	Kyoto	2014年9月
The transcriptional coregulator CITED2 regulates adipocyte differentiation by interacting with retinoblastoma protein	Matsumoto M, Hayakawa T, Sakai M, Yamaji D, Yagi T, Yano H, Mitsushima M, Kasuga M	9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabertes and Atherosclerosis Congress	Kyoto	2014年9月

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。