

金田博夫研究助成基金
研 究 成 果 報 告 書
（第4版）

一般財団法人サンスター財団
2024 年 1 月

目 次

研究報告

1 医師 長尾 博文P03

大阪大学大学院医学系研究科 内分泌・代謝内科学

2 医学博士 小塚 智沙代.....P10

琉球大学大学院 医学研究科 内分泌代謝・血液・膠原病内科学講座

(第二内科)

選考委員一覧P16

受給者一覧P17

研究報告

1

医師 **長尾 博文**

大阪大学大学院医学系研究科

2

医学博士 **小塚 智沙代**

琉球大学大学院 医学研究科

インスリン受容体シグナル伝達機構の特異性とリガンド非占拠下での意義の解明

長尾 博文

申請時：大阪大学大学院医学系研究科 内分泌・代謝内科学

現在：大阪大学大学院医学系研究科 代謝血管学寄附講座

要旨

インスリン受容体(IR)と IGF-1 受容体(IGF1R)は非常に相同性が高く、類似のシグナル伝達系を共有しているが、IR は主に代謝恒常性を調節し、IGF1R は主に増殖シグナルを調節していることが、これまでの数多くの研究で示されている。両受容体シグナル伝達機構の違いとそのメカニズムの解明は、肥満や糖尿病などの病態の詳細やそれらに対するアプローチに繋がるため積年の課題である。まず細胞工学的手法とリン酸化プロテオミクスを組み合わせ、IR と IGF1R による詳細なシグナル伝達様式の違いを明らかにした。さらに IR における細胞内 juxtamembrane 領域の Leucine-973 が、IR と IGF1R のシグナル伝達の主要な相違を規定する重要なアミノ酸残基であることを、*in vitro* と *in vivo* の双方で明らかにした。さらに、IR の細胞内シグナル伝達の詳細な検討を行う中で、リガンド作用下での細胞内シグナル伝達経路に加え、リガンド非占拠下での受容体の役割（アポトーシス感受性の制御や細胞老化制御）が示唆された。

内容

■ 本研究の背景

IR は IGF1R と高い相同性を有し、下流のシグナル伝達の多くを共有し相補的に作用している。IR は主に代謝恒常性(PI3K/Akt)を調節し、IGF1R は主に増殖シグナル(Shc/MAPK)を調節していることが、これまでの数多くの研究で示されている^{1,2}。両受容体の発現量は種々の臓器・細胞種によって異なり、肥満や慢性炎症などの病態によっても変化しうる。肥満・内臓脂肪蓄積状態では各種臓器において、IR の代謝調節に関わるシグナルが減弱するインスリン抵抗性が引き起こされ、高血糖や糖尿病に繋がる一方で、高血糖は成長・増殖シグナル活性化を介して血管障害や糖尿病合併症の進展に結びついていることが知られており、両受容体シグナル伝達様式の違いとそのメカニズムの解明は、肥満や糖尿病などの病態の詳細やそれに対するアプローチに繋がるため積年の課題である。また IR・IGF1R シグナルは癌の発症や進展にも密接に関係しており、各々の受容体特異的シグナル伝達経路の解明は、肥満・糖尿病のみならず癌領域においてもその複雑な病態を理解する上で重要である。

IR・IGF1R の juxtamembrane 領域内の NPEY モチーフは、IRS-1 や Shc 等の主要なアダプタータンパク質のリクルートに必須であるが³、派遣先研究室では、ヒト IR の Leucine-973 を IGF1R 配列と同様の phenylalanine に置換すると(L973F-IR)、インスリン作用下で細胞増殖シグナル優勢

(IRS-1 のリン酸化が低下する一方で、Shc のリン酸化が亢進する) に変化することを見出している⁴。この IR-Leucine-973 が両受容体におけるシグナル伝達の違いに大きく寄与している可能性がある。

また、派遣先研究室ではこれまでに、IR 及び IGF1R をダブルでノックアウトしたマウスから作製した前駆脂肪細胞株を用い、ダブルノックアウト細胞では野生型と比しアポトーシス耐性になること⁵や、様々なインプリント遺伝子の発現が著減すること⁶を報告してきた。これらはリガンド非存在下の培養条件でも観察され、チロシナーゼ活性に依存しない受容体シグナルとその機能の存在が想定された。インスリン作用による IR とその下流のシグナル伝達は、様々な臓器・細胞において広範に解明されているが、このリガンドが結合していない“Unoccupied state”における IR の役割・意義についてはほとんど解明されておらず、糖尿病を含む代謝疾患研究において新たな観点をもたらす可能性がある。

■ 本研究の目的

IR と IGF1R による詳細なシグナル伝達様式の違いを明らかにする。さらに IR における juxtamembrane 領域の Leucine-973 が、IR と IGF1R のシグナル伝達の主要な相違を規定している可能性があり、詳細なシグナル伝達変化とその意義を *in vitro* と *in vivo* の双方のモデルで検証する。また、リガンド刺激下での IR シグナル伝達経路のみならず、リガンド非占拠性の IR シグナルとその役割について明らかにする。

■ 本研究の成果

① IR 及び IGF1R 特異的シグナル伝達経路の解明

IR と IGF1R による詳細なシグナル伝達様式の違いを明らかにするため、IR 及び IGF1R をダブルノックアウトしたマウス前駆脂肪細胞株(DKO)に、IR、IGF1R、IR の細胞外ドメインと IGF1R の細胞内ドメインをもつキメラ受容体 (IR_IGF1R)、IGF1R の細胞外ドメインと IR の細胞内ドメインをもつキメラ受容体 (IGF1R_IR) を安定発現させた細胞株を作製した(図 1)。これらを用いることで、IR と IGF1R 及びそれらのリガンドによる相補的な相互作用がない、純粋な実験系で検討を行った。インスリン (IR と IR_IGF1R に対し)と IGF-1 (IGF1R と IGF1R_IR に対し)による刺激の有無で、包括的なリン酸化プロテオミクスを施行したところ、リガンド存在下における、IR と IGF1R に共通するシグナル伝達経路及び、受容体特異的なシグナル伝達経路が明らかとなった。IR でよりリン酸化レベルが高いリン酸化サイトの解析により、mTORC1 シグナルや PI3K/Akt シグナルといった代謝経路が IR で IGF1R に比し亢進していた。また IGF1R でよりリン酸化レベルが

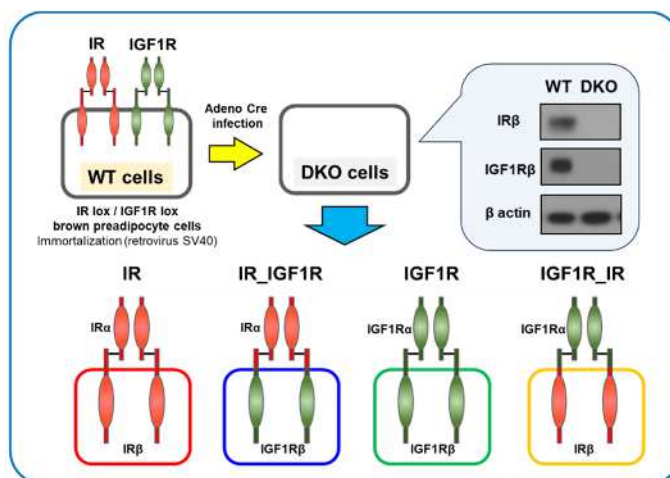


図1. IR、IGF1R及びキメラ受容体(IR_IGF1R及びIGF1R_IR)発現細胞の作製

高いリン酸化サイトの解析により、細胞周期や有糸分裂、Rho-GTPases などの細胞増殖シグナルが IGF1R で亢進していることを見出した。

また、キメラ受容体 (IR_IGF1R 及び IGF1R_IR) の解析を追加することで、これらの受容体特異的なシグナル伝達経路が、細胞外ドメインと細胞内ドメインのどちらに依存しているのかを詳細に解析した。IR 及び IGF1R 特異的なシグナル伝達経路は大部分が細胞内ドメインに依存しているが、一部細胞外ドメインを介していることが明らかとなった。

② IR における Leucine-973 は IGF1R とのシグナル伝達の主要な違いを規定するアミノ酸残基である

続いて、IR における細胞内 juxtamembrane 領域の Leucine-973 が、IR と IGF1R のシグナル伝達の主要な相違を規定している可能性を先行研究で見出し⁴、IR の Leucine-973 を IGF1R 配列と同様の phenylalanine に置換し (L973F-IR)、詳細なシグナル伝達変化とその意義を *in vitro* と *in vivo* の双方のモデルで検討した。*in vitro* においては、IR 及び IGF1R をダブルノックアウトしたマウス前駆脂肪細胞 (DKO) に、野生型ヒト IR (WT-IR) あるいは L973F-IR を安定発現させた細胞株 (L973F-IR) を樹立した (図 2)。これらを用いてインスリン刺激下でのシグナル伝達をウェスタンブロット法で検討したところ、WT-IR に比し L973F-IR 細胞では、IRS-1、Akt 及び mTOR のリン酸化が低下し、一方で Shc や Gab-1 のリン酸化が著明に亢進していた。つまり、IR の L973F 変異はインスリン作用下で代謝シグナルが減弱し細胞増殖シグナル優勢 (IGF1R 様) に変化をもたらした。さらに、L973F-IR 細胞はインスリン刺激下での Glycolysis の低下、グルコース取り込みの低下、そして細胞増殖速度の亢進を認めた。リン酸化プロテオーム解析では、L973F-IR 細胞でリガンド刺激下において、IRS-1/PI3 キナーゼ/Akt/mTOR 経路の障害、そして Shc/MAPK シグナル及び細胞周期関連蛋白のリン酸化亢進がみられた。

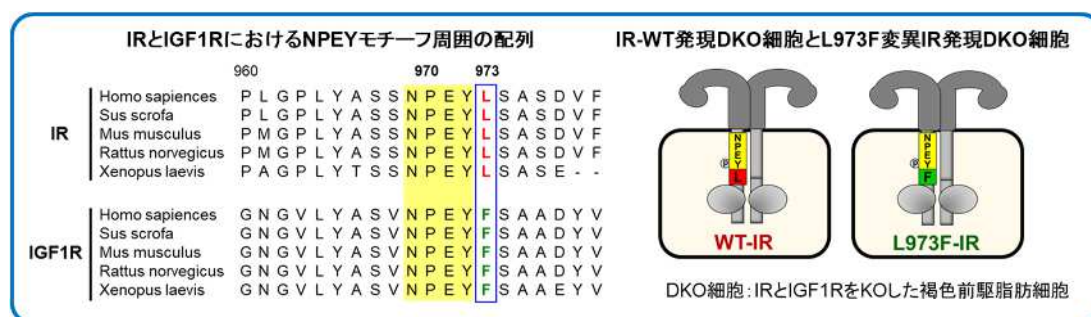


図2. IRとIGF1RにおけるNPEYモチーフ周囲の配列とL973F変異IR発現細胞の作製

続いて L973F-IR 変異ホモ接合体ノックインマウス (L973F-IR マウス) を作製し (図 3)、*in vivo* での影響について解析を行った。L973F-IR マウスは野生型マウスと比し、通常食下で血糖値や体重に変化はみられなかったが、グルコース負荷試験において軽度の耐糖能障害、インスリン負荷試験においてインスリン感受性の低下を認めた。下大静脈からインスリンを投与し、各組織におけるインスリン下流シグナルを評価したところ、*in vitro* での結果と同様に、IRS-1 や Akt のリン酸化が低下し、一方で Shc の

リン酸化が著明に亢進していた。L973F-IR マウスでは、肝臓でのコレステロール含量及び血中コレステロール量の低下を認めた。また、高脂肪食負荷による体重増加が L973F-IR マウスで低下しており、皮下白色脂肪組織の有意な重量低下と肝重量の低下を認めた。両群間で摂餌量には変化はみられず、インスリンシグナルの（代謝面での）障害に基づくものと考えられた。以上より、IR における Leucine-973 は、IR と IGF1R とのシグナル伝達の違いを特徴づける重要なアミノ酸残基であると考えられた(図 4)。

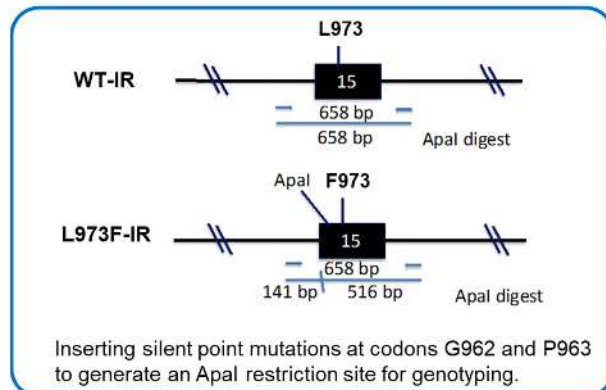


図3. L973F変異IRノックインマウスの作製

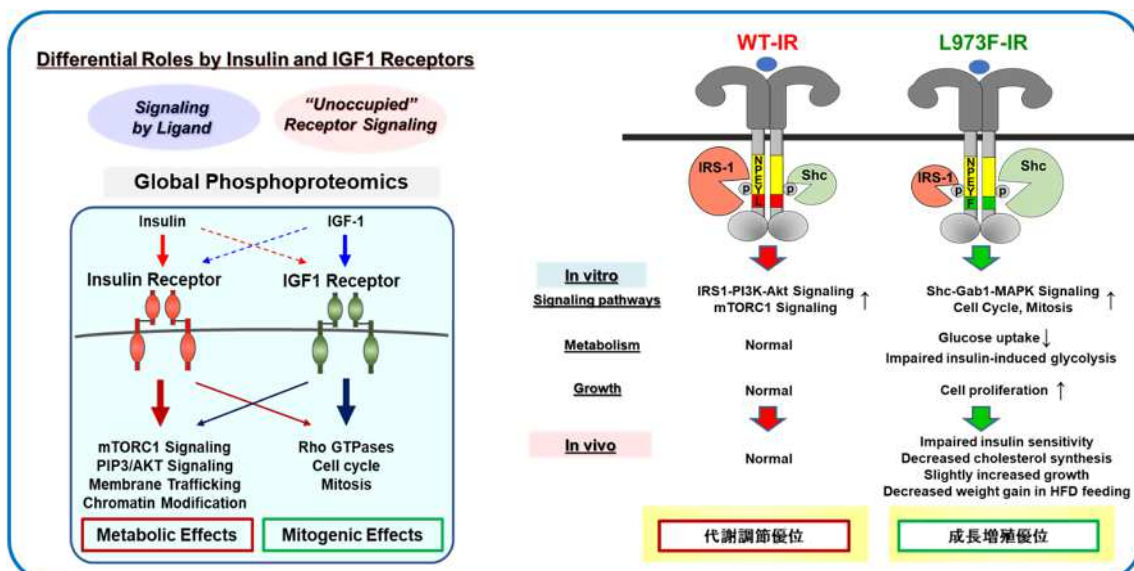


図4. IRとIGF1Rによるシグナル伝達様式の違い(左)とIR-WTとL973F変異IRでの代謝・増殖調節の変化(右)

③ “Unoccupied state”におけるインスリン受容体の役割・意義

最後に、リガンド刺激下での IR シグナル伝達経路に加えて、リガンド非占拠性の IR シグナルとその役割について検討を行った。DKO 細胞に、野生型ヒト IR(WT-IR)、kinase-dead IR(K1030R 変異)、ΔCT-IR(C 末端なし)、JMO-IR(チロシンキナーゼ領域と C 末端なし)を安定発現させた細胞株を作製した。これらの細胞を用いてインスリンによる刺激の有無(100nM で 15 分)でリン酸化プロテオーム解析を行い、従来から明らかとなっているインスリン刺激下での IR のチロシンキナーゼ活性に基づくシグナル伝達経路に加え、リガンドとチロシンキナーゼ活性非依存性のシグナルネットワークを見出した。その多くは IR(WT-IR)、K1030R 変異 IR 及びΔCT-IR によって同様に引き起こされ、C 末端を除く IR の細胞内ドメインがこれらの変化に関わっていると考えられた。具体的には、IR(WT-IR)、K1030R 変異 IR 及びΔCT-IR 発現細胞で、DKO や JMO-IR 発現細胞と比し、細胞と細胞外マトリックス相互作用に関連するタンパク質リン酸化の増加、JAK/STAT/インターフェロニンシグナルの低下、ATM シグナルの低下、

細胞周期関連のタンパク質リン酸化低下がみられた。これらのシグナルネットワークの多くは、プロテオーム解析に基づく各々のタンパク質量で補正しても保持されていた。

また、同様の条件下でプロテオーム解析及びトランスクリプトーム解析を行ったところ、リガンド非刺激下での細胞株間のタンパク質・遺伝子発現の変化の大部分が IR(WT-IR)、K1030R 変異 IR 及び Δ CT-IR によって同様に引き起こされていた。プロテオーム解析では、IR(WT-IR)、K1030R 変異 IR 及び Δ CT-IR 発現細胞で、DKO や JMO-IR 発現細胞と比し、コラーゲンを含む細胞外マトリックス蛋白の増加、JAK/STAT/インターフェロニンシグナルに関連する免疫システム関連蛋白の減少がみられ(NF- κ B シグナル含む)、これらの変化の 70-80%は mRNA 発現の変化を伴っていた。またトランスクリプトーム解析では、これらの遺伝子発現変化に加え、SASP 関連遺伝子の発現が DKO や JMO-IR 発現細胞に比較し、IR(WT-IR)、K1030R 変異 IR 及び Δ CT-IR 発現細胞で低下していることを見出した。

IR(WT-IR)、K1030R 変異 IR 及び Δ CT-IR 発現細胞では、DKO や JMO-IR 発現細胞と比し、細胞増殖が亢進していた。さらに、各種刺激下によるアポトーシス感受性、細胞生存率を検討したところ、興味深いことに、IR(WT-IR)、

K1030R 変異 IR 及び Δ CT-IR の再発現によりアポトーシス感受性が回復したが、JMO-IR の再発現ではほぼ回復はみられなかった。SASP 関連遺伝子の発現が IR(WT-IR)、K1030R 変異 IR 及び Δ CT-IR 発現細胞と比し、DKO や JMO-IR 発現細胞で増加を示していることも含め、IR の細胞内ドメインが細胞老化のフェノタイプを抑制しているものと考えられた。以上より、リガンド非占拠下での IR の役割（アポトーシス感受性の制御や細胞老化制御）が示唆された(図 5)。

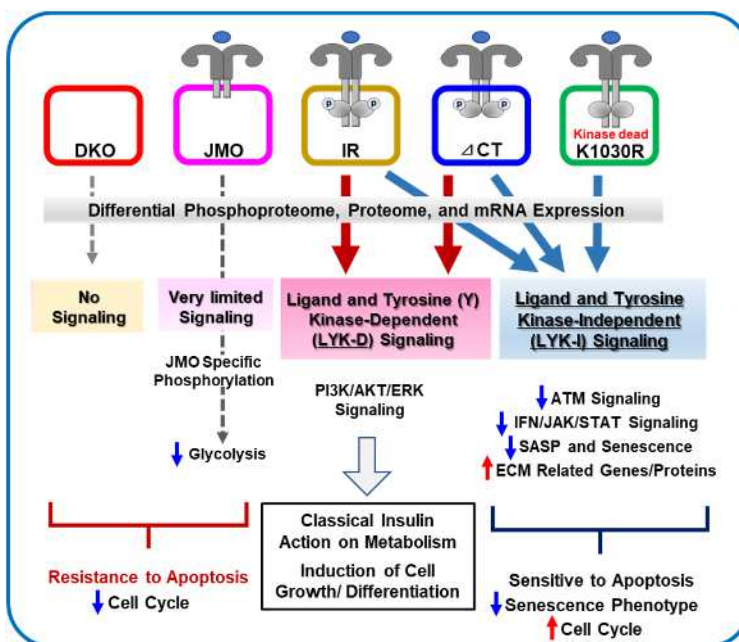


図5. リガンド占拠・非占拠下でのインスリン受容体の役割予想図

引用文献

1. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014;6(1):a00919.
2. White MF, Kahn CR. Insulin action at a molecular level — 100 years of progress. Mol Metab. 2021;52:101304.

3. He W, O'Neill TJ, Gustafson TA. Distinct modes of interaction of SHC and insulin receptor substrate-1 with the insulin receptor NPEY region via non-SH2 domains. *J Biol Chem*. 1995;270(40):23258–23262.
4. Cai W, Sakaguchi M, Kleinridders A, Gonzalez-Del Pino G, Dreyfuss JM, O'Neill BT, Ramirez AK, Pan H, Winnay JN, Boucher J, Eck MJ, Kahn CR. Domain-dependent effects of insulin and IGF-1 receptors on signalling and gene expression. *Nat Commun*. 2017;8:14892.
5. Boucher J, Macotela Y, Bezy O, Mori MA, Kriauciunas K, Kahn CR. A kinase-independent role for unoccupied insulin and IGF-1 receptors in the control of apoptosis. *Sci Signal*. 2010;3(151):ra87.
6. Boucher J, Charalambous M, Zarse K, Mori MA, Kleinridders A, Ristow M, Ferguson-Smith AC, Kahn CR. Insulin and insulin-like growth factor 1 receptors are required for normal expression of imprinted genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(40):14512–14517.

発表業績一覧

■論文

1. **Hirofumi Nagao**, Ashok Kumar Jayavelu, Weikang Cai, Hui Pan, Jonathan M Dreyfuss, Thiago M Batista, Bruna B Brandão, Matthias Mann, C Ronald Kahn. Unique ligand and kinase-independent roles of the insulin receptor in regulation of cell cycle, senescence and apoptosis. *Nature communications* 14(1) 14:57, 2023.
2. **Hirofumi Nagao**, Weikang Cai, Bruna B Brandão, Nicolai J Wewer Albrechtsen, Martin Steger, Arijeet K Gattu, Hui Pan, Jonathan M Dreyfuss, F Thomas Wunderlich, Matthias Mann, C Ronald Kahn. Leucine-973 is a crucial residue differentiating insulin and IGF-1 receptor signaling. *The Journal of clinical investigation* 133(4): e161472, 2023.
3. **Hirofumi Nagao**, Weikang Cai, Nicolai J Wewer Albrechtsen, Martin Steger, Thiago M Batista, Hui Pan, Jonathan M Dreyfuss, Matthias Mann, C Ronald Kahn. Distinct signaling by insulin and IGF-1 receptors and their extra- and intracellular domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118(17): e2019474118, 2021.

■受賞

1. 第 96 回日本内分泌学会学術総会「愛・内分泌。」賞(優秀演題賞) 2023 年 6 月
2. ADA Presidents' Select Abstract (The American Diabetes Association's 82nd Scientific Sessions) 2022 年 6 月

■学会発表

1. **長尾 博文**, C. Ronald Kahn, 下村 伊一郎. インスリン受容体における Leucine-973 は IGF-1 受容体とのシグナル伝達の違いを規定するアミノ酸残基である 第 96 回日本内分泌学会 学術総会 2023 年 6 月
2. **Hirofumi Nagao**, Weikang Cai, Hui Pan, Thiago M Batista, Bruna B Brandão, C Ronald Kahn. Novel Ligand and Kinase-Independent Signaling by the Insulin Receptor, ADA 82nd Scientific Sessions, 223-OR, New Orleans, LA, USA, 2022 年 6 月
3. **Hirofumi Nagao**, Weikang Cai, Thiago M Batista, Hui Pan, Jonathan M Dreyfuss, C Ronald Kahn. Defining Distinct Actions of Insulin and IGF-1 Receptors and Their Extra-and Intra-Cellular Domains at the Level of the Phosphoproteome, ADA 80th Scientific Sessions, 1737-P, Chicago, IL, USA, 2020 年 6 月

FGF15/19 を介した糖代謝のエピゲノム制御

小塚 智沙代

申請時：琉球大学大学院 医学研究科 内分泌代謝・血液・膠原病内科学講座（第二内科）

現在：理化学研究所生命医科学研究センター 疾患エピゲノム遺伝研究チーム

要旨

エピゲノム修飾は環境因子によって変化する。エピゲノム異常が生活習慣・環境に起因する肥満や糖尿病の発症リスクに関与する可能性が示唆されているが、その分子メカニズムは未だほとんど分かっていない。本研究ではアセチル化ヒストンに結合して転写を制御するプロモドメイン含有タンパク質 4（Brd4）による糖代謝のエピゲノム制御について検討した。野生型のマウスに Brd4 阻害剤 JQ-1 を投与すると、高血糖と重度の耐糖能異常が生じた。このとき、インスリン感受性は個体レベルにおいても組織レベルにおいても変化しなかったが、インスリン分泌の低下を認めた。また、JQ-1 は小腸における線維芽細胞増殖因子（FGF）15（マウス型）の発現を阻害し、肝臓における FGF 受容体 4 シグナルを低下させた。このような Brd4 阻害による糖代謝異常は、FGF19（ヒト型）の過剰発現によって完全に回復し、高血糖が正常化した。そこで次にヒト腸管細胞を用いて、Brd4 が FGF19 の発現を制御するメカニズムを検討した。Brd4 が FGF19 のプロモーター領域に結合しており、JQ1 添加によって結合が阻害されることで FGF19 の発現が低下した。これらのことから、Brd4 が小腸における FGF15/19 と肝臓の FGF シグナルの新規転写制御因子であり、腸-肝連関を介して全身の糖代謝に寄与していることが明らかとなった。

内容

胎児期に受けた環境ストレスが出生後の肥満や糖尿病発症に影響していることが示され、そのメカニズムとしてエピゲノムが注目されている^{1, 2}。エピゲノムとは遺伝子発現を制御する DNA やヒストンへの後天的な化学修飾であり、環境ストレスに応答して変化する。どのようなエピゲノム修飾が胎児期につくられることで出生後の肥満や糖尿病を惹起しているのかは未だよくわかっていない。我々はこれまでに、胎児期の低栄養によって成長後に代謝疾患を発症するメカニズムに、胆汁酸-Fibronectin X receptor（FXR）-Fibroblast growth factor 15/19（FGF15/19）経路（図 1）により介在される腸-肝連関の異常が関与していることを

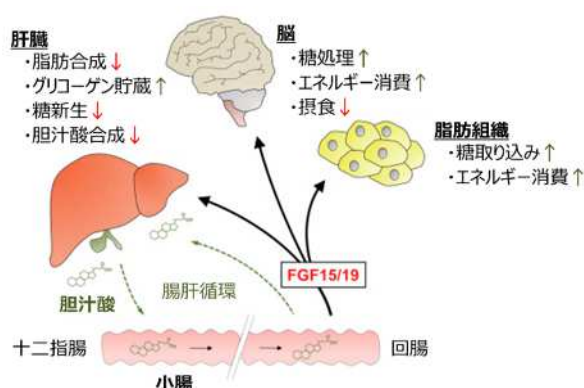


図 1 胆汁酸-Fibronectin X receptor（FXR）-Fibroblast growth factor 15/19（FGF15/19）経路

食後に肝臓や胆嚢から分泌される胆汁酸が小腸において FGF 15/19 の分泌を促す。分泌された FGF15/19 は脳・肝臓・脂肪組織に作用し、血糖低下効果を発揮する*。
引用文献4より引用改変

報告してきた³。そこで胎児期の低栄養がエピゲノム変化を介して腸-肝連関に異常を起こしているのではないかと考え、本研究では小腸において作用し、全身の糖代謝調節に関与するエピゲノム調節因子を探索した。

FGF19 の発現を制御するエピゲノム制御因子を同定するため、ヒト腸管細胞株 HT-29 細胞を用いたクロマチン免疫沈降法により FGF19 プロモーター領域への結合を調べた (図 2A)。その結果、アセチル化ヒストンに結合する転写調節因子である Bromodomain-containing protein 4 (Brd4) が FGF15/19 の発現変化を介した糖代謝の強力な調節因子であることを見出した。Brd4 が FGF19 のプロモーター領域上に結合し、Brd4 阻害剤である JQ-1 の添加により結合が阻害されると FGF19 の発現レベルも低下した (図 2B, C)。

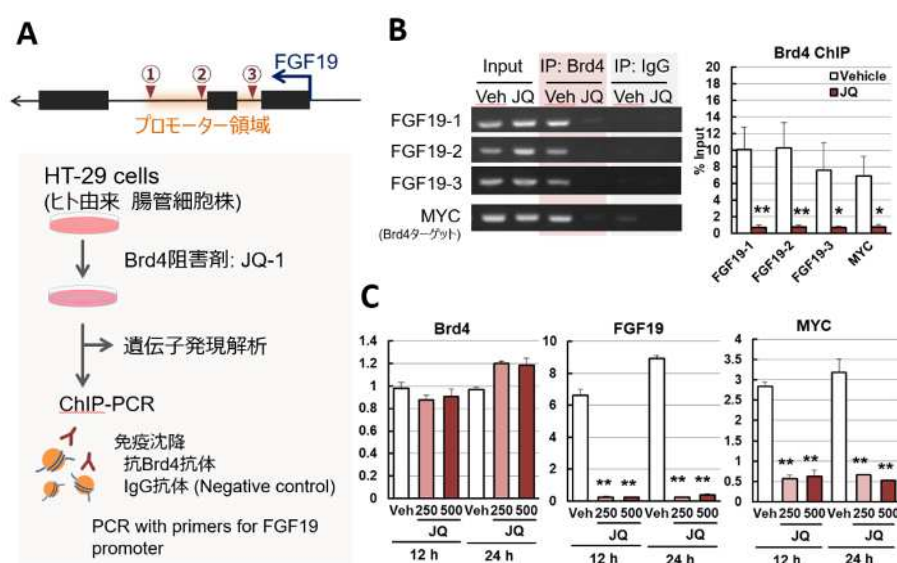


図 2 ヒト腸管細胞株 HT-29 細胞において、Brd4 は FGF19 のプロモーター領域に結合し、発現を制御する

(A) HT-29 細胞を用いたクロマチン免疫沈降。FGF19 のプロモーター領域上の 3 ヶ所にプライマーを設計し、Brd4 の結合を調べた。(B) 3 つの領域のいずれにおいても Brd4 が結合していた。Brd4 阻害剤 JQ-1 の添加により、結合は消失していた。(C) Brd4、FGF19、MYC の遺伝子発現。Brd4 の発現レベルには変化がなかったが、FGF19 の発現レベルは JQ-1 の添加により低下し、プロモーター領域への Brd4 の結合と相関していた。JQ-1 添加 250, 500 nM, 12-24h ($n = 4$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Veh)

そこで次に生体においても Brd4 が FGF15/19 の発現制御を介して糖代謝に影響しているのかを調べるため、マウスに JQ-1 を投与したところ (50mg/kg/day, ip)、高血糖や耐糖能異常を呈した (図 3A-C)。糖代謝異常が起こる機序を調べるため、インスリン感受性と膵臓からのインスリン分泌を解析した。空腹時の血中インスリン値に差はなかったが、グルコース投与後の血中インスリン値は JQ-1 投与マウスで減少した (図 3D)。JQ-1 は膵島サイズには影響を及ぼさなかったが、単離膵島からのインスリン分泌は低グルコース (2.9mmol/L) および高グルコース (20.2mmol/L) においてともに JQ-1 の添加により有意に減少した (図 3F, G)。次に、肝臓におけるグルコース代謝に対する JQ-1 の影響を調べた。JQ-1 投与マウスではグリセロール投与後の血糖上昇が亢進したことから、JQ-1 投与により糖新生が亢進していると考えられた (図 3E)。一方、グルコースクランプにより測定した肝臓におけるインスリン作用に差はなく、Akt リン酸化にも差はみられなかった。初代肝細胞においても JQ-1 の添加はインスリン刺激による Akt リン酸化に影響しなかった。これらのことから、JQ-1 はインスリンシグナ

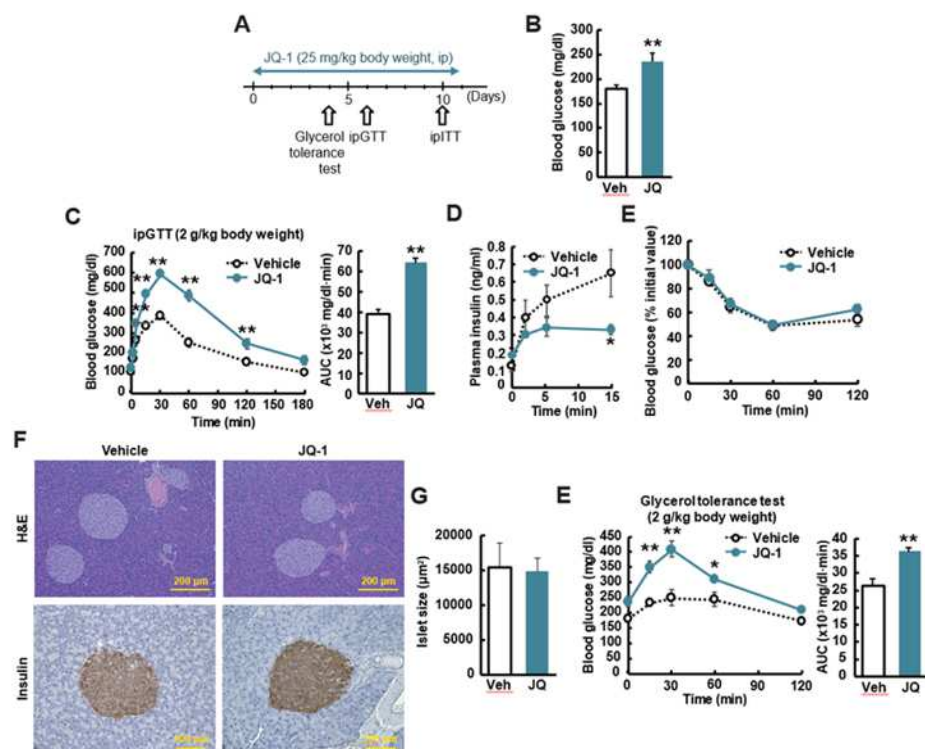


図3 マウスへの JQ-1 投与により、耐糖能異常が生じる

(A, B) JQ-1 投与開始後 4 日目から高血糖が認められたことから、4 日目以降に耐糖能、インスリン感受性を評価した。(C) JQ-1 投与により糖負荷後の血糖上昇が悪化した。(D, E) JQ-1 投与群では糖負荷後の血漿インスリン値の低下を認めた。インスリン感受性には変化がなかった。(F, G) 膵島サイズは JQ-1 の投与では変化しなかった (>100 膵島/マウス)。(H) JQ-1 投与によりグリセロール負荷後の血糖上昇が亢進した。(n = 5-6, * p < 0.05, ** p < 0.01 vs Veh)

ルとは独立した機序によって高血糖を引き起こしていると考えられた。さらに、JQ-1 を投与した時の小腸における FGF15 の遺伝子発現レベルを調べた。Brd4 は肝臓に比べて小腸において高発現しており (図 4A)、小腸が JQ-1 の主要なターゲットのひとつであると考えられる。しかし、JQ-1 の投与は小

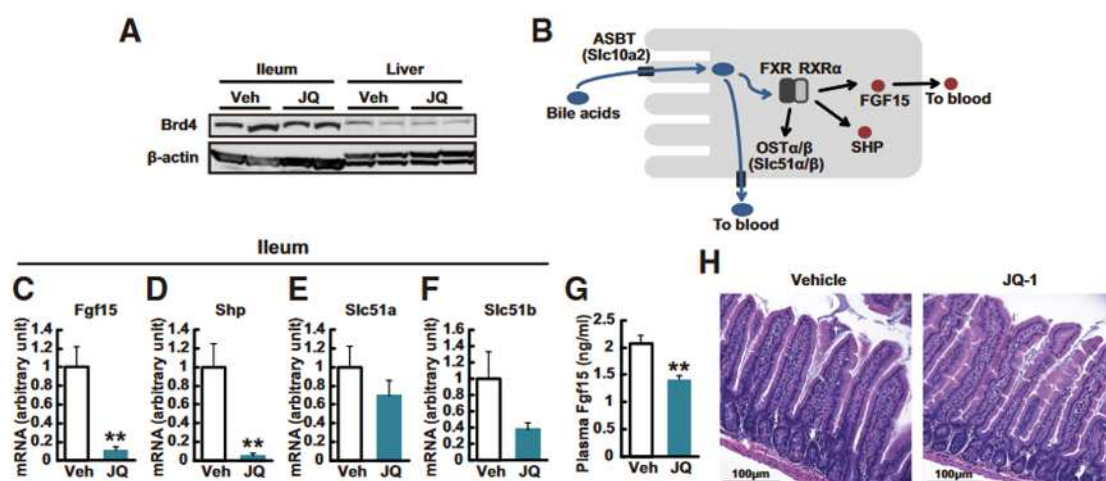


図4 JQ-1 は小腸における Fgf15 発現を減少させるが、絨毛構造は変化しない

(A) Brd4 は小腸 (ileum: 回腸) では高発現しているが、肝臓では発現が低い。JQ-1 投与は小腸、肝臓においてともに Brd4 の発現レベルには影響しない。(B) 腸管細胞における胆汁酸シグナルの模式図。(C-F) 小腸における胆汁酸シグナル伝達に関連する遺伝子のうち、Fgf15 と Shp の発現レベルのみが有意な低下を認めた。(G) 血漿中 Fgf15 値も JQ-1 の投与により低下した。(H) 小腸の絨毛構造に変化は認めなかった。(n = 5-6, ** p < 0.01 vs Veh)

腸の柔毛構造には変化を認めなかった（図 4H）。FGF15 は腸管細胞において胆汁酸をリガンドとする核内受容体 FXR により発現誘導される（図 4B）。そこで、胆汁酸/FXR 系にかかわる遺伝子の発現を調べたところ、JQ-1 投与マウスの小腸では、Fgf15 と Shp の発現レベルのみ発現低下を認めた（図 4C-F）。このとき、血中の FGF15 レベルも低下を認めた（図 4G）。

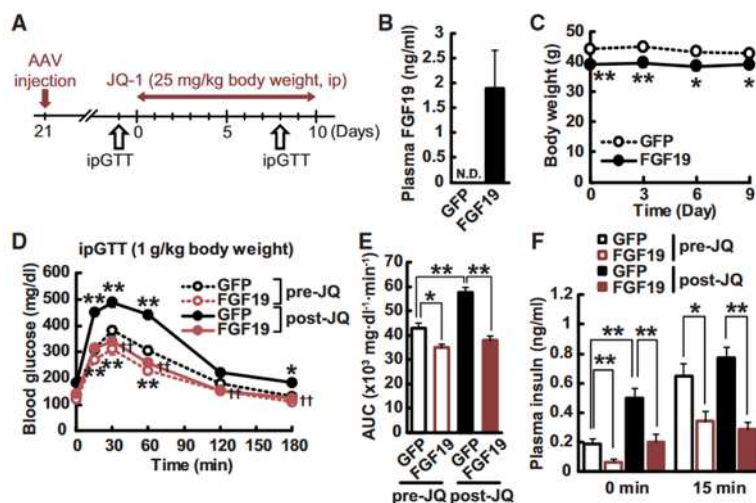


図 5 FGF19 の過剰発現により JQ-1 投与後の高血糖は改善する

(A, B) アデノ随伴ウイルスベクターによりマウスに FGF19 を遺伝子導入した。投与後 3 週間後には血漿中に FGF19 が検出された。(C) FGF19 の過剰発現により体重減少を認めたが、JQ-1 投与はコントロール群、FGF19 発現群いずれにおいても体重に影響しなかった。(D, E) コントロール群では JQ-1 投与後に耐糖能の悪化を認めたが、FGF19 発現群では JQ-1 投与後の耐糖能悪化は認められなかった。(F) FGF19 の過剰発現によりインスリン分泌の低下を認め、インスリン感受性の改善が示唆された。JQ-1 の投与は空腹時のインスリン分泌を上昇させていたが、グルコース投与後のインスリン分泌には影響しなかった。(n = 5-6, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs GFP_pre-JQ, ++ $p < 0.01$ vs FGF19_pre-JQ)

最後に JQ-1 投与による糖代謝異常が FGF15/19 を補充することで改善するのかを調べるため、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて FGF19 を遺伝子導入したマウスに JQ-1 (50mg/kg/day, ip) を投与し、耐糖能を評価した（図 5）。JQ-1 はコントロール群（AAV-GFP）において、投与開始 4 日後から血糖値を上昇させたが、FGF19 発現群（AAV-FGF19）では血糖値の変化は観察されなかった。10 日目にグルコース負荷試験を行ったところ、コントロール群においては JQ-1 投与により耐糖能異常がみられたが、FGF19 発現群では JQ-1 投与による耐糖能異常はみられなかった（図 5D, E）。以上のことから、エピゲノム制御に関わる Brd4 は小腸における FGF15/19 の新しい転写調節因子であり、FGF15/19 の発現変化を介して肝臓および全身の糖代謝調節に関与することが明らかになった。今後は胎児期の母体環境が糖尿病発症リスクを上昇させるメカニズムへの関与を検討していきたい。

引用文献

1. Roseboom T, de Rooij S, Painter R. The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. *Early Hum Dev.* 2006;82(8):485-91.

2. Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, et al. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(44):17046-9.
3. Ma H, Sales VM, Wolf AR, Subramanian S, Matthews TJ, Chen M, et al. Attenuated Effects of Bile Acids on Glucose Metabolism and Insulin Sensitivity in a Male Mouse Model of Prenatal Undernutrition. *Endocrinology*. 2017;158(8):2441-52.
4. Jahn D, Rau M, Hermanns HM, Geier A. Mechanisms of enterohepatic fibroblast growth factor 15/19 signaling in health and disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015;26(6):625-35.

発表業績一覧

■論文

1. **Kozuka C**, Sales V, Osataphan S, Yuchi Y, Chimene-Weiss J, Mulla C, Isganaitis E, Desmond J, Sanechika S, Kusuyama J, Goodyear L, Shi X, Gerszten RE, Patti ME. Bromodomain inhibition reveals FGF15/19 as a target of epigenetic regulation and metabolic control. *Diabetes* 71:1023-1033, 2022.
2. Grizales AM, Patti ME, Lin AP, Beckman JA, Sahni VA, Cloutier E, Fowler KM, Dreyfuss JM, Pan H, **Kozuka C**, Lee A, Basu R, Pober DM, Gerszten RE, Goldfine AB. Metabolic Effects of Betaine: A Randomized Clinical Trial of Betaine Supplementation in Prediabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 103:3038-3049, 2018
3. Osataphan S, Macchi C, Singhal G, Chimene-Weiss J, Sales V, **Kozuka C**, Dreyfuss JM, Pan H, Tangcharoenpaisan Y, Morningstar J, Gerszten R, Patti ME. SGLT2 inhibition reprograms systemic metabolism via FGF21-dependent and -independent mechanisms. *JCI Insight* 4(5):e123130, 2019
4. Sheehan A, Goldfine A, Bajwa M, Wolfs D, **Kozuka C**, Piper J, Fowler K, Patti ME. Pramlintide for post-bariatric hypoglycaemia. *Diabetes Obes Metab* 24:1021-1028, 2022.

■学会発表

1. **Kozuka C**. A novel epigenetic mechanism whereby brown rice and its component, γ-oryzanol attenuates preference for dietary fat. The Japan-US Science Forum in Boston, Boston, USA, (November, 2017)
2. **Kozuka C**, Sales V, Yuchi Y, Osataphan S, Desmond J, Mulla C, Smith C, Qi J, Dreyfuss J, Pan H, Patti ME. Bromodomain-containing proteins play a pivotal role in glucose metabolism in mice. American Diabetes Association (ADA)

Research Symposium Epigenetics and Epigenomics: Implications for Diabetes and Obesity, Boston, USA, (November, 2017)

3. **Kozuka C**, Sales V, L. Zhou, Osataphan S, Y. Yuchi, J. Chimene-Weiss, Desmond J, Mulla C, Smith C, Qi J, Dreyfuss J, Pan H, Patti ME. Bromodomain-containing proteins regulate glucose metabolism via gut-liver FGF15/19 pathway, Keystone eSymposia on Obesity: From Cell to Patient joint with Diabetes: Many Faces of the Disease, Online, USA, (February, 2021)
4. **Kozuka C**. Bromodomain inhibition reveals FGF15/19 as a target of epigenetic regulation and metabolic control. IMS-McGill Symposium, Montréal, Canada, (September, 2022)
5. **Kozuka C**, Sales V, Yuchi Y, Osataphan S, Desmond J, Mulla C, Dreyfuss J, Pan H, Patti ME. Bromodomain-containing proteins regulate glucose metabolism via bile acid-FXR-FGF15/19 pathway. 第 92 回 日本内分泌学会学術総会, 宮城, 2019 年 5 月
6. **Kozuka C**, Sales V, Yuchi Y, Osataphan S, Chimene-Weiss J, Desmond J, Mulla C, Dreyfuss J, Pan H, Patti ME. Bromodomain-containing proteins regulate FGF15/19 and glucose metabolism. 第 40 回 日本肥満学会, 東京, 2019 年 11 月
7. **小塚智沙代**. 留学はしたほうがよい? ~留学のメリット・デメリット~. 2020 年 第 93 回 日本内分泌学会学術総会 YEC 特別企画, Online, 2020
8. **小塚智沙代**. エピゲノムを標的とした新しい肥満医療を目指して, 第 41 回 日本肥満学会, 富山・Online, 2021 年 3 月
9. **小塚智沙代**, Patti ME. エピゲノム制御因子 Brd4 は小腸における FGF15/19 の発現調節を介して糖代謝を制御する, 第 32 回分子糖尿病学シンポジウム, 岐阜・Online, 2021 年 12 月

第4版 執筆者選考時の選考委員一覧

委員長 柏木 厚典 社会医療法人 誠光会 理事長

委員（五十音順）

〃	和泉 雄一	東京医科歯科大学大学院教授
〃	稲垣 暢也	京都大学大学院医学研究科教授
〃	春日 雅人	（独）国立国際医療研究センター理事長
〃	門脇 孝	東京大学大学院医学系研究科代謝栄養病態学 （糖尿病・代謝内科）教授
〃	下村 伊一郎	大阪大学大学院医学系研究科教授
〃	村上 伸也	大阪大学大学院歯学研究科教授

※役職は選考時のものです

受給者一覧

2024.1

年度	氏名	申請時の所属	留学先 メンター	留学先
2009	水谷 幸嗣	東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 歯周病学分野	George L. King, M.D.	Joslin Diabetes Center , Harvard Medical School
	福井 健司	大阪大学大学院 医学系研究科 内分泌・代謝内科学	C. Ronald Kahn, M.D.	Joslin Diabetes Center , Harvard Medical School
2010	秋山 優	山口大学大学院医学研究科 応用理工学系学域病態制御内科学分野	Rohit N. Kulkarni, M.D., Ph.D.	Joslin Diabetes Center , Harvard Medical School
2011	片桐 さやか	東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 歯周病学分野	George L. King, M.D.	Joslin Diabetes Center , Harvard Medical School
	藤坂 志帆	富山大学附属病院 第一内科	C. Ronald Kahn, M.D.	Joslin Diabetes Center , Harvard Medical School
2012	佐竹栄一郎	浜松医科大学医学部小児科	Rohit N. Kulkarni, M.D., Ph.D.	Joslin Diabetes Center , Harvard Medical School
2013	対象者なし			
2014	四釜 洋介	徳島大学病院糖尿病対策センター	Steven E. Shoelson, M.D.	Joslin Diabetes Center , Harvard Medical School
	佐藤 真理	北海道大学大学院歯学研究科	Yu-Hua Tseng, Ph.D,	Joslin Diabetes Center , Harvard Medical School
2015	新城 尊徳	九州大学大学院歯学研究院	George L. King, M.D.	Joslin Diabetes Center , Harvard Medical School
	小塚 智沙代	琉球大学大学院医学研究科	Mary-Elizabeth Patti, M.D.	Joslin Diabetes Center , Harvard Medical School
2016	木村 友彦	川崎医科大学 糖尿病・代謝・内分泌内科学	Rohit N. Kulkarni, M.D., Ph.D.	Joslin Diabetes Center , Harvard Medical School
	楠山 譲二	鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 口腔生化学分野	Laurie Goodyear, Ph.D,	Joslin Diabetes Center , Harvard Medical School
2017	長尾 博文	大阪大学大学院医学系研究科 内分泌・代謝内科学	C. Ronald Kahn, M.D.	Joslin Diabetes Center , Harvard Medical School
	辻 忠孝	大阪大学大学院歯学研究科 口腔外科学第一教室	Yu-Hua Tseng, Ph.D,	Joslin Diabetes Center , Harvard Medical School
2018 2019	中断			
2020	鬼塚 理	九州歯科大学 口腔機能学講座歯周病学分野	George L. King, M.D.	Joslin Diabetes Center , Harvard Medical School
2021	高垣 雄太	金沢医科大学 糖尿病内分泌内科学	Laurie Goodyear, PhD,	Joslin Diabetes Center , Harvard Medical School
	芝 多佳彦	東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 歯周病学分野	William V. Giannobile, DDS, MS, DMedSc.,	Oral Medicine ,Infection , and Immunity , Harvard School of Dental Medicine
2022	樋口 雄亮	京都府立医科大学大学院医学研究科 循環器内科学	Shingo Kajimura, PhD,	Harvard Medical School Beth Israel Deaconess Medical Center
2023	細川 友誠	神戸大学大学院医学研究科 糖尿病・内分泌内科学部門	Edward T. Chouchani, Ph.D.	Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School
	大杉 勇人	東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 歯周病学分野	George L. King, M.D.	Joslin Diabetes Center , Harvard Medical School