



TOHOKU
UNIVERSITY

HNF4 α を介した糖新生における転写共役因子の 同定と新規糖尿病治療標的の探索

こうけつ たくみ

纈纈 拓海

東北大学大学院 医学系研究科 分子内分泌学分野

◆研究分野の状況・課題－糖尿病におけるグルカゴンの重要性

糖尿病は、インスリン分泌低下とインスリン抵抗性という2つの病態によって高血糖状態を引き起こし、合併症を併発することでQOLの低下、寿命の短縮につながる疾患である。以前から、糖尿病における高血糖状態には、血糖値を下げるインスリンの作用不全が大きく関与すると考えられてきた。しかし近年、糖尿病における高血糖状態には、肝臓において糖新生経路を活性化させる作用のあるグルカゴンの分泌異常が大きく関与しているということが注目を集めている。これまでに、グルカゴンを分泌する膵 α 細胞の欠損マウスやグルカゴン受容体欠損マウスに対してインスリン分泌を完全に阻害しても、血糖値が全く上昇しないことが報告されている。また、グルカゴン受容体欠損マウスにグルカゴン受容体を導入すると、血糖値が上昇することも示されている[1]。さらに、健常人と比較し、2型糖尿病患者ではグルカゴン分泌が異常に亢進していることが知られている[2]。以上のことから、インスリンの作用不全に加えて、グルカゴンの異常分泌による肝臓での糖新生亢進も2型糖尿病における高血糖状態の大きな原因であることが示唆されている[3]。

過去には、グルカゴン受容体拮抗薬LY-2409021の治験が進められていたが、血糖値改善効果が認められた一方で、体重増加、血圧上昇、脂肪肝などの副作用から開発が中止された。従って、グルカゴンシグナルを直接標的とした新規治療薬を開発するには、グルカゴン受容体とは別の治療標的を探索する必要があるが、肝臓での糖新生におけるグルカゴンシグナルの分子機序は未だ十分に明らかになっておらず、その解明は新たな糖尿病治療薬の開発においても必須であると考えられる。

◆本研究計画の着想に至った経緯－HNF4 α に着目した新たな治療薬開発アプローチ

これらの知見から、肝臓におけるグルカゴンシグナルを標的とした糖尿病治療薬の治療標的としてHNF4 α (Hepatocyte nuclear factor 4 α) という転写因子に着目した。HNF4 α は肝臓に高発現する核内受容体で、肝細胞でグルカゴンシグナルにより活性化し、糖新生遺伝子の発現を誘導する(図1)。一方で、膵 β 細胞ではインスリン分泌に関与しており、HNF4 α 遺伝子変異により若年発症糖尿病(MODY)を引き起こすため[4]、新規糖尿病治療薬開発には、肝臓特異的にHNF4 α の転写制御を行う因子を見出す必要がある(図1)。

これまでにHNF4 α を介した糖新生遺伝子の制御を行う転写共役因子を網羅的に同定した研究はなく、肝臓における糖新生遺伝子の制御機構を解明する上で重要な課題となっている。そこで本研究では、HNF4 α の転写制御を行う転写共役因子複合体を網羅的に同定し、その中から肝臓特異的にHNF4 α を介して糖新生遺伝子を制御する因子を見出すことを着想した。これにより、新たな糖新生遺伝子の制御メカニズムを明らかにし肝臓におけるグルカゴンシグナルを直接標的とした新規糖尿病治療薬の治療標的を発見することができると考えられる。

[1] Unger RH, et al. *J Clin Invest*, 122: 4-12, 2012.

[2] Dunning BE, et al. *Endocr Rev*, 28: 253-283, 2007.

[3] Campbell JE, et al. *Nat Rev Endocrinol*, 11: 329-338, 2015.

[4] Miura A, et al. *J Biol Chem*, 281: 5246-5257, 2006.

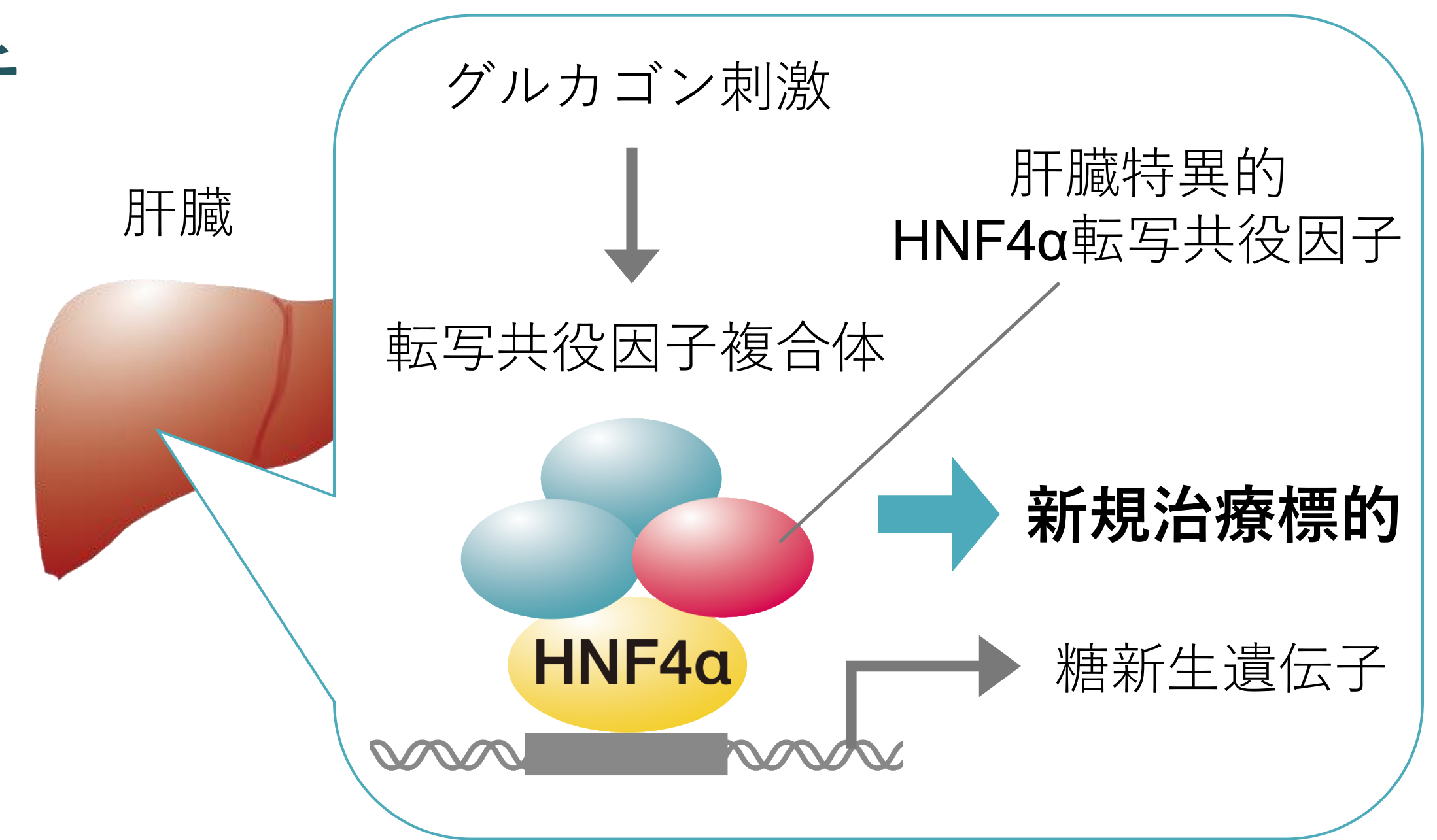


図1 治療標的としての
HNF4 α 転写共役因子複合体

◆研究目的

本研究は、肝臓特異的なHNF4 α 転写共役因子を同定し、HNF4 α を介して糖新生遺伝子を制御する転写共役因子を見出すことにより、肝臓における糖新生調節の新たな分子機序を明らかにするとともに、糖尿病の新たな治療標的を見出すことを目的としている。

◆研究方法

一般に転写因子は、核内において転写共役因子と呼ばれる一連のクロマチン構造調節因子と複合体を形成し転写を制御していることが知られている。また近年、組織特異的に複合体が形成されることで、組織特異的な遺伝子発現制御を行っていることが明らかとなってきた[5]。申請者の所属する研究グループでは内在性のタンパク質相互作用を網羅的に同定するRIME法と呼ばれるプロテオミクスの手法を導入し、転写因子に結合する転写共役因子複合体を精製し、質量分析計を用いて同定する技術を確立してきた[6, 7]。本研究目的を達成するための研究項目は以下の4つである。

① マウス臓器を用いたRIME法による絶食時特異的HNF4 α 結合因子の精製・同定

RIME法を用いて、グルカゴンシグナルが亢進する絶食時特異的にHNF4 α の転写制御を行う新規転写共役因子を網羅的に同定する。抗HNF4 α 抗体を用いて免疫沈降を行い、絶食状態のC57BL/6マウス肝臓からHNF4 α 特異的結合因子群を精製する。精製後、質量分析を行い、コントロールの*ad lib*マウスと比較することで、HNF4 α 転写共役因子候補を定量的に同定する(図2)。図3は既に行ったRIME法の結果を定量解析したものである。

② HNF4 α と新規HNF4 α 転写共役因子の相互作用の検証

in vitro, *in vivo*において、①で同定されたHNF4 α 転写共役因子候補が実際にHNF4 α と相互作用するか検証する。ヒト肝がん由来細胞HepG2細胞または、絶食状態のマウス肝臓を用いて、免疫沈降とウェスタンブロットを組み合わせた実験により、HNF4 α と転写共役因子候補が結合することを確認する。

③ 新規HNF4 α 転写共役因子の機能解析

HepG2細胞を用いたルシフェラーゼアッセイを行い、HNF4 α 転写共役因子候補がHNF4 α 転写活性に与える影響を評価する。次に、HNF4 α 転写共役因子候補が糖新生遺伝子の転写制御を行っているか検証する。HepG2細胞にHNF4 α 転写共役因子候補を過剰発現させ、RT-qPCRにより糖新生遺伝子であるG6PC、PEPCKのmRNA発現評価を行う。また、HepG2細胞にCRISPR-Cas9を用いたゲノム編集を行い、HNF4 α 転写共役因子候補欠損細胞を作製する。野生型HepG2細胞とHNF4 α 転写共役因子候補欠損細胞を用いたRT-qPCRを行い、糖新生遺伝子やその他のHNF4 α 標的遺伝子の発現差を比較する。

④ ヒトにおける新規HNF4 α 転写共役因子の相互作用評価

ヒトの肝臓において新規HNF4 α 転写共役因子が発現しているか、組織免疫染色を行い評価する。また、公開されている糖尿病患者の遺伝子発現データベースを利用し、ヒトにおける新規HNF4 α 転写共役因子の遺伝子発現解析を行う。2型糖尿病患者と非糖尿病患者におけるHNF4 α 転写共役因子遺伝子発現を相関解析することで、ヒトにおけるHNF4 α 転写共役因子の糖尿病病態への関与を調べる。

[5] Goodrich JA, et al. *Nat Rev Genet*, 11: 549-558, 2010. [6] Yokoyama A, et al. *J Biol Chem*, 289: 18152-18162, 2014

[7] Kouketsu T, et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 615: 81-87, 2022.

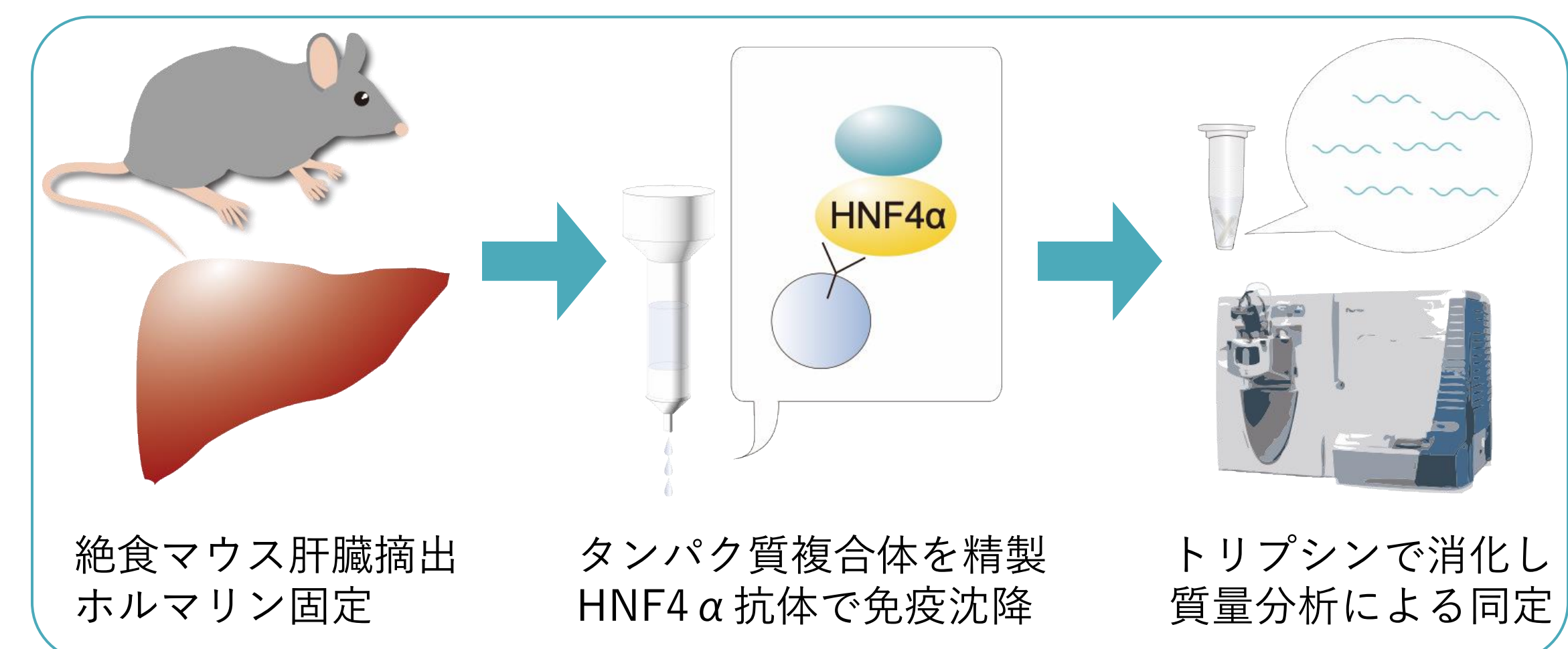


図2 RIME法の概要

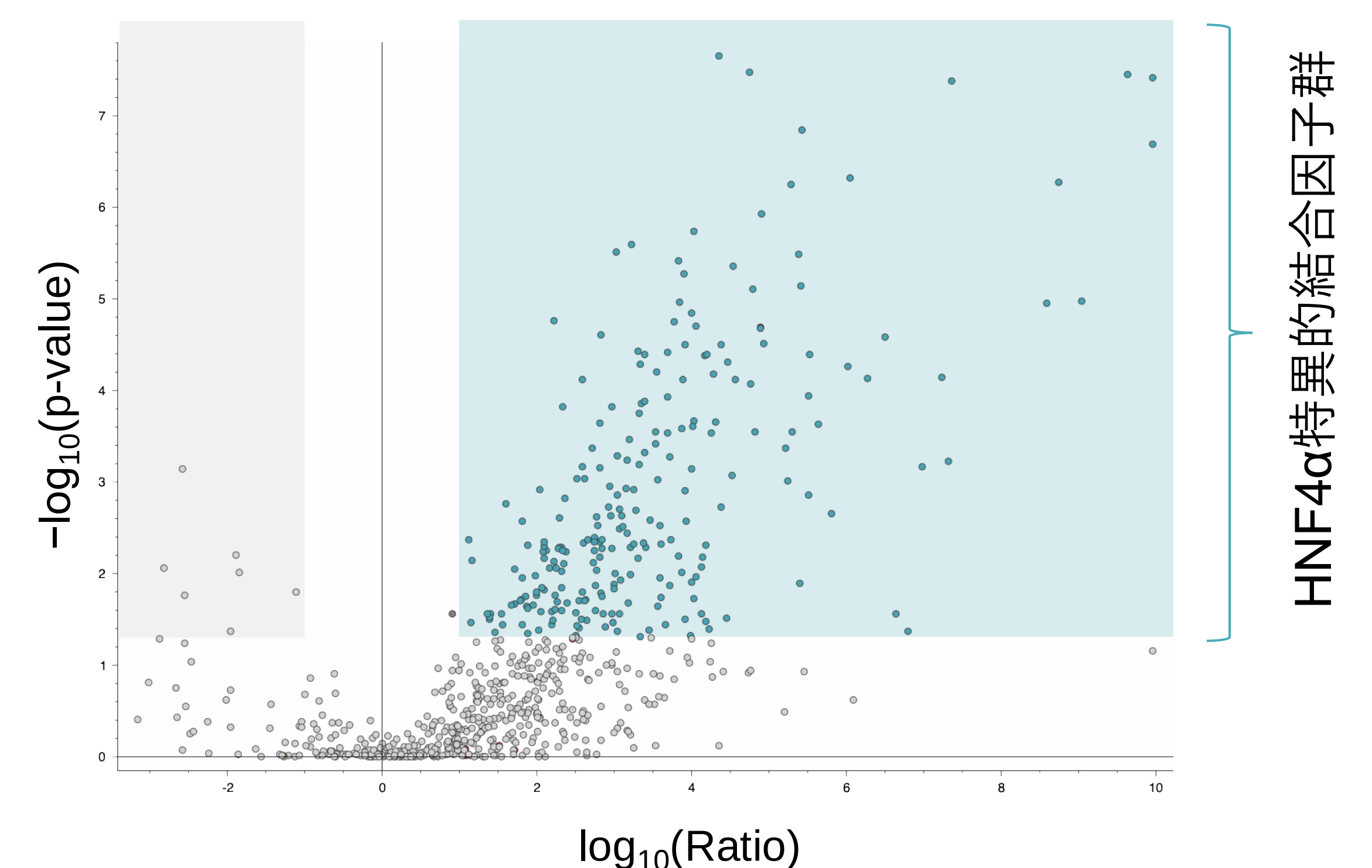


図3 絶食時にHNF4 α と結合する
転写共役因子候補群

◆現在の進捗

本研究では、肝臓におけるHNF4 α による遺伝子発現制御の分子基盤に着目しているが、グルカゴンシグナルによって活性化される転写共役因子複合体を網羅的に同定した研究はこれまでになく、新規性が高いと考えられる。絶食状態のマウス肝臓とコントロールの*ad lib*マウス肝臓を用いてRIME法を行い、HNF4 α 転写共役因子群を同定した。現在は、その候補因子群の中からHNF4 α に結合し、糖新生を制御する新規のHNF4 α 転写共役因子を見出すべく、候補因子の機能解析を行っている。

将来的には、同定された新規HNF4 α 転写共役因子を標的とした糖尿病治療薬の開発を行う。それにより開発された全く新しい作用機序の糖尿病治療薬は、現在の治療では効果不十分な糖尿病患者、今後新たに糖尿病と診断される患者の予後やQOLを改善し、医学・医療に大きく貢献することが期待される。