

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07442

研究課題名(和文) 視床下部の軽度慢性炎症によるエネルギー代謝異常の誘発機構解析

研究課題名(英文) Abnormal energy metabolism induced by hypothalamic low-graded inflammation

研究代表者

高橋 勇二 (TAKAHASHI, Yuji)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：20154875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では視床下部に生じる軽度慢性炎症によるエネルギー代謝異常にストレス応答性転写因子ATF5が関与することを明らかにすることを目的とし、ATF5欠損マウスおよび視床下部不死化培養細胞を用いて検討を進めた。ATF5は、肥満によって視床下部のミトコンドリアに生じたストレスシグナルを核に伝える役目を果たした。ATF5欠損動物は通常食や高脂肪食給餌の何れでも低体重であった。また、視床下部不死化培養細胞への内分泌学攪乱物質のTBT暴露は炎症性変化とミトコンドリア断片化を引き起こし食欲抑制因子MSHの発現低下をもたらした。これらの結果は、軽度炎症や肥満の発症にATF5が関与することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：This research was planned to clarify how stress responsive transcription factor ATF5 could participate in energy metabolism abnormality due to low-graded inflammation of the hypothalamus using ATF5-defective mouse and hypothalamic immortalized cells. It was demonstrated that ATF5 was induced by endoplasmic reticulum stress detected in the hypothalamus because of obesity, and that ATF5 also mediated signals associating with ER-stress initiated mitochondrial stress from the mitochondria to the nucleus. ATF5-knockout mice demonstrated the low body-weight both in a normal meal feeding and in the high-fat meal feeding. In addition, exposure of hypothalamus cells to tributyltin, an endocrine-disrupting chemical, caused an inflammatory response leading to mitochondrial fragmentation and the repression of the appetite inhibitor MSH. These results suggest that ATF5 could play an important role in low-graded inflammation and the obese development through the hypothalamus malfunction.

研究分野：環境分子生理学

キーワード：ストレス応答 視床下部 肥満 転写因子 代謝異常 内分泌攪乱化学物質 遺伝子欠損マウス

1. 研究開始当初の背景

軽度慢性炎症の発症が糖尿病やアルツハイマー病に共通した病理像として注目が集まっている。軽度慢性炎症“low-graded inflammation”の発症は、LPSによるToll-like受容体とその下流のNF- κ B活性化やIL-1分泌を介する自然免疫系の関与が代表的である。近年、軽度慢性炎症を引き起こすNF- κ B活性化やIL-1分泌が、酸化ストレス、小胞体ストレス、栄養素欠乏、および、ウイルス感染等のストレスを統合する役割を持つ翻訳因子のeIF2のリン酸化の下流に位置することが明らかになり、ストレス負荷による炎症誘導機構が明らかとなった。

視床下部の軽度慢性炎症：視床下部はストレス応答およびエネルギー代謝に重要なホルモンであるACTHやTSHを分泌する室傍核、摂食抑制および促進ペプチド分泌神経の起始核である弓状核、そして摂食行動を制御する視床下部外側野が存在し、これらの神経回路によって食欲とエネルギー代謝が制御を受けている。栄養素過剰が視床下部に軽度慢性炎症が誘発し、レプチンやインスリン抵抗性を誘発し糖尿病や肥満などの代謝性疾患を増悪することが示された。また、成熟個体における脳神経細胞の新生部位として、これまで知られていた脳室下帯と海馬歯状回に加えて視床下部が同定され、さらに、栄養素過剰による軽度慢性炎症が視床下部の神経新生を抑制することも示された。しかし、栄養素過剰が、視床下部神経幹細胞の細部分裂を抑制し、エネルギー代謝異常を引き起こす分子機構については不明な点が多い。

ストレス応答因子ATF5：申請者は、低酸素や栄養素欠乏などのストレスに応答する転写因子としてCREB/ATFファミリーに属するATF5(Activating Transcription Factor 5)を同定した。ATF5は、eIF2のリン酸化を介する統合ストレス反応によって発現が活性化される。

2. 研究の目的

ATF5は、脳室下帯や海馬歯状体で神経新生に重要な役割を持つことから、申請者は、「視床下部においてATF5は神経新生制御因子として作用し、栄養素過剰による視床下部炎症を抑制し抗肥満因子として機能しているのではないか」という仮説を導いた。本仮説を検証し、栄養素過剰による視床下部神経再生遅延と軽度慢性炎症の抑制因子としてのATF5の機能とその分子機構を明らかにすることを、研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1)ATF5欠損動物の作成 ネオマイシン耐性遺伝子を含むターゲティングベクターにATF5エクソン1上流と下流の配列をクローニングし、株化胎性幹細胞を組み替えた。選択した細胞をマウスの胚に挿入しキメラマ

ウスを得た。誕生したATF5欠損キメラマウスをC57BL/6マウスに戻し交配し純系化した。また、条件欠損マウスを作成するために組換え法を応用した。また、近年開発が進んでいるCRISPR-Cas9を用いるゲノム編集法を応用した。特に受精卵を体内から取り出すことなく、比較的容易にゲノム編集可能なGONAD法を用いた。GONAD法は卵管内にある受精卵に対して、ガイドRNAとCAS9タンパクを電気穿孔し、ゲノム編集を行った。

(2)脳の組織学的解析

ATF5欠損マウスの脳を組織学的に観察した。嗅球および大脳を固定後、凍結切片を作成した。再生した切片に様々な抗体を作用させ、特定のタンパク質の発現を蛍光顕微鏡、あるいは、共焦点顕微鏡を用いて観察した。さらに、胎児期にチミジン類似体のBrdUを投与し、増殖期の細胞を標識した。抗BrdU抗体を用いてDNAを合成する増殖期細胞を観察した。

(3)炎症誘導条件負荷

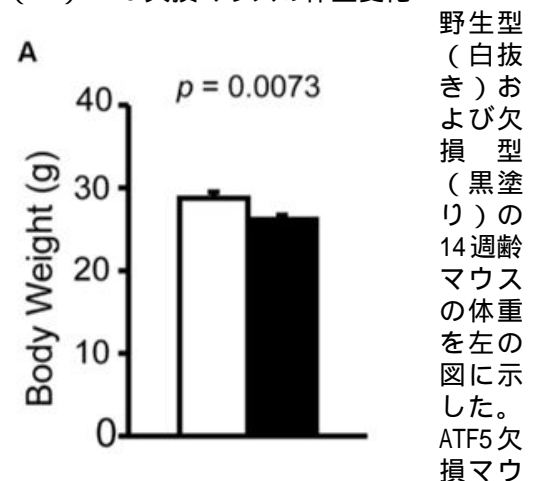
脳への炎症を誘発するため、小胞体ストレス誘導剤のツニカマイシンを投与した。また、内分泌攪乱化学物質として作用し、小胞体およびミトコンドリアに作用し炎症反応を郵送する有機スズ化合物のTBT(トリブチルスズ)を投与した。さらに、高脂肪食で12週間飼育し高エネルギー・飽和脂肪酸食給餌により脳に炎症を誘導した。

(4)株化視床下部細胞

食欲抑制に関与するPOMC遺伝子のプロモーター下流で蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックマウスからSV40ラージT抗原で不死化した視床下部細胞株であるmHypoA-POMC/GFP-2培養した。その培養細胞にTBTを暴露しPOMC発現に及ぼす影響をRNA量およびタンパク質量のレベルで検討を加えた。

4. 研究成果

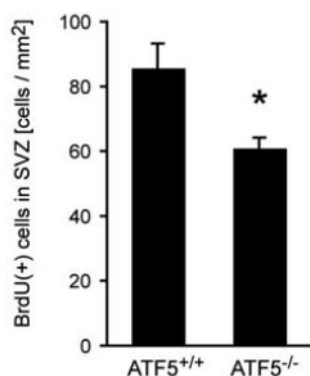
(1)ATF5欠損マウスの体重変化



の体重は野生型の約80%と有意に低下していた。この体重変化の理由としては、欠損マウスは多動であることが示されていることがエネルギー消費の増加に関与し、体

重の減少をもたらしている可能性がある。さらに、高脂肪食を4週齢から12週間給餌した。ATF5欠損マウスの体重は低下傾向を示した。予備的な実験では体重が増加傾向を示したが、マウスの純系化を進めると有意な体重変化は認められなかった。従って、ATF5欠損が食欲に及ぼす効果は、マウスの系統間で差がある可能性がある。

(2) 脳の細胞分化および増殖における増殖におけるATF5の役割



胎生14日目の胎子を妊娠した母体にBrdUを投与し胎子の脳の脳室下帯における細胞分裂活性を検討すると、ATF5欠損マウスでのBrdU養成細胞数が低下しており、

細胞増殖活性の低下が認められた。一方、増殖細胞から分化細胞への移行割合を検討すると、変化は認められなかった。従って、ATF5は、脳における神経幹細胞の分裂に重要な役割を果たすことが示唆された。

(3) 炎症誘導条件負荷

脳の炎症を誘起するために高脂肪食の給餌、あるいは、有機スズ化合物のトリブチルスズ(TBT)を投与した。高脂肪の投与は視床下部に軽度の炎症を誘起することが報告されている。12週間の高脂肪食給餌によっても、野生型では有意な体重の増加を認めた。しかし、ATF5欠損マウスでは体重増加の割合が野生型に比較して有意に少なかった。この原因として摂食量を検討したが、有意な変化は認められなかった。視床下部における組織形態の変化を検討したが、野生型との差異を見いだすことはできなかった。また、TBT暴露は肝臓における脂肪滴蓄積を増加させた。しかし、ATF5欠損の影響は明らかではなかった。

(4) 培養視床下部細胞へのTBT暴露影響
始めに、マウス視床下部にATF5が発現していること、その発現レベルは大脳皮質より高く海馬より低いことを明らかにした。次に、SV40-T抗原で不死化したマウス視床下部細胞を培養し、ATF5と食欲抑制ペプチドMSHの発現を確認した。さらに、TBT暴露によって軽度炎症の指標となるNF- κ Bの活性化、および、ミトコンドリアの断片化が起こることを明らかにした。

Schneebergerらは、マウスへの高脂肪食給餌により視床下部POMC神経のミトコンドリアの断片化とミトコンドリアの融合を促進するMitofusin2の低下を報告している。そ

して、この変化は小胞体ストレスと関連していることを示した。ATF5は、小胞体ストレスによって誘起される総合ストレス反応により進むeIF2のリン酸化の標的分子で、ATF5発現量は小胞体ストレスによって誘導を受ける。また、ATF5はミトコンドリアに生じたストレスを核に伝える役割を果たしている。これらの結果は、肥満や内分泌攪乱化学物質のTBTの暴露が小胞体ストレスを誘起し食欲調節やエネルギー代謝に影響して慢性的な代謝性疾患を増強していること、そして、このような代謝性疾患の発症にATF5が関与することを示唆している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

1. Umemura M, Tsunematsu K, Shimizu YI, Nakano H, Takahashi S, Higashiura Y, Okabe M, Takahashi Y. Activating transcription factor 5 is required for mouse olfactory bulb development via interneuron. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2015 **23**, 1-8. 査読有 DOI: 10.1080/09168451.2015.1012042
2. Nakano H, Iida Y, Suzuki M, Aoki M, Umemura M, Takahashi S, Takahashi Y. Activating transcription factor 5 (ATF5) is essential for the maturation and survival of mouse basal vomeronasal sensory neurons. *Cell Tissue Res.* 2016, **363**, 621-633. 査読有 DOI: 10.1007/s00441-015-2283-8
3. Umemura M, Ogura T, Matsuzaki A, Nakano H, Takao K, Miyakawa T, Takahashi Y. Comprehensive Behavioral Analysis of Activating Transcription Factor 5-Deficient Mice. *Front Behav Neurosci.* 2017, **11**, 125. 査読有 DOI 10.3389/fnbeh.2017.00125

[学会発表](計 13 件)

1. Ryoko Tanabe, Mariko Umemura, Haruo Nakano, Shigeru Takahashi, Yuji Takahashi ATF5 is involved in development of the cerebral cortex. The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2014/9, Yokohama, Japan
2. 飯田吉剛, 鈴木誠人, 青木満里恵, 中野

- 春男, 梅村真理子, 高橋滋, 高橋勇二、マウス鋤鼻細胞の分化と生存性における転写因子 ATF5 の役割、第 37 回日本分子生物学会年会、2014/11、横浜
- 3 . 齋藤遼太、梅村真理子、田籠博太郎、中野春男、高橋滋、高橋勇二、ATF5 は神経細胞の樹状突起形成に重要である、BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回生化学会大会 合同大会)、2015 年 12 月、神戸
- 4 . Haruo Nakano, Yoshitaka Iida, Marie Aoki, Makoto Suzuki, Miyu Yamamoto, Takahiro Murase, Mariko Umemura, Shigeru Takahashi, Yuji Takahashi. ATF5 transcription factor controls the maturation and survival of mouse vomeronasal sensory neurons. 17th International Symposium on Olfaction and Taste 2016/6, Yokohama
- 5 .中野 春男、飯田 吉剛、村瀬 貴太、梅村 真理子、高橋 滋、高橋 勇二、The expression and function of CCAAT/enhancer-binding protein gamma (C/EBP) in mouse vomeronasal sensory neurons. 第 39 回日本神経科学大会、2016 年 7 月、横浜
- 6 . 武田ゆかり, 尹 永淑, 淵野裕之, 川原信夫, 高橋 滋, 高橋勇二, 井上英史, アポトーシス誘導因子 CHOP の発現を促進する天然化合物の探索, 第 60 回日本薬学会関東支部大会 (2016/9, 東京)
- 7 .青木 優香里、畔柳 知幸、中野 春男、梅村 真理子、高橋 滋、高橋 勇二、巻貝組織再生における RXR の発現局在、第 19 回環境ホルモン学会研究発表会、2016/12、つくば
- 8 . 出口 侑希乃、山田 基弘、上坂 望、勝俣 優利、中野 春男、梅村 真理子、高橋 滋、高橋 勇二、マウス腸管粘膜上皮の杯細胞の終末分化における ATF5 の関与、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月、横浜
- 9 . 武田ゆかり, 尹 永淑, 淵野裕之*, 川原信夫*, 高橋 滋, 高橋勇二, 井上英史, ホルトソウ (Euphorbia lathyris) から単離された Lathyrane 骨格のジテルペノイドは CHOP の発現を誘導する, 日本薬学会第 137 年会 (2017/3, 仙台)
- 10 . 尹 永淑, 野田幸恵, 高橋 滋, 高橋勇二, 井上英史, コショウ (Piper nigrum) から単離されたアルカロイドは BDNF 誘導を活性化する, 日本薬学会第 137 年会 (2017/3, 仙台)
- 11 .山田 基弘、出口 侑希乃、上坂 望、勝俣 優利、中野 春男、梅村 真理子、高橋 滋、高橋 勇二、マウス腸管の粘液産生細胞の分化におけるストレス応答因子 ATF5 の役割、第 94 回日本生理学会大会、2017 年 3 月、浜松
- 12 . 梅村真理子, 小倉多恵, 金子泰之, 中野春男, 高橋滋, 高雄啓三, 宮川剛, 高橋勇二, 転写因子 ATF5 の欠損は行動異常を引き起こす, 第 40 回日本神経科学大会, 2017/7, 幕張
- 13 . 中野春男、栗野聖月、古川愛子、久保茉実、平尾仁美、梅村真理子、高橋滋、高橋勇二、ATF5 調節性の microRNA によるマウス嗅細胞の分化誘導、生命科学系学会合同年次大会 (Conbio2017) 2017/12、神戸
- 6 . 研究組織
(1)研究代表者
高橋 勇二 (TAKAHASHI, Yuji)
東京薬科大学・生命科学部・教授
研究者番号: 20154875