

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09862

研究課題名(和文) 脂肪細胞での統合的ストレス応答経路による肥満制御機構の解明

研究課題名(英文) Role of integrated stress response in adipocyte

研究代表者

三宅 雅人(MIYAKE, Masato)

徳島大学・先端酵素学研究所(プロテオ)・講師

研究者番号：30588976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、代謝疾患の際に生ずる様々なストレスに応答するための一つである統合的ストレス応答経路の脂肪細胞における役割についてマウスを用いて解析を行った。その結果、脂肪細胞での統合的ストレスの活性化は、脂肪細胞自身の代謝には大きく影響しないことが判明した。一方で、脂肪細胞での統合的ストレスの活性化は、摂食抑制因子として知られているGDF15の発現を上昇させて高脂肪食選択的に摂食を抑制することを明らかにした。また、高脂肪食によって誘導される食事性肥満が脂肪細胞の統合的ストレス応答によって改善されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果によって統合的ストレス応答の活性化は、細胞自律的なストレスへの対応の役割だけでなく、内分泌ホルモンなどを介した臓器連関によって個体レベルでストレスに応答して恒常性を保つために機能していることが示唆された。また、脂肪細胞への適切な統合的ストレス応答の活性化は、摂食行動を制御する可能性が示され新たな肥満や糖尿病の治療標的となることがわかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of integrated stress response (ISR), which is one of stress response signaling and activated in metabolic disorders, in adipocytes of mice. The ISR did not affect metabolic function in adipocyte. However, activation of the ISR induced GDF15 expression that is known to repress appetite in adipocyte. The ISR-induced GDF15 repressed high-fat diet specific food intake and improved diet-induced obesity.

研究分野：代謝学

キーワード：肥満 糖尿病 臓器連関 摂食調節

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞は、平時や疾患発生時に関わらず様々なストレスに晒される。ストレスに対応するために細胞は翻訳開始因子である  $eIF2\alpha$  をリン酸化して翻訳を抑制する統合的ストレス応答を活性化させる。統合的ストレス応答は、翻訳を減少させることによって翻訳に消費されるエネルギーを減少させてストレス応答へと供給する。また、統合的ストレス応答によって発現上昇する転写因子  $ATF4$  などの働きによってストレス軽減に機能する遺伝子の発現を上昇させて、ストレスに対応する。統合的ストレス応答は、様々なストレスで活性化されることから、糖尿病、神経変性疾患、癌など種々の疾患で活性化が観察されて、疾患の発症や進展に関与する。肥満や糖尿病においても統合的ストレス応答が病態に関与することが報告されている。我々は、これまでに肝臓と骨格筋における統合的ストレス応答の役割を明らかにし、統合的ストレス応答が細胞種によって特異的な機能を有する可能性を見出している。一方で、脂肪細胞における役割については未だ未解明な部分が残されている。

### 2. 研究の目的

肥満や糖尿病の病態における脂肪細胞での統合的ストレス応答の役割とその分子機構を明らかにして、肥満や糖尿病の新規治療標的としての統合的ストレス応答経路の役割について検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 統合的ストレス応答の活性化による肥満の制御

まず、脂肪細胞特異的に統合ストレス応答経路を薬剤(AP)を用いて時期特異的に活性化できる遺伝子改変マウス(Tgマウス)を作出した。Tgマウスと野生型マウス(WTマウス)を用いて高脂肪食で肥満を誘導し、さらにAPによって統合的ストレス応答を活性化したときの病態について検討を行った。具体的には糖負荷試験やインスリン負荷試験などの糖尿病関連検査、血中脂質や脂肪酸などの血液生化学試験を行った。また、白色脂肪細胞の関連病態として脂質代謝や糖代謝に関する遺伝子発現や慢性炎症などを評価した。また、鼠径部脂肪組織の組織像の観察を行い、褐色脂肪様細胞への分化を観察した。褐色脂肪細胞の機能としてはエネルギー代謝や熱産生に関わる遺伝子発現変化と個体レベルでの代謝を解析するために酸素消費量などの基礎代謝測定を行った。

#### (2) 統合的ストレス応答活性化による肥満制御の分子機構の解明

統合的ストレス応答活性化によって変化する標的遺伝子を同定するために、統合的ストレス応答を活性化したときのTgマウスの脂肪組織を用いてマイクロアレイ解析を行った。さらに発現変化した遺伝子の中で表現系に寄与する遺伝子を探索した。特に(1)の結果より内分泌因子やサイトカインなどに着目して解析を行った。これら解析によって見いだされた遺伝子の発現制御メカニズムを統合ストレス応答で発現上昇する下流転写因子のノックアウト細胞などを用いて検証し、クロマチン免疫沈降法を用いて転写因子による制御を解析した。また、標的遺伝子の産物をマウスに投与して統合的ストレス応答と似た表現系が出るか検討した。さらに、標的遺伝子の受容体遺伝子を欠損したマウスを作成して、Tgマウスと交配することで表現系が消失するか検討する。

#### (3) $eIF2\alpha$ リン酸化を誘導する薬剤による肥満改善作用

既知の  $eIF2\alpha$  リン酸化誘導薬や遺伝子発現データベースを用いた解析などから同定した統合的ストレス応答活性化化合物を用いて培養細胞やマウスに投与することで標的遺伝子の発現変化やマウスの個体表現系について解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 統合的ストレス応答の活性化による肥満の制御

まず、TgマウスがAP依存的に統合的ストレス応答を活性化できるか確認したところ、APの投与によって白色脂肪組織、褐色脂肪組織ともに  $eIF2\alpha$  リン酸化が上昇していることが確認され、統合的ストレス応答を脂肪細胞特異的に任意の時期に活性化できた。TgマウスにAPを投与すると、通常食では体重に変化は認められなかったが、高脂肪食を給餌しているときは体重上昇が抑制された。また、高脂肪食による食事性肥満マウスにおいてAPを投与したときも体重が減少して肥満改善作用があることがわかった。このマウスでは耐糖能の改善など糖・脂質代謝の改善も認められた。一方、野生型マウスではAPを投与

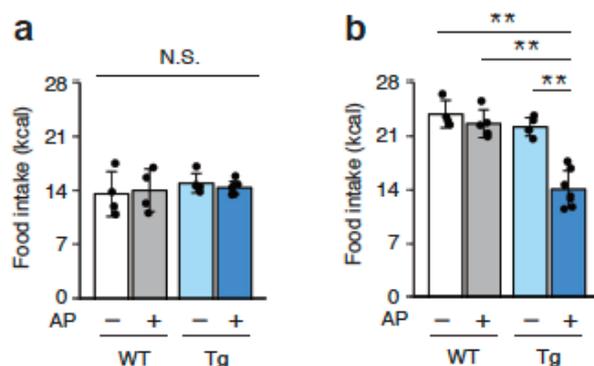


図 1. 野生型マウスおよび Tg マウスでの摂食量 (a)通常食、(b)高脂肪食

しても体重に変化は認められなかった。以上のことから、脂肪細胞での統合的ストレス応答の活性化は肥満抑制作用があることが示された。Tg マウスを用いて脂肪細胞における機能を解析したところ、白色脂肪、褐色脂肪ともに肥満改善作用につながるような遺伝子発現の変化を観察できなかった。さらに、組織学的にも白色脂肪細胞の大きさは減少していたが炎症などに差は見られず、褐色脂肪組織においても組織像に顕著な差は認められなかった。肥満改善作用の原因を探索したところ、意外なことに Tg マウスに AP を投与したときは高脂肪食特異的に摂食量が低下していることがわかった (図 1)。さらに通常食と高脂肪食を同時に与えたところ、野生型マウスや溶媒処理の Tg マウスでは高脂肪食を選択的に食べるのに対して AP を処理した Tg マウスでは高脂肪食の摂食量が減少し、代わりに通常色の摂食量が多くなっていった。以上のことから、脂肪細胞での統合的ストレス応答は、高脂肪食特異的に摂食を抑制して肥満を抑制・改善する作用を持つことが示された。

## (2) 統合的ストレス応答活性化による肥満制御の分子機構の解明

上記の結果より、脂肪細胞が何らかのシグナルを発して摂食行動を制御していることが示唆された。脂肪細胞から分泌される摂食抑制因子である leptin の発現は、AP を投与しても上昇していなかったことから他の因子が関与していることが示唆された。そこで、褐色脂肪細胞を用いて AP を投与したときの遺伝子発現変化をマイクロアレイによって網羅的に解析した。その結果 AP 処理した Tg マウスでは摂食調節因子として知られている growth differentiation factor 15 (GDF15) の発現が大きく上昇していた。さらに GDF15 の血中濃度を調べたところ、Tg マウスへの AP の投与によって上昇していた (図 2)。3T3L1 脂肪細胞株を用いて統合的ストレス応答を活性化する様々な薬剤を添加したところ、全て GDF15 の発現を上昇させた。GDF15 の発現を制御する転写因子として統合的ストレス応答で発現上昇することが知られている ATF4 と CHOP の関与について調べた。3T3L1 で ATF4 と CHOP を欠損させたところ、統合的ストレス応答による GDF15 の発現上昇が大きく低下した。さらにクロマチン免疫沈降法をもちいて ATF4 と CHOP の GDF15 エンハンサーへの結合を見出し、結合部位を CRISPR/Cas9 を用いて欠損させたところ統合的ストレス応答による GDF15 の発現上昇が完全に消失した。以上のことから統合的ストレス応答は転写因子 ATF4 と CHOP を介して直接に GDF15 の発現を上昇させることがわかった。次に、機能的に GDF15 が重要であるかを調べるために野生型マウスに GDF15 を投与したところ、低濃度では統合的ストレス応答の活性化と同様に高脂肪食でより強く摂食量が低下し、通常食と高脂肪食の選択実験においても高脂肪食の摂食量低下と通常食の上昇が認められた。さらに CRISPR/Cas9 を用いて GDF15 の受容体である GFRAL を欠損したマウスを樹立して Tg マウスと交配して表現型を解析した。その結果、Tg マウスへの AP 投与は体重が減少し高脂肪食の摂食量を減少させたが、GFRAL を欠損した Tg マウスにおいては体重減少と摂食量低下は認められなかった (図 3)。以上のことから、脂肪細胞での統合的ストレス応答は内分泌因子である GDF15 の発現上昇を介して高脂肪食の摂食を抑制して肥満改善作用を持つことが示された。

## (3) eIF2 $\alpha$ リン酸化を誘導する薬剤による肥満改善作用

GDF15 の発現変化を指標とした発現解析データベースの解析より 10(E), 12(Z)-Octadecadienoic Acid (t10c12CLA) に着目した。脂肪細胞株 3T3L1 において t10c12CLA を処理したところ統合的ストレス応答を活性化して GDF15 の発現を上昇させた。褐色脂肪細胞株においても t10c12CLA は、GDF15 の発現を上昇させたが、骨格筋細胞株 C2C12 などではほとんど上昇が認められなかったことから脂肪細胞特異的な統合的ストレス応答活性化剤の可能性が示された。さらに t10c12CLA を野生型マウスに投与したところ、脂肪細胞での GDF15 の遺伝子発現と血中 GDF15 濃度の上昇が認められた。さらに t10c12CLA 投与群では高脂肪食の食事が低下した。以上のことから、t10c12CLA は統合的ストレス応答の活性化剤として GDF15 を介して肥満を改善する可能性が示された。

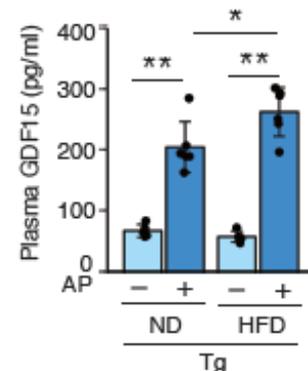


図 2. Tg マウスにおける血中 GDF15 濃度

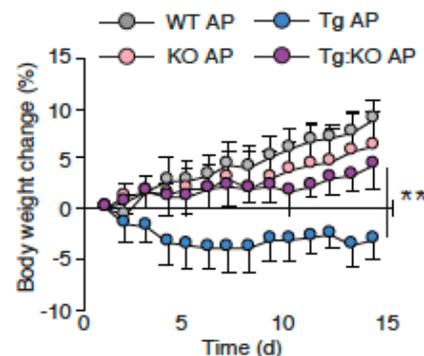


図 3. 野生型マウス、Tg マウスと GFRAL KO マウスにおける AP 投与時の体重変化

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Kato Hironori, Okabe Kohki, Miyake Masato, Hattori Kazuki, Fukaya Tomohiro, Tanimoto Kousuke, Beini Shi, Mizuguchi Mariko, Torii Satoru, Arakawa Satoko, Ono Masaya, Saito Yusuke, Sugiyama Takashi, Funatsu Takashi, Sato Katsuaki, Shimizu Shigeomi, Oyadomari Seiichi, Ichijo Hidenori, Kadowaki Hisae, Nishitoh Hideki | 4. 巻<br>3                 |
| 2. 論文標題<br>ER-resident sensor PERK is essential for mitochondrial thermogenesis in brown adipose tissue  | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>Life Science Alliance  | 6. 最初と最後の頁<br>e201900576- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.26508/lisa.201900576  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)  | 国際共著<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Hamada Yoshimasa, Furumoto Yuji, Izutani Akira, Taniuchi Shusuke, Miyake Masato, Oyadomari Miho, Teranishi Kenji, Shimomura Naoyuki, Oyadomari Seiichi   | 4. 巻<br>15                |
| 2. 論文標題<br>Nanosecond pulsed electric fields induce the integrated stress response via reactive oxygen species-mediated heme-regulated inhibitor (HRI) activation  | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>PLOS ONE   | 6. 最初と最後の頁<br>e0229948-   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1371/journal.pone.0229948   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)  | 国際共著<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Miyake Masato, Oyadomari Seiichi.  | 4. 巻<br>28                |
| 2. 論文標題<br>Inter-Organ Metabolic Communication via the Unfolded Stress Response  | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>Clinical calcium   | 6. 最初と最後の頁<br>1548-1553   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>ClicCa181115481553   | 査読の有無<br>無                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Hisanaga Satoshi, Miyake Masato, Taniuchi Shusuke, Oyadomari Miho, Morimoto Masatoshi, Sato Ryosuke, Hirose Jun, Mizuta Hiroshi, Oyadomari Seiichi   | 4. 巻<br>8                 |
| 2. 論文標題<br>PERK-mediated translational control is required for collagen secretion in chondrocytes  | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports   | 6. 最初と最後の頁<br>773-        |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-017-19052-9   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)  | 国際共著<br>-                 |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Fischer Carina, Seki Takahiro, Lim Sharon, Nakamura Masaki, Andersson Patrik, Yang Yunlong, Honek Jennifer, Wang Yangang, Gao Yanyan, Chen Fang, Samani Nilesh J., Zhang Jun, Miyake Masato, Oyadomari Seiichi, Yasue Akihiro, Li Xuri, Zhang Yun, Liu Yizhi, Cao Yihai | 4. 巻<br>8           |
| 2. 論文標題<br>A miR-327-FGF10-FGFR2-mediated autocrine signaling mechanism controls white fat browning   | 5. 発行年<br>2017年     |
| 3. 雑誌名<br>Nature Communications   | 6. 最初と最後の頁<br>2079- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41467-017-02158-z  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>該当する        |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Miyake Masato, Kuroda Masashi, Kiyonari Hiroshi, Takehana Kenji, Hisanaga Satoshi, Morimoto Masatoshi, Zhang Jun, Oyadomari Miho, Sakaue Hiroshi, Oyadomari Seiichi | 4. 巻<br>12              |
| 2. 論文標題<br>Ligand-induced rapid skeletal muscle atrophy in HSA-Fv2E-PERK transgenic mice  | 5. 発行年<br>2017年         |
| 3. 雑誌名<br>PLOS ONE  | 6. 最初と最後の頁<br>e0179955- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1371/journal.pone.0179955  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-               |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Kurahashi Kiyoe, Inoue Seika, Yoshida Sumiko, Ikeda Yasumasa, Morimoto Kana, Uemoto Ryoko, Ishikawa Kazue, Kondo Takeshi, Yuasa Tomoyuki, Endo Itsuro, Miyake Masato, Oyadomari Seiichi, Matsumoto Toshio, Abe Masahiro, Sakaue Hiroshi, Aihara Ken-ichi | 4. 巻<br>24              |
| 2. 論文標題<br>The Role of Heparin Cofactor in the Regulation of Insulin Sensitivity and Maintenance of Glucose Homeostasis in Humans and Mice.  | 5. 発行年<br>2017年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Atherosclerosis and Thrombosis  | 6. 最初と最後の頁<br>1215-1230 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.5551/jat.37739  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Miyake Masato, Zhang Jun, Oyadomari Seiichi  |
| 2. 発表標題<br>Preemptive Activation of the Integrated Stress Response in adipose tissue suppress food intake and improved obesity through growth and differentiation factor 15 |
| 3. 学会等名<br>EMBO workshop Proteostasis: From organelles to organisms (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>三宅 雅人、張 君、久永 哲、親泊 美帆、親泊 政一                   |
| 2. 発表標題<br>脂肪細胞における統合的ストレス応答はGDF15を介した摂食抑制により食事性肥満を改善する |
| 3. 学会等名<br>第61回日本糖尿病学会年次学術集会                            |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>三宅 雅人、張 君、親泊 政一                                 |
| 2. 発表標題<br>脂肪組織での統合的ストレス応答はDdit3-Gdf15経路による摂食抑制を介して肥満を改善する |
| 3. 学会等名<br>第39回日本肥満学会                                      |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>三宅 雅人、谷内 秀輔、親泊 政一                 |
| 2. 発表標題<br>CRISPRスクリーンで同定した新規PERK経路制御因子の機能解明 |
| 3. 学会等名<br>第13回小胞体ストレス研究会                    |
| 4. 発表年<br>2018年                              |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>三宅 雅人、親泊 政一                  |
| 2. 発表標題<br>脂肪細胞におけるストレス応答性転写因子ATF4の機能解明 |
| 3. 学会等名<br>第30回分子糖尿病学シンポジウム             |
| 4. 発表年<br>2018年                         |

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>三宅 雅人 , 親泊 政一              |
| 2. 発表標題<br>小胞体ストレス応答因子PERKによる代謝調節機構   |
| 3. 学会等名<br>2017年度生命科学系学会合同年次大会 (招待講演) |
| 4. 発表年<br>2017年                       |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

|   |
|---|
| 徳島大学親泊研究室HP <a href="http://www.genome.tokushima-u.ac.jp/dmb/DMB/homu.html">http://www.genome.tokushima-u.ac.jp/dmb/DMB/homu.html</a> |
|---|

| 6. 研究組織                   |                       |    |
|---------------------------|-----------------------|----|
| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|                           |                       |    |