

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15075

研究課題名(和文)Activin Bシグナルによるエネルギー恒常性維持機構の解明

研究課題名(英文)Activin B signaling controls energy homeostasis

研究代表者

小林 直樹 (Kobayashi, Naoki)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・上級研究員

研究者番号：80750728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アクチビンBの過剰発現によりインスリン抵抗性改善作用、耐糖能異常改善作用、グルコース依存性インスリン分泌(GSIS)亢進作用に加え、褐色脂肪組織における熱産生およびエネルギー消費を亢進させることで脂肪量を減少させる可能性を新たに見出した。また、アクチビンBによる薬理効果の少なくとも一部はFGF21を介したものであることが示唆された。一方で、アクチビンBサブユニットをコードするInhbb遺伝子組織特異的欠損マウスを新たに作出し、代謝表現系を解析したところ、GSISに障害を認めた。このことから、アクチビンBは生理的なインスリン分泌制御に寄与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究からTGFβファミリーリガンドのひとつであるアクチビンBによる新たなエネルギー恒常性制御機構が明らかとなった。また、肥満など代謝性疾患・糖尿病などの病態においては、この経路が抑制されていることが病態の原因となっていることが示唆された。また、外因性にアクチビンBを補充することで、これらの疾患の新たな治療法となると考えられた。一方、アクチビンBは絶食など代謝ストレス時にその発現が肝臓において亢進を認めた。また、新たに作出した組織特異的アクチビンB欠損マウスにおいてインスリン分泌が障害されることを見出した。これらの結果は生理的なインスリン分泌における新たな制御機構の存在を指摘するものである。

研究成果の概要(英文)：we found that Activin B could improve whole-body glucose metabolisms through modulating both insulin sensitivity and glucose-induced insulin secretion (GSIS). We also found that Activin B could reduce fat mass and improve obesity of obese mice models via stimulating heat production and energy expenditure which depend on FGF21. During glucose tolerance test (GTT), increased insulin secretion was observed in normal lean mice or D10 mice with Inhbb gene transfer despite the improvement of insulin sensitivity. On the other hand, the study using newly established tissue-specific Inhbb gene knockout mice suggested that Activin B is required for physiological GSIS in normal mice.

研究分野：代謝学

キーワード：インスリン抵抗性 インスリン分泌 FGF21 アクチビン

## 1. 研究開始当初の背景

生体は外界の状況に応じて様々な因子をコントロールすることで、生体の恒常性を維持している。特に、全身のエネルギー恒常性は、脂肪組織・肝臓・骨格筋などのインスリン感受性組織が分泌因子や神経系を介して相互にコミュニケーションすることで厳密に維持されており、その破綻により糖尿病をはじめとする代謝性疾患が誘導されることが指摘されている。これらのネットワークの分子メカニズムの解明は、生体におけるエネルギー恒常性の理解にとどまらず、代謝性疾患の成立・進展機序の解明や未だ確立されていない根治療法への道を拓くものと考えられるが、その複雑さ故に全容の理解には未だ至っていない。

これまでに様々な分泌因子がパラクライン・エンドクラインの作用で生体のエネルギー恒常性が維持されていることが示され、またそのネットワークの破綻が糖尿病・代謝性疾患の一因となっていることが示されてきた。また近年では、TGF $\beta$ ファミリーリガンドに属する分子による糖・エネルギー代謝における役割についての報告がなされているが、その全容には不明な点多く残されている (Endocr.Rev.32(3):387-403 (2011))。

## 2. 研究の目的

これまでに筆者らは、TGF $\beta$ ファミリーリガンドの一種であるアクチビン B がエネルギー摂取により発現制御されており、肝臓におけるアクチビン B シグナルが糖・エネルギー代謝にコントロールに重要であることを示唆する知見を得ている。この結果から、アクチビン B は栄養・エネルギー摂取に応答し、生体恒常性を維持する分子ネットワークの一端を担う肝臓由来分泌因子 Hepatokine の一種であると考えている。この経路はこれまで知られていなかった新規の糖・エネルギー代謝制御メカニズムである可能性が高いと考えられることから、アクチビン B 作用の中心的な分子メカニズムを解明することで、エネルギー恒常性ネットワークの一端を明らかにすることを本研究の主な目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1) アクチビン B 強制発現による代謝表現系の解析

絶食など代謝ストレス下においてアクチビン B をコードする *Inhbb* 遺伝子発現量が著明に増加することを見出した。正常マウスおよび病態モデルマウスにおいて、ウイルスベクターを用いて肝臓において *Inhbb* 遺伝子を強制発現させ、その代謝表現系を解析することで、エネルギー恒常性におけるアクチビン B の役割を明らかにする。

### 2) 組織特異的アクチビン B 欠損マウスの代謝表現系の解析

*Inhbb* 遺伝子にコードされる Inhibin B サブユニットが 2 つ結合することで機能体となるため、*Inhbb* 遺伝子を欠失させ、アクチビン B を産生されないマウスを作成する。全身性 *Inhbb* ノックアウトマウスの報告によれば、発生時の影響が無視できない (Genes Dev. 8(4):414-427 (1994))。そのため、CRIPR/Cas9 システムを用いて *Inhbb* Exon2 を挟むように LoxP 配列を挿入した *Inhbb* Flox マウスを作成し、肝特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウスとの交配により組織特異的 *Inhbb* 欠損マウスを作成しその代謝表現系を解析することで、エネルギー恒常性におけるアクチビン B の役割を明らかにする。

## 4. 研究成果

### 1) アクチビン B 強制発現による代謝表現系の解析

各種病態モデルマウスにおける予備検討から、アクチビン B の強制発現により、血中でのアクチビン B 濃度の亢進が認められ、インスリン抵抗性の改善、耐糖能異常の改善、グルコース依存性インスリン分泌 (GSIS) の亢進が認められた。

高脂肪食給餌によって作成した食餌性肥満マウスにおいて、AAV(アデノ随伴ウイルスベクター)を用いて肝特異的に *Inhbb* 遺伝子を導入したところ、インスリン感受性の亢進および GSIS の亢進を伴って、著明な耐糖能異常の改善を認めた。また、持続的なアクチビン B 高産生状態を 1 週間以上維持したところ、有意な体重低下を認めた。アクチビン強制発現により、熱産生およびエネルギー消費量は有意に増加しており、BAT(褐色脂肪組織)における組織学的解析および遺伝子発現解析からは、BAT 機能の改善が示唆された。また、体組成の解析から、体重低下は主に脂肪重量の低下であると考えられ、除脂肪体重・筋重量・握力に著変を認めなかった。

アクチビン B の強制発現により肝臓における FGF21 の発現量および血中濃度が有意に増加していた。そこで、高脂肪食負荷 FGF21 欠損マウスにおける AAV による持続的なアクチビン B 高産生による影響について、野生型マウスにおける影響と比較したところ、FGF21 欠損マウスにおいては、野生型マウスと同様に耐糖能異常改善作用を認めたが、インスリン感受性の改善作用および脂肪量の減少効果は明らかに減弱していた。さらに、アクチビン B 導入による熱産生およびエネルギー消費量の亢進は、FGF21 欠損マウスにおいてはこの効果が認められなかった。

このことから、アクチビンによる脂肪量の減少はエネルギー消費の亢進によるものと考えられ、

この効果は FGF21 に依存したものと考えられた。

## 2) アクチビン B 欠損マウスの代謝表現系の解析

新たに作出した組織特異的 *Inhbb* 遺伝子欠損マウスにおける代謝表現系を解析したところ、インスリン感受性には著変を認めず、わずかに耐糖能異常を認めた。そこで、腹腔内糖負荷後の血中インスリン濃度を評価したところ、野生型マウスと比して *Inhbb* 遺伝子欠損マウスで低値であり、グルコース依存性インスリン分泌の障害が示唆された。この結果から、*Inhbb* 遺伝子は正常マウスの生理的なインスリン分泌制御に必要であることが示唆された。しかしながら、単離膵島および膵還流法で GSIS を評価したところ、*Inhbb* 欠損マウスと野生型の間に差を認めなかった。このことから、細胞におけるグルコース感知からインスリン分泌には異常はなく、インスリン分泌の修飾経路に異常があるものと考えられた。

一方で、正常マウスにおけるアクチビン B 強制発現によりインスリン感受性の亢進が認められるにも関わらず、腹腔内糖負荷後の血中インスリン濃度は著明に増加していた。また、グルコースのみならず、アミノ酸、SU 薬などのインスリン分泌刺激に対する反応も亢進した。上記の *Inhbb* 欠損マウスでの結果と考え合わせるとアクチビンシグナルはグルコースに対する生理的なインスリン分泌反応を制御するために重要であると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Gotaro Toda, Kotaro Soeda, Yukiko Okazaki, Naoki Kobayashi et al.	4. 巻 79(1)
2. 論文標題 Lipopolysaccharide-Mediated Signaling in Adipose Tissue Macrophages Regulates Postprandial Glycemia Through Akt-mTOR Activation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 43-53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2020.04.033	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する
1. 著者名 Gotaro Toda, Kotaro Soeda, Yukiko Okazaki, Naoki Kobayashi, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Insulin- And Lipopolysaccharide-Mediated Signaling in Adipose Tissue Macrophages Regulates Postprandial Glycemia Through Akt-mTOR Activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2020.04.033.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する
1. 著者名 Kobayashi Masatoshi, Ohsugi Mitsuru, Sasako Takayoshi, Awazawa Motoharu, Umehara Toshihiro, Iwane Aya, Kobayashi Naoki, Okazaki Yukiko, Kubota Naoto, Suzuki Ryo, Waki Hironori, Horiuchi Keiko, Hamakubo Takao, Kodama Tatsuhiko, Aoe Seiichiro, Tobe Kazuyuki, Kadowaki Takashi, Ueki Kohjiro	4. 巻 38
2. 論文標題 The RNA Methyltransferase Complex of WTAP, METTL3, and METTL14 Regulates Mitotic Clonal Expansion in Adipogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 e00116-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00116-18	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Ikushima YM, Awazawa M, Kobayashi N, Osonoi S, Takemiya S, Kobayashi H, Suwanai H, Morimoto Y, Soeda K, Adachi J, Muratani M, Charron J, Mizukami H, Takahashi N, Ueki K.	4. 巻 70(7)
2. 論文標題 MEK/ERK Signaling in Cells Bifunctionally Regulates -cell Mass and Glucose-stimulated Insulin-secretion Response to Maintain Glucose Homeostasis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 1519-1535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2337/db20-1295.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

1. 著者名 Maya Matsushita, Motoharu Awazawa, Naoki Kobayashi, Yoshiko Matsumoto Ikushima, Kotaro Soeda, Miwa Nakano, Masafumi Muratani, Kenta Kobayashi, Matthias Bluher, Jens Claus Bruning, Kohjiro Ueki	4. 巻 29(4)
2. 論文標題 An Antisense Transcript Transcribed from Irs2 Locus Contributes to the Pathogenesis of Hepatic Steatosis in Insulin Resistance.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology.	6. 最初と最後の頁 680-689
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2021.12.008.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 小林直樹、岡崎由希子、門脇孝、植木浩二郎
2. 発表標題 Activin B による肥満モデルにおける脂肪組織に対する効果
3. 学会等名 第24回 アディポサイエンスシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林直樹、岡崎由希子、門脇孝、植木浩二郎
2. 発表標題 Activin B による肥満モデルにおける脂肪組織に対する効果
3. 学会等名 第40回 日本肥満学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林直樹、岡崎由希子、門脇孝、植木浩二郎
2. 発表標題 Activin B による肥満モデルにおける脂肪組織に対する効果
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林直樹、岡崎由希子、門脇孝、植木浩二郎
2. 発表標題 Activin B による肥満モデルにおける脂肪組織に対する効果
3. 学会等名 第34回 日本糖尿病・肥満動物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林直樹、岡崎由希子、門脇孝、植木浩二郎
2. 発表標題 Activin B - Fst13 による代謝制御機構とその破綻による代謝異常
3. 学会等名 第62回 日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林直樹、岡崎由希子、門脇孝、植木浩二郎
2. 発表標題 Activin B による肥満モデルにおける脂肪組織に対する効果
3. 学会等名 第24回 アディポサイエンスシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林直樹、岡崎由希子、門脇孝、植木浩二郎
2. 発表標題 Activin B による肥満モデルにおける脂肪組織に対する効果
3. 学会等名 第40回 日本肥満学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林直樹、岡崎由希子、門脇孝、植木浩二郎
2. 発表標題 Activin B - Fst13 Axis Regulates Glucose Metabolism
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林直樹、岡崎由希子、門脇孝、植木浩二郎
2. 発表標題 Activin B - Fst13による代謝制御機構とその破綻による代謝異常
3. 学会等名 第61回 日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naaki Kobayashi, Yukiko Okazaki, Takashi Kadowaki, Kohjiro Ueki
2. 発表標題 Hepatic Activin B controls glucose metabolism
3. 学会等名 39th JASSO, APDO SYMPOSIUM 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林直樹、岡崎由希子、門脇孝、植木浩二郎
2. 発表標題 Activin B-Fst13による代謝制御機構とその破綻による代謝異常
3. 学会等名 第33回 日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林直樹、岡崎由希子、門脇孝、植木浩二郎
2. 発表標題 Activin B-Fst13による代謝制御機構とその破綻による代謝異常
3. 学会等名 第33回 糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------