

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月25日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009年度～2011年度

課題番号：21590067

研究課題名（和文）メタボリックシンドロームにおけるストレスとサイトカインシグナルのクロストーク

研究課題名（英文）Crosstalk between stress and cytokine signaling in metabolic syndrome

研究代表者

林 秀敏 (HAYASHI HIDETOSHI)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：80198853

研究成果の概要（和文）：本研究ではメタボリックシンドロームにおけるストレスシグナルと炎症性サイトカインのシグナルのクロストークについて、様々なストレスで誘導される TRB3 という pseudokinase を中心に、脂肪細胞や肝細胞、 β 細胞をモデルとして検討した。両シグナルとも脂肪細胞の分化や機能においてはともに強く阻害したのに対し、肝細胞では、 $TGF\beta$ のシグナルを TRB3 は強く抑制し、 β 細胞では小胞体ストレスなどによる機能低下を $TGF\beta$ が解除することを見出し、細胞によって、両者のシグナルのクロストークは異なった表現型を示すことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the crosstalk between stress and inflammatory cytokine signaling in metabolic syndrome using adipocytes, hepatocytes and pancreatic beta cells, especially focused on contribution of the members of pseudokinase family TRBs, which are induced by various stresses.

Both signals were strongly attenuated the maturation and function of adipocytes (3T3-L1 cells and HW11 cells). On the other hand, in human hepatoma cell line, HepG2 cells, stress induced TRB3 potently inhibited the signaling of one of the inflammatory cytokines, $TGF\beta$. Moreover the impairment of β cell line, Min6 cells, induced by endoplasmic reticulum stress is rescued by $TGF\beta$. Our findings suggest that the crosstalk of both signal showed the cell-specific phenotype, and that TRBs proteins function as the tuner of these responses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：ストレス、TRB3、 $TGF\beta$ 、脂肪細胞、 β 細胞、メタボリックシンドローム

1. 研究開始当初の背景

糖尿病や高脂血症などの生活習慣病の急増は社会問題になっており、その発症原因の追求・根本的治療の確立は急務となっている。最近、これら生活習慣病と酸化ストレス、小胞体ストレス、低酸素ストレスなど、各種ストレスとの関連性についての知見が見受けられるが、その分子レベルでの解析は少ない。申請者らは **TRB3** というタンパクが種々の小胞体ストレスに応じて発現亢進し、アポトーシスを増強することを見出した。この **TRB3** タンパクはその上流の転写因子とその **coactivator** との結合を阻害することによって、**TRB3** 自身の発現をネガティブ・フィードバック的に制御していることも明らかにし、一時的な弱いストレスの場合、誘導された **TRB3** は細胞死誘導を制御し、その間、細胞は修復を試みているが、持続的な過度のストレスが発生している状況では、一定レベル以上の **TRB3** が細胞内に蓄積し、未知の経路によって、アポトーシスの方向に細胞が傾くというモデルを提唱し、「**TRB3** はそのストレスの強度を感知するセンサー」の役割を担っているのではないかと予想している。また、この **TRB3** は小胞体ストレスばかりでなく、酸化ストレスや低酸素、グルコース枯渇など、他のストレスにおいても誘導されることを見出しており、広くストレス応答を制御している分子の一つである可能性を考えている。最近、**TRB3** が糖尿病モデルマウスの肝臓などで高い発現を示し、インスリン抵抗性を誘導していることが報告され、また、II型糖尿病のゲノム上の責任遺伝子が存在する領域の一つに **TRB3** が存在すること、II型糖尿病患者から **TRB3** の多型が検出されるなど、**TRB3** と糖尿病とを結びつける知見が増えつつある。

2. 研究の目的

本研究では、糖尿病や高脂血症を、特に、①脂肪細胞、②肝細胞、の各細胞分化やその機能に焦点を当てて、小胞体ストレスだけではなく、酸化ストレスや栄養飢餓、低酸素ストレスなど、様々なストレスに対する応答とともに各種サイトカインによるその機能調節を **TRB3** をキー分子、シグナル統合分子として検討した。

3. 研究の方法

白色・褐色脂肪細胞分化、あるいはその機能における **TGF-β**、**TRBs** の効果

褐色脂肪細胞株 (HB2)、白色脂肪細胞株 (HW11、3T3-L1) を用いて、その増殖・分化、肥大化、ならびにその機能への **TRBs**、あるい

は炎症性サイトカインである **TGF-β** の影響を調べる。

- ① 白色・褐色脂肪細胞の分化過程における **TRBs**、あるいは **TGFβ** の効果を様々なマーカー遺伝子の発現や形態を観察して調べた。
- ② 成熟脂肪細胞の脂質代謝におけるストレス、**TGF-β** による機能変化、特に、脂肪滴の形成、ならびに中性脂肪の蓄積について検討した。

膵β細胞の生存、ならびに機能における **TGFβ**、**TRBs** の役割

- ① 種々の刺激、ストレスにおける細胞内の **TRB3** の発現変化を遺伝子、タンパクレベルで観察した。
- ② **TRB3** の過剰発現、あるいはノックダウンによる細胞の増殖能やグルコース応答性、インスリン分泌能への影響について観察した。
- ③ 各種刺激によるβ細胞の機能障害や細胞死への **TGFβ** の効果についても調べた。

肝細胞の機能における **TRBs**、**TGFβ** の効果

- ① **TGFβ** のシグナルや作用に及ぼす **TRB3** や **TRB3** 誘導性のストレスの影響を遺伝子やタンパク、あるいは転写活性化能について検討した。
- ② そのメカニズムを探るために、**TGFβ** のシグナル伝達分子である **Smad2/3** の機能に対する **TRB3** による影響(転写活性化能、局在、DNA結合能など)を調べた。
- ③ コレステロール代謝関連遺伝子である **SREBP** の転写活性化能、ならびに発現への影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 脂肪細胞に及ぼす効果

- ① 炎症や代謝などへの関与が示されている核内受容体 **RORα** の脂肪細胞分化に及ぼす影響について検討したところ、**RORα** は脂肪細胞分化のマスターレギュレーター **C/EBPβ** と結合することによってコ・アクチベーターとの結合を阻害し、**C/EBPβ** の転写活性を抑制して脂肪細胞分化を阻害することを明らかにした。また、**RORα** は別のマスターレギュレーターである **PPAR_γ** 依存的に発現するペリリピン(脂肪滴の生成に必須)の発現を抑制し、これはペリリピンのプロモーター上にある **PPAR_γ** と **RORα** の結合領域がほとんど重なっており、お互い競合的に結合を阻害することにより抑制され

ることを見出した (*Mol. Endocrinol.* (2009))。

- ② マウス白色脂肪細胞株 (HW11)、褐色脂肪細胞株 (HB2) を用いて、脂肪細胞分化・成熟化に及ぼす抗炎症サイトカイン TGFβ の影響を調べたところ、いずれの細胞株ともその分化の抑制効果が見出された、その効果は特に白色脂肪細胞株で強く認められた。また、成熟した脂肪細胞株への TGFβ の効果を検討したところ、褐色脂肪細胞株はほとんど影響を受けなかったのに対し、白色脂肪細胞株では顕著な脂肪滴の減少が見られ、白色脂肪細胞の機能を特異的に制御可能であることが示唆された (in preparation)。
- ③ 白色脂肪細胞株 (3T3-L1、HW11 細胞など) の分化・成熟化においてストレス誘性の TRB3 は、以前の検討で、負に制御することを明らかにしている。今回、抗炎症性サイトカインの一つである TGFβ による影響を調べたところ、脂肪細胞の成熟化を強く抑制すること、さらに、成熟化した脂肪細胞の脂肪滴が TGFβ により劇的に減少することを見出した。この脂肪滴の減少は脂肪滴形成に重要な働きをしている perilipin の発現が強く低下していることによること、またその原因としてその上流の転写因子である PPARγ の活性ではなく、発現が抑制されていることによって起こっていることが明らかとなった。TRB3 も PPARγ の活性を低下することから、TRB3 を介したストレスシグナルと TGFβ のシグナルは脂肪滴の減少に協調的に働く可能性が考えられた。

(2) 肝細胞に及ぼす効果

- ① ヒト肝がん細胞株 HepG2 細胞を用いて、TGFβ 依存的な細胞内情報伝達を TRB3 は強く抑制することを見出した。この抑制効果は小胞体ストレスを細胞に加えても認められ、また、TRB3 のノックダウンで減弱した。TGFβ の情報伝達分子群である Smad family 分子の中で、Smad3 と Smad7 が TRB3 と強く結合することが明らかにした。Smad7 についてはこの TRB3 による TGFβ シグナルの抑制機構への関与は今のところ不明であるが、Smad3 については TRB3 はリン酸化や転写活性化能には影響せず、DNA への結合を抑制することを明らかにした (in preparation)。
- ② 肝癌細胞株 (HepG2) において、TRB3 は SREBP-2 遺伝子発現を抑制することにより、コレステロールホメオスタシスの制御に関与していることを明らかにし

た。さらに、HepG2 において TGFβ シグナルが TRB3 によって抑制され、これは、TGFβ シグナル分子の一つ Smad3 の DNA への結合低下に基づくことを明らかにした。

(3) 膵臓 β 細胞に及ぼす効果

- ① マウス膵 β 細胞株 MIN6 細胞は 5mM グルコース条件下で小胞体ストレスをおこすと、インスリンやその発現に重要な転写因子 PDX1 の発現が低下するが、TGFβ が共存すると小胞体ストレスが緩和され、インスリンなどの発現低下も回復した。一方、高血糖 (25mM) 条件下では TGFβ 存在下でも小胞体ストレスの緩和は見られず、インスリン低下も回復しなかった。これらは高血糖時、TGFβ のシグナル伝達が抑制されるためであることが示唆された。

(4) 他の細胞に及ぼす効果

- ① ストレス誘導性 pseudokinase TRB3 は多くのがんで高発現していることが知られており、TRB3 の細胞周期への影響を検討するため、cyclin dependent kinase (CDK) の脱リン酸化・活性化をおこす phosphatase Cdc25A のタンパク発現への TRB3 の影響を調べた。すると、通常の状態ではその発現を TRB3 は負に制御し、DNA 傷害時に不安定化する Cdc25A を TRB3 は逆に安定化させるといふ、二相性の制御を Cdc25A に対して行っていることを新たに見出した (*Biol. Pharm. Bull.* (2010))。また、TRB3 は細胞周期依存的にそのタンパクの発現が変動することを見出し、これは細胞周期関連ユビキチンリガーゼの一つである APC/C^{Cdh1} が深く関与していることが明らかとし、これが Cdc25A の細胞周期依存的な発現変化を引き起こしている可能性を見出した (*BBRC* (2010))
- ② 免疫増強性サイトカインである IL-2 の NF-AT という転写因子による転写を TRB3 は正に、TRB1 は逆に負に制御していることを見出し、TRB1/TRB3 の発現のバランスの免疫応答への影響の可能性が示された。

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 7 件)

- ① J. Xu, Y. Itoh, H. Hayashi, T. Takii, K. Miyazawa, K. Onozaki
Dihydrotestosterone inhibits IL-1α or TNF-

α -induced proinflammatory cytokine production via androgen receptor-dependent inhibition of NF- κ B activation in rheumatoid fibroblast-like synovial cell line.

Biol. Pharm. Bull., 34, (2011) 1724-1730, 査読有

② S. Sakai, N. Ohoka, K. Onozaki, M. Kitagawa, M. Nakanishi, H. Hayashi
Dual mode of regulation of Cdc25A protein by TRB3.

Biol. Pharm. Bull., 33, (2010) 1112-1116 査読有

③ H. Fukasawa, T. Yamamoto, Y. Fujigaki, T. Misaki, N. Ohashi, T. Takayama, S. Mugiya, T. Oda, C. Uchida, K. Kitagawa, T. Hattori, S. Suzuki, H. Hayashi, S. Ozono, M. Kitagawa, A. Hishida

Reduction of TGF- β type II receptor is caused by the enhanced ubiquitin-dependent degradation in human renal cell carcinoma.

Int. J. Cancer, 127, 1517-1525 (2010) 査読有

④ N. Ohoka, S. Sakai, K. Onozaki, M. Nakanishi, H. Hayashi

Anaphase promoting complex/cyclosome-Cdh1 mediates the ubiquitination and degradation of TRB3.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 392, (2010) 289-294 査読有

⑤ K. Yamazaki, J. Gohda, A. Kanayama, Y. Miyamoto, H. Sakurai, M. Yamamoto, S. Akira, H. Hayashi, B. Su, J. Inoue

Two mechanistically and temporally distinct NF- κ B activation pathways in IL-1 signaling.

Science Signaling, 2, (2009) ra66 査読有

⑥ N. Ohoka, S. Kato, H. Hayashi, R. Sato

The orphan nuclear receptor ROR α restrains adipocyte differentiation through a reduction of C/EBP β activity and perilipin gene expression.

Mol. Endocrinol., 23, (2009) 759-771 査読有

⑦ F. Ishikawa, T. Akimoto, H. Yamamoto, Y. Araki, T. Yoshie, K. Mori, H. Hayashi, K. Nose, M. Shibamura

Gene expression profiling identifies a role for CHOP during inhibition of the mitochondrial respiratory chain.

J. Biochem., 146, (2009) 123-132 査読有

[学会発表] (計 10 件)

① 大岡伸通, 林 秀敏, 内藤幹彦, 佐藤隆一郎: ヒト肝癌細胞株における TRB3 によ

る SREBP-2 制御機構の解明. 日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 29 日 (札幌)

② Y.Noguchi, W.Kojima, S.Sakai, Y.Itoh, Y.Inoue, H.Hayashi: Regulation of FoxO1 activity by TRB1. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 11 月 16 日 (横浜)

③ 楽 怡, 岡山敦子, 野口祐美子, 井上靖道, 伊藤友香, 小野寄菊夫, 齋藤昌之, 林 秀敏
TGF- β による白色脂肪細胞における脂肪滴蓄積の制御. 第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 22 日 (京都)

④ 牛山小百合, 井手佑子, 吉井由比子, 酒井聡, 伊藤友香, 大岡伸通, 小野寄菊夫, 井上靖道, 林 秀敏
ストレスセンサータンパク質 TRB3 と TGF- β シグナルのクロストーク. 第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 22 日 (京都)

⑤ 酒井 聡, 大岡伸通, 北川雅 子, 中西 真, 小野寄菊夫, 林 秀敏
TRB1 による Cdc25A の発現制御機構の解析. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 8 日 (神戸)

⑥ Y.Sakai, K.Fukamachi, M.Futakuchi, H.Tsuda, M.Suzui, H.Hayashi
Establishment of human TRB3 transgenic mice. 第 69 回日本癌学会総会、2010 年 9 月 22 日 (大阪)

⑦ 井上万由美, 朴 佳栄, 荒川友博, 伊藤友香, 小野寄菊夫, 齋藤昌之, 林 秀敏
Effects of cytokines on the accumulation of lipid droplets in white and brown adipocytes during their differentiation. 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日 (横浜)

⑧ 牛山小百合, 井手佑子, 酒井 聡, 伊藤友香, 大岡伸道, 小野寄菊夫, 林 秀敏
ストレス誘導性タンパク質 TRB3 による TGF- β シグナルの制御. 次世代を担う若手ファーマ・バイオフィオーラム 2009、2009 年 11 月 14 日 (名古屋)

⑨ 中田佳宏, 酒井 聡, 大岡伸通, 小野寄菊夫, 林 秀敏
小胞体ストレス誘導性細胞死における pseudokinase TRB3 の役割. 第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 23 日 (神戸)

⑩ 高橋 裕, 大岡伸通, 加藤省吾, 林 秀敏, 佐藤隆一郎
脂肪細胞分化過程における核内受容体

ROR α の機能解析. 第30回日本肥満学会、
2009年10月9日(浜松)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 秀敏 (Hidetoshi Hayashi)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号: 80198853

(2) 研究分担者

伊藤 友香 (Yuka Itoh)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号: 40454326

酒井 聡 (Satoshi Sakai)

新潟薬科大学・薬学部・助教
研究者番号: 50566081

(3) 連携研究者

()

研究者番号: