

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461328

研究課題名(和文) 視床下部、膵臓ATF3ダブルノックアウトマウスの解析

研究課題名(英文) The analysis of hypothalamus and pancreas specific ATF3 double knockout mice

研究代表者

橋本 博美(横田博美)(HASHIMOTO, HIROMI)

群馬大学・生体調節研究所・助手

研究者番号：30323372

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)：2型糖尿病はインスリン抵抗性と膵内分泌細胞障害が合わさって発症する。さらに、中枢性(視床下部)のエネルギー制御破綻も肥満と糖尿病の病態に深く関わっている。申請者は視床下部/膵臓特異的ATF3ダブルノックアウトマウスを作製し、これらのマウスが血中インスリンやグルカゴン濃度に変化はないが、耐糖能が改善すること、さらに摂餌量の減少から体重が低下し、全身のインスリン感受性が改善していることを明らかとした。従って、視床下部のATF3は全身の糖代謝やエネルギー代謝の調節に重要な役割を果たす。

研究成果の概要(英文)：The pancreas and hypothalamus are critical for maintaining nutrient and energy homeostasis. Combined disorders in these organs account for the onset of metabolic syndrome. We generated pancreas- and hypothalamus-specific ATF3 knockout mice and showed that these mice displayed better glucose tolerance, neither plasma glucagon nor insulin level was altered in these mice. However, these mice exhibited higher insulin sensitivity, which was accompanied by leaner phenotype due to decreased food intake and increased energy expenditure. We concluded that ATF3 plays an important role in the control of glucose and energy metabolism.

研究分野：代謝学

キーワード：ATF3 視床下部

1. 研究開始当初の背景

現在、我が国における糖尿病患者数は急増中である。従って、糖尿病に対する新しい予防法、治療法の開発が、医学研究者にとって急務となっている。これまで、糖尿病研究者の多くは、2型糖尿病に伴う膵β細胞障害(インスリン分泌障害)に着目し、その分子機序の解明に力を注いできた。しかしながら、2型糖尿病ではα細胞におけるグルカゴン分泌抑制の障害も認められる。一方、視床下部は食欲とエネルギー消費を調節する重要な臓器であり、特に弓状核には食欲を促進し、エネルギー消費を抑制する神経ペプチドである *Agrp* を発現するニューロンが存在している。申請者が所属する研究室では以前に、転写因子 *FoxO1* と *Stat3* が *Agrp* の遺伝子転写を調節することを報告したが、それ以外の転写因子も関与している可能性がある。

ATF3 は *ATF/CREB* ファミリーに属する転写因子で、種々の細胞性ストレス(低酸素、小胞体ストレス、サイトカインなど)によって発現が誘導されるストレス応答性転写因子である。しかしながら、最近では外環境の変化(気温、栄養状態など)によっても *ATF3* の発現が誘導されることが明らかとなっており、環境適応性転写因子と考えられている。申請者は組織免疫染色を用いて、*ATF3* が膵臓においては内分泌細胞(β細胞とα細胞)に特異的に発現していること、また、視床下部の *Agrp* ニューロンにも発現していることを確認した。しかしながら、これらの細胞における *ATF3* の機能については不明であった。

2. 研究の目的

本研究課題においては、視床下部、膵臓特異的 *ATF3* ダブルノックアウトマウスを作製し、表現型を解析することで、これらの臓器における *ATF3* の役割の解明を試みた。メタボリック症候群では過食が原因の肥満を伴った2型糖尿病が重大な問題となっており、視床下部機能が障害されるメカニズムの解明が急がれる。本研究課題では視床下部と膵臓の両方で *ATF3* をノックアウトすることで、両臓器での *ATF3* の機能を同時に検討できる点がユニークである。研究成果から、*ATF3* の発現や転写活性を遺伝子学的、あるいは薬理的に操作することで、これまでになかった新しい作用機序のメタボリック症候群に対する治療法、あるいは予防法の開発につながる可能性があり、有意義な研究課題と考えた。

3. 研究の方法

視床下部と膵臓における *ATF3* の生理的役割を *in vivo* で明らかにする為に、*Pdx1-Cre* トランスジェニックマウス(ハーバード大学の Douglas Melton 教授より供与)と *ATF3 flox* マウス(東京医科歯科

大学の北嶋教授より供与)を交配し、視床下部と膵臓で特異的に *ATF3* が欠損するマウスを作製した。*Pdx1-Cre* マウスが膵臓と視床下部の両方の臓器に特異的に *Cre* を発現していることは、*Pdx1-Cre* マウスを *Rosa26-eGFP* マウス(Jacksonより購入)と交配させ、*GFP* シグナルを膵臓と視床下部でのみ検出することにより(他の臓器では検出しない)確認した。作製したマウスの各臓器をサンプリングし、実際に膵臓と視床下部で特異的に *ATF3* がノックアウトされていることを、免疫組織学的解析とウエスタンブロット法を用いて確認した(図1)。

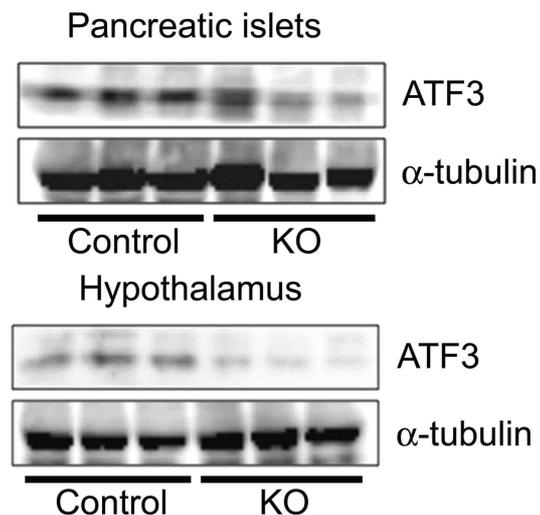


図1

次に、作製したマウスの体重、摂餌量を経時的に測定するとともに、血液サンプルを用いて、各種代謝パラメータ(血糖値、血中グルカゴン値、血中インスリン値など)の測定を行った。また、各種負荷試験(糖負荷試験、インスリン耐性試験など)に加え、呼吸代謝システム(Oxymax)を用いた酸素消費量、二酸化炭素排出量、熱産生量、呼吸商の測定、さらにマウス行動解析装置(ACTIMO-100)を用いた行動量の定量解析を行った。次に、これらのマウスからラ氏島を単離し、グルコースに対するグルカゴン分泌能を解析した。また、定量RT-PCRを用いて、ラ氏島と視床下部における各種ホルモン、転写因子などの遺伝子プロファイリングを行った。

4. 研究成果

まず、視床下部、膵臓特異的 *ATF3* ダブルノックアウトマウス(DKO)の空腹時、及び随時の血糖値はコントロールマウスに比べて有意に低下しており、糖負荷試験を施行すると、DKO マウスでは有意に耐糖能が改善していた(図2)。従って、当初は膵臓において *ATF3* が欠損しているために、インスリンやグルカゴンの分泌に変化が生じていると考えられたが、実際にDKOマ

ウスの血中インスリン濃度とグルカゴン濃度を測定してみると、図3に示すように、空腹時、随時ともコントロールと差が認められなかった。

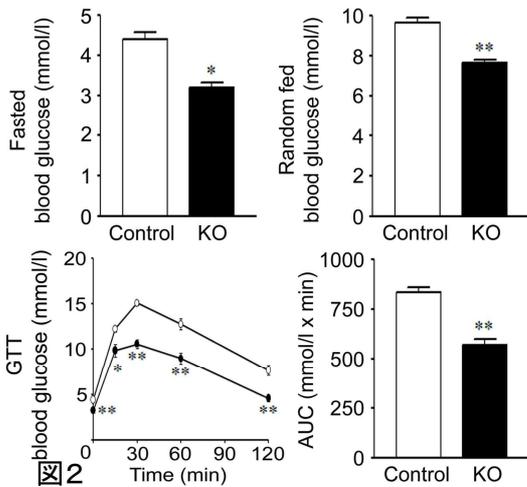


図2

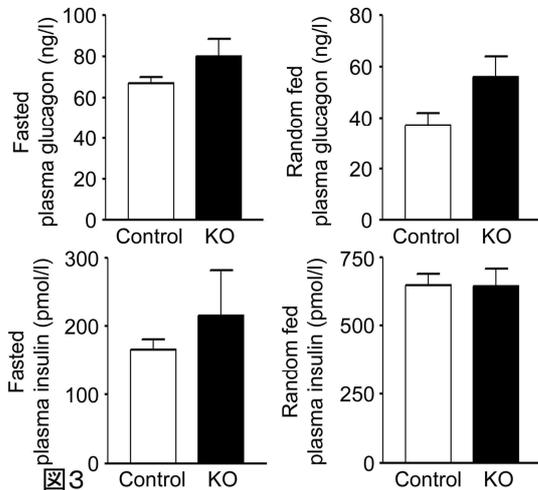


図3

そこで、DKO マウスからラ氏島を単離し、in vitro でグルコースによるインスリンとグルカゴン分泌反応を調べたが、両者に変化は認められなかった。さらに、単離ラ氏島を用いてグルカゴンとインスリンの mRNA 量を定量解析したが、やはり DKO マウスで変化が認められなかった (図4)。

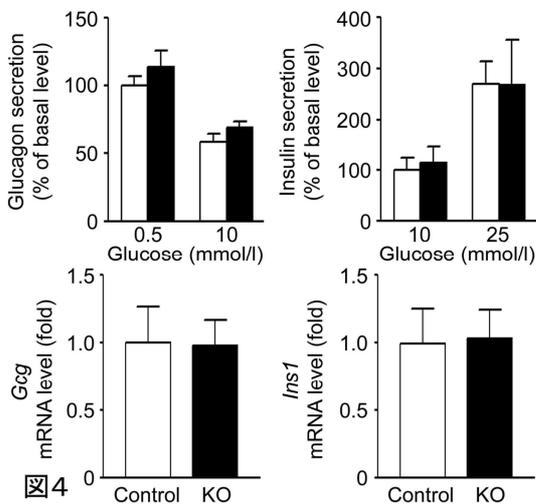


図4

次に、インスリン負荷試験を行った所、DKO マウスはインスリンの感受性が亢進しており、実際に肝臓と骨格筋において、インスリンによる AKT のリン酸化は DKO マウスで明らかに亢進していることが確認された (図5)。

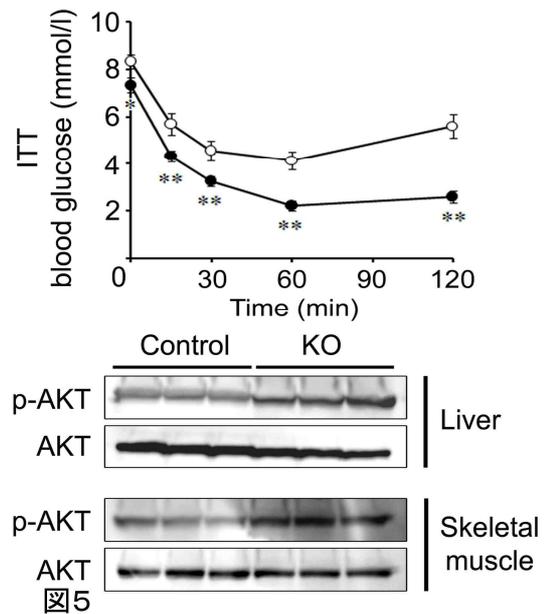


図5

一方、DKO マウスの体重はコントロールマウスに比べて低値を示し、摂食量も有意に減少していた (図6)。

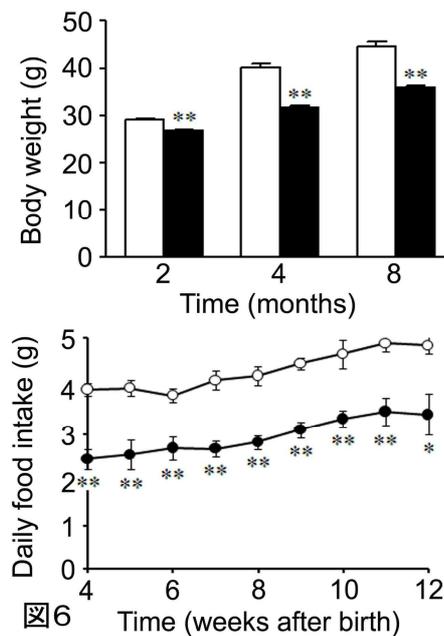


図6

さらに、エネルギー消費量を代謝測定装置で解析したところ、DKO マウスで有意に酸素消費量が増加していた (図7) 従って、視床下部の ATF3 は摂食量とエネルギー消費を調節し、体重調節とインスリン感受性に影響することが判明した。一方で、膵臓の ATF3 は細胞や細胞機能にあまり影響しないと考えられた。今後、ATF3 を標的にした肥満、糖尿病に対する治療法や予防法の開発につながることを期待される。

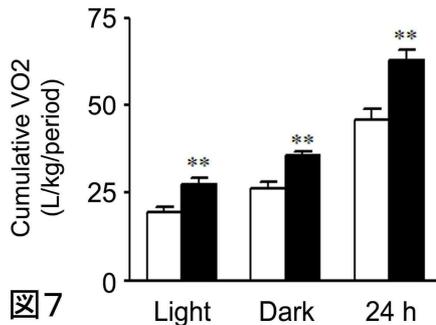
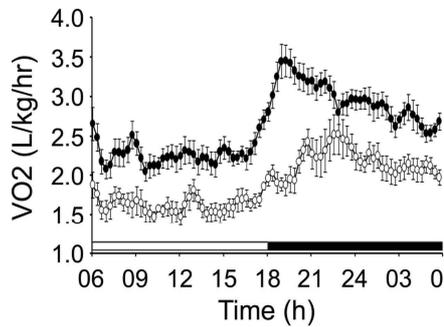


図7

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 2 件)

1. Lee Y-S, Kobayashi M, Kikuchi O, Sasaki T, Kim H-J, Yokota-Hashimoto H, Susanti V-Y, Ido-Kitamura Y and Kitamura T. ATF3 expression is induced by low glucose in pancreatic alpha and beta cells and regulates glucagon but not insulin gene transcription. **Endocr J** 査読有り 61: 85-90. 2014.
2. Lee Y-S, Sasaki T, Kobayashi M, Kikuchi O, Kim H-J, Yokota-Hashimoto H, Shimpuku M, Susanti V-Y, Ido-Kitamura Y, Kimura K, Inoue H, Tanaka-Okamoto M, Ishizaki H, Miyoshi J, Ohya S, Tanaka Y, Kitajima S and Kitamura T. Hypothalamic ATF3 is involved in regulating glucose and energy metabolism. **Diabetologia** 査読有り 56: 1383-1393. 2013.

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://taisha.imcr.gunma-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

橋本 博美 (HASHIMOTO Hiromi)
 群馬大学・生体調節研究所・助手
 研究者番号：30323372

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：