

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860705

研究課題名(和文) ストレス応答性転写因子ATF3の肝臓糖代謝調節メカニズムの解明

研究課題名(英文) Effect of ATF3 induced by stress on glucose metabolism in the liver

## 研究代表者

渡邊 一史 (Watanabe, Hitoshi)

金沢大学・脳・肝インターフェースメディスン研究センター・博士研究員

研究者番号：50721495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓でのストレス応答が、肝臓インスリン抵抗性および糖代謝異常に果たす役割については、必ずしも十分に解明されていない。肥満・インスリン抵抗性状態や小胞体ストレス誘導時において、ストレス誘導性転写因子であるATF3発現の増加を確認した。またこの時、IL-6による糖新生系酵素遺伝子発現を抑制する転写因子STAT3のリン酸化は減弱していた。これらの結果は、肥満・インスリン抵抗性時の肝臓糖代謝異常にATF3やSTAT3が何らかの役割を果たす可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：The role of hepatic stress response in insulin resistance and glucose metabolism is not elucidated enough. Through this study, we have clarified expression of ATF3, is transcription factor induced by stress, increased in the condition of obesity and insulin resistance and the induction of endoplasmic reticulum. Then, phosphorylation of STAT3, inhibits the expression of glucose production related gene in the liver, by IL-6 was decreased. These results suggest that there is possibility that ATF3 and STAT3 in the liver regulate the glucose metabolism.

研究分野：内分泌

キーワード：肝臓 糖代謝 ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

肥満・過栄養に伴う肝臓インスリン抵抗性は、個体レベルでの糖代謝異常、特に肝臓にける糖新生の増加と密接に関連している。肝臓における糖新生には、糖新生系酵素である G6pase や Pck1 の発現調節が重要であることが知られている (Diabetes Metab Res Rev 17:250, 2001)。これらの糖新生系酵素の遺伝子発現は、絶食時におけるグルカゴンや摂食時におけるインスリンによる制御を受ける。肥満・糖尿病状態において認められる肝臓糖産生の増加は、グルカゴンによる cyclic AMP response element binding protein (CREB) などの活性化や PI3-K シグナル経路などのインスリンシグナルの障害によって誘導されることが明らかにされている (Science 319:1402, 2008; J Clin Invest 110:1483, 2002)。

近年、このような肝臓における糖産生制御異常の病因として、酸化ストレス・小胞体ストレス・慢性炎症といった種々のストレスの重要性が指摘されている。これらのストレスに共通する JNK シグナルの活性化などの生体応答は、インスリンシグナル伝達の阻害により、肝臓インスリン抵抗性を惹起することが知られている (Nature 420:333, 2002 など)。一方で、ストレス応答は、遺伝子転写制御を介し、炎症や細胞障害、細胞死の誘導などを引き起こすことも知られている (Nature 444:860, 2006 など)。実際に、小胞体ストレスの軽減が、炎症や細胞障害、細胞死の誘導を抑制するとともに、肥満マウス肝臓におけるインスリンシグナル伝達障害を改善することにより、糖新生を抑制することが報告されている (Science 313:1137, 2006)。

しかし、肝臓でのストレス応答による遺伝子発現制御の変化が、肝臓インスリン抵抗性および糖代謝異常に果たす役割については、必ずしも十分に解明されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、肥満に伴う小胞体ストレスが肝臓における糖代謝、特に糖産生に及ぼす影響およびその作用メカニズムを解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究には、小胞体ストレスモデルとして

通常マウス由来初代培養肝細胞へのツニカマイシン処理、糖尿病・肥満 db/db マウス由来の初代培養肝細胞および db/db マウス個体を用い、小胞体ストレスの肝臓糖産生への作用を検討した。具体的には、小胞体ストレス下において、ストレス誘導性転写因子である Activating transcription factor 3 (ATF3) タンパク質の発現動態および糖新生系酵素遺伝子発現を抑制する転写因子 signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) のリン酸化動態をウェスタンブロット法により解析をした。小胞体ストレスを軽減する化学シャペロン PBA を用いて、小胞体ストレスの軽減が STAT3 のリン酸化に与える影響を解析した。また、小胞体ストレス誘導時の肝糖新生系酵素遺伝子 G6pase の遺伝子発現レベルを定量的 PCR 法により解析し、STAT3 のリン酸化レベルと肝臓糖産生の関係性について検討した。さらに、db/db マウスを用いて個体レベルでの小胞体ストレスの肝臓糖産生への作用における STAT3 の役割について検討を行った。

## 4. 研究成果

初代培養肝細胞への小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシン処理が、糖産生に及ぼす影響について検討した。ツニカマイシンの初代培養肝細胞への添加は、ストレス誘導性転写因子である ATF3 タンパク質発現量を増加させることを確認した。また、初代培養肝細胞へのツニカマイシン処理は、IL-6 による STAT3 のリン酸化を抑制した。STAT3 は、IL-6 刺激によりリン酸化されて活性化型となり、肝糖新生系酵素遺伝子 G6pase の遺伝子発現を抑制する転写因子として知られる。実際に、IL-6 刺激による STAT3 のリン酸化を介する G6pase 遺伝子発現の抑制効果は、ツニカマイシン処理下においては減弱した。IL-6 依存性の STAT3 のリン酸化および G6pase 遺伝子発現の抑制作用は、小胞体ストレス誘導下では減弱したが、小胞体ストレスを軽減する化学シャペロン PBA の添加によって回復した。

次に、糖尿病・肥満 db/db マウス由来初代培養肝細胞において、小胞体ストレスが糖産生に及ぼす影響について検討を行った。db/db マウス由来初代培養肝細胞では、ATF3 タンパク質発現量が通常マウス由来初代培養肝細胞における発現量に比べて増加しており、小胞体ストレスが上昇していると考えられる。db/db マウス由来初代培養肝細胞に

においても通常マウス由来初代培養肝細胞へのツニカマイシン処理時と同様に、IL-6 刺激による STAT3 のリン酸化は低下した。この db/db マウス由来初代培養肝細胞において認められた IL-6 依存性の STAT3 のリン酸化の低下は、化学シャペロン PBA の添加によって通常マウス由来初代培養肝細胞と同等のレベルに改善した。G6pase 遺伝子発現は、STAT3 のリン酸化レベルを反映し、db/db マウス由来初代培養肝細胞において認められる IL-6 による発現抑制の障害が、化学シャペロン PBA の添加により改善した。

最後に、マウス個体において小胞体ストレスの糖産生制御メカニズムにおける STAT3 の役割を検討した。db/db マウス肝臓では、通常マウスに比べて ATF3 タンパク質発現が上昇しており、db/db マウスは小胞体ストレスが増加していた。通常マウスへの IL-6 投与は、STAT3 の著しいリン酸化を誘導した。一方で、db/db マウスにおいては、IL-6 による STAT3 のリン酸化誘導は障害されていた。この db/db のおける IL-6 依存性の STAT3 のリン酸化の減弱は、化学シャペロン PBA の前投与によって通常マウスと同レベルまで回復した。また、化学シャペロン PBA の前投与は、db/db マウスにおいて認められる IL-6 依存性の STAT3 のリン酸化を介した G6pase 遺伝子発現抑制作用の障害を改善した。

これらのことから、小胞体ストレスによって引き起こされる肝臓糖代謝異常の一つの要因として、小胞体ストレスの IL-6 依存性の STAT3 リン酸化を介した肝糖新生系酵素遺伝子発現抑制作用の障害が、小胞体ストレスによって引き起こされる肝臓糖代謝異常の一つの要因であることが明らかとなった。

## 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6件)

Kimura K, Tanida M, Nagata N, Inaba Y, Watanabe H, Nagashimada M, Ota T, Asahara S, Kido Y, Matsumoto M, Toshinai K, Nakazato M, Shibamoto T, Kaneko S, Kasuga M, Inoue H. Central Insulin Action Activates Kupffer Cells by Suppressing Hepatic Vagal Activation via the Nicotinic Alpha 7 Acetylcholine Receptor. Cell Rep. 2016 Mar 15; 14(10):2362-74. (査読有)

Watanabe H, Nakano T, Saito R, Akasaka D, Saito K, Ogasawara H, Minashima T, Miyazawa K, Kanaya T, Takakura I, Inoue N, Ikeda I, Chen X, Miyake M, Kitazawa H, Shirakawa H, Sato K, Tahara K, Nagasawa Y, Rose MT, Ohwada S, Watanabe K, Aso H. Serotonin Improves High Fat Diet Induced Obesity in Mice. PLoS One. 2016 Jan 14;11(1):e0147143. (査読有)

Hondo T, Someya S, Nagasawa Y, Terada S, Watanabe H, Chen X, Watanabe K, Ohwada S, Kitazawa H, Rose MT, Nochi T, Aso H. Cyclophilin A is a new M cell marker of bovine intestinal epithelium. Cell Tissue Res. In press. (査読有)

Watanabe H, Chen X, Shoji N, Saito R, Nakano T, Saito K, Sumiyoshi K, Rose MT, Okada N, Watanabe K, Aso H. Stimulatory effect of plasma samples from fattening cattle on adipogenesis-related gene expression in preadipocyte cells. Anim Sci J. 2015 Jul;86(7):698-706. (査読有)

Inaba Y, Furutani T, Kimura K, Watanabe H, Haga S, Kido Y, Matsumoto M, Yamamoto Y, Harada K, Kaneko S, Oyadomari S, Ozaki M, Kasuga M, Inoue H. Growth arrest and DNA damage-inducible 34 regulates liver regeneration in hepatic steatosis in mice. Hepatology. 2015 Apr;61(4):1343-56. (査読有)

Suzuki M, Tada A, Kanmani P, Watanabe H, Aso H, Suda Y, Nochi T, Miyazawa K, Yoda K, He F, Hosoda M, Saito T, Villena J, Kitazawa H. Advanced application of porcine intramuscular adipocytes for evaluating anti-adipogenic and anti-inflammatory activities of immunobiotics. PLoS One. 2015 Mar 19;10(3):e0119644. (査読有)

[その他]

ホームページ等

<http://inoue.w3.kanazawa-u.ac.jp/index.html>

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 一史 (WATANABE HITOSHI)  
金沢大学・脳肝インターフェースメディスン  
研究センター・博士研究員  
研究者番号：50721495

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし