

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08909

研究課題名(和文) 小胞体ストレス応答転写因子ATF6 による肥満・糖尿病の増悪化機構の解明

研究課題名(英文) The role of endoplasmic reticulum sensor ATF6beta in diabetes and obesity

研究代表者

三宅 雅人 (MIYAKE, Masato)

徳島大学・先端酵素学研究所・准教授

研究者番号：30588976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞内タンパク質の恒常性を維持する小胞体ストレス応答経路の中でもATF6の肥満・糖尿病における役割を明らかにすることでATF6を標的とした肥満・糖尿病に対する創薬への基盤とすることである。ATF6の全身性欠損マウスは、肥満・糖尿病に対して抵抗性を示すが、ATF6単独での肝臓特異的欠損マウスではそのような表現系は観察されなかった。また、現在までにATF6とパラログであるATF6を肝臓特異的に二重欠損したマウスにおいてのみ、肥満・糖尿病に対して抵抗性を示すことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞体ストレスは肥満や糖尿病で生じるストレスであり、創薬標的となりうることを示されている。一方で、ATF6経路の意義は十分に解明されておらず、その解明は新たな治療標的の開発につながる可能性がある。本研究によって、肝臓におけるATF6が肥満や糖尿病において重要であることが示され、今後のさらなる研究により新規の治療標的となりうるだけでなく、生物学的意義がまだ十分にわかっていないATF6経路の分子機構に迫ることができる。

研究成果の概要(英文)：This study aims to elucidate the role of endoplasmic reticulum stress sensor ATF6 in obesity and diabetes and establish the molecular basis as a therapeutic target. A previous study revealed that conventional knock-out of ATF6 prevent obesity and diabetes when mice fed with a high-fat diet. We found that liver-specific knock-out of ATF6 has no obvious phenotype related to obesity and diabetes compared to control in mice. To understand the role of the ATF6 pathway, tissue-specific ATF6, and its paralog ATF6 double knockout mice were established. Among skeletal muscle, adipose tissue, monocyte, and liver, we found that liver-specific ATF6 /ATF6 double knockout mice prevent obesity and diabetes when mice fed a high-fat diet. More studies will reveal the importance of ATF6 on obesity and diabetes and lead to the establishment of a therapeutic target.

研究分野：代謝学

キーワード：肥満 糖尿病 小胞体 ATF6 肝臓

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

小胞体は、膜・分泌タンパク質の合成を担う器官である。種々の生理的・病態生理的な要因によって小胞体の内部環境のバランスが崩れ、変性タンパク質が小胞体内に蓄積し、小胞体ストレスと呼ばれる状態が発生する。小胞体ストレスは、肥満・糖尿病における種々の代謝調節組織の細胞で生じて、タンパク質の発現や輸送、局在など恒常性を破綻させて細胞機能を低下させること、細胞死の誘導によって機能的細胞を減少させることで肥満・糖尿病の発症や進展に寄与することがわかってきている。しかし、タンパク質恒常性の維持と独立した小胞体ストレス応答の機能が、肥満・糖尿病における細胞機能低下や病態の進展にどのような影響を与えるかは十分に明らかとなっていない。特に小胞体ストレス経路の転写因子 ATF6 は ATF6 と類似した機能を持つと考えられているが、分子シャペロンの転写誘導に影響しないことも報告されており標的や機能の理解は十分でない。本研究開始前の予備検討として ATF6 もしくは ATF6 を全身で欠損するマウスに肥満・糖尿病を発症させたところ、ATF6 欠損マウスでのみ野生型マウスと比べて肥満とインスリン抵抗性が改善することを見だしていた。この結果は、ATF6 が ATF6 と異なり肥満・糖尿病を悪化させることを示唆するが、どのインスリン標的臓器における転写制御が病態悪化において重要であるか決定するに至っていない。

### 2. 研究の目的

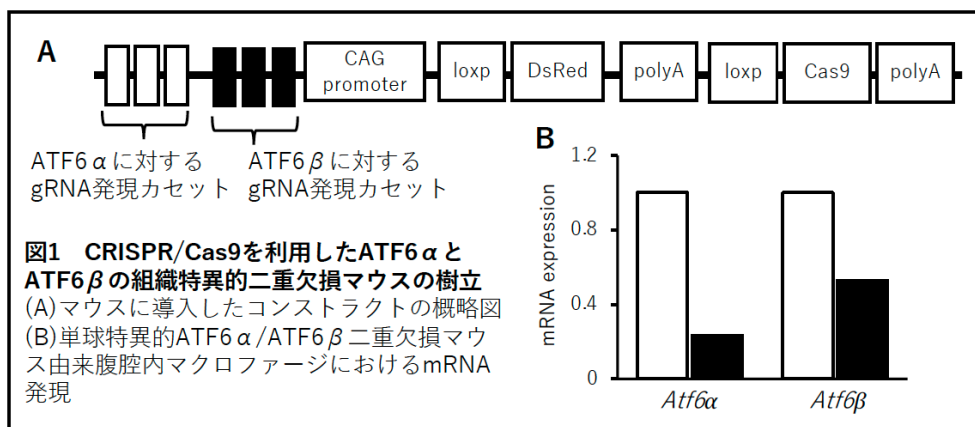
本研究では、小胞体ストレス応答の中でも ATF6 を介した転写制御機構に着目して、肥満・糖尿病における細胞機能低下及び病態悪化の分子機構の解明と ATF6 を標的とした肥満・糖尿病に対する創薬応用を目指す。

### 3. 研究の方法

骨格筋、肝臓、脂肪組織、単球特異的 Cre 発現マウスと CRISPR/Cas9 システムを利用した gRNA/Cas9 発現マウスを交配することで ATF6 とパラログである ATF6 の組織特異的二重欠損マウスを作成し、それらマウスに高脂肪食を給餌することで肥満・糖尿病を誘発し、体重変化およびインスリン抵抗性や耐糖能について検討する。また、Cre と loxp システムを用いて肝臓特異的に ATF6 単独、及び ATF6 /ATF6 欠損マウスを作成して表現系について検討を行った。

### 4. 研究成果

研究計画当初に解析を予定していた ATF6 を組織特異的に欠損させるための遺伝子改変マウスが遺伝子機能とは無関係に次世代を産出できない想定外の問題が発生したため、CRISPR/Cas9 システムを用いて ATF6 とパラログである ATF6 を組織特異的に二重欠損させる遺伝子改変マウス (Tg マウス) を用いて解析を行った。具体的には ATF6 と ATF6 に対する guide RNA を恒常的に発現し、かつ cre 依存的に Cas9 を発現するトランスジェニックマウスを樹立した (図 1A)。今回作成した CRISPR/Cas9 システムを利用して遺伝子を欠損させる方法は、単球特異的欠損マウスで検討したところ、従来の遺伝子を欠損させる方法である cre/loxp システムに比べて遺伝子発現低下効率はやや落ちるものの、野生型マウスと比べて ATF6 と ATF6 の発現が遺伝子改変マウスにおいて低下していた (図 1B)。さらに、Tg マウスと骨格筋、脂肪、肝臓、のそれぞれの細胞において cre を特異的に発現するマウスと交配することで ATF6 /ATF6 を組織特異的に二重欠損したマウスを作成した。



通常飼育下においてこれらのマウスの体重は、対照マウスと比較して差は認められなかった。肥満・糖尿病の病態に対する影響を解析するために、これらマウスに高脂肪食を給餌して病態を解析した。骨格筋、脂肪、単球の ATF6 $\alpha$  / ATF6 $\beta$  二重欠損マウスにおいて野生型と比べて体重増加に優位な差は認められず、また耐糖能やインスリン感受性にも差は認められなかった(図2)。

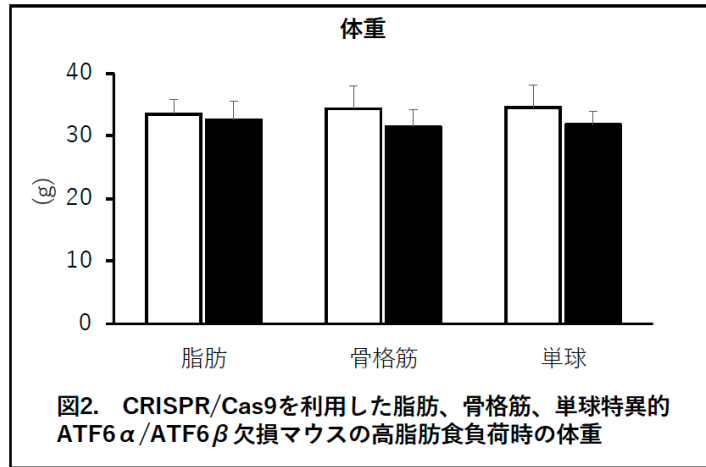


図2. CRISPR/Cas9を利用した脂肪、骨格筋、単球特異的 ATF6 $\alpha$ /ATF6 $\beta$ 欠損マウスの高脂肪食負荷時の体重

肝細胞特異的 TF6 $\alpha$  / ATF6 $\beta$  二重欠損マウスの解析を行ったところ、通常食飼育下において対照マウスと比べて体重は低下傾向にあるものの大きな差を認めなかった。一方で、高脂肪食を給餌したときにおいて耐糖能に差は認められなかったものの体重増加が肝臓特異的 ATF6 $\alpha$  / ATF6 $\beta$  二重欠損マウス抑制された(図3)。解析を予定していた ATF6 $\alpha$  flox マウスを新たに樹立して Cre/loxP 法で ATF6 $\alpha$  と ATF6 $\beta$  を欠損したマウスを作成して解析したところ、このマウスは通常食でも体重の低下が認められ、肝臓の機能において ATF6 $\alpha$  と ATF6 $\beta$  が重要であることが判明した。ATF6 $\alpha$  / ATF6 $\beta$  欠損マウスと対照マウスの肝臓において RNA-seq 解析を行ったところ、既知の標的遺伝子に加えて、脂質代謝関連遺伝子の一部が低下していることがわかった。

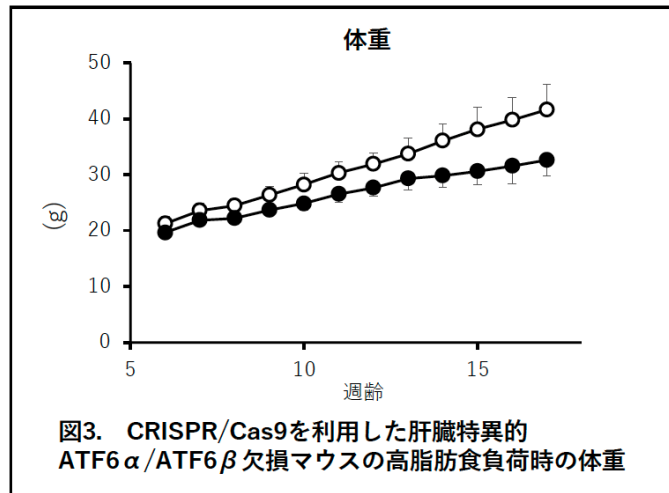


図3. CRISPR/Cas9を利用した肝臓特異的 ATF6 $\alpha$ /ATF6 $\beta$ 欠損マウスの高脂肪食負荷時の体重

次に、肝臓特異的に ATF6 $\alpha$  を単独で欠損できるマウスを作成して解析した。肝臓特異的 ATF6 $\alpha$  欠損マウスは、通常食給餌飼育と高脂肪食給餌飼育のいずれであっても体重増加に対照マウスと比べて優位な差は認められず、また耐糖能にも差は認められなかった。

以上より、ATF6 $\alpha$  単独での肥満・糖尿病の増悪化は、骨格筋、脂肪、肝臓、単球臓器以外が担っているか、複数臓器での欠損が重要であることが判明した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6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 2件）

1. 著者名 Miyake Masato, Sobajima Mitsuaki, Kurahashi Kiyoe, Shigenaga Akira, Denda Masaya, Otaka Akira, Saio Tomohide, Sakane Naoki, Kosako Hidetaka, Oyadomari Seiichi	4. 巻 29
2. 論文標題 Identification of an endoplasmic reticulum proteostasis modulator that enhances insulin production in pancreatic cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 996 ~ 1009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2022.01.002	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Sobajima Mitsuaki, Miyake Masato, Hamada Yoshimasa, Tsugawa Kazue, Oyadomari Miho, Inoue Ryota, Shirakawa Jun, Arima Hiroshi, Oyadomari Seiichi	4. 巻 611
2. 論文標題 The multifaceted role of ATF4 in regulating glucose-stimulated insulin secretion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 165 ~ 171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.04.038	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Du Qiqiao, Wu Jieyu, Fischer Carina, Seki Takahiro, Jing Xu, Gao Juan, He Xing kang, Hosaka Kayoko, Tong Le, Yasue Akihiro, Miyake Masato, Sobajima Mitsuaki, Oyadomari Seiichi, Sun Xiaoting, Yang Yunlong, Zhou Qinjun, Ge Minghua, Tao Wei, Yao Shuzhong, Cao Yihai	4. 巻 119
2. 論文標題 Generation of mega brown adipose tissue in adults by controlling brown adipocyte differentiation in vivo	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	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) 10.1073/pnas.2203307119	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する
1. 著者名 Nguyen Dinh Thi, Le Thuong Manh, Hattori Tsuyoshi, Takarada-Iemata Mika, Ishii Hiroshi, Roboon Jureepon, Tamatani Takashi, Kannon Takayuki, Hosomichi Kazuyoshi, Tajima Atsushi, Taniuchi Shusuke, Miyake Masato, Oyadomari Seiichi, Tanaka Takashi, Kato Nobuo, Saito Shunsuke, Mori Kazutoshi, Hori Osamu	4. 巻 11
2. 論文標題 The ATF6 -calreticulin axis promotes neuronal survival under endoplasmic reticulum stress and excitotoxicity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-021-92529-w	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 Saito Yu, Ikemoto Tetsuya, Tokuda Kazunori, Miyazaki Katsuki, Yamada Shinichiro, Imura Satoru, Miyake Masato, Morine Yuji, Oyadomari Seiichi, Shimada Mitsuo	4. 巻 28
2. 論文標題 Effective three dimensional culture of hepatocyte like cells generated from human adipose derived mesenchymal stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences	6. 最初と最後の頁 705 ~ 715
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jhbp.1024	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Miyake Masato, Zhang Jun, Yasue Akihiro, Hisanaga Satoshi, Tsugawa Kazue, Sakaue Hiroshi, Oyadomari Miho, Kiyonari Hiroshi, Oyadomari Seiichi	4. 巻 24
2. 論文標題 Integrated stress response regulates GDF15 secretion from adipocytes, preferentially suppresses appetite for a high-fat diet and improves obesity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103448 ~ 103448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.103448	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 -

[学会発表] 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 三宅 雅人、傍島 光昭、倉橋 清衛、重永 章、傳田 将也、大高 章、齋尾 智英、小迫 英尊、親泊 政一
2. 発表標題 膵 細胞において小胞体ストレスを軽減しインスリン合成を促進する新規化合物の同定
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三宅 雅人、親泊 政一
2. 発表標題 小胞体ストレス応答による 細胞自律的・非自律的代謝制御
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020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			
スウェーデン	Karolinska Institute			