

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790868

研究課題名（和文） 肝細胞周期調節因子の肝糖脂質代謝における役割

研究課題名（英文） Investigation of the role of cell-cycle regulatory mechanism in hepatic glucose metabolism

研究代表者

井上 啓 (INOUE HIROSHI)

金沢大学・フロンティアサイエンス機構・特任准教授

研究者番号：50397832

研究成果の概要（和文）：Cyclin D1は、細胞周期調節のみならず、様々な転写因子の活性を制御している。肝臓Cyclin D1の遺伝子および蛋白発現は、絶食に伴い減少し、食事摂取後に増加した。培養肝細胞を用いた糖新生酵素プロモーター解析では、Cyclin D1の遺伝子導入により肝糖新生酵素遺伝子発現プロモーター活性が、減少した。これらの結果は、肝臓Cyclin D1が糖代謝制御に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）：Cyclin D1 is known to regulate not only cell-cycle but also activity of various transcription factors. Through this investigation, we have uncovered an alteration in hepatic cyclin D1 expression by fasting and refeeding. Fasting reduced the expression of cyclin D1 gene and protein and refeeding increased. We have also clarified that cyclin D1 suppressed the promoter activity of gluconeogenic gene in H42E hepatoma cell. These results suggest that hepatic cyclin D1 would play a certain role in the regulation of glucose metabolism.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：内分泌代謝学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：肝糖新生、細胞周期、Cyclin D1、STAT3

## 1. 研究開始当初の背景

肝臓は、個体の糖脂質代謝制御に中心的役割を果たす臓器であり、その代謝制御の障害は糖尿病・高脂血症など様々な代謝異常症を引き起こす。肝糖脂質代謝が、肝糖脂質代謝系酵素の遺伝子転写レベルでの発現調節により強く制御されることから、肝糖脂質代謝系酵素の遺伝子転写制御メカニズムの研究には国内外を問わず多くの研究者が参入して

いる。しかし、栄養状態やホルモン環境の変化に対応して、どのような機構で転写因子の活性が調節され、肝糖新生系酵素の遺伝子転写が制御されるかについては、未だ不明な点が多い。

代表者は、平成17、18年度若手研究(B)「糖脂質代謝制御におけるSTAT3の機能解析」などの研究費を受け、遺伝子転写制御を介した糖脂質代謝制御メカニズムに関する研究を行ってきた。最近では、転写因子STAT3が肝

臓において糖代謝酵素の遺伝子発現を制御し、個体糖代謝に重要な役割を果たしていること(研究業績-発表論文 10: Inoue H, et al. Nat Med. 10:168, 2004)、さらに、摂食後に、中枢神経インスリン作用を介した臓器間相互作用により、肝臓 STAT3 が活性化されることを見出している(Inoue H, et al. Cell Metab. 3:267, 2006)。

代表者は、糖代謝制御における肝臓 STAT3 の重要性を解明する過程で、細胞周期調節因子 CyclinD1 の発現が、肝臓 STAT3 活性と並行することを見出した(未発表データ)。CyclinD1 は、STAT3 の転写標的遺伝子の一つであり、細胞周期・増殖の制御に重要な機能を果たす分子である。肝臓においても、肝障害モデルや肝切除モデルを用いた検討から、STAT3 依存性の CyclinD1 の発現増加が、肝細胞再生・増殖に重要であることが報告されている(Nat Rev Mol Cell Biol. 5:836, 2004)。

一方で、CyclinD1 が、脂肪細胞では転写因子 PPAR の活性を、乳癌細胞では転写因子 C/EBP の活性を調節し、遺伝子転写を制御することが報告されており(Mol Cell Biol. 23:6159, 2003, Cell. 114:323, 2003)、CyclinD1 が細胞増殖調節以外に遺伝子転写調節にも重要な役割を果たしていることが明らかにされている。

生理的状态では、肝細胞は増殖しておらず、細胞周期は停止している。そのために、生理的条件における肝臓 CyclinD1 の役割は、十分に解明されておらず、特に肝糖脂質代謝調節における役割は全く明らかにされていない。実際に、代表者の検討でも、肝臓 STAT3 活性化に伴い CyclinD1 の発現は上昇するものの、CyclinE や PCNA などの細胞増殖マーカー遺伝子は増加しておらず(未発表データ)、生理的肝臓 STAT3 活性化の条件下では CyclinD1 の増加は肝細胞増殖に寄与していない。すなわち、摂食によって発現が増加する CyclinD1 は、肝細胞の増殖制御とは異なる何らかの生理的役割を有している可能性が示唆される。CyclinD1 の発現制御因子である STAT3 が肝糖脂質代謝調節に重要な役割を果たすこと、CyclinD1 による転写活性調節が報告されている PPAR $\gamma$  や C/EBP $\beta$  が肝糖脂質代謝に関連する転写因子であることなどを踏まえると、摂食に伴う CyclinD1 の発現増加が肝糖脂質代謝制御になんらかの機能を果たす可能性は高いと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究計画は CyclinD1 の肝糖脂質代謝における役割を明らかにすることを目的とする。具体的には、第一に、肝臓における生理的な CyclinD1 の発現制御機構を解明する。第二に、肝臓特異的 CyclinD1 欠損マウスなどの解析

により、肝糖脂質代謝制御における CyclinD1 の重要性を解明する。

## 3. 研究の方法

マウス肝臓において、肝臓 STAT3 が活性化される生理的条件下で、すなわち随時摂食・絶食・再摂食の各条件において、CyclinD1 の発現について検討を行う。また、肝細胞への野生型または変異体 CyclinD1 過剰発現により、肝糖代謝関連酵素群の遺伝子発現を検討する。個体における作用を検討するために肝臓特異的 CyclinD1 欠損マウスを作成し、表現型を解析する。

## 4. 研究成果

代表者らは、肝臓 Cyclin D1 の遺伝子発現および蛋白発現が、絶食に伴い減少し、食事摂取後に増加することを見出した。食事摂取 1 時間後より、肝糖新生系酵素である Pck1 および G6pc の発現は減少するが、肝臓 Cyclin D1 の遺伝子発現は食事摂取後 2-3 時間後より増加した(Fig. 1A)。肝臓 CyclinD1 蛋白は、肝臓 STAT3 リン酸化と同様に、食後 3 時間以降に増加を示した(Fig. 1B)。

食事摂取に伴い、CyclinD1 の遺伝子発現が増加するにもかかわらず、細胞増殖と密接に関与する PCNA (proliferating cell nuclear antigen) の遺伝子発現は変化なく(Fig. 1A)、実際に、食事摂取後 48 時間までの肝細胞数

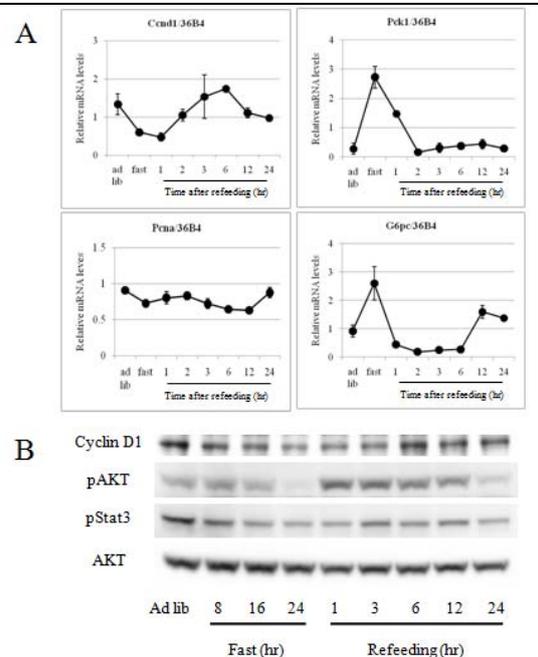


Fig.1 肝臓CyclinD1の遺伝子発現および蛋白発現が、絶食に伴い減少し、食事摂取後に増加する。解析には6週齢C57BL/6Jマウスを用いた。A) 随時摂食時(Ad lib)、絶食24時間後(fast)、再摂食(Refeeding)後の各時間における肝臓の遺伝子発現の変化を定量的PCRを用いて検討した。B) 随時摂食時(Ad lib)、絶食開始後の各時間(fast)、24時間絶食後の再摂食(Refeeding)後の各時間における肝臓の蛋白発現およびリン酸化の変化をウェスタンブロット法を用いて検討した。

にも変化を認めなかった。このことは、食事摂取による肝臓 CyclinD1 の発現変化は、肝細胞増殖ではない作用により生理的役割を果たしている可能性が示唆された。

次に、CyclinD1 の肝糖新生酵素遺伝子発現制御への影響を H4 II E 培養肝細胞を用いた G6pc プロモーター活性を用いて検討した。cAMP 存在下において G6pc 遺伝子発現プロモーター活性は増加し、インスリン処理、または、IL-6 処理により減少した。CyclinD1 の遺伝子導入により、G6pc 遺伝子発現プロモーター活性は明らかに減少した。CyclinD1 は CDK4 活性化を介し細胞周期を調節するが、Cyclin D1 の K112E 変異体は、CyclinD1 による CDK4 活性化作用を持たないことが報告されている。CyclinD1K112E 変異体によっても、CyclinD1 遺伝子導入と同様に、G6pc 遺伝子発現プロモ

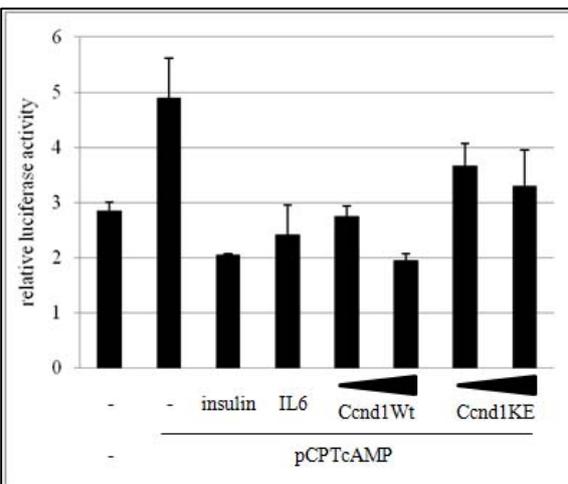


Fig2 H4 II E 培養肝細胞を用い、CyclinD1 の G6pc プロモーター活性に対する作用を検討した。細胞に Cyclin D1 (Ccnd1) 野生型 (Wt) または K112E 変異体 (KE) 発現ベクターを、G6pc プロモーター制御下にルシフェラーゼを発現するベクターとともに遺伝子導入し、プロモーター活性を測定した。

ーター活性は減少した (Fig. 2)。これらの検討から、食事摂取後の肝臓 CyclinD1 発現の増加は、肝細胞増殖作用ではなく、肝糖代謝調節作用を有する可能性が示唆される。

このような CyclinD1 の肝糖代謝調節における生理的重要性を検討するために、CyclinD1 の第 2・第 3 エクソンを Frt で挟んだネオマイシン耐性カセットとともに LoxP 配列で挟んだマウスを作成した (Fig. 3A)。作成マウスでの CyclinD1 遺伝子の組み換えをサザンブロット法にて確認を行いマウス個体における CyclinD1 遺伝子の相同組み換えを確認した (Fig. 3B)。さらに、FLP レコンビナーゼ発現マウスとの交配によりネオマイシン耐性カセットを除去後、現在肝臓特異的 Cre リコンビナーゼ発現マウスと交配し、肝臓特異的に CyclinD1 が欠損するマウスを作成した。肝臓特異的 CyclinD1 欠損マウスでは、メンデルの法則どおりに出生し、また肝臓組織像も正常であった。肝臓特異的 CyclinD1 欠損マウスは、対照マウスと比較し明らかな体重変化を示さず、さらに、随時血糖についても明らかな変化を示さなかった。今後、CyclinD1 による肝糖新生系酵素遺伝子発現制御メカニズムの解明を進めるとともに、肝臓特異的 CyclinD1 欠損マウスの解析を通し、CyclinD1 の肝糖新生調節における重要性を解明していく予定である。より具体的には、肝臓特異的 CyclinD1 欠損マウスへの高脂肪食負荷による肥満・インスリン抵抗性誘導、またはレプチン受容体欠損 db/db マウスとの交配による肝臓特異的 CyclinD1 欠損 db/db マウスの作成・解析により、肥満・インスリン抵抗性状態における肝臓 CyclinD1 の役割について解明を行ってゆく。

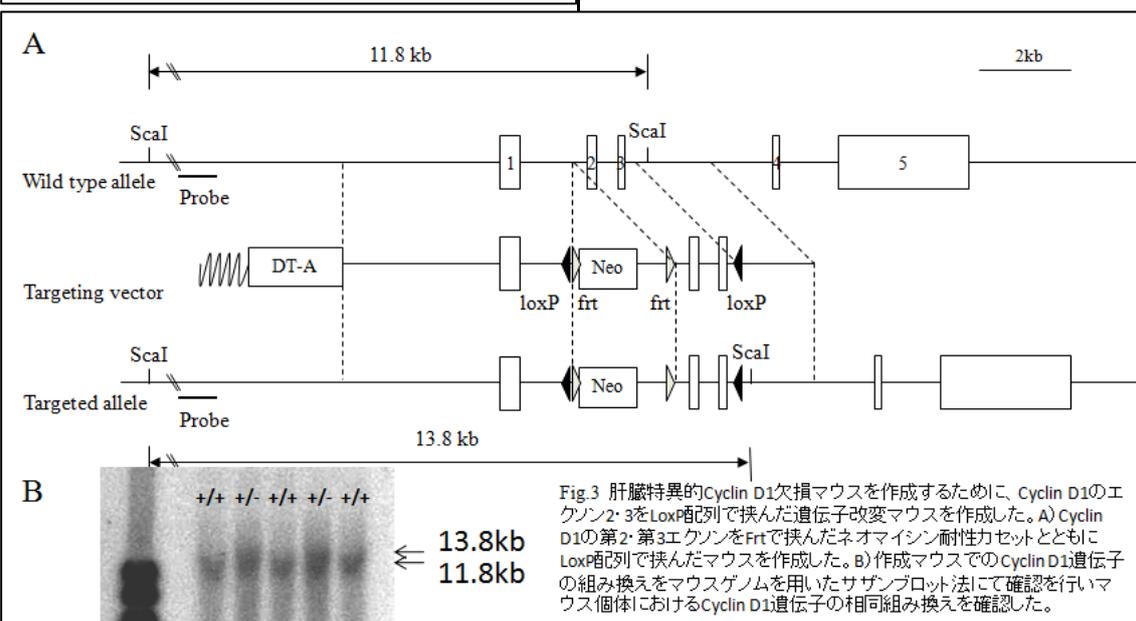


Fig. 3 肝臓特異的 Cyclin D1 欠損マウスを作成するために、Cyclin D1 のエクソン 2・3 を LoxP 配列で挟んだ遺伝子改変マウスを作成した。A) Cyclin D1 の第 2・第 3 エクソンを Frt で挟んだネオマイシン耐性カセットとともに LoxP 配列で挟んだマウスを作成した。B) 作成マウスでの Cyclin D1 遺伝子の組み換えをマウスゲノムを用いたサザンブロット法にて確認を行いマウス個体における Cyclin D1 遺伝子の相同組み換えを確認した。

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3件)

①井上 啓、中枢神経インスリン作用による肝糖産生制御機構、実験医学、2011、29(5):773-778。(査読無)

②.Takashima M, Ogawa W, Hayashi K, Inoue H, Kinoshita S, Okamoto Y, Sakaue H, Wataoka Y, Emi A, Senga Y, Matsuki Y, Watanabe E, Hiramatsu R, Kasuga M. Role of KLF15 in regulation of hepatic gluconeogenesis and metformin action. Diabetes. 2010 Jul;59(7):1608-15。(査読有)

③.Matsuda T, Kido Y, Asahara SI, Kaisho T, Tanaka T, Hashimoto N, Shigeyama Y, Takeda A, Inoue T, Shibutani Y, Koyanagi M, Hosooka T, Matsumoto M, Inoue H, Uchida T, Koike M, Uchiyama Y, Akira S, Kasuga M. Ablation of C/EBPbeta alleviates ER stress and pancreatic beta cell failure through the GRP78 chaperone in mice. J Clin Invest. 2010 Jan 4;120(1):115-26。(査読有)

[学会発表] (計4件)

①木村久美・井上啓、小胞体ストレスは、アセチル化抑制を介して、STAT3 依存性の肝糖新生系酵素遺伝子発現抑制を阻害する、第22回分子糖尿病学シンポジウム、2010年12月4日、東京カンファレンスセンター品川(東京都)

②木村 久美・井上啓、小胞体ストレスは脱アセチル化を介してSTAT3 依存性の肝糖新生酵素発現抑制を阻害する、第31回日本肥満学会、2010年10月1日、前橋テルサ(群馬県)

③井上 啓、小胞体ストレスはSTAT3 依存性の肝糖新生酵素発現抑制を阻害する、第53回日本糖尿病学会年次学術集会、2010年5月27日、岡山コンベンションセンター(岡山県)

④山田智子・井上啓、STAT3 依存性肝糖新生調節における小胞体ストレスの役割、日本薬学会第130年会、2010年3月28日、就実大学(岡山県)

[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

井上 啓 (INOUE HIROSHI)

金沢大学・フロンティアサイエンス機構・  
特任准教授  
研究者番号：50397832

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし