

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 15 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21580370

研究課題名（和文）メタボリック症候群に対するアクチビン E の有効性

研究課題名（英文）Effect of activin E on the prevention and therapy of metabolic syndrome.

研究代表者

橋本 統 (HASHIMOTO OSAMU)

北里大学・獣医学部・講師

研究者番号：90317058

研究成果の概要（和文）：TGF- β ファミリーに属するアクチビン E の機能解析を行ったところ、アクチビン E は肝臓における転写制御の特徴やインスリン高感受性というトランスジェニックマウスの表現型から、糖・エネルギー代謝に関与していることが示された。このことは、メタボリック症候群などの治療薬としてのアクチビン E の有用性を示している。

研究成果の概要（英文）：To assess the role of activin E, a member of the transforming growth factor- β superfamily in glucose/energy metabolism, we investigated the transcriptional regulation of activin E in the liver cells and the phenotype of transgenic mice over-expressing activin E. Activin E plays a pathophysiological role in glucose/energy metabolism. The results should help identify the target for the prevention and therapy of metabolic syndrome.

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	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学

キーワード：インスリン感受性、エネルギー代謝、メタボリックシンドローム、肝臓、トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

アクチビンは TGF- β 、インヒビン、BMP、GDF、MIS などとともに細胞の分化・増殖因子である TGF- β スーパーファミリーに属する因子で、 β サブユニット (β A および β B) がジスルフィド結合で架橋したホモまたはヘテロダイマーであり、数種の分子種（アクチビン A、

AB、B) が存在する。当初、下垂体前葉からの FSH の分泌を促進する物質として分離されたが、その後の研究によりアクチビンは、卵胞だけでなく全身の種々の組織に存在し、生体内で多彩な機能を有していることが知られるようになった。10 年ほど前に、新たに β E サブユニットすなわちアクチビン E が哺乳類でクローニングされた。アクチビン E は肝

臓において特異的に mRNA の発現が認められる。そのため、オートクライン・パラクライン因子として肝臓において分化・増殖等の機能を有する事が推測されたが、アクチビン E のノックアウトマウスでは、肝臓の発生や発達に異常はみられなかった。そのため、肝臓の分化・増殖以外の機能を有している事が示唆されたが、その生物学的機能は未だ明らかでない。しかし、これまでの研究において、アクチビン E を全身に過剰発現させたトランスジェニックマウス (TgAct β E マウス) では、高インスリン感受性を示し、耐糖能が向上していることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究では、アクチビン E の糖・エネルギー代謝調節への影響を検討する事を目的に、アクチビン E 遺伝子の肝臓における転写制御機構を検討した。さらに、アクチビン E を肝臓特異的に過剰発現したトランスジェニックマウスにおける糖・エネルギー代謝に関連する表現型の解析を行った。以上のように、アクチビン E の脂肪細胞に対する機能解析を通してメタボリック症候群に対するアクチビン E の治療薬としての可能性を追求した。

3. 研究の方法

(1) アクチビンプロモーター活性の解析

まず、HepG2 細胞またはラット初代培養肝細胞におけるアクチビン E mRNA の発現がインスリンによって制御されるかどうかをノーザンブロット法を用いて解析した。次に、ヒトアクチビン E 遺伝子の 5' 領域 (プロモーター領域) を口腔内細胞から抽出したヒトゲノム DNA をテンプレートに PCR 法により増幅した。配列は NCBI genebank に登録されているヒト第 12 番染色体配列をもとにする。このアクチビン E のプロモーター断片をプロモーターアッセイ用のベクター (pGL3 Basic) にサブクローニングした。

このアクチビン E プロモーターベクターを HepG2 細胞にトランスフェクションしてルシフェラーゼアッセイによりその転写活性調節領域さらにはインスリン応答領域を検討した。また、どのような転写因子により発現が調節されているのかをクロマチン免疫沈降法などを用いて解析した。

(2) Cre-LoxP システムを用いた肝臓特異的アクチビン E 発現 Tg マウスの作製と表現型解析

pCALNL5 プラスミドにマウスアクチビン E cDNA をサブクローニングしてトランスジェニックを作製した。このトランスジェニックを C57BL/6J の受精卵雄性前核にマイクロインジェクションして folxed-activinE マウスを得た。このマウスと肝臓特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウス (Alb-Cre マウス、Jackson lab より購入) を交配させて肝臓特異的にアクチビン E を発現させたマウス (Alb-ActE マウス) を作製した。Alb-ActE マウスの糖・エネルギー代謝に係る表現型を解析した。脂肪組織の組織学的検索や血糖値測定、グルコース負荷試験、インスリン負荷試験、体重測定、食餌量測定を行なった。さらに、高脂肪食給餌時の体重変化を測定した。

4. 研究成果

(1) アクチビン E 遺伝子の転写制御

HepG2 細胞またはラット初代培養肝細胞におけるアクチビン E mRNA の発現はインスリンによって上昇することがノーザンブロット法により確認された。さらに、HepG2 細胞においてアクチビン E 遺伝子のプロモーターと考えられる配列をつないだレポータープラスミドの転写活性はインスリンによって増強した (Fig. 1)。このアクチビン E 遺伝子のプロモーター内に存在する CAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) の結合配列を点変異させるとインスリンに対する応答が減少した。

A

```

-1437 gagctccatttttacccttaacaggcctgaggggtgctgctgct/.../aca
-840 tcatgctcacatcatgctccaggccaactggactctggcggccagcacagcagggtc
-780 agggggtgactctctgctcctgctggcactgccactggcctgagcaagagggctccatt
-720 ctctaccgcccaaacctcatcctctctagccagctgtagaataaagagacca
-660 gaattttctctggcctaaggccagaggaatcaccactggactcaccagctgctc
-600 atggaaactgctgcagcagtggtgaagctagaagactagaggtatgagggaaattgcc
-540 ctcccaactgctcacaaggcttccctcccaagctccagactggggactggagc
-480 atggaatcactcctcttttctgcatcagctgtccacattgaccccccaacccat
C/EBP-1
-420 accctactcaggccagtcaccatggccagatggtgaacactgagctgagggaggga
-360 ggacctccccctgcagggcctgatggcagcagactggccaactctgggactcag
C/EBP-2
-300 agggtaggtcgctggctgaccactaggttggaaagccaggcagctggcttaaaag
-240 gccccaggtcagtagccagacatgagctgtgagggtaagcagactatccatcagatga
-180 tctactttcagcttctgagctccagacaatagaagacaggtggctgacacctggcca
-120 agggtaggtgtggcagtggtgctgctgctcactgtgctcctattggccccagcaatcag
-60 actcaacagcagcagcagcactgctcagggctcttgaaccagggcattcaccagggagc
+1 ATGCGGCTCCCTGATGTCAGCTCTGGCTGGTGGCTGTGGCACTGGTGGAGCACAG
M R L P D V Q L W L V L L W A L V R A Q

```

B

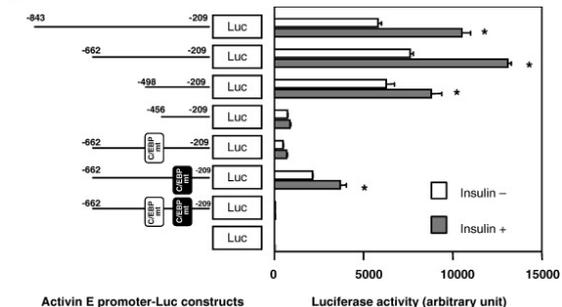


Fig. 1.

(A) The genomic sequence located upstream of the start codon of activin β E subunit gene. The first base of the translated ATG was arbitrarily annotated as +1. Two C/EBP sites (C/EBP-1 and C/EBP-2) are underlined. (B) Luciferase reporter plasmids containing various lengths of sequences upstream of the start codon of activin E were transfected to HepG2 cells. After serum starvation for 16 h, the cells were incubated with or without 100 nM insulin for 24 h and subjected to the reporter assay. Luciferase activity was expressed relative to that of the longest DNA construct (no insulin treatment). Mutations of the C/EBP-1 and C/EBP-2 sites are indicated by open and closed boxes, respectively. Data represent means \pm SE of three experiments. *A significant difference at $P < 0.05$ between without (-) and with (+) insulin. mt, mutation

また、クロマチン免疫沈降法により C/EBP はアクチビン E 遺伝子のプロモーターに結合することが確認された。このことから C/EBP がアクチビン E の発現を制御していることが示唆された。また、高い血中インスリン濃度を示す DIO (diet-induced obese) マウスの肝臓におけるアクチビン E mRNA の発現を quantitative real-time PCR により検討したところ、コントロールマウスに比べ有意に上昇していた (Fig. 2)。

以上のように、アクチビン E 遺伝子の発現はインスリンによって調節され、糖代謝または糖尿病などの病態にアクチビン E が関与していることが示唆された。

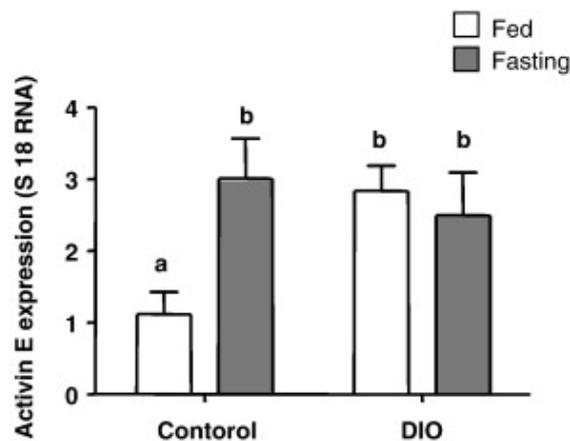


Fig. 2. Expression of the activin β E subunit gene was measured by quantitative real-time PCR

and expressed as a ratio to S18 RNA, with the level in control livers in fed states set to 1. Values are means \pm SE. $n = 4$ in each groups. Bars with different letters indicate a significant difference at $P < 0.05$. DIO, diet induced obesity mice.

(2) Alb-ActE マウスにおける高インスリン感受性

次に、アクチビン E の血糖調節への影響を検討する事を目的に、Alb-ActE マウスの糖代謝に関連する表現型の解析を行った。Alb-ActE マウスにおける糖代謝に関連する表現型の解析において、Alb-ActE マウスでは摂餌量には変化がないにもかかわらず血糖値さらには体重がコントロールマウスに比較して低下していた。興味深いことに高脂肪食給餌時の体重も低い状態を維持していた。また、通常食給餌時のグルコース負荷試験 (GTT) およびインスリン負荷試験 (ITT) の両試験において負荷後すべての時間においてコントロールマウスに比べ有意に血糖値が低下していた。このように、Alb-ActE マウスではインスリン感受性が亢進していることが認められた。

そこで、主なインスリン感受性臓器の組織重量を測定したところ、Alb-ActE マウスの肩甲骨間における褐色脂肪組織 (BAT) の重量は低下しており、その組織像を観察すると褐色脂肪細胞の断面積が有意に低下していた。また、褐色脂肪細胞のミトコンドリアに特異的に発現し、酸化リン酸化を脱共役してエネルギーを熱に変換する脱共役蛋白質 (UCP-1) の発現量を real time PCR で比較したところ、Alb-ActE マウスの UCP-1 は野生型マウスに比べ UCP-1 の発現量が有意に上昇していた。さらに腹腔内の腸管膜脂肪組織中に UCP-1 陽性細胞が観察された。Alb-ActE マウスでは野生型マウスに比べ体温が上昇していることから、アクチビン E が褐色脂肪細胞の UCP-1 の発現、さらに白色脂肪の褐色脂肪細胞化を調節してエネルギー代謝を亢進させていることが示唆された。

本研究において、アクチビン E が脂肪細胞の分化を制御することでインスリン感受性を高め、糖・エネルギー代謝を亢進させる機能を有することが示唆された。今後、アクチビン E による脂肪細胞への詳細な作用が解明し、アクチビン E のメタボリック症候群などの治療薬としての可能性を追求したい。

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. Hashimoto, O., Takagi, R., Yanuma, F., Doi, S., Shindo, J., Endo, H., Hasegawa, Y. and Shimasaki, S. 2012. Identification and characterization of canine growth differentiation factor-9 and its splicing variant. *Gene* 499: 266-272.
2. Hashimoto, O., Yonezawa, T., Sugiyama, Y., Kawaminami, M. and Hasegawa, Y. 2010. Molecular cloning and expression of canine prolactin gene. *Exp. Anim.* 59: 643-646.
3. Hashimoto, O., Sekiyama, K., Matsuo, T. and Hasegawa, Y. 2009. The role of activin E in glucose metabolism: Transcriptional regulation of the inhibin/activin β E subunit gene in the liver. *Life Sci.* 85: 534-540.

[学会発表] (計 3 件)

1. Yoshida, T., Hashimoto, O., Kawada, T., Funaba, M. and Matsui, T. Roles of the TGF- β family in brown adipocyte differentiation. 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 16 日 (横浜)
2. 吉田拓史, 橋本 統, 河田照雄, 舟場正幸, 松井 徹. TGF- β ファミリーによる褐色脂肪前駆細胞の分化制御 日本畜産学会第 114 回大会 2011 年 8 月 27 日 (十和田)
3. 橋本 統, 関山一成, 松尾 剛, 長谷川喜久. アクチビン E の糖代謝への関与: 肝臓におけるアクチビン E 遺伝子の発現調節 第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月 2 日 (神戸)

[図書] (計 1 件)

1. Hashimoto, O. and Funaba, M. 2011. Activin in glucose metabolism. "Vitamins and Hormones, Vol. 85: Activin and Inhibin", (Litwack, G. ed.), Academic Press, Burlington, pp. 217-234.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 統 (HASHIMOTO OSAMU)
北里大学・獣医学部・講師
研究者番号: 90317058