

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号： 34306  
 研究種目： 若手研究(B)  
 研究期間： 2011~2012  
 課題番号： 23790819  
 研究課題名（和文）  
 レチノイン酸による肝臓インスリン感受性増強機構の解明と創薬開発への応用  
 研究課題名（英文）  
 Investigation of the mechanisms of hepatic insulin sensitization by retinoic acid.  
 研究代表者  
 土谷 博之 (TSUCHIYA HIROYUKI)  
 京都薬科大学・薬学部・講師  
 研究者番号： 00403402

研究成果の概要（和文）：研究代表者の独自の発見である、レチノイドによるレプチン依存的インスリン抵抗性改善作用について、その作用機序の解明を行った。その結果、レチノイドは、肝細胞においてレプチン受容体遺伝子発現を増強し、レプチンシグナルを活性化していることがわかった。さらに合成レチノイドのタミバロテンも同様の作用を持つことが明らかになり、新規インスリン抵抗性治療薬としての有用性が示された。またレプチンシグナルの新たな標的遺伝子として AntiX を見出し、インスリン抵抗性発症とその発現が良く相関していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Based on our original finding, the leptin-dependent hepatic insulin sensitization by retinoid, I investigated its precise mechanisms. It was demonstrated that retinoid activates hepatic leptin signaling by directly inducing leptin receptor expression via retinoid receptor. A synthetic retinoid, tamibarotene, also showed the same effect, suggesting its potential as a novel insulin-resistance treatment. Moreover, AntiX was identified as a target gene of hepatic leptin signaling, and the expression level of AntiX in the liver was significantly correlated with the pathological status of insulin resistance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

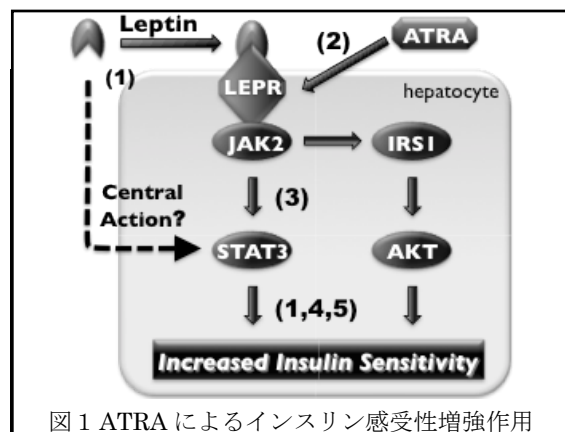
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：1. レチノイン酸、2. タミバロテン、3. インスリン抵抗性、4. レプチン、5. STAT3、6. 肝臓、7. NAFLD、8. NASH

1. 研究開始当初の背景

インスリン抵抗性は、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）やメタボリックシンドロームの基盤病態であり、患者数の増加に伴い、より効果的な予防・改善法の確立が求められている。これまで研究代表者は、高脂肪・高フルクトース食を与えたNAFLDモデルマウスにおいて、all-trans レチノイン酸（ATRA）による、①肝細胞レプチン受容体（LEPR）の転写レベルでの発現誘導、ならびに②肝臓インスリン（IRS1、AKT）および



びレプチンシグナル (JAK2、STAT3) の活性化、さらに③レプチン欠損 ob/ob マウスの ATRA 不応性を示し、「ATRA によるレプチン依存的肝 STAT3 活性化を介したインスリン抵抗性改善作用」を明らかにした (図 1)。

STAT3 は、肝臓において糖新生を抑制することで血糖値の上昇を抑え、インスリン感受性を増強することが近年報告されている (Nat Med, 10, 168-174, 2004; Cell Metab, 3, 267-275, 2006; J Clin Invest, 118, 2132-2147, 2008)。この肝 STAT3 活性化については、インスリンによる中枢を介した肝 IL6 発現誘導が提唱されている (Cell Metab, 3, 267-275, 2006) が、申請者の研究では、STAT3 が活性化した肝臓での IL6 発現誘導は認められず、レプチンによる肝臓直接作用が示唆されている。

レプチンは、視床下部の STAT3 活性化を介した中枢作用が知られているが、末梢、特に、STAT3 を直接活性化できない短鎖 LEPR アイソフォーム (LEPR-S) のみを発現する肝細胞に対するレプチンの生理的意義はほとんど不明である。しかし筋細胞では、LEPR-S による p38 MAPK を介した STAT3 活性化が報告されており (Biochim Biophys Acta, 1801, 1115-1122, 2010)、レプチンの肝臓直接作用による肝 STAT3 活性化機構の存在が強く示唆される。しかしながら、ATRA、レプチン、STAT3 の肝臓インスリン感受性における詳細な関係は、未だ不明のままである。

そこで研究代表者は、自らの見出した「ATRA によるレプチン依存的肝 STAT3 活性化を介したインスリン抵抗性改善作用」をより発展させることで、レプチンの肝臓直接作用とインスリン感受性との関連性の解明、さらにはこれに基づくインスリン抵抗性発症・進展メカニズムの解明と新たな予防・改善法の確立が期待できると考えた。このような経緯から、①レプチンによる肝臓直接作用の立証 (図 1(1))、②ATRA による肝 LEPR 発現誘導メカニズム (図 1(2))、および③レプチン依存的肝 STAT3 活性化メカニズムの解明 (図 1(3))、④肝 STAT3 依存的に発現誘導されるインスリン感受性増強遺伝子の網羅的解明 (図 1(4)) について検討することとした。

さらに将来、ATRA による催奇形性や過剰症、STAT3 活性化に伴う発癌作用は、インスリン抵抗性を基盤とする NAFLD やメタボリックシンドロームを予防・改善する創薬開発において、重大な障害になると申請者は考えた。そこで、より安全なインスリン抵抗性予防・改善法確立を目的とし、⑤STAT3 非依存的にインスリン感受性増強遺伝子を発現誘導する化合物の探索に有用なスクリーニングシステムの開発 (図 1(5))、を着想する

に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では主に以下の項目について検討を行った。

- (1) レチノイドによる LEPR 遺伝子発現メカニズムの解明
- (2) マウス肝細胞株 TLR3 を用いた STAT3 活性化の検討
- (3) STAT3 によるインスリン感受性亢進に関与する新規遺伝子の探索
- (4) 新規インスリン抵抗性治療薬としてタミバロテンの検証

## 3. 研究の方法

### (1) NAFLD モデルマウスの構築

マウスは C57BL/6J マウス (オス、5 週齢) を使用した。1 週間の馴化期間の後、高脂肪高フルクトース (HFHFr) 食を 16 週間与えた後、2 群に分け、HFHFr 食、ATRA 添加 HFHFr 食 (ATRA+HFHFr)、を 4 週間与えた。タミバロテンの効果の検討は、遺伝的インスリン抵抗性発症モデルである KK-A<sup>y</sup> マウスを用い、通常食またはタミバロテン添加通常食を 4 週間事由摂食させた。

### (2) 遺伝子発現解析

遺伝子発現量は、Real-time RT-PCR または Western blot 法により評価した。

### (3) 鉄および脂質の定量

組織および細胞内の非ヘム鉄は、バソフェナントロリンによる比色法により定量した。遊離脂肪酸 (NEFA)、トリグリセリド (TG) および総コレステロール (TChol) は、NEFA C-テストワコー、トリグリセリド E-テストワコー、コレステロール E-テストワコー (和光純薬工業) によってそれぞれ定量した。

### (4) 血糖値、血清インスリンおよびアディポサイトカインの定量

血糖値は、尾静脈より採血し、グルコメーター (ニプロ) により測定した。摂食時血糖値は、1、2、3、4 週目に、空腹時血糖は 4 週目において、それぞれ測定した。

心臓より採取した血液を一晩氷上において、遠心分離により血清を回収した。血清インスリンおよびレプチン濃度は、ELISA 法 (株式会社シバヤギ) により定量した。

### (5) 細胞培養

マウス不死化肝細胞株 TLR-3 (Exp Cell Res. 1991;197:50-56) は東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターより分与いただき、10% FBS 添加 D'MEM 培地にて培養した。

(6) ルシフェラーゼアッセイ

マウス *Lepr* 遺伝子プロモーター領域を PCR により増幅し、pGL3-basic ベクターに組み込んだ。また DR1-2 サイトの検討では、同じ配列またはその逆配列をもつオリゴ DNA を pTAL-Luc ベクターの TATA 様プロモーターの上流に組込んだ。これらのルシフェラーゼ発現プラスミドは FuGene6 により TLR3 ヘトランスフェクションし、デュアルルシフェラーゼアッセイ (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

(7) クロマチン免疫沈降及び次世代シーケンス解析 (ChIP-Seq)

TLR-3 に 50 ng/mL マウス IL-6 を 20 分間処理し、ホルムアルデヒドで固定後、クロマチンを回収した。ChIP は、抗 STAT3 抗体 (Cell Signaling Technology) および ChIP-IT キット (Active Motif) により行った。回収されたクロマチン DNA 断片は Illumina HiSeq 2000 により配列を解析した。

(8) Rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法

Anti-X の発現領域は、SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (TaKaRa Bio) を用いた RACE 法により行った。

4. 研究成果

(1) レチノイドによる LEPR 遺伝子発現メカニズム

マウス *Lepr* 遺伝子プロモーター領域をクローニングし (図 2)、レポーターアッセイを行った。

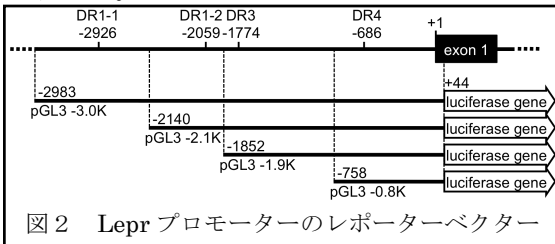


図 2 *Lepr* プロモーターのレポーターベクター

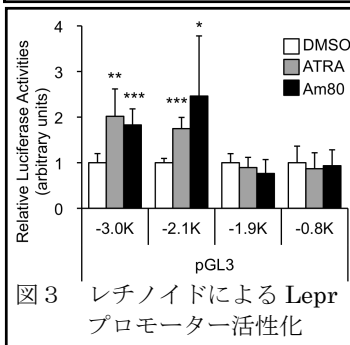


図 3 レチノイドによる *Lepr* プロモーター活性化

その結果、-1.9K、-0.8K において ATRA およびタミバロテン (Am80) に対する応答性が消失し、これらのレチノイドに対する応答配列が

-2140~-1774bp に存在することが示唆された (図 3)。

そこでこの領域に存在するダイレクトリピート配列 (DR1-2) と同じ配列を TATA 様

プロモーターの上流に組み込み、再度レポーターアッセイを行ったところ、この DR-1-2 配列がレチノイド応答配列として機能していることが示された (図 4)。

また ChIP アッセイによる検討から、DR1-2 配列への RAR $\alpha$ / $\beta$  の結合がレチノイドによって誘導されることが確認された。

これらの検討からレチノイドは、DR1-2 配列への RAR $\alpha$ / $\beta$  の結合を介して LEPR 遺伝子発現を直接誘導していることが示された。

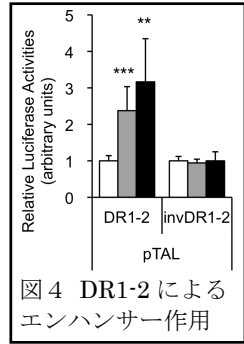


図 4 DR1-2 によるエンハンサー作用

(2) マウス肝細胞株 TLR3 を用いた STAT3 活性化の検討

マウス肝細胞株 TLR3 に ATRA を処理した後、レプチンを作用させたところ、ATRA 未処理に比べ STAT3 の活性化が増強された。このとき ATRA を処理した細胞では LEPR 発現量が明らかに増加していた (図 5)。

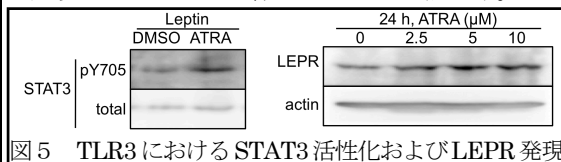


図 5 TLR3 における STAT3 活性化および LEPR 発現

(3) STAT3 によるインスリン感受性亢進に関与する新規遺伝子の探索

STAT3 はシグナル伝達因子であると同時に転写因子として機能する。すなわち、STAT3 が制御する遺伝子にはインスリン感受性亢進の機能を持つものが存在していると考えられる。そこで、ChIP-Seq

により STAT3 の標的遺伝子の網羅的解析を試みたところ、肝細胞において STAT3 により発現制御を受ける 27 遺伝子を同定した。

これらの遺伝子の内、特に興味深いものとして X および AntiX 遺伝子に注目した (図 6)。この AntiX 遺伝子は、X 遺伝子の第 2 イントロンに存在し、X 遺伝子とは逆の方向に転写される EST として報告がある。そこでその発現領域を RACE 法により決定した。その結果、AntiX は 2 つのエキソンに 362 塩基の転写領域を持つことが明らかとなった。

次に NAFLD マウスモデルマウスの肝臓における X および AntiX 遺伝子の mRNA 発現を定量した。

その結果、X 遺伝子は、ATRA 投与によつ

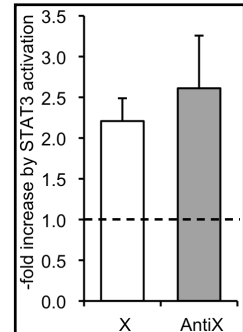


図 6 STAT3 活性化 TLR3 における X および AntiX 発現誘導

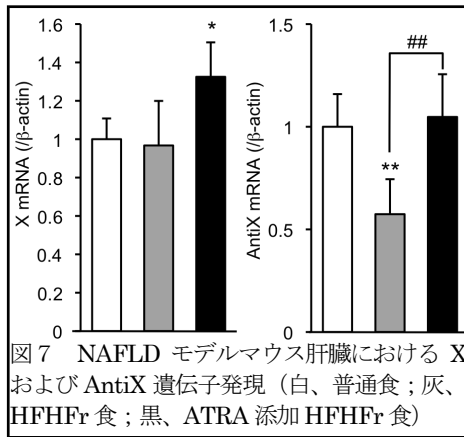


図7 NAFLD モデルマウス肝臓における X および AntiX 遺伝子発現 (白、普通食; 灰、HFHFr 食; 黒、 ATRA 添加 HFHFr 食)

てインスリン抵抗性が改善したマウスにおいて、普通食 (健康マウス) ならびに HFHFr 食 (NAFLD マウス) より発現が亢進していた。一方、AntiX は NAFLD マウスで発現が有意に低下し、ATRA 投与によって回復していた (図 7)。

これらの X および AntiX 遺伝子発現がレチノイドによって制御を受けているかを調べるため、TLR3 に ATRA 処理を行い、遺伝子発現を定量した。その結果、ATRA の標的遺伝子である RAR $\beta$  は発現上昇したものの、X および AntiX 遺伝子の発現は変化を認めなかった (図 8)。

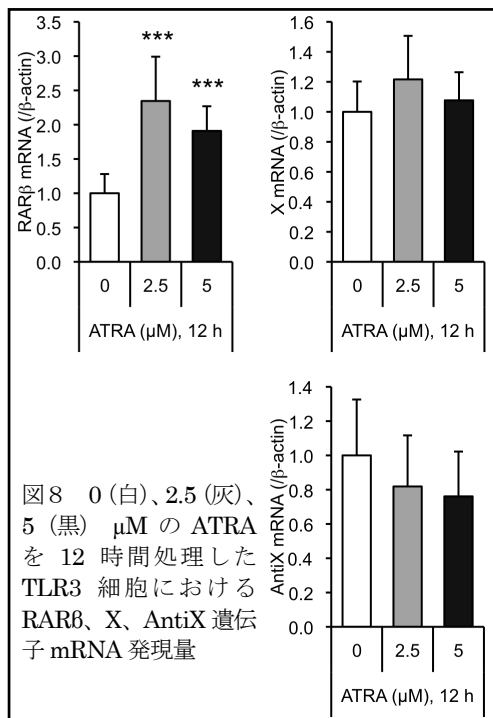


図8 0 (白)、2.5 (灰)、5 (黒)  $\mu$ M の ATRA を 12 時間処理した TLR3 細胞における RAR $\beta$ 、X、AntiX 遺伝子 mRNA 発現量

これらの結果より X および AntiX は STAT3 によって発現制御される遺伝子であり、その肝臓における発現はインスリン抵抗性と相関していることが明らかとなった。今後インスリン抵抗性との関連を明らかにするため X および AntiX の機能解析を行っていく予定である。

#### (4) 新規インスリン抵抗性治療薬としてタミバロテンの検証

RAR $\alpha$ / $\beta$  選択的アゴニストであるタミバロテンは、現在、急性前骨髄球性白血病に適用が認可されている。そのため、インスリン抵抗性改善薬としての適応拡大を目的に、ATRA と同様のインスリン抵抗性改善作用を有するのか調べた。

タミバロテンは、濃度依存的に TLR3 における LEPR 発現を上昇させた。また遺伝的インスリン抵抗性発症モデルである KK- $A^y$  マウスにタミバロテンを投与したところ、経時的な血糖値上昇の抑制とインスリン抵抗性指数 (HOMA-IR) の改善が認められた (図 9)。

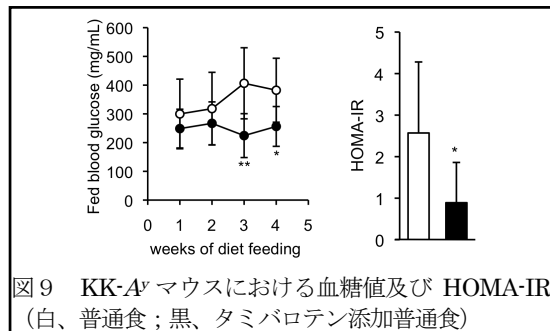


図9 KK- $A^y$  マウスにおける血糖値及び HOMA-IR (白、普通食; 黒、タミバロテン添加普通食)

さらにこのとき肝臓における LEPR 発現は有意に上昇し、STAT3 も活性化が亢進していた (図 10)。

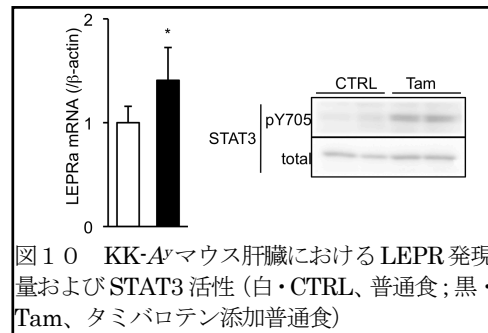


図10 KK- $A^y$  マウス肝臓における LEPR 発現量および STAT3 活性 (白・CTRL、普通食; 黒・Tam、タミバロテン添加普通食)

また、以前、研究代表者はレチノイド欠乏食及び過剰食を与えたマウスにおいて、レチノイドによる肝非ヘム鉄量の減少と鉄代謝関連遺伝子のヘモジュベリン (HJV) の発現減少を観察している。興味深いことにタミバロテンを投与したマウスの肝臓においても非ヘム鉄量が有意に減少しており、同時に HJV 発現が有意に低下していた (図 11)。

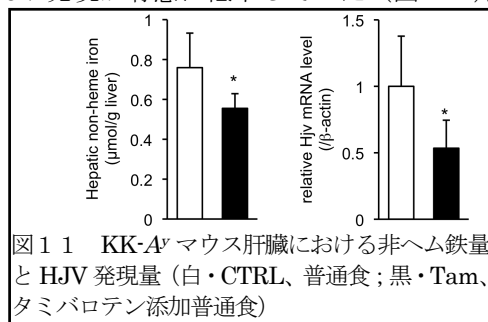


図11 KK- $A^y$  マウス肝臓における非ヘム鉄量と HJV 発現量 (白・CTRL、普通食; 黒・Tam、タミバロテン添加普通食)

近年肝臓への鉄の過剰沈着は酸化ストレス

スを亢進させ、インスリン抵抗性や脂質代謝異常、C型肝炎病態との関連が示唆されている。レチノイドによるインスリン抵抗性改善作用についても、鉄蓄積の抑制と酸化ストレスの軽減が関与している可能性が、これらの結果より示唆された。

以上の結果より、ATRA並びにタミバロテンは、鉄蓄積抑制作用を伴う新規のインスリン抵抗性改善薬として期待できることが示された。

#### 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4件)

(\*は corresponding author)

- 1) H Tsuchiya\*, et al. Retinoids ameliorate insulin resistance in a leptin-dependent manner in mice. *Hepatology* 2012; 56: 1319–1330.
- 2) H Tsuchiya\*, et al. High-Fat, High-Fructose Induces Hepatic Iron Overload via a Hecidin-Independent Mechanism Prior to the Onset of Liver Steatosis and Insulin Resistance in Mice. *Metabolism* 2013; 62: 62–69
- 3) O Yoshikawa, Y Ebata, H Tsuchiya\*, et al. A retinoic acid receptor agonist tamibarotene suppresses iron accumulation in the liver. *Obesity* 2013; 21: E22–E25.
- 4) 土谷博之\* 非アルコール性脂肪性肝疾患治療薬としてのレチノイドの有用性 *薬学雑誌* 2012; 132; 903–910.

[学会発表] (計5件)

- 1) H Tsuchiya, et al. Hepatic iron overload induced by a high-fat, high-fructose diet occurs prior to the onset of liver steatosis and insulin resistance via a hepcidin-independent mechanism in mice. The 4th EMBO meeting. 22–25 September 2012 Nice (France).
- 2) H Tsuchiya, et al. Retinoids ameliorate insulin resistance in a leptin-dependent manner. The 3rd EMBO meeting. 10–13 September 2011 Vienna.
- 3) 土谷博之 非アルコール性脂肪性肝疾患とレチノイド 第62回日本薬学会近畿支部大会(招待講演) 2012年10月20日 西宮
- 4) 土谷博之 レチノイドによるインスリン抵抗性改善作用に関わるSTAT3標的転写産物の網羅的探索 日本レチノイド研究会 第23回学術集会 2012年10月19日 米子

- 5) 土谷博之、他 レチノイドによるインスリン抵抗性改善作用におけるレプチン依存的メカニズムの解明 第48回日本肝臓学会総会 2012年6月7-8日 金沢

[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

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

土谷 博之 (TSUCHIYA HIROYUKI)  
京都薬科大学・薬学部・講師  
研究者番号：00403402

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：