

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2018～2020

課題番号：18KT0065

研究課題名(和文) 血中エクソソームの脂質の量と質の変化からの生活習慣病病態の把握

研究課題名(英文) Lifestyle-related pathological conditions by the changes in the quantity and quality of blood exosome lipids

研究代表者

岩崎 仁 (Iwasaki, Hitoshi)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：20626874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：生活習慣病の病態の進行では明確に病気と判断できない状態「未病」を経て、病気として判断される。そのため、病態の状況を判断するバイオマーカーを定義することが必要である。CREBHは脂質代謝を制御する転写因子であり、CREBH欠損マウスは食餌誘導性の脂肪肝を増悪化する。その際、肝臓ではnon coding RNAの一つH19が異常に増加するとともに炎症性サイトカインのいくつかも増加することを見出した。Cre-LoxPシステムで肝臓特異的CREBH過剰発現マウスをCRISPR/Cas9システムを用い作製した。このマウスは血中脂質の低下を示し、CREBHが肝臓で脂質代謝を改善することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CREBHは現在まで、知名度のある分子ではなかった。しかしながら、CREBH欠損マウスが脂質代謝異常から脂肪肝を呈する新たなモデルマウスであることを示した学術的、社会的意義は大きい。また、その病態発症のメカニズムにエクソソームで細胞間、組織間を移動し、病態発症に関与すると報告のあるnon coding RNA, H19が関与することを示唆する結果を得た。新たな病態マーカーになりえる因子の同定は、今後の脂肪肝の治療戦略に新たな道筋を示したと言え、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：It is judged as a disease after going through a state "not sick" that cannot be clearly judged as a disease in the progression of the pathological condition of a lifestyle-related disease. Therefore, it is necessary to define a biomarker that determines the condition of the pathological condition. CREBH is a transcription factor that regulates lipid metabolism, and CREBH-deficient mice exacerbate and exacerbate diet-induced fatty liver. At that time, it was found that one of the non-coding RNAs, H19, was abnormally increased in the liver, and that some of the inflammatory cytokines were also increased. In addition, liver-specific CREBH overexpressing mice were generated using the Cre-LoxP system using the CRISPR / Cas9 system. The mice showed reduced blood lipids, indicating that CREBH improves lipid metabolism in the liver.

研究分野：応用健康科学

キーワード：生活習慣病 CREBH

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本でも食生活の欧米化に伴い欧米同様、メタボリックシンドローム患者の増加が深刻な社会問題となっている。そのため、生活習慣病の新たな治療法の開発とともに、病気の早期発見、予測法の開発が必要となっている。その中で病態を把握する新たなバイオマーカーの特定が待たれている。現在、血中の生化学成分、ホルモンとともに脂肪酸の量だけでなく、脂肪酸の組成の変化、マイクロRNA(miRNA)が指標となっている。

脂質代謝における重要な転写因子として sterol regulatory element-binding protein (SREBP)、cAMP-responsive element-binding protein H (CREBH)、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) が機能する。我々はこれら転写因子に着目し、組織、細胞内脂肪酸組成の量と質が生活習慣病病態を制御することを明らかにしてきた。

CREBH は肝臓、小腸にのみ発現する小胞体膜貫通型タンパクであり、脂質代謝改善に機能する。CREBH を肝臓で過剰発現させると、食事誘導性肥満を抑制する。その際、肝臓では脂肪酸酸化に関連する酵素群、生活習慣病改善ホルモンである Fibroblast growth factor 21 (FGF21) の発現を上昇させた(1)。一方、CREBH 欠損マウスは高脂肪食を負荷すると正常(WT)マウスでも脂肪肝を呈するが、それ以上に増悪化する(2)。また、CREBH KO マウスは動脈硬化モデルマウスと交配すると異常なまでの動脈硬化が早期に悪化する。この変化は小腸からの脂質吸収促進と肝臓での脂質代謝異常によるものである(3)。このように CREBH の遺伝子改変マウスは肥満、糖尿病、非アルコール性脂肪肝、動脈硬化といった生活習慣病に大きく影響することを明らかにしてきた。

糖尿病をはじめとする生活習慣病の多くは生活している上での実質的な障害が病態発症初期にはなく、病気である自覚がない。特に非アルコール性脂肪肝では血液検査で肝障害が指摘された場合、すでに病気が進行してしまっている。そのため、早期に様々な表現型を示す生活習慣病を簡便に、そして、厳密に非侵襲で検査する方法が必要となっている。

2. 研究の目的

日本でも食生活の欧米化に伴い欧米同様、メタボリックシンドローム患者の増加が深刻な社会問題となっている。生活習慣病患者の増大は医療費の増加、患者自身の QOL の低下を引き起こし、個人のみならず、社会全体にとっても大きな問題となっている。そのため、生活習慣病の新たな治療法の開発が必要である。CREBH KO マウスでは食餌誘導性に脂肪肝を誘導した際、異常なまでの病態の悪化を観察している。本課題ではこのマウスを用い、病態悪化の分子メカニズムを明らかにする。病態悪化のバイオマーカーを特定し、新たな予測法の確立を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CREBH 組織特異的過剰発現マウスの作製

LoxP-HA Tag-活性型マウス CREBH-LoxP を含む cDNA をマウス ROSA26 ゲノム上に CRISPR/Cas9 システムで挿入した。CREBH flox Tg マウスを作製し、肝臓特異的 Cre Tg マウスと交配し、肝臓特異的 CREBH 過剰発現(CREBH L-Tg)マウスを作製した。

(2) CREBH KO マウスを用いた脂肪肝発症メカニズムの解明

CREBH KO マウスを用い、食事で脂肪肝を誘導するため、メチオニン・コリン欠損(MCD)食を負荷した。それらマウスから血液、および、組織サンプルを回収し、解析を行った。

4. 研究成果

(1) CREBH L-Tg マウスの作製と成長の関連

肝臓特異的 CREBH Tg マウスを作製するため、CRISPR/Cas9 システムを用い、ROSA26 locus ゲノム上に LoxP-HA Tag-活性型マウス CREBH cDNA-LoxP を含む cDNA を挿入した。目的の配列が挿入された CREBH flox Tg マウスを得た。得られたマウスと肝臓特異的 Cre Tg マウスと交配し、肝臓特異的 CREBH Tg (CREBH L-Tg)マウスを得た。

CREBH L-Tg マウスでは血糖値、血中インスリン値、血中トリグリセライド値の顕著な低下を示した。また、CREBH の標的遺伝子で生活習慣病改善ホルモンである Fibroblast growth factor 21 (FGF21) の肝臓での発現、および、血中レベルが著しい増加を確認した。

CREBH L-Tg マウスは明らかに成長が遅延し、体重の増加が抑制された。成長を制御する成長ホルモンが異常なまでの高値を示すのに対し、その下流で成長の実行因子である Insulin like growth factor 1 (IGF-1) は測定限界ほどの低値を示した。この表現型は成長ホルモン抵抗性の病態と同じであった。CREBH は元来、絶食時に発煙が上昇し、絶食状態を模倣させる因子であることを我々が報告していた。栄養飢餓は成長を抑制することが周知の事実である。本結果から CREBH が栄養と成長を繋ぐ因子であることを明らかにした。

(2) CREBH 欠損による非アルコール性脂肪肝の悪化

CREBH KO マウスにメチオニン・コリン欠損(MCD 食)を負荷した。血中肝障害マーカーである alanine aminotransferase (ALT)、aspartate aminotransferase (AST) 値を食餌負荷 8 週間経時的に測定した。負荷 1 週間目で著しい増加が増加し、その後、8 週間目まで高値を維持した。一方、正常(WT)マウスでも増加は止められたが、CREBH KO マウスと比べると軽微であった。肝

炎、黄疸の血液マーカーあるビリルリン(総ビリルリン、間接ビリルビン)も8週間負荷で著な増加を示した。これら結果から、胆汁うっ滞による黄疸を CREBH KO マウスで比較的、短期間で呈した。さらに、肝機能のマーカーである血中アルブミンも測定した。CREBH KO マウスでは WT マウスに比べ明らかな低下を示しており、CREBH KO マウスでは肝障害により、肝機能が低下したことが明らかになった。

CREBH KO マウスの肝臓は萎縮し、病理像として、肝臓内の脂肪滴は WT マウスと比べ、少なかった。しかしながら、マッソントリクローム染色により肝線維化を評価すると、線維化の促進が観察された。全体的に肝臓の構造に異常が観察された。

MCD 食負荷 1 週間目の肝臓中の遺伝子発現解析したところ、CREBH KO マウスでは脂肪酸酸化を司る転写因子 PPAR の発現が著しく低下した。脂肪酸酸化能の低下が想定され、脂肪蓄積が増加していることが想定できる。ノンコーディング RNA の一つである Long noncoding RNA (lncRNA) の H19 の顕著な上昇が見られた。H19 はエクソソームに包埋され、細胞間を行き来すること、血中にも分泌され、肝臓以外の組織へ運ばれることがすでに報告されている。その中で H19 が胆汁うっ滞性肝障害の原因の一つであることも報告されている。それゆえ、CREBH の欠損が H19 の発現を誘導し、肝障害を悪化させたと考えられる。また、さらに、炎症を惹起させ慢性炎症を誘導するサイトカインである Lipocalin 2 (Lcn2)、Osteopontin (Opn)、C-C motif chemokine 2 (CCL2)/Monocyte chemoattractant protein 1 (Mcp1)も増加しており、様々な因子が病態悪化に関与することを明らかにした。

<引用文献>

- (1)Y. Nakagawa et al., Hepatic CREB3L3 controls whole-body energy homeostasis and improves obesity and diabetes. *Endocrinology* 155, 4706-4719 (2014).
- (2)Y. Nakagawa et al., CREB3L3 controls fatty acid oxidation and ketogenesis in synergy with PPARalpha. *Sci Rep* 6, 39182 (2016).
- (3)Y. Nakagawa et al., Enterohepatic Transcription Factor CREB3L3 Protects Atherosclerosis via SREBP Competitive Inhibition. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 11, 949-971 (2021).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Nakagawa Y, Wang Y, Han SI, Okuda K, Oishi A, Yagishita Y, Kumagai K, Ohno H, Osaki Y, Mizunoe Y, Araki M, Murayama Y, Iwasaki H, Konishi M, Itoh N, Matsuzaka T, Sone H, Yamada N, Shimano H. | 4. 巻 11(4) |
| 2. 論文標題 Enterohepatic Transcription Factor CREB3L3 Protects Atherosclerosis via SREBP Competitive Inhibition. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cell Mol Gastroenterol Hepatol. | 6. 最初と最後の頁 949-971 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2020.11.004. | 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 Satoh A, Han SI, Araki M, Nakagawa Y, Ohno H, Mizunoe Y, Kumagai K, Murayama Y, Osaki Y, Iwasaki H, Sekiya M, Konishi M, Itoh N, Matsuzaka T, Sone H, Shimano H. | 4. 巻 23(3) |
| 2. 論文標題 CREBH Improves Diet-Induced Obesity, Insulin Resistance, and Metabolic Disturbances by FGF21-Dependent and FGF21-Independent Mechanisms. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 iScience | 6. 最初と最後の頁 100930 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.100930. | 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 Matsuzaka T, Kuba M, Koyasu S, Yamamoto Y, Motomura K, Arulmozhiraja S, Ohno H, Sharma R, Shimura T, Okajima Y, Han SI, Aita Y, Mizunoe Y, Osaki Y, Iwasaki H, Yatoh S, Suzuki H, Sone H, Takeuchi Y, Yahagi N, Miyamoto T, Sekiya M, Nakagawa Y, Ema M, Takahashi S, Tokiwa H, Shimano H. | 4. 巻 71(5) |
| 2. 論文標題 Hepatocyte ELOVL Fatty Acid Elongase 6 Determines Ceramide Acyl-Chain Length and Hepatic Insulin Sensitivity in Mice. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Hepatology | 6. 最初と最後の頁 1609-1625 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.30953. | 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 Ma Y, Sekiya M, Kainoh K, Matsuda T, Iwasaki H, Osaki Y, Sugano Y, Suzuki H, Takeuchi Y, Miyamoto T, Yahagi N, Nakagawa Y, Matsuzaka T, Shimano H. | 4. 巻 523(2) |
| 2. 論文標題 Transcriptional co-repressor CtBP2 orchestrates epithelial-mesenchymal transition through a novel transcriptional holocomplex with OCT1. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun. | 6. 最初と最後の頁 354-360 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.12.070. | 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 Sharma R, Matsuzaka T, Kaushik MK, Sugasawa T, Ohno H, Wang Y, Motomura K, Shimura T, Okajima Y, Mizunoe Y, Ma Y, Saber ZM, Iwasaki H, Yatoh S, Suzuki H, Aita Y, Han SI, Takeuchi Y, Yahagi N, Miyamoto T, Sekiya M, Nakagawa Y, Shimano H. | 4. 巻 9(1) |
| 2. 論文標題 Octacosanol and policosanol prevent high-fat diet-induced obesity and metabolic disorders by activating brown adipose tissue and improving liver metabolism. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Sci Rep. | 6. 最初と最後の頁 5169 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-41631-1. | 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 Murayama Y, Yahagi N, Takeuchi Y, Aita Y, Mehrzad Saber Z, Wada N, Li E, Piao X, Sawada Y, Shikama A, Masuda Y, Nishi-Tatsumi M, Kubota M, Izumida Y, Miyamoto T, Sekiya M, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Sugano Y, Iwasaki H, Kobayashi K, Yatoh S, Suzuki H, Yagyu H, Kawakami Y, Shimano H. | 4. 巻 593(4) |
| 2. 論文標題 Glucocorticoid receptor suppresses gene expression of Rev-erb (Nr1d1) through interaction with the CLOCK complex. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 FEBS Lett. | 6. 最初と最後の頁 423-432 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13328. | 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 Araki M, Nakagawa Y, Oishi A, Han SI, Wang Y, Kumagai K, Ohno H, Mizunoe Y, Iwasaki H, Sekiya M, Matsuzaka T, Shimano H. | 4. 巻 19(7) |
| 2. 論文標題 The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) Agonist Pemafibrate Protects against Diet-Induced Obesity in Mice. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Int J Mol Sci. | 6. 最初と最後の頁 2148 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19072148. | 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 Ohno H, Matsuzaka T, Tang N, Sharma R, Motomura K, Shimura T, Satoh A, Han SI, Takeuchi Y, Aita Y, Iwasaki H, Yatoh S, Suzuki H, Sekiya M, Nakagawa Y, Sone H, Yahagi N, Yamada N, Higami Y, Shimano H. | 4. 巻 159(6) |
| 2. 論文標題 Transgenic Mice Overexpressing SREBP-1a in Male ob/ob Mice Exhibit Lipodystrophy and Exacerbate Insulin Resistance. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Endocrinology. | 6. 最初と最後の頁 2308-2323 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/en.2017-03179. | 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 - |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

筑波大学 医学医療系 内分泌代謝・糖尿病内科
<https://www.u-tsuba-endocrinology.jp/>

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 |
|-------------------|--|--|----|
| 研究 分 担 者 | 中川 嘉 (Nakagawa Yoshimi) (80361351) | 富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授 (13201) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|