

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11737

研究課題名(和文) 非アルコール性脂肪肝発症における肝臓内細胞連関の解明

研究課題名(英文) The study of intra-hepatic cell interaction in the development of nonalcoholic fatty liver disease

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子CREBHの肝臓特異的過剰発現マウスを作成した。このマウスは成長ホルモン抵抗性による成長遅延を示し、CREBHが栄養異化と成長遅延を結ぶ因子であることを証明した。CREBH KOマウスにMCD食を負荷すると肝障害・肝炎を呈した。肝臓での網羅的遺伝子発現解析から、炎症を惹起させる分子をいくつか抽出した。これら因子は肝実質細胞と非実質細胞の間で炎症を増悪化させものであった。さらに、ChIP-seq解析を組み合わせてAK2がCREBHの標的遺伝子であることを見出した。AK2の低下はミトコンドリア機能の低下が炎症を引き起こすことで、細胞死を誘導し、炎症反応を惹起させたと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CREBHが栄養飢餓の助長と成長阻害を繋ぐ分子であることをマウスレベルで実証したことは、CREBHの機能増強により人工的に栄養飢餓を誘導させられることも示した。この結果はCREBHが肥満の解消させる治療薬開発につながる可能性を示した。CREBH欠損により肝障害・肝炎を異常なまでに増悪化する。肝臓は様々な細胞で構成されており、肝障害を発症する際には肝臓内の細胞間連関が増悪化に寄与する。この肝機能障害を誘導しうる分泌因子を複数特定し、細胞間連関によるメカニズムの一端を明らかにしたことで、肝炎治療薬開発につながる成果を得た。

研究成果の概要(英文)： Liver-specific transcription factor CREBH overexpressing mice were generated using Cre-LoxP system and CRISPR/Cas9 system. This mouse showed severe growth retardation due to growth hormone resistance, demonstrating that CREBH is a factor linking nutritional catabolism and growth retardation. When CREBH KO mice were fed with an MCD diet, they presented with severe liver damage and hepatitis. From the comprehensive gene expression analysis in the liver, some molecules that cause inflammation were extracted. These factors exacerbated inflammation between hepatic parenchymal cells and nonparenchymal cells. Furthermore, by combining ChIP-seq analysis, it was found that AK2 is a novel target gene of CREBH. It is considered that the decrease of AK2 induces an inflammatory reaction by inducing cell death due to the decrease in mitochondrial function.

研究分野：栄養学

キーワード：生活習慣病 脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

近年の食生活の欧米化に伴い日本でも生活習慣病患者の急激な増加が大きな社会問題となっている。特に脂肪肝の問題は大きくなっている。脂肪肝には飲酒による脂肪肝(アルコール性脂肪肝)と、お酒を飲まないのに発症する非アルコール性脂肪肝の2種類がある。現在、国内での正確な患者数はわかっていませんが、人間ドックを受ける人で非アルコール性脂肪肝に罹患している人が30~40%であることから、推定で1000万~2000万人の潜在患者がいると考えられている。さらに、非アルコール性脂肪肝炎に進展するのは100~200万人と考えられている。そのため、非アルコール性脂肪肝治療のためにはその発症、および改善の分子メカニズムの解明が必要である。非アルコール性脂肪肝の発症と糖尿病(高血糖)、脂質異常症、高血圧との間の強い関連性がヒトのデータからも明らかとなっている。また、非アルコール性脂肪肝は病態が悪化すると、非アルコール性脂肪肝炎を発症し、次第に線維化を起こし肝硬変にまで発展していく。肝硬変にまで進行すると年率で数%に、肝がんが発生すると言われています。それゆえ、脂肪肝を治すことはがんを抑制することにつながり、非常に重要である。しかしながら、その決定的な治療法は未だ確立できていない。それゆえ、新たな病態モデルマウスの開発とともに、新たな視点からの病態解析が必要となっている。

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。SREBP は脂質合成を促進させるように、CREBH、PPAR は脂質分解を促進させるように脂質代謝に関連する酵素群の遺伝子発現を制御する。そのため、SREBP の活性化は脂肪肝を増悪化し、CREBH、PPAR の活性化は脂肪肝を改善させる。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。

我々はさらに CREBH に着目し、新規の非アルコール性脂肪肝の分子メカニズムを明らかにすることを考えている。脂質の代謝だけでなく、糖代謝の両方向からの影響、肝臓内の細胞肝連関を制御する分泌因子(炎症系サイトカイン、non coding RNA など)による相互作用が関わるデータをすでに得ており、新たな治療戦略だけでなく、バイオマーカーの同定にも寄与できる研究である。肝臓と小腸にのみ発現し、特に栄養欠乏時の肝臓で高発現する転写因子 CREBH の解析を重点的に行っている。肝臓の CREBH は生活習慣病を改善する肝臓から分泌されるホルモン FGF21 の発現を誘導し、食事誘導性肥満を改善させる。その際、脂質異常症治療薬フィブレードの標的遺伝子で転写因子 PPAR と CREBH は協調して FGF21 の発現を誘導することを報告している(1)。その中で研究代表者らが解析している転写因子 CREBH はヒトでの解析から異常なまでの高トリグリセライド血症を呈する患者で CREBH 遺伝子変異が病態の原因であることが報告されている(2)。それゆえ、ヒトの非アルコール性脂肪肝の病態の解明において、CREBH KO マウスは有用な研究対象となりえる。確かに、CREBH KO マウスではヒトと同様に高トリグリセライド血症を示すことを申請者は報告している(3, 4)。また、非アルコール性脂肪肝を誘導する各種エサを負荷すると脂肪肝から、さらに肝炎、肝硬変へと病態が正常マウスに比べ、悪化が著しい結果を得ている(未発表データ)、(3-5)。CREBH KO マウスでは食事誘導性の非アルコール性脂肪肝を悪化させ、脂肪肝炎にまで進行させ、短期間で肝機能障害を示し死亡する(未発表データ)ことも見出している。CREBH KO マウスに非アルコール性脂肪肝を食事誘導性に発症させた際の網羅的遺伝子解析からいくつかのノンコーディング RNA の発現が著しく上昇することを確認している。これらの結果は現在まで報告はなく、その新規性、独自性が担保されている。特にノンコーディング RNA は肝実質細胞からエクソソームを介して肝臓内の細胞間、さらに血中を介し全身に運ばれ、運ばれた組織で組織機能の低下を引き起こすことが報告されている。機能がほとんど分かっていないノンコーディング RNA と病態形成の相互作用の解明ができる。また、エクソソームを介すことから、病態に関連するノンコーディング RNA であればバイオマーカーとして病態、病状把握が可能となり、社会的ニーズも期待できる。

2. 研究の目的

新たな非アルコール性脂肪肝発症から肝がんを発症させられる動物モデルである CREBH KO マウスを使い複雑な肝臓内細胞間連関を通じた炎症惹起の分子機序を明らかにする。肝臓内は栄養代謝を司る肝実質細胞(肝細胞 Hepatocyte)と非実質細胞(類洞内皮細胞 LSEC)、クッパ細胞(Kupffer cell)、肝星細胞(Stellate cell)、好中球(Neutrophil)に分けられる。肝実質細胞からのサイトカインの異常分泌が、炎症に関わる好中球、クッパ細胞を活性化し、肝星細胞が元になる線維化を誘導することが知られている。その相互作用の中心に CREBH を置き、炎症惹起、線維化の未知の活性化機構を明らかにする。CREBH の機能異常が引き起こす細胞連関の恒常性の異常破綻のメカニズムを解き明かす。これら細胞以外にも肝臓で作られた胆汁酸を運ぶ通路である胆管を構成する胆管上皮細胞にも着目する。

3. 研究の方法

(1) CREBH 組織特異的過剰発現マウスの作製と解析

CREBH 組織特異的過剰発現マウスの作製

マウスで組織特異的に遺伝子発現を制御するため、Cre-LoxP システムを使用した。まず、マウスゲノム上に挿入するコンストラクトとして、LoxP-HA Tag-活性型マウス CREBH-LoxP を含む cDNA を構築した。この cDNA 配列を ROSA26 ゲノム上に挿入するように、CRISPR/Cas9 システムに関連するベクターとともに受精卵に挿入した。目的とおりに挿入された活性型 CREBH が Cre-LoxP システムで制御される (CREBH flox Tg) マウスを 1 匹得た。作成した CREBH flox Tg マウスと肝臓特異的 Cre Tg マウスとを交配し、肝臓特異的 CREBH 過剰発現 (CREBH L-Tg) マウスを作製した。さらに、CREBH L-Tg マウスは FGF21 KO マウスと交配し、CREBH L-TG/FGF21 KO マウスを作成した。

CREBH L-Tg マウスの表現型解析

生後 1 か月で解剖し、体重、肝臓重量を測定するとともに、肝臓、血液を採取した。肝臓からは mRNA とタンパクを抽出し、それぞれリアルタイム CR で遺伝子発現を、ウェスタンブロッティングでタンパクを測定した。血液は血糖値、インスリン、トリグリセライド、コレステロール、遊離脂肪酸、成長ホルモン (GH)、Insulin like-growth factor 1 (IGF1)、Fibroblast growth factor 21 (FGF21) を測定した。骨密度測定装置 (DEXA) を用い、骨密度、体脂肪率を測定した。

(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 マウスに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。肝臓から mRNA を抽出し RNA seq またはマイクロアレイ解析を行い、網羅的解析データを取得した。

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 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 GH 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 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。GH 刺激は肝臓において JAK2-STAT5 経路を活性化する。活性化された STAT5 は転写因子として成長を制御する IGF1 などの発現を上昇させ、成長を促進する。肝臓の遺伝子発現を解析したところ CREBH L-Tg マウスでは STAT5 が標的とする遺伝子のすべてが低下し、その中には IGF1 が含まれていた。タンパクレベルで JAK2、STAT5 のリン酸化状態を評価するとリン酸化レベルが著しく低下しており、この変化が STAT5 の活性抑制を引き起こしたことになる。GH は細胞膜上に存在する受容体 (GHR) を介して、細胞内へシグナルを伝える。CREBH L-Tg マウスでは GHR の発現が低下し、タンパクレベルでも低下していた。したがって、CREBH L-Tg マウスでは GHR の低下により、GH シグナルが遮断され、それ以降のシグナルが低下したことで IGF1 の低下、成長遅延が生じたと考えられた。血中 GH の異常高値はこのシグナルの抑制に対するフィードバックの結果であり、GH 抵抗性を引き起こす原因でもあった。

CREBH の主要な標的遺伝子である FGF21 の過剰発現マウスも成長遅延を示すことが報告されていたため (6)、我々はさらに CREBH L-Tg マウスと FGF21 KO マウスを交配し、CREBH L-Tg/FGF21 KO マウスを作成した。FGF21 が CREBH の成長遅延に関係するのであれば、このマウスは成長遅延を引き起こさないと想定した。しかしながら、このマウスも成長遅延を引き起こし、CREBH L-Tg マウスで見られた変化が同様に見られた。GHR の発現低下とともに GH シグナル分子の不活性化が同様に見られており、これら変化は FGF21 を介していないことを証明した。しかしながら、CREBH による成長遅延に FGF21 が全く関与しないわけではなく、別の経路から寄与していることは否定できない。

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。栄養飢餓は成長に必要な栄養の不足を引き起こし、成長を抑制する。本結果から CREBH が栄養異化を促進させることで成長を抑制させる因子であることを明らかにした (7)。

(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 MCD 食を負荷すると異常なまでの肝障害を生じる。病態を悪化させる原因遺伝子であり、CREBH により制御される因子を同定するため、食餌負荷後、経時的 (1、4、8 週) に肝臓を採取し、網羅的解析を行った。CREBH KO マウスで上昇する遺伝子は食餌負荷後 1、4、8 週の全期間で上昇しているものに炎症性サイトカイン Lcn2、鉄代謝異常が引き起こす細胞死 (フェロトーシス) を誘導する Slc7a11 が抽出された。4、8 週齢で上昇した遺伝子にもフェロトーシスに関連する Spp1、Cd44 も含まれており、フェロトーシスが促進されていることが想定できる。GO 解析でも鉄代謝 (iron transport) や炎症に関連する (neutrophil chemotaxis、

neutrophil aggregation)が変化していることを示した。

MCD食負荷1週間でGO解析からCREBH KOマウスでは脂質代謝に関連するプロセス(fatty acid metabolic process, unsaturated fatty acid biosynthetic process, lipid metabolic process)とサーカディアンリズムに関連する遺伝子(circadian regulation of gene regulation, rhythmic process)が特に変動した。MCD食負荷8週間では脂質代謝とともに酸化還元のプロセス(oxidation-reduction process)も変動した。CREBH KOマウスで発現が半分以下になる遺伝子をMCD食負荷後1, 4, 8週間でそれぞれ抽出し、さらに、すべての期間で発現が低下する遺伝子を36個抽出した。

CREBHを正常マウスの肝臓でアデノウイルスを使い過剰発現させた後、CREBHタンパクが結合するゲノム領域を特定するため、ChIP-seqを行った。その結果とMCD食で低下した遺伝子の中でCREBHがそのプロモーター上に結合する遺伝子として、Ak2, Elovl2, 1810055G02Rik, Tor1b, I111rap, Tnfaip8l1, Fads2, Apo4を同定した。Elovl2, Fads2, Apo4はすでにCREBHの標的遺伝子として特定されており、Ak2は新規標的と考えられた。CREBHはPPARと標的遺伝子を共有するため、CREBH KO、PPAR KOマウスの肝臓の網羅的解析データでAk2の発現を確認した。絶食時での変化ではあるが、Ak2は両遺伝子のKOマウスでも減少しており、2つの転写因子により制御されていることが示唆された。CREBH L-Tgマウスの肝臓の網羅的遺伝子発現データではAk2の発現はCREBHで上昇しており、Ak2はCREBHの標的遺伝子であると考えられる。

引用文献

1. Nakagawa, Y., Satoh, A., Yabe, S., Furusawa, M., Tokushige, N., Tezuka, H., Mikami, M., Iwata, W., Shingyouchi, A., Matsuzaka, T., Kiwata, S., Fujimoto, Y., Shimizu, H., Danno, H., Yamamoto, T., Ishii, K., Karasawa, T., Takeuchi, Y., Iwasaki, H., Shimada, M., Kawakami, Y., Urayama, O., Sone, H., Takekoshi, K., Kobayashi, K., Yatoh, S., Takahashi, A., Yahagi, N., Suzuki, H., Yamada, N., and Shimano, H. (2014) Hepatic CREB3L3 controls whole-body energy homeostasis and improves obesity and diabetes. *Endocrinology* **155**, 4706-4719
2. Lee, J. H., Giannikopoulos, P., Duncan, S. A., Wang, J., Johansen, C. T., Brown, J. D., Plutzky, J., Hegele, R. A., Glimcher, L. H., and Lee, A. H. (2011) The transcription factor cyclic AMP-responsive element-binding protein H regulates triglyceride metabolism. *Nat Med* **17**, 812-815
3. Nakagawa, Y., Satoh, A., Tezuka, H., Han, S. I., Takei, K., Iwasaki, H., Yatoh, S., Yahagi, N., Suzuki, H., Iwasaki, Y., Sone, H., Matsuzaka, T., Yamada, N., and Shimano, H. (2016) CREB3L3 controls fatty acid oxidation and ketogenesis in synergy with PPAR α . *Sci Rep* **6**, 39182
4. Nakagawa, Y., Oikawa, F., Mizuno, S., Ohno, H., Yagishita, Y., Satoh, A., Osaki, Y., Takei, K., Kikuchi, T., Han, S. I., Matsuzaka, T., Iwasaki, H., Kobayashi, K., Yatoh, S., Yahagi, N., Isaka, M., Suzuki, H., Sone, H., Takahashi, S., Yamada, N., and Shimano, H. (2016) Hyperlipidemia and hepatitis in liver-specific CREB3L3 knockout mice generated using a one-step CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep* **6**, 27857
5. Kikuchi, T., Orihara, K., Oikawa, F., Han, S. I., Kuba, M., Okuda, K., Satoh, A., Osaki, Y., Takeuchi, Y., Aita, Y., Matsuzaka, T., Iwasaki, H., Yatoh, S., Sekiya, M., Yahagi, N., Suzuki, H., Sone, H., Nakagawa, Y., Yamada, N., and Shimano, H. (2016) Intestinal CREBH overexpression prevents high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia by reducing Npc1l1 expression. *Mol Metab* **5**, 1092-1102
6. Inagaki, T., Lin, V. Y., Goetz, R., Mohammadi, M., Mangelsdorf, D. J., and Kliewer, S. A. (2008) Inhibition of growth hormone signaling by the fasting-induced hormone FGF21. *Cell Metab* **8**, 77-83
7. Nakagawa, Y., Kumagai, K., Han, S. I., Mizunoe, Y., Araki, M., Mizuno, S., Ohno, H., Matsuo, K., Yamada, Y., Kim, J. D., Miyamoto, T., Sekiya, M., Konishi, M., Itoh, N., Matsuzaka, T., Takahashi, S., Sone, H., and Shimano, H. (2021) Starvation-induced transcription factor CREBH negatively governs body growth by controlling GH signaling. *FASEB J* **35**, e21663

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2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 -

〔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-tsukuba-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