様式Ｃ－１９

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２５年　４月２８日現在

機関番号：１２１０２
研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2010～2012
課題番号：22300234
研究課題名（和文）　食事栄養素が導く新規転写因子 CREBH 活性化と生活習慣病改善の分子機構の解明
研究課題名（英文）　The molecular mechanism that CREBH activation by nutrition improves metabolic syndrome
研究代表者
中川　嘉（NAKAGAWA YOSHIMI）
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：80361351

研究成果の概要（和文）：現在、日本では食生活の欧米化に伴い生活習慣病患者の急増が社会問題になっている。遺伝子発現調節を起点とした生活習慣病発症や遺伝子発現の変化による生活習慣病の改善のメカニズムの解明を目指した。本課題では転写因子 CREBH は肝臓において生活習慣病を改善するホルモンである FGF21 の発現を上昇させることで生活習慣病を改善させることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Transcriptional regulation of metabolic genes in the liver is the key to maintaining systemic energy homeostasis.　Here we demonstrate that a membrane-bound transcription factor, cAMP responsive element binding protein-H (CREBH), is activated during fasting, which mediates a wide spectrum of metabolic responses to starvation.　Adenoviral and transgenic overexpression of CREBH reduces plasma lipid and glucose levels and body weight in both normal and diabetic obese mice.　CREBH directly transactivates fibroblast growth factor 21 and its plasma level, which is at least partially attributed to these effects of CREBH on the systemic energy homeostasis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２０１０年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
２０１１年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
２０１２年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総　計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：分子生物学
科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学
キーワード：生活習慣病、エネルギー代謝、転写調節、遺伝子発現

１．研究開始当初の背景
欧米先進各国では、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。日本でも、食生活の欧米化に伴い欧米同様、生活習慣病患者が急速に増加している。生活習慣病患者の増大は医療費の増加といった社会的な問題とともに、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。生活習慣病の発症の原因としては、食生活の欧米化、老化、運動不足、生活におけるストレスである。しかし、現在の治療法ではライフスタイルを変えずに治療をすることできない。そのため、現在までに行われている治療以外に新たなライフスタイルを変えない治療法の確立が必要である。
　我々は新たに食事摂取に伴う生体でのアミノ酸、脂肪酸、糖の変化が転写因子を介し

た遺伝子発現制御をどのように制御しているかを明らかにしていくための研究を行ってきている。新たな生活習慣病の治療標的として膜結合型転写因子であるCREBHに着目した。CREBHは我々が現在まで研究を行ってきているSREBPと同じ構造、同じ活性化機構を持つ。しかし、活性化される条件が異なる。CREBHは栄養欠乏時、SREBPは栄養過多時に活性化され、活性化される条件が相反する興味深い機構を持つ。さらにCREBHはエネルギー代謝調節の責任臓器である肝臓に発現が限局しており、CREBHがエネルギー代謝、生活習慣病に関連があることが推測された。解析の結果、CREBHが生活習慣病の改善に寄与するデータを得てきている。CREBHが生活習慣病を改善するのに対し、同じ構造、活性化機構をもつSREBPは全く逆に生活習慣病を悪化させる。この対極にある分子の違いを明らかにすることは生活習慣病改善の手段の発見につながると考えられる。

２．研究の目的

機能としてCREBHと逆の効果を有するSREBPの今までの研究成果を踏まえ、生理的なCREBHの活性化因子の同定、CREBHの標的因子の同定から、CREBHの生活習慣病、エネルギー代謝への関与を明らかにする。新たな標的因子を同定することで、現在までに知られている分子メカニズム以外での生活習慣病の改善するメカニズムを明らかにする。

また、CREBHの活性を制御する因子の同定では、特に活性化因子として、食事中に含まれるアミノ酸、脂肪酸、糖質、ビタミンに注目し、食事成分の変化が与える生活習慣病改善とCREBHの機能の関連性を明らかにすることで“食”からの生活習慣病改善の可能性を探る。

３．研究の方法

(1) 【過剰発現アデノウイルスを用いたマウスでの解析】マウスへCREBH過剰発現アデノウイルスを肝臓特異的に導入する。生体へ与える影響を血清パラメーター、遺伝子発現、タンパク変化で解析する。

(2) 【CREBH RNAiアデノウイルスを用いたマウスでの解析】過剰発現同様、マウスへ導入し、様々なパラメーターでの変化を解析する。過剰発現と比較し、CREBHの直接的な影響を明らかにする。

(3) 【食事の種類による変化の解析】食事成分の違いによるCREBHの発現を検討する。脂肪、糖の比率の違いによる影響を検討する。１．高脂肪・高ショ糖食、２．低脂肪・高ショ糖食、３．ダイエット食(ケトン食)である高脂肪・糖質なし食といった食事をマウスに与える。また、絶食や再摂食といった極端な栄養状態でも検討を行う。

(4) 【CREBH遺伝子改変マウスの作成】組織特異的CREBH活性型過剰発現マウスを作製する。Cre-lox Pシステムにより Cre存在時、活性型CREBHが発現するようにコンストラクトする。

(5) 【遺伝子改変マウスと生活習慣病モデルマウスとの交配による病態改善の検討】作成した遺伝子改変マウス(トランスジェニックマウス、ノックアウトマウス)と生活習慣病モデルマウス(ob/ob、LDL KO、ApoE KOなど)と交配し、それらのマウスの病態に対する影響を生化学的指標、遺伝子発現、タンパク解析から検討する。肥満モデルマウス(ob/ob, KKAy)との交配から、脂肪蓄積・インスリン抵抗性への影響を検討する。

４．研究成果

(1)栄養状態におけるCREBHの発現パターン

CREBHは肝臓に発現が限局し、その発現は栄養状態に依存し変化した．絶食時に増加し、再摂食時にはその発現は減少する。生活習慣病モデルマウスであるdb/dbマウスではこの栄養状態よる遺伝子発現制御が破綻している。また、核型CREBHのタンパク量は正常マウスで絶食時に再摂食時と比較し増加するのに対し、db/db マウスではその変化が見られなかった。このことはCREBHの発現が栄養状態により変動し、エネルギー代謝の恒常性に機能することが推測された。

(2)アデノウイルスによる CREBH 過剰発現がマウスへ与える影響

CREBH 組換えアデノウイルスを作製し、正常(C57B6J)マウスへ導入し生体への影響を検討した。肝臓でのCREBHの発現量の増加に伴い、体重、摂食量、血糖値、インスリン、中性脂肪、コレステロールの低下が観察された。また、脂肪重量、肝重量、筋肉量についても減少が見られた。これら効果の原因となりえる遺伝子を特定するため mRNA アレイ解析を行ったところ、著しい発現の増加を示す遺伝子として FGF21 を同定した。FGF21は肝臓から分泌されるホルモンであり、全身に作用し生活習慣病病態を改善することが明らかになっている．実際、CREBHの過剰発現により肝臓では FGF21 mRNA が顕著に増加するとともに、血中FGF21濃度も約７倍にまで増加していた。

さらに、遺伝子発現変動について検討した。脂肪酸合成遺伝子である Fatty acid synthaseの低下、コレステロール合成遺伝子HMG CoA synthaseおよびHMG CoA reductaseの発現が低下しており、血清での脂質・コレステロールの低下がこれら遺伝子発現低下によるものと考えられた。また、脂肪燃焼に関わるPPARαとその共役因子PGC-1αの発現

が誘導されており、このことが中性脂肪の低下の一因と考えられた。また、脂質・コレステロール合成系遺伝子群は全体として低下傾向にあり、CREBH により肝臓での脂質・コレステロール合成が低下している結果を示した。

(3)CREBH 過剰発現による生活習慣病モデルマウスへの影響

CREBH の効果が生活習慣病の改善に機能するかを、生活習慣病のモデルマウスである KKAy マウスを用い解析を行った。CREBH 過剰発現により、血糖値、血中インスリン値、血中中性脂肪、コレステロールは著しく低下し、KKAy の生活習慣病病態を改善した。その際、やはり、肝臓および血中の FGF21 も増加した。

食事性肥満に対する影響について検討するため、高脂肪・高ショ糖食負荷したマウスで解析を行った。KKAy 同様に血糖値、血中インスリンの低下と血中 FGF21 の増加が見られ、体重の減少、肥満の抑制が見られた。

動脈硬化モデルマウスである LDLR KO マウスと CREBH 遺伝子改変マウスとの掛け合わせ実験では、CREBH 過剰発現マウスでは血中脂質の低下、CREBH KO マウスでは逆に上昇が見られた。CREBH は動脈硬化の進展にも影響を与える可能性を示唆しており、今後、実際に動脈硬化病巣の形成への影響を検討する予定である。

(4)ケトン食における CREBH の機能

PPARαが CREBH の発現を上昇させる転写因子の一つとして、我々は報告している。ある種の脂肪酸は PPARαの内因性のリガンドであることからも高脂肪・糖質欠損食(ケトン食)という脂肪酸の上昇を誘導する餌をマウスへ負荷することで PPARαを活性化させた。このとき PPARαの活性化に伴い FGF21 の発現が上昇することが知られている。マウスにケトン食を 3 日間、4 週間与え、CREBH および FGF21 の発現を検討したところ、3 日間、4 週間のどちらも 2 つの遺伝子発現は上昇した。この食事負荷において FGF21 の発現制御に CREBH が関わる可能性が示唆された。実際に関わるのかを検討するため、CREBH RNAi(CREBHi)アデノウイルスをケトン食 4 週間摂取した正常マウスへ投与し、その影響を検討した。CREBH の発現の低下とともに FGF21 の発現も低下しており、直接的な関与が示唆された。ケトン食時の FGF21 の発現の低下は脂質合成を上昇させることがすでに報告されているが、CREBH の欠損によっても同じ効果が引き起こされ、血中トリグリセリド、血中コレステロールは著しく上昇した。FGF21 は PPARαの標的である HMGCS2 の発現を上昇させ、ケトン体合成を促進し、血中ケトン体を上昇させる。CREBHi では血中ケトン体濃度が低下しており、FGF21, HMGCS2 の発現減少が原因と考えられた。つまり、CREBH は FGF21 の発現を制御することでケトン体・脂質代謝を調節すると考えられた。FGF21 と HMGCS2 の発現は CREBH の発現抑制によりそれぞれの発現が低下したが、それぞれの発現は PPARαで制御されており、CREBHi による直接的な作用か、PPARαを介した間接的な制御かは明らかではない。

(5)PPARαと CREBH の相互作用

ケトン食実験の結果からも CREBH が PPARαと関連することが予想されたことから、コントロール RNAi および CREBH RNAi アデノウイルスを正常マウスに投与し、PPARαのアゴニストであるフェノフィブラートおよび Wy14643 を 6 日間負荷させ、その変化を検討した。コントロール RNAi を投与したマウスでは PPARαアゴニストにより PPARαの標的である PPARα自身、ACO、CPT-1α、HMGCS2 などの発現が上昇し、CREBH の発現も上昇した。逆に、CREBH の RNAi により内因性の CREBH の発現抑制を抑制すると PPARαアゴニストによる PPARαの活性化は抑制され、PPARαの標的遺伝子群の発現は低下した。

さらに、CREBH ノックアウトマウスにも同様に PPARαアゴニストを負荷した。RNAi と同様に、FGF21,HMGCS2, ACO などの発現は低下し、血中トリグリセライドの PPARαアゴニストによる低下作用はキャンセルされた。

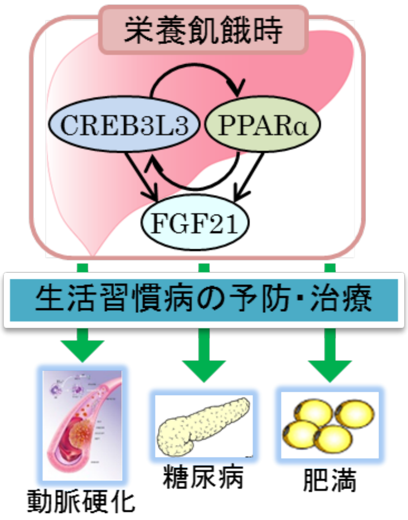
このことは CREBH が PPARα制御因子であることを示唆する結果である。

(6)FGF21 プロモーター解析

CREBH が直接、FGF21 の発現を制御するかを in vitro で解析を行った。マウス肝臓細胞由来の AML12 細胞にアデノウイルス CREBH を感染させた。CREBH の発現上昇により FGF21 が上昇した。さらに FGF21 プロモーターを用いた Luc assay および EMSA assay で CREBH が FGF21 かっせいのプロモーター活性を上昇し、CREBH が FGF21 プロモーターへ直接結合する結果であった。また、in vivo ChIP assay でも CREBH は FGF21 プロモーターに直接結合しており、絶食時に再摂食時に比べその結合は顕著に上昇であった。また、FGF21 は PPARαにより発現が制御されている報告がすでにあることから、PPARαノックアウトマウスを用い CREBH による直接的な制御の有無について検討した。PPARαノックアウトマウスへ CREBH アデノウイルスの投与と、PPARαノックアウトマウスと CREBH の肝臓特異的過剰発現トランスジェニックマウスとを交配させた。どちらのマウスの肝臓においても PPARαが欠損していても CREBH の過剰発現により FGF21 の発現が誘導され血中 FGF21 も増加した。したがって、in vitro, in vivo においても CREBH が FGF21 の発現を制御する重要な因子であることが明らかとなった。

CREBH は肝臓において栄養欠乏時に活性化

する。その標的遺伝子の一つとして生活習慣病を改善する報告のある FGF21 を上昇させる。また、血中脂質の低下に寄与する PPARα と相互に作用し、その効果を増大する。これら効果により CREBH は生活習慣病を改善することを見出した。FGF21 を標的とした生活習慣病治療薬の開発がすでに行われており、CREBH を起点とした治療薬への応用が可能性を示す結果を得た。今後、CREBH を活性化させる因子を見つけることで生活習慣病の新たな治療戦略構築に貢献できると考える。



５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計１３件）

1. Naka A, Iida K, Nakagawa Y, Iwasaki H, Takeuchi Y, Satoh A, Matsuzaka T, Ishii KA, Kobayashi K, Yatoh S, Shimada M, Yahagi N, Suzuki H, Sone H, Yamada N, Shimano H. TFE3 inhibits myoblast differentiation in C2C12 cells via down-regulating gene expression of myogenin. Biochem Biophys Res Commun. 2013 in press 査読有
2. Matsuzaka T, Atsumi A, Matsumori R, Nie T, Shinozaki H, Suzuki-Kemuriyama N, Kuba M, Nakagawa Y, Ishii K, Shimada M, Kobayashi K, Yatoh S, Takahashi A, Takekoshi K, Sone H, Yahagi N, Suzuki H, Murata S, Nakamuta M, Yamada N, Shimano H. Elovl6 promotes nonalcoholic steatohepatitis in mice and humans. Hepatology 2013 in press 査読有
3. Fujimoto Y, Nakagawa Y, Shingyouchi A, Tokushige N, Nakanishi N, Satoh A, Matsuzaka T, Ishii KA, Iwasaki H, Kobayashi K, Yatoh S, Suzuki H, Yahagi N, Urayama O, Yamada N, Shimano H. Dicer has a crucial role in the early stage of adipocyte differentiation, but not in lipid synthesis, in 3T3-L1 cells. Biochem Biophys Res Commun. 2012 ;420(4):931-6. 査読有
4. Iwasaki H, Naka A, Iida K, Nakagawa Y, Matsuzaka T, Ishii KA, Kobayashi K, Takahashi A, Yatoh S, Yahagi N, Sone H, Suzuki H, Yamada N, Shimano H. TFE3 Regulates Muscle Metabolic Gene Expression, Increases Glycogen Stores, and Enhances Insulin Sensitivity in Mice. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2012 ;302(7):E896-902 査読有
5. Kumadaki S, Karasawa T, Matsuzaka T, Ema M, Nakagawa Y, Nakakuki M, Saito R, Yahagi N, Iwasaki H, Sone H, Takekoshi K, Yatoh S, Kobayashi K, Takahashi A, Suzuki H, Takahashi S, Yamada N, Shimano H. Inhibition of ubiquitin ligase F-box and WD repeat domain-containing 7α (Fbw7α) causes hepatosteatosis through Krüppel-like factor 5 (KLF5)/peroxisome proliferator-activated receptor γ2 (PPARγ2) pathway but not SREBP-1c protein in mice. J Biol Chem. 2011 ;286(47):40835-46.7.215. 査読有
6. Saito R, Matsuzaka T, Karasawa T, Sekiya M, Okada N, Igarashi M, Matsumori R, Ishii K, Nakagawa Y, Iwasaki H, Kobayashi K, Yatoh S, Takahashi A, Sone H, Suzuki H, Yahagi N, Yamada N, Shimano H. Macrophage Elovl6 deficiency ameliorates foam cell formation and reduces atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011 ;31(9):1973-9. 査読有
7. Karasawa T, Takahashi A, Saito R, Sekiya M, Igarashi M, Iwasaki H, Miyahara S, Koyasu S, Nakagawa Y, Ishii K, Matsuzaka T, Kobayashi K, Yahagi N, Takekoshi K, Sone H, Yatoh S, Suzuki H, Yamada N, Shimano H. Sterol regulatory element-binding protein-1 determines plasma remnant lipoproteins and accelerates atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011 ;31(8):1788-95. 査読有
8. Yamamoto T, Watanabe K, Inoue N, Nakagawa Y, Ishigaki N, Matsuzaka T, Takeuchi Y, Kobayashi K, Yatoh S, Takahashi A, Suzuki H, Yahagi N, Gotoda T, Yamada N, Shimano H. Protein kinase Cbeta mediates hepatic induction of sterol regulatory element-binding protein-1c by insulin. J Lipid Res.

2010 :51(7):1859-70. 査読有
9. Takeuchi Y, Yahagi N, Izumida Y, Nishi M, Kubota M, Teraoka Y, Yamamoto T, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Sekiya M, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga JI, Gotoda T, Ishibashi S, Itaka K, Kataoka K, Nagai R, Yamada N, Kadowaki T, Shimano H. Polyunsaturated fatty acids selectively suppress sterol regulatory element-binding protein-1 through proteolytic processing and autoloop regulatory circuit. J Biol Chem. 2010 ;285(15):11681-91. 査読有
10. Danno H, Ishii KA, Nakagawa Y, Mikami M, Yamamoto T, Yabe S, Furusawa M, Kumadaki S, Watanabe K, Shimizu H, Matsuzaka T, Kobayashi K, Takahashi A, Yatoh S, Suzuki H, Yamada N, Shimano H. The liver-enriched transcription factor CREBH is nutritionally regulated and activated by fatty acids and PPARalpha. Biochem Biophys Res Commun. 2010 ;391(2):1222-7. 査読有

〔学会発表〕（計７件）
1. 中川　嘉、島野　仁　糖・脂質代謝調節における絶食応答転写因子 CREBH の機能　第 56 回日本糖尿病学会　2013 年 5 月 17 日　熊本　シンポジウム
2. 中川　嘉、佐藤　葵、松坂　賢、岩崎　仁、小林　和人、矢藤　繁、嶋田　昌子、矢作　直也、山田　信博、鈴木　浩明、島野　仁　糖・脂質代謝調節における CREBH-PPARa 相互作用の解明　2013 年 5 月 16 日　熊本
3. 中川　嘉、山田　信博、　CREBH によるエネルギー代謝調節機構と生活習慣病に対する機能の解明　第 32 回日本肥満学会　2011 年 9 月 23 日　淡路島
4. 三上 素樹，中川 嘉，徳重 直子，新行内 晶子，木綿 梢里，藤本 ゆり，佐藤 葵，松坂 賢，石井 清朗，山田 信博，島野 仁 The liver-enriched transcription factor CREBH is nutritionally regulated and activated by fatty acids and PPARa in vitro and in vivo. BMB2010 第 33 回日本分子生物学会年会第 83 回日本生化学会大会合同大会　2010 年 12 月 9 日　神戸
5. 徳重 直子，中川 嘉，三上 素樹，新行内 晶子，藤本 ゆり，木綿 梢里，佐藤 葵，松坂 賢，石井 清朗、山田 信博，島野 仁 生活習慣病における脂質代謝制御因子 CREBH の機能解析　BMB2010 第 33 回日本分子生物学会年会第 83 回日本生化学会大会合同大会　2010 年 12 月 10 日　神戸
6. 藤本 ゆり，中川 嘉，徳重 直子，三上 素樹，新行内 晶子，木綿 梢里，佐藤 葵，松坂 賢，石井 清朗，山田 信博，島野 仁 肥満病態モデルマウスにおける糖・脂質代謝制御因子 CREBH の影響　BMB2010 第 33 回日本分子生物学会年会第 83 回日本生化学会大会合同大会　2010 年 12 月 10 日　神戸
7. Yoshimi Nakagawa, Motoki Mikami, Akiko Shingyouuchi, Naoko Tokushige, Nobuhiro Yamada, Hitoshi Shimano CREBH is the new regulator of hepatic gene expression in fasted state 第 42 回日本動脈硬化学会総会・学術集会　2010 年 7 月 15 日　岐阜

〔図書〕（計２件）
1. 中川　嘉、菊池　琢哉、島野　仁　FGF21 と糖代謝　Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌 2013　20-27, 2013/01　中外医学社
2. 中川　嘉、島野　仁　絶食時の肝における遺伝子発現応答（第１土曜特集 エネルギー代謝転写因子ネットワークと生活習慣病）--（臓器・疾患別にみた転写因子の展開）The hepatic homeostasis by transcription factors in fasted condition　医学のあゆみ 237(6) 661-665 2011/5/7　医歯薬出版

〔その他〕
筑波大学　医学医療系　内分泌代謝・糖尿病内科
http://www.u-tsukuba-endocrinology.jp/

６．研究組織
(1)研究代表者
中川　嘉（NAKAGAWA YOSHIMI）
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：80361351

(2)研究分担者
島野　仁（SHIMANO HITOSHI）
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：20251241

松坂　賢（MATSUZAKA TAKASHI）
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：70400679

石井　清朗（ISHII KIYOAKI）
筑波大学・医学医療系・助教
研究者番号：80419150　（H22→H23）