

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 8 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25282214

研究課題名(和文) 絶食時栄養制御因子 CREBH が腸肝循環を介し肥満形成を抑制するメカニズム

研究課題名(英文) Fasting-induced transcription factor CREBH ameliorates obesity via entero-hepatic circulation

研究代表者

中川 嘉 (Nakagawa, Yoshimi)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・准教授

研究者番号：80361351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：CREBHは肝臓、小腸にのみ発現する転写因子である。我々は肝臓特異的CREBH Tgマウスを作成した。このマウスは肥満誘導性食を負荷しても肥満、糖尿病の発症を抑制した。その分子メカニズムとしてCREBHはPPAR との相互作用によってFGF21発現を制御していることにあった。動脈硬化に関してはCREBH Tgマウスで改善し、CREBH KOマウスは悪化した。非アルコール性脂肪肝の発症についてはCREBH KOマウスで病態を悪化させた。CRISPR/Cas9システムによりCREBH組織特異的KOマウスを作成し、肝臓CREBHが非アルコール性脂肪肝の原因であることを見出した。

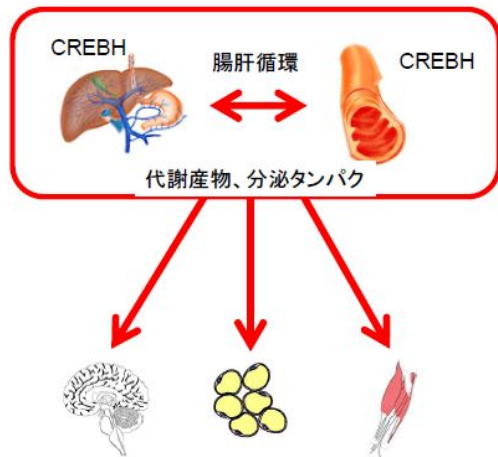
研究成果の概要(英文)：CREBH is a transcription factor, which is expressed in liver and intestine. Liver-specific CREBH Tg mice were generated, which suppressed diet-induced obesity and diabetes. CREBH and PPAR synergistically regulated hepatic FGF21 expression. CREBH KO mice showed atherosclerosis and non-alcoholic fatty liver disease. Conversely, CREBH Tg suppressed atherosclerosis. Using CRISPR/Cas9 system, we firstly generated liver-specific CREBH knockout mice, which exhibited non-alcoholic fatty liver disease, suggesting that liver CREBH, but not intestine CREBH, is important for the pathology of non-alcoholic fatty liver disease

研究分野：栄養学

キーワード：生活習慣病 CREBH ゲノム編集 肥満 糖尿病

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ができない。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。そのための治療標的遺伝子の特定とその活性制御機構の解明が必要となっている。また、生活習慣病の治療を目指す上で単一の組織での機能を評価するだけでは不十分であり、組織間の連携を視野に解析を行う必要がある。CREBH は当初、肝臓での機能が重要とされていた。しかし、その発現は肝臓の他に腸管にもある。腸と肝臓は脂質・コレステロール代謝を調節する重要な組織連関であり、これら組織でのみ発現する転写因子 CREBH の機能を組織連関の視点から解析することで新たな代謝調節機構が解明できる。



2. 研究の目的

生活習慣病における脂質代謝異常は病態形成において重要な位置にある。我々は強力に脂質低下作用を有する新たな転写因子間相互作用として CREBH-PPAR α によるオートループ機構を見出している。その効果により CREBH 過剰発現マウスは食事負荷による生活習慣病病態の形成を抑制する結果を得ている。当初、CREBH による効果は肝臓での効果のみであると想定していたが、CREBH は腸管にも発現していることから、肝臓 腸管における組織連関からの視点で新たに解析を進める。CREBH は腸管での食事成分の吸収の段階から肝臓、体内全体の代謝性物質を調節し、エネルギー代謝を調節す

るメカニズムを想定している。腸管、肝臓それぞれの CREBH の機能を解明し食事成分吸収から始まる組織連関を通し生活習慣病の改善のメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

【CREBH の機能増強に機能する転写活性化分子の同定】

CREBH の活性を増強、抑制する因子(転写因子、共役因子)を同定する。核内受容体・転写因子発現ライブラリーを構築しており、それを用い CREBH 活性化をモニターするアッセイから同定を試みる。この系を使い活性化因子の同定を行っており、この実験系を熟知している(Nakagawa Nature Medicine 2006)。また、活性化させるリガンド・薬剤の探索を行う。シグナル伝達の活性化薬剤に対する応答性も CREBH の活性モニターアッセイで検討する。薬剤に対する応答性からも機能を増強する因子の探索を行う。2つの方向からの探索で新たな活性制御因子の同定が可能である。

【CREBH, PPAR α に関わる因子の相互作用の解析】

CREBH は Crtc2, ATF6(Zhang Cell 2006, Lee Cell Metab. 2007)、PPAR α は RXR α や PGC-1 α などの転写因子や共役因子との相互作用が報告されている。CREBH-PPAR α の相互作用にこれらを含めた様々な因子がどのように作用しているかを、ルシフェラーゼアッセイ、two hybrid、免疫沈降などを用い細胞レベルでの結合実験を行う。さらに、マウス肝臓においても免疫沈降で結合の有無を検討する。また、その際、様々な栄養条件下での結合する分子の種類、強弱を比較し、標的遺伝子の発現への影響を検討する。

【CREBH の標的遺伝子の特定】

CREBH の遺伝子改変マウス(過剰発現、ノックアウトマウス)でマイクロアレイ解析を行い、網羅的な解析から候補を抽出する。多くのアレイ解析を行ってきており解析は問題ない。アレイ解析での解析では直接的な標的遺伝子を特定することはできない。そこで、マウスを用いた ChIP-sequence を行う。人工抗原を CREBH に結合したアデノウイルスを作製する。ChIP assay では抗体の質が実験を左右するため、人工的な抗原に対する抗体を使うことで確実に ChIP assay を行えるようにする。ChIP-sequence の解析では共同研究で連携し解析を行う。

【新たな遺伝子組み換え法を用いた組織特異的ノックアウトマウスの作成法の確立】

従来の組織特異的なノックアウトマウスの作成では Cre-LoxP システムを用い、多くのステップを経て長時間を要していた。そこで本申請では新たな手法として Precision TALs を用いる。Fok1 ヌクレアーゼと

Precision TALs の融合タンパク質を用い、特定のゲノム配列において、DNA の二重鎖を切断する。このメカニズムを利用することで、RNAi ではないサイレンシングが可能になる。このシステムを使い組織特異的に CREBH ノックアウトしたマウスを作製する。RNAi を使った組織特異的ノックアウトマウスの作成系は確立できておらず、新たなノックアウトマウス構築系として本研究での確立を目指す。CREBH は肝臓、腸管の 2 つの組織で主に発現しているため、機能の責任組織を特定するためにも、肝臓、腸管のそれぞれのノックアウトマウスを作製し、CREBH の組織特異的な機能の解析を行う必要がある。

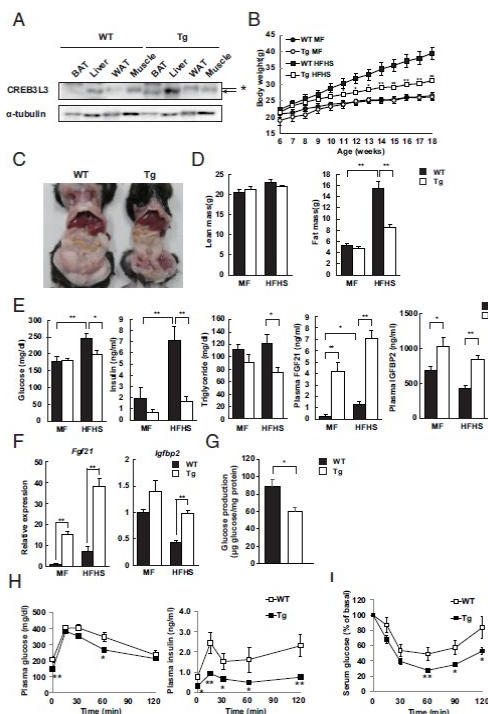
【食事、栄養状態における変化の解析】

遺伝子改変マウス、アデノウイルスといった解析での結果を踏まえ、病態形成における役割を確認していく。マウスへの高脂肪高シヨ糖食の負荷は肥満、インスリン抵抗性を惹起する。食事の変化、脂質異常症、糖尿病といった生活習慣病の形成過程において CREBH 活性制御機構の破綻が病態形成にどのくらい影響するか、また、活性の変化には分子間のネットワークのどの部分の破綻が原因になっているのかを検証する。

また、動脈硬化誘発食ではコレステロール代謝を中心に解析するモデルである。CREBH が腸肝循環に重要な機能を有しているのであれば、動脈硬化発症に何らかの影響を及ぼすことが考えられる。CREBH トランスジェニックマウス、ノックアウトマウスを用い動脈硬化発症について検討を行う。

4. 研究成果

CREBH は、強力に血糖値、インスリン値とともに血中脂質を低下させる。この要因と



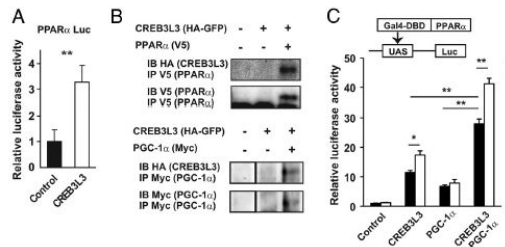
して、CREBH が肝臓で生活習慣病改善因子 FGF21 の発現を上昇させることにあることを見出している。FGF21 は PPARα により発現が制御され生活習慣病を改善する機能を有することが報告されている (Dutchak PA Cell 2012)。また、肝臓で産生された FGF21 は脂肪組織に作用し脂肪分解を促進させ肥満を予防する (Chau MD PNAS 2010)。これら効果は CREBH でも確認しており、CREBH トランスジェニック (Tg) マウスに食事性肥満を誘発させても肥満を呈さない結果をすでに得ている。

特に白色脂肪組織の重量の低下が著しかった。高脂肪・高シヨ糖食による血糖値、血中インスリン値、血中トリグリセライド値の上昇が抑制された。その際、生活習慣病の改善に機能するホルモン FGF21、IGFBP2 が肝臓で発現上昇、血中レベルでの上昇が見られた。グルコース負荷試験、インスリン負荷試験で Tg マウスの感受性の増強が見られた。

CREBH 過剰発現マウスでは酸素消費量の増加が観察されており、白色脂肪組織、褐色脂肪組織での脂肪酸酸化能にかかわる遺伝子発現の上昇が見られており、それら変化が酸素消費量の増加を導いたと考えられた。これは肝臓から分泌された FGF21 に起因していると考えられた。

FGF21 の発現制御は PPARα により制御されることが報告されている。しかし、CREBH は直接、FGF21 のプロモーター上に結合し、発現を上昇させる結果を得た。また、CREBH は PPARα と物理的な結合があり、その結合が FGF21 の発現を協調的に制御することを見出した。

2 つの因子 PPARα と CREBH の間ではオートループ活性化機構が形成されており、FGF21 のみならず、PPARα、CREBH、それぞれの標的遺伝子の発現を制御し、糖・脂質代謝を調節することを見出した (Nakagawa 2014 *Endocrinology*)。



動脈硬化形成における CREBH の効果

CREBH Tg マウスおよび CREBH KO マウスと動脈硬化モデルマウス (LDLR KO マウス) と交配した。CREBH KO/LDLR KO マウスは早期に動脈硬化を発症したのに対し、CREBH Tg/LDLR KO マウスでは動脈硬化形成の抑制を示した。

現在、そのメカニズムについて解析中である。

非アルコール性脂肪肝における CREBH の効果

CREBH KO マウスにメチオニン・コリン欠損(MCD)食を負荷した。WT マウスと比較し、血中 ALT、AST を評価したところ、早期に肝障害を呈した。肝臓組織標本からも異常な脂質蓄積、マクロファージの浸潤、線維化が CREBH KO マウスで観察された。

現在、その分子メカニズムを解析している。肝臓、小腸のどちらの CREBH が病態形成に寄与しているかを検討するため、下記の組織特異的な CREBH KO マウスを作成した。

CRISPR/Cas9 による遺伝子改変マウスの作成

CRISPR/Cas9 を使って遺伝子改変マウスを作成する技術が近年使われ始めた。我々は組織特異的な CREBH ノックアウトマウスを作成するため、CRISPR/Cas9 システムを用い、CREBH flox マウスを作成した。

1 度に 2 つの loxP site をゲノムに挿入した例は過去に 1 報報告があるが、実際に、組織特異的 KO マウスの作成例はなかった。我々は受精卵に CRISPR/Cas9 に必要なベクターおよび DNA 断片を挿入し、20 匹のマウスを得た。このうち、1 匹が loxP site を 2 個持つマウスであった。このマウスに組織特異的 Cre Tg マウスと交配し、組織特異的な CREBH KO マウスを作成した(Nakagawa *Scientific Reports* in press)。

Injected embryos	Transferred embryos (%)	Pups delivered (%)	Indel (%)
277	239 (86)	20 (7)	1 (0.4)

CREBH 肝臓特異的 KO マウスは脂肪肝を発症する

作成した肝臓特異的 CREBH KO(LKO)マウスは全身で CREBH を欠損した(CREBH KO)マウスとは異なる血中脂質の変化を起こした。CREBH KO では血中トリグリセライドの上昇、コレステロールの低下を示したのに対し、LKO マウスではトリグリセライド、コレステロールの両方で上昇を示した。LKO ではコレステロール合成系遺伝子の発現を統括する転写因子 SREBP-2 の発現を始めに、その下流遺伝子の発現も上昇しておりこれはコレステロール上昇の原因として考えられた。

血中脂質の上昇が非アルコール性脂肪肝と関連があると想定し、メチオニン・コリン欠損食により生じる脂肪肝を発症するモデルでの CREBH の機能を検証した。LKO マウスでは正常マウスと比較し、早期に肝障害を生じる結果を得た。炎症系の遺伝子発現の上昇が原因にあり、血中の肝障害マーカー ALT、AST が早期に急激に上昇した。肝臓の病理所見も炎症、繊維化の所見を観察した(Nakagawa *Scientific Reports* in press)。

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 11 件)

1. Nakagawa Y, Oikawa F, Mizuno S, Ohno H, Yagishita Y, Satoh A, Osaki Y, Takei K, Kikuchi K, Han SI, Matsuzaka T, Iwasaki H, Kobayashi K, Yatoh S, Yahagi N, Suzuki H, Sone H, Takahashi S, Yamada N, Shimano H. Hyperlipidemia and hepatitis in liver-specific CREB3L3 knockout mice generated using a one-step CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep.* in press
2. Kuba M, Matsuzaka T, Matsumori R, Kuba M, Kaga N, Taka H, Ikehata K, Okada N, Kikuchi T, Ohno H, Han SI, Takeuchi Y, Kobayashi K, Iwasaki H, Yatoh S, Suzuki H, Sone H, Yahagi N, Arakawa Y, Fujimura T, Nakagawa Y, Yamada N, Shimano H. Absence of Elovl6 attenuates steatohepatitis but promotes gallstone formation in a lithogenic diet-fed Ldlr^{-/-} mouse model. *Sci Rep.* 2015;5:17604
3. Ehara T, Kamei Y, Yuan X, Takahashi M, Kanai S, Tsujimoto K, Tamiya T, Nakagawa Y, Shimano H, Takai-Igarashi T, Hatada I, Suganami T, Hashimoto K, Ogawa Y. Ligand-activated PPAR α -dependent DNA Demethylation Regulates the Fatty Acid β -oxidation Genes in the Postnatal Liver *Diabetes* 2015 64(3):775-84
4. 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, Shimano H. Hepatic CREB3L3 controls whole-body energy homeostasis and improves obesity and diabetes *Endocrinology* 2014 155(12):4706-4719.
5. Izumida Y, Yahagi N, Takeuchi Y, Nishi M, Shikama A, Takarada A, Masuda Y, Kubota M, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Iizuka Y, Itaka K, Kataoka K, Shioda S, Nijijima A, Yamada T, Katagiri H, Nagai R, Yamada N, Kadowaki T, Shimano H. Glycogen shortage during fasting triggers liver-brain-adipose neurocircuitry to facilitate fat utilization. *Nature Communications* 2013 4:2316
6. Fujimoto Y, Nakagawa Y, Satoh A, Okuda K, Shingyouchi A, Naka A,

Matsuzaka T, Iwasaki H, Kobayashi K, Yahagi N, Shimada M, Yatoh S, Suzuki H, Yogosawa S, Izumi T, Sone H, Urayama O, Yamada N, Shimano H TFE3 controls lipid metabolism in adipose tissue of male mice by suppressing lipolysis and thermogenesis. *Endocrinology* 2013 154(10):3577-3588.

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 中川 嘉、柳下 友香、佐藤 葵、田中 杏奈、松坂 賢、山田 信博、島野 仁 CREB3L3 - FGF21による脂質代謝調節と動脈硬化形成のメカニズム 第 43 回内分泌代謝研究会 2015 年 10 月 17 日 東京
2. 中川 嘉、佐藤 葵、大崎 芳典、松坂 賢、山田 信博、島野 仁 ケトン食摂取時のエネルギー代謝に関わる新たな遺伝子発現調節機構 第 36 回日本肥満学会 2015 年 10 月 2 日 名古屋
3. Yoshimi Nakagawa, Hitoshi Shimano CREB3L3 regulates energy metabolism in enterohepatic circulation 第 47 回日本動脈硬化学会総会 2015 年 7 月 10 日 仙台
4. 中川 嘉、佐藤 葵、大崎 芳典、松坂 賢、山田 信博、島野 仁 転写因子 CREB3L3 による絶食時エネルギー代謝調節機構 第 52 回日本臨床分子医学会学術集会 2015 年 4 月 10 日 京都
5. 中川 嘉、奥田 佳菜子、八木 豊美、折原 佳奈、佐藤 葵、及川 総香、松坂 賢、嶋田 昌子、岩崎 仁、小林 和人、矢藤 繁、矢作 直也、鈴木 浩明、山田 信博、島野 仁 転写因子 CREBH による動脈硬化発症進展における役割 第 68 回日本栄養・食糧学会大会 2014 年 5 月 31 日 札幌
6. 中川 嘉、奥田 佳菜子、八木 豊美、折原 佳奈、佐藤 葵、及川 総香、松坂 賢、嶋田 昌子、岩崎 仁、小林 和人、高橋 昭光、矢藤 繁、矢作 直也、鈴木 浩明、山田 信博、島野 仁 転

写因子 CREBH の動脈硬化発症進展における役割 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会 2014 年 5 月 24 日 大阪

7. 中川 嘉 転写因子 CREBH による肝臓を起点としたエネルギー代謝変化のメカニズム 第 43 回日本栄養・食糧学会北海道支部会 2013 年 10 月 26 日 札幌
8. 中川 嘉、島野 仁 FGF21 を介した転写因子 CREBH によるエネルギー代謝調節機構 第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 12 日 横浜
9. 中川 嘉、島野 仁 糖・脂質代謝調節における PPAR α -CREBH の相互作用の解明 第 67 回日本栄養・食糧学会大会 2013 年 5 月 25 日 名古屋
10. 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
11. 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-PPAR α 相互作用の解明 第 56 回日本糖尿病学会 2013 年 5 月 16 日 熊本

〔図書〕(計 4 件)

1. 中川 嘉 肝臓 CREB3L3 による全身性の代謝調節による糖尿病・肥満の改善機構 月刊 細胞 Vol. 47 No. 10 29-33 2015 (株)ニューロサイエンス社
2. 中川 嘉、島野 仁 肥満 2 型糖尿病の分子メカニズム 2. 肝臓 The Lipid Vol. 26 No. 2 24-31 2015-4 メディカルレビュー社
3. 中川 嘉、島野 仁 骨格筋の脂質代謝調節 実験医学 Vol. 32 No. 9 1340-1345 2014 羊土社
4. 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

〔その他〕
ホームページ等
筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構
<http://wpi-iis.tsukuba.ac.jp/japanese/>

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 (Yoshimi Nakagawa)
筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・
准教授
研究者番号： 80361351

(2) 研究分担者

島野 仁 (Hitoshi Shimano)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号： 20251241

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