

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22794

研究課題名（和文）組織特異的KOマウスを用いたSREBP-1aの小腸恒常性維持に対する機能解析

研究課題名（英文）The effects of SREBP-1a on intestine homeostasis are determined using intestine- or macrophage- specific SREBP-1a KO mice

研究代表者

中川 嘉（Nakagawa, Yoshimi）

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授

研究者番号：80361351

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：SREBP-1aの欠損(KO)マウスおよびfloxマウスを作成した。SREBP-1a KOマウスでは小腸絨毛部分が短く、小腸全体の長さも短くなった。小腸内細胞の細胞増殖は抑制された。小腸での遺伝子発現では脂肪酸不飽和化・伸長酵素の発現が抑制され、オレイン酸、パルミトレイン酸が減少した。SREBP-1a KOマウスに脂肪酸を投与すると小腸構造の回復が見られた。小腸オルガノイド培養でもSREBP-1a欠損で成長が遅延した。オレイン酸、パルミトレイン酸を添加することで成長は回復した。SREBP-1aが脂肪酸合成を制御し、小腸の構造維持に重要であることを初めて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SREBP-1aはSREBPファミリーの中でも生理的機能はあまりないと想定され、解析が進んでいなかった。それゆえ、遺伝子改変マウスの作製も遅れており、全身KOマウスおよび組織特異的KOマウスは存在していなかった。本研究で初めて全身KOおよびfloxマウスを作製したことの学術的意義は大きい。さらにSREBP-1a KOマウスでの小腸構造異常が見られることは脂質代謝が小腸構造の維持に必要であり、栄養代謝を調節する新たな知見を示した。新たな生活習慣病治療戦略の開発へ繋がる社会的な意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：We generated SREBP-1a deficient (KO) and flox mice. In this mouse, the structure of the small intestine was abnormal, the villi were short, and the length of the entire small intestine was also shortened. Cell proliferation of cells in the small intestine was suppressed. In gene expression in the small intestine, the expression of fatty acid desaturation / elongation enzyme was suppressed, and oleic acid and palmitoleic acid were decreased. Fatty acid administration to SREBP-1a KO mice showed recovery of small intestinal structure. Growth was delayed due to SREBP-1a deficiency even in small intestinal organoid culture. Growth was restored by adding oleic acid and/or palmitoleic acid. We revealed that SREBP-1a has a crucial role in maintaining the structure of the small intestine.

研究分野：応用健康科学

キーワード：SREBP-1a 脂肪酸合成 小腸構造 小腸の発生・分化

1. 研究開始当初の背景

SREBP は脂質合成に関わる酵素群の発現を制御し、脂質合成を促進させる。SREBP には 3 つのアイソタイプがある。SREBP-1c は脂肪酸合成に関わる酵素群、SREBP-2 はコレステロール合成に関わる酵素群の遺伝子発現を制御する。SREBP-1a は脂肪酸とコレステロールの両方を制御し、転写活性化能も SREBP-1c と比較し、強力である。我々グループでは最初に SREBP-1a, 1c, 2 の肝臓特異的過剰発現マウス(Shimano JCI 1996, Shimano JCI 1997, Horton JCI 1998) および SREBP-1a, 1c がともにノックアウトされた SREBP-1 KO マウス(Shimano JCI 1997)を作成した。最近、SREBP-1 KO マウスの解析からマクロファージの炎症の収束因子として SREBP-1 が機能することを報告した(Oishi Cell Metab. 2017)。それ以来、炎症と SREBP-1 を解析するグループより、マウス譲渡依頼が殺到している。しかしながら、SREBP-1a, 1c、どちらの機能が大事なのかは分かっていない。そのため、SREBP-1a と 1c の機能の違いを明確にする必要がある。一方、小腸は代謝の面では解析が不十分である組織であるため、その重要性は多い。さらに、免疫・炎症、栄養代謝、細胞増殖が複雑に絡み合う組織である。SREBP-1a は細胞周期、細胞増殖に作用し、細胞増殖が活発な臓器での発現が高い(Nakakuki FEBS J 2007)。

小腸における SREBP の機能については、SREBP の活性の律速酵素である SCAP のノックアウトマウスで解析が行われている。小腸特異的 SCAP KO マウスは小腸の全長が短く、絨毛/陰窩部分が短くなる。小腸での SREBP の標的遺伝子はすべて抑制される。小腸からのコレステロール吸収が抑制されることが原因で、小腸の形成が抑制される(McFarlane JLR 2015)。SREBP-2 の組織特異的 KO マウスでは逆に小腸全長が長く、絨毛部分が長くなる。小腸オルガノイド形成は KO マウスで抑制されるが、コレステロールの補充でリカバーでき、コレステロールが小腸構造維持に重要であることが示されている(Rong JLR 2017)。しかしながら、SREBP-1a についての報告はない。小腸は細胞増殖が盛んな組織の一つであり、SREBP-1a の発現が高い組織でもあり、SREBP-1a の機能を解析するのに適していると想定した。

2. 研究の目的

SREBP-1 は脂肪酸・コレステロール合成を促進する転写因子であり、SREBP-1 は同じ遺伝子から SREBP-1a と SREBP-1c が N 末端領域の一部のみが異なる 2 つのスプライシングバリエーションが作られる。我々はこの分子の生理的機能について解析を行ってきている。SREBP-1c は細胞内の脂質量に応じて、その発現が変動し栄養制御と密接に連携している。SREBP-1c は脂肪酸の合成を促進する。それに対し、SREBP-1a は栄養状態に応じた発現変動は弱く、栄養責任臓器における発現も多くはない。その反面、SREBP-1a は脂肪酸・コレステロール合成の両者の合成を促進させるだけでなく、細胞周期に対しても機能し細胞増殖を促進させることを明らかにしてきた。

本課題では現在まで世界で作成されていなかった各 SREBP-1 のバリエーション特異的、組織特異的ノックアウト(KO)マウスを初めて作成し、それら分子の機能を明らかにする。特に細胞増殖・分化が盛んな組織である小腸での機能に焦点を当てる。栄養吸収臓器である小腸を構成する腸管上皮は数日でほぼ全てが新しい細胞に置き換わる。それゆえ、細胞増殖における SREBP-1a の重要性が想定される。また、SREBP-1a はマクロファージをはじめとする免疫系の細胞にも非常に発現が多く、腸管免疫における機能への影響も想定される。小腸特異的のみならず、マクロファージ特異的に SREBP-1a を KO することで小腸の恒常性維持と栄養吸収の機能に対する影響、関係を解析する。さらに、SREBP-1a だけでなく SREBP-1c、SREBP-1a/1c についても同様に解析し、SREBP-1 のバリエーションの違い、発現場所の違いから小腸機能・構造への機能を明らかにする。本課題では SREBP-1 による小腸機能維持 栄養代謝の新たな概念を新規に作成した遺伝子改変マウスモデルで実証し、栄養代謝への新たな制御機構を提唱する。

3. 研究の方法

SREBP-1a の小腸内の発現部位の検討

SREBP-1a の発現部を特定するため、正常マウスの小腸を使い、in situ hybridization で評価した。SREBP-1a と SREBP-1c は Exon 1 が異なるため、SREBP-1a Exon 1a の領域をプローブとした。

SREBP-1 の組織特異的 KO マウスの作成

CRISPR/Cas9 システムを用い SREBP-1a の Exon 1 (Exon 1a)を 2 つの flox サイトで挟むコンストラクトを作製し、受精卵に遺伝子導入した。このコンストラクトが目的ゲノム上に挿入できた SREBP-1a flox マウスを作成した。また、この工程の中で SREBP-1a Exon 1a を欠損したマウスも同時に作成できた。このマウスは SREBP-1a を合成できなく、結果的に、SREBP-1a KO マウスが作成できた。

SREBP-1 遺伝子改変マウス的小腸構造の評価

様々な食事条件(絶食、通常摂食、絶食後無脂肪食再摂)における小腸の構造の変化を形態学的に評価した。

脂肪酸組成の変化

小腸陰窩部分を摘出し、脂肪酸組成を HPLC で解析した。

小腸の SREBP-1a に関連する遺伝子の発現解析

絶食および無脂肪食再摂食時に SREBP-1a KO マウスおよび正常マウスから小腸を摘出し、RNA を抽出し、リアルタイム PCR で遺伝子発現を検討した。

SREBP-1a の小腸発生、分化における機能に対する評価

小腸構造への影響の根源を調べるため、SREBP-1a KO マウスおよび正常マウスから小腸幹細胞を単離し、小腸初代培養(オルガノイド)を行い、成長、分化に対する影響を検討した。

4. 研究成果

SREBP-1 の発現部位

SREBP-1a が SREBP-1c よりも発現が高い組織は、小腸、マクロファージであり、その他の組織では SREBP-1c の発現が高かった。さらに、SREBP-1a の発現を小腸全体で *in situ hybridization* で検討した。SREBP-1a は小腸全体に発現し、その中でも陰窩に多く発現していた。

SREBP-1a 遺伝子改変マウスの作製

SREBP-1 は最初の Exon の違いによるスプライシング CRISPR/Cas9 システムを用い、SREBP-1a flox マウスを作製した。また、SREBP-1a flox マウスを作製している中、SREBP-1a の Exon 1a を欠損したマウス(SREBP-1 KO)も作製した。SREBP-1a flox マウスは小腸特異的 Cre Tg マウスと交配し、SREBP-1a 小腸特異的 KO (I-KO)マウスを作製した。

SREBP-1a KO マウスの小腸構造

SREBP-1a KO マウスの小腸構造を評価したところ、通常摂食時には正常(WT)マウスと比べ、変化はなかった。しかしながら、絶食時および絶食後無脂肪食を負荷した際には絨毛部分の長さが短くなった。絶食、絨毛は短くなるが、さらに SREBP-1a KO マウスでは短くなった。絶食後に無脂肪食で再摂食させると WT マウスでは絶食により短くなったものが、長くなる。しかしながら、SREBP-1a KO マウスではその変化が見られなかった。

その際の陰窩部分に存在する腸管幹細胞の数をマーカー遺伝子である Olf4 の免疫染色で評価した。SREBP-1a KO マウスでは腸管幹細胞の数が絶食時、無脂肪食の再摂食時の両方で正常マウスに比べ、減少していた。また、陰窩での細胞の増殖について PCNA で評価したが、これも SREBP-1a KO マウスで低下した。BrdU でも細胞増殖を評価したところ、幹細胞以外の細胞でも SREBP-1a KO マウスでは増殖が抑制されていた。

SREBP-1a KO マウスの小腸での遺伝子発現変化

SREBP-1a と SREBP-1c は脂肪酸合成に関する遺伝子発現を上昇させることが知られている。SREBP-1a KO マウスの小腸では SREBP-1c が絶食時に発現が顕著に上昇したが、無脂肪食再摂食時は上昇傾向にあった。SREBP-1a/c の標的遺伝子であり、脂肪酸不飽和化・伸長酵素 Scd-1、Elovl6 が無脂肪食再摂食時に検知な低下を示した。SREBP-1c よりも SREBP-1a が小腸ではこれら遺伝子の発現制御に影響することが明らかになった。絶食時には明らかな変化はなかった。陰窩部分の脂肪酸組成を検討したところ、Scd-1、Elovl6 の発現が低下した際に生じるオレイン酸、パルミトレイン酸の低下が確認できた。

脂肪酸の補填による SREBP-1a KO マウスの小腸構造への影響

無脂肪食再摂食時に脂肪酸の補充として大豆油の添加とコレステロールの添加を行い、SREBP-1a KO マウスで見られる小腸絨毛が短くなる現象をリカバーできるかを評価した。大豆油は SREBP-1a の小腸構造を改善させたが、コレステロールの添加では逆に構造の崩壊が起きた。Olf4 の免疫染色、細胞増殖能の評価でも、大豆油添加で SREBP-1a KO マウスの移譲は改善した。

小腸オルガノイド形成に対する脂肪酸の影響

小腸オルガノイド培養にオレイン酸、パルミトレイン酸を添加し、SREBP-1a KO マウスで見られるオルガノイド成長の異常が改善できるかを評価した。オレイン酸では多くのオルガノイドが死ぬが、成長できたオルガノイドは正常に近い形態を作った。パルミトレイン酸は増殖は回復できたが、成長、分化は回復できなかった。両脂肪酸を添加すると増殖、成長の両者を回復させた。SREBP-1a は Scd-1、Elovl6 の発現を制御し、オレイン酸、パルミトレイン酸の供給を制御し、小腸構成細胞の増殖、分化を司る機能を有することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------