

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26500001

研究課題名(和文) 脂質代謝と小胞体ストレスをつなぐCREBHの非アルコール性脂肪肝発症における役割

研究課題名(英文) The roles of CREBH in non-alcoholic fatty liver

研究代表者

小林 和人 (KOBAYASHI, Kazuto)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：30455935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本課題ではCREBHが生活習慣病、特に非アルコール性脂肪肝の発症・進展にどのように関わっているかを検討した。CRISPR/Cas9システムを用いたCREBH肝臓特異的KO(LKO)マウスの作成に成功した。このマウスは絶食時に血中脂質の明らかな上昇を呈した。その原因の一つに脂肪酸・コレステロール合成の発現を支配する転写因子SREBPの上昇にあることを明らかにした。非アルコール性脂肪肝のモデルであるメチオニン・コリン欠損食をLKOマウスに負荷すると早期に激しい肝障害を呈した。本課題では新たな遺伝子改変マウスの作成方法を確立し、CREBHの欠損が非アルコール性脂肪肝を誘発させることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined how CREBH is involved in lifestyle-related diseases, especially on the development and progression of nonalcoholic fatty liver. CREBH liver-specific KO (LKO) mouse using CRISPR/Cas9 system was successfully produced. The mouse exhibited a remarkable increase in blood lipids upon fasting. One of the causes is the increase of the transcription factor SREBPs which govern the expression of fatty acid and cholesterol synthesis genes. When LKO mice were fed with methionine choline deficient diet, which is a nonalcoholic fatty liver model, severe liver injury appeared in the early period. In this study, we have established a method for preparing new genetically modified mice, and clarified that deficiency of CREBH induces nonalcoholic fatty liver.

研究分野：応用健康科学

キーワード：非アルコール性脂肪肝 脂質代謝

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。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。

これまでの研究で CREBH が強力に血糖値、インスリン値とともに血中脂質を低下させることを見出した。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った。FGF21 は PPAR α 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 (Dutchak PA *Cell* 2012)。また、肝臓で産生された FGF21 は抹消組織で様々な生活習慣病改善作用を示し、白色脂肪組織では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 でも同様に確認している。

CREBH は過去の報告では小胞体ストレスによりその発現が誘導され、小胞体ストレスが起点となる炎症を増強することが知られている (Zhang K *Cell* 2006)。しかしながら、我々の解析では逆に小胞体ストレスにより CREBH の発現は低下し、小胞体ストレスを抑制

する機能を有する結果を得ている。

2. 研究の目的

CREBH は生活習慣病を改善する転写因子である。CREBH は小胞体ストレスにより活性化され、小胞体ストレスを活性化されることが報告されている。しかし、我々の解析ではむしろ小胞体ストレスを抑制する結果を得ている。小胞体ストレスは生活習慣病の様々な病態で活性化され病態形成の原因である。したがって、我々は CREBH が小胞体ストレスを抑制することで生活習慣病を改善すると想定している。

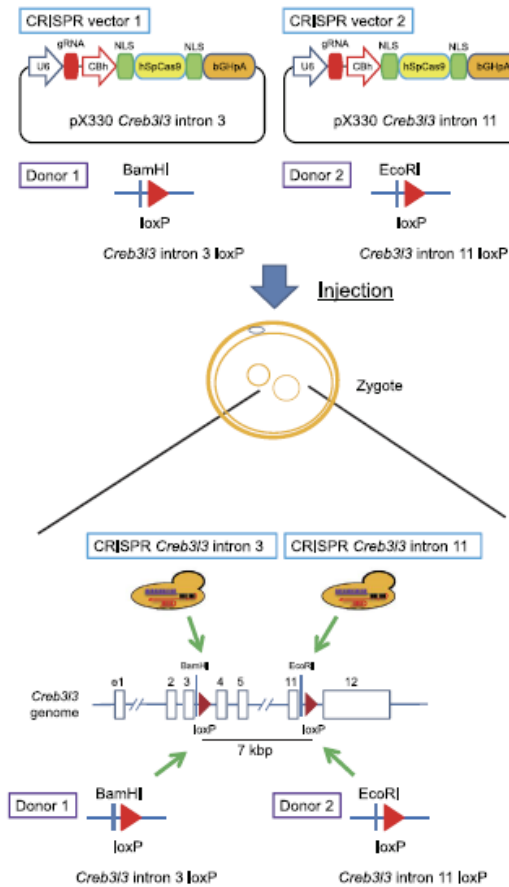
脂質代謝異常による病態の中でも CREBH の機能を明らかにする。非アルコール性脂肪肝のモデルであるマウスへのメチオニン・コリン欠損食 (MCD) の負荷について CREBH 遺伝子改変マウスを使用し解析を行う。非アルコール性脂肪肝は 3 人に 1 人の割合で発症する重大な病態である。

本課題では CREBH が脂質代謝の改善に寄与する点、小胞体ストレスを抑制する機能を有する可能性を考慮し、脂質代謝異常のモデルを用い、CREBH と小胞体ストレスの関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)【CRISPR/Cas9 システムによる組織特異的 CREBH KO マウスの作成】

CREBH は肝臓、腸管で発現しており、ノックアウトマウスは両方の組織で CREBH を欠損している。そのため、どちらの組織での機能が優位に機能するかがわからない。本課題で組織特異的なノックアウトマウスを作製した。CRISPR/Cas9 system をもちいることでマウスを作成した。pX330 に CREBH の Intron3、11 に対する CRISPR 切断配列をそれぞれ組み込み pX330 CREBH intron3、pX330 CREBH intron11 を作成した。CREBH intron3 および 11 に loxP 配列に組み込んだ DNA 断片を作成した。これら 2 つのベク



ターと2つのDNA断片を受精卵にインジェクションし、仮親に移植した。

277個の受精卵にインジェクションし、20匹の子マウスを得た。そのうちの1匹にloxP配列が挿入できた。

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

肝臓・腸管特異的 Cre マウスと得られた CREBH flox マウスと交配し、組織特異的ノックアウトマウスを作成した。

(2) 【トリグリセライド代謝の検討】

VLDL 産生能の検討のため、8週令マウスを18時間絶食後、LPL 阻害剤 Triton WR-1339 を尾静脈から投与し、経時的に血液を採取した。トリグリセライドクリアランスの評価のため、8週令マウスを24時間絶食し、オリーブオイルを経口投与し、経時的に血液を採取した。

(3) 【CREBH による脂肪肝への影響】

メチオニン・コリン欠損食(MCD)負荷によりマウスは脂肪肝とともに炎症、線維化などを示す。肝臓特異的 CREBH 遺伝子 KO マウスに負荷し、その変化を検討する。

脂肪肝の評価として HE 染色、線維化 Masson trichrome 染色で評価した。また、血液成分の変化、遺伝子発現の変化をリアルタイム PCR で評価した。

4. 研究成果

CREBH は肝臓と小腸に発現する転写因子であり、栄養代謝に関与することがこれまでの研究で明らかとなっている。肝臓と小腸に CREBH は発現することから組織特異的に CREBH を欠損するマウスを CRISPR/Cas9 system を用いて作成した。CRISPR/Cas9 システムを用い、マウス CREBH ゲノム上の intron3 と intron11 にの2か所に loxP 配列を1度に操作で挿入した。この方法での flox マウスは過去に1度報告がある。しかしながら、さらに得られたマウスと組織特異的 Cre Tg マウスを交配し、組織特異的 KO マウスを作成した例はわれわれが初めてであった。

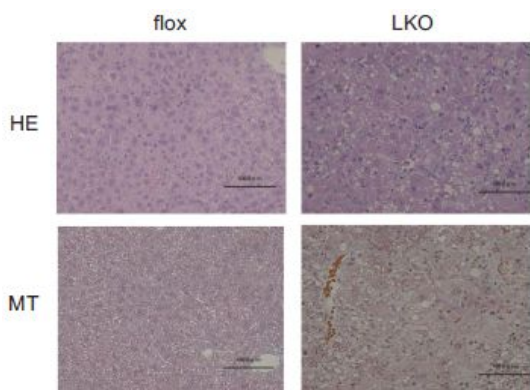
肝臓特異的 CREBH KO(LKO)マウスを作成し、そのフェノタイプを確認した。全身の KO マウスと同様に、血中トリグリセライドの顕著な増加を確認した。血中コレステロールは全身 KO マウスでは変化がなかったのに対し、LKO マウスでは有意な増加が観察された。

トリグリセライドの代謝について肝臓での VLDL 産生能、血中のトリグリセライドクリアランスを検討したところ、VLDL 産生能については正常マウス(WT)と違いがなかった。しかし、トリグリセライドクリアランスは明らかに LKO で低下していた。このことが LKO マウスでの血中トリグリセライド上昇の原因と考えられた。

肝臓における遺伝子発現検討では LPL 活性を制御するアポリポタンパクで LPL を活性化する ApoA4, ApoA5, ApoC2 の発現が LKO マウスで低下しており、この変化が LPL 活性を低下させ、血中トリグリセライドを上昇させたと考えられた。

すでに CREBH は PPARα と相互作用し、PPARα の標的遺伝子の発現を上昇させる報告がある。この報告のように LKO マウスでは PPARα およびその標的遺伝子である FGF21, Cpt-1a の発現が低下していた。PPARα 活性の低下は脂肪酸酸化能の低下を伴う。この変化も血中トリグリセライドを上昇させる要因である。逆に脂肪酸合成遺伝子 FAS の発現が絶食時には LKO で増加し、コレステロール合成酵素遺伝子 HMGCS1, HMGCR はその発現制御因子 SREBP とともに LKO で上昇していた。これらの変化も血中脂質の変化に寄与していると想定される。

LKO マウスにメチオニン・コリン欠損(MCD)食を負荷したところ、4 週間という短期間の負荷でも血中 ALT, AST の上昇など著しい肝障害を示した。肝臓組織標本からも明らかなマクロファージの浸潤、組織構造の崩壊、マッソントリクローム(MT)染色により繊維化



が観察された。遺伝子発現解析では炎症、繊維化のマーカー遺伝子 TGFβ, α-SMA, Col1a1 の発現が有意に上昇しており、この変化が肝障害、線維化に結びついていると想定された。

本課題では CRISPR/Cas9 システムをもちいることで効率的に組織特異的な KO マウスを作成できることを示した。CREBH を肝臓で欠損すると血中脂質が増加すること、CREBH は肝臓、小腸に発現するが、非アルコール性脂肪肝を誘発する MCD では早期に激しい肝所外を呈することを示した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Nakagawa Y, Oikawa F, Mizuno S, Ohno H, Yagishita Y, Satoh A, Osaki Y, Takei K, Kikuchi T, Han SI, Matsuzaka T, Iwasaki H, Kobayashi K, Yatoh S, Yahagi N, Isak M, 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.* 2016;6:27857. doi: 10.1038/srep27857. 査読有

Suzuki-Kemuriyama N, Matsuzaka T, Kuba M, Ohno H, Han SI, Takeuchi Y, Isaka M, Kobayashi K, Iwasaki H, Yatoh S, Suzuki H, Miyajima K, Nakae D, Yahagi N, Nakagawa Y, Sone H, Yamada N, Shimano H. Different Effects of Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids on Atherogenic High-Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Mice. *PLoS One.* 2016;11(6):e0157580. doi: 10.1371/journal.pone.0157580. 査読有

Kuba M, Matsuzaka T, Matsumori R, Saito R, 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 Elov16 attenuates steatohepatitis but promotes gallstone formation in a lithogenic diet-fed Ldlr^{-/-} mouse model. *Sci*

Rep. 2015;5:17604. doi: 10.1038/srep17604.

査読有

Tang N, Matsuzaka T, Suzuki M, Nakano Y, Zao H, Yokoo T, Suzuki-Kemuriyama N, Kuba M, Okajima Y, Takeuchi Y, Kobayashi K, Iwasaki H, Yatoh S, Takahashi A, Suzuki H, Sone H, Shimada M, Nakagawa Y, Yahagi N, Yamada N, Shimano H. Ablation of Elov16 protects pancreatic islets from high-fat diet-induced impairment of insulin secretion *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 450(1):318-23. doi:

10.1016/j.bbrc.2014.05.113. 査読有

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, Shimno H. Hepatic CREB3L3 controls whole-body energy homeostasis and improves obesity and diabetes *Endocrinology* 2014 155(12):4706-4719. doi: 10.1210/en.2014-1113. 査読有

〔学会発表〕(計 7件)

及川 総香、中川 嘉、佐藤 葵、大崎 芳典、韓 松伊、松坂 賢、岩崎 仁、小林 和人、矢藤 繁、鈴木 浩明、矢作 直也、山田 信博、島野 仁 CRISPR/Cas9 システムを用いた肝臓特異的CREB3L3 ノックアウトマウスにおける高脂血症と肝炎 第59回日本糖尿病学会年次学術集会 2016年5月21日 国立京都国際会館 京都府京都市

及川 総香、中川 嘉、佐藤 葵、大崎 芳典、韓 松伊、松坂 賢、岩崎 仁、小林 和人、矢藤 繁、鈴木 浩明、矢作 直也、山田 信博、島野 仁 one-step CRISPR /

Cas9 システムを用いた肝臓特異的CREB3L3 ノックアウトマウスは高脂血症とMCDによる著しい肝炎を引き起こした 第53回日本臨床分子医学会学術集会 2016年4月15日 東京国際フォーラム 東京都千代田区

佐藤 葵、中川 嘉、松坂 賢、岩崎 仁、小林 和人、矢藤 繁、鈴木 浩明、山田 信博、島野 仁 CREB3L3 は皮下脂肪組織の褐色化を促進し食餌誘導性肥満を抑制する 第53回日本臨床分子医学会学術集会 2016年4月15日 東京国際フォーラム 東京都千代田区

柳下 友花、中川 嘉、奥田 佳菜子、八木 豊美、佐藤 葵、及川 総子、松坂 賢、岩崎 仁、小林 和人、矢作 直也、矢藤 繁、鈴木 浩明、山田 信博、島野 仁 Creb3l3 の動脈硬化形成における役割 第58回日本糖尿病学会年次学術集会 2015年5月23日 海峡メッセ 下関 山口県下関市

柳下 友香、中川 嘉、奥田 佳菜子、八木 豊美、佐藤 葵、及川 総香、折原 佳奈、松坂 賢、岩崎 仁、小林 和人、矢藤 繁、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87回日本生化学会大会 2014年10月17日 国立京都国際会館 京都府京都市

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 酪農学園大学 北海道江別市

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 大阪国際
会議場 大阪府大阪市

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.u-tsubu-endocrinology.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 和人 (KOBAYASHI, Kazuto)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：30455935

(2) 研究分担者

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