

令和元年6月19日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09738

研究課題名(和文) 転写因子CREB3L3による複合的な生活習慣病改善に関わる新規因子の同定

研究課題名(英文) Identification of a novel factor involved in lifestyle-related disease amelioration by the transcription factor CREB3L3

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)： CREB3L3を肝臓で過剰発現する(CREB3L3 Tg)マウスでは食餌性肥満の発症を抑制した。CREB3L3はFGF21の肝臓での発現を上昇させ、白色脂肪組織のベージュ化による熱産生の増加も改善を説明できる変化であった。確かにCREB3L3 TgマウスとFGF21欠損マウスとを交配するとそれら効果はキャンセルされた。インスリン応答性の増強はFGF21に依存しなかった。そこに関連するCREB3L3が制御する因子としてKisspeptinを同定し、インスリン抵抗性の改善に寄与することを明らかにした。本研究でCREB3L3による肥満の改善効果の分子メカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CREB3L3が肥満、糖尿病の改善に寄与する生活習慣病の新たな治療標的となりえることを示した。また、その分子メカニズムの一端としてFGF21, Kisspeptinなどの肝臓から分泌される液性因子であることを示した。CREB3L3自身もメジャーな分子ではなく、これからの研究で活性化機構の解明、活性化化合物の同定が進めば、既存の生活習慣病治療薬とは異なる治療戦略の構築が期待できる。

CREB3L3の本課題でも示したように劇的に生活習慣病を改善するにも関わらず、研究は現在まで盛んとは言えない。それゆえ、我々の研究は学術的にも大きな意義がある。

研究成果の概要(英文)： In mice overexpressing CREB3L3 in the liver, the development of diet-induced obesity due to high-fat high-sucrose diet feeding was apparently suppressed. CREB3L3 increased liver gene expression and blood levels of FGF21 and then increased thermogenesis by beigeing, partially explaining CREB3L3 suppressed obesity. Certainly, mating CREB3L3 Tg mice with FGF21 deficient mice canceled those effects. However, the suppression of inflammation seen in adipose tissue of CREB3L3 Tg mice was not canceled. Glucose responsiveness and insulin responsiveness in CREB3L3 Tg mice were also not dependent on FGF21. We found Kisspeptin as a new target gene for CREB3L3, and it was revealed that the increase in expression is a direct action by CREB3L3 and that it contributes to the improvement of insulin resistance by CREB3L3. In this study, we have clarified one of the molecular mechanisms of the improvement effect of obesity by CREB3L3.

研究分野：代謝学

キーワード：生活習慣病 FGF21 食餌誘導性肥満

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、日本では食生活の欧米化による糖質の過剰摂取や脂質の質と量の変化、運動の減少により、肥満症や糖尿病といった生活習慣病患者が増加している。生活習慣病は慢性疾患であり、個人の生活の質(QOL)の低下のみならず、日本で社会問題となっている40兆円を超える医療費の増大にも大きく寄与している。そのため、生活習慣病の遺伝的背景や病態生理、成因を明らかにし、根本的な予防法や治療法を確立することは極めて重要である。生活習慣病は、長期的に過剰なエネルギーを摂取することにより、糖や脂質などの代謝に関与するエネルギー代謝関連遺伝子の発現制御が破綻した状態であると考えられ、生活習慣病の成因や、治療法を明らかにする上でそれらの発現を制御する転写因子が重要となる。このような背景のもと、我々は様々な転写因子に着目し、それらの生活習慣病における役割や治療効果を明らかにしてきた。

我々は新たに生活習慣病に関与する転写因子としてCREB3L3に着目している。CREB3L3は肝臓と腸管にのみ発現し、栄養欠乏時に活性化し、血中及び肝臓の脂質代謝を制御することが報告されている(Lee JH *Nature Medicine* 2011, Zhang C *Hepatology* 2012)。しかしながら、CREB3L3による肥満症や糖尿病における機能は未知の部分が多く、生活習慣病への効果を評価するうえで、その解明は必須である。また、CREB3L3の遺伝子発現制御および活性化機構は絶食や炎症により発現が増加し、小胞体ストレスにより活性化されることが分かっているが、治療・予防を目指す上で詳細なメカニズムを明らかにする必要がある。上記問題を解決することで新たな生活習慣病の予防・治療へと応用するための基盤研究を行う。その上で我々は、すでに以下のような研究結果を得ている。

肝臓において活性化型CREB3L3を過剰発現させたCREB3L3トランスジェニックマウス(CREB3L3-Tgマウス)は高カロリー食を負荷しても肥満になりにくく、糖尿病の悪化をも抑制した。また、アデノウイルスによるCREB3L3の過剰発現においては体重、血糖値、インスリン値が低下した。これらの病態改善効果はCREB3L3と同様に栄養欠乏時に活性化するPPARと協調し、生活習慣病を改善する効果が報告されているFGF21やIGFBP2の発現を増加させることが一因であること明らかにした(Nakagawa *Endocrinology* 2014)。しかしながら、詳細な分子メカニズムについては未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

生活習慣病患者は増加の一途をたどっており、その病態生理、成因を明らかにし、根本的な予防法や治療法を確立することは急務である。我々は栄養飢餓によって肝臓で誘導される転写因子CREB3L3を生活習慣病の治療標的として着目している。CREB3L3の脂質代謝制御メカニズムについて報告があるが、肥満や糖代謝に関する機能や、誘導・活性化因子については不明な点が多い。本研究ではCREB3L3-Tgマウスを用いて、食餌誘導性の肥満および糖尿病における機能およびメカニズムを明らかにし、かつ、CREB3L3の誘導・活性化因子を評価・探索することを目的とした。

3. 研究の方法

【マウス解析】CREB3L3-TgマウスとFGF21欠損(FGF21 KO)マウスを交配し、CREB3L3-Tg FGF21 KOマウスを作成した。正常(WT)マウス、CRE3L3-Tgマウス、FGF21 KOマウス、CREB3L3-Tg FGF21 KOマウスに高脂肪・高シヨ糖食を12週間負荷し、食事誘導性に肥満を誘導した。グルコース負荷試験(GTT)、インスリン負荷試験(ITT)を行った。また、酸素消費量をマウス酸素消費量測定装置(ARCO-2000)により測定した。肝臓、脂肪組織(精巣周囲白色脂肪組織:eWAT、皮下鼠蹊部脂肪組織:iWAT、褐色脂肪組織:BAT)を採取し、QPCRによる遺伝子発現解析、ウェスタンブロットング(WB)によるタンパク発現解析、免疫染色によるタンパク発現解析を行った。2型糖尿病モデルマウスob/obマウスとCREB3L3-Tgマウスを交配し、ob/ob CREB3L3-Tgマウスを作成した。

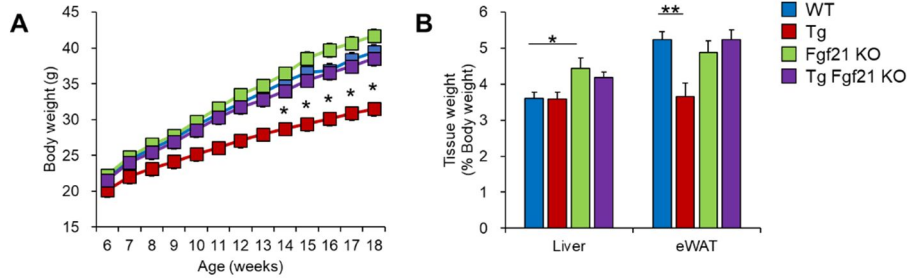
【アデノウイルス Kisspeptin shRNA の作製と CREBH-Tg マウスでの機能解析】pENTRU6を基にKisspeptin shRNAベクターを作成し、pAd PLアデノウイルスベクターに載せ替え、pAdU6Kisspeptin shRNAを作成した。このベクターを293A細胞にトランスフェクションし、アデノウイルスKisspeptin shRNA(Ad Kiss1 shRNA)を作成した。CREBH-Tg FGF21 KOマウスにアデノウイルスを導入し、GTT、ITTを行った。

【CREB3L3による Kisspeptin の発現制御解析】Kiss1遺伝子プロモーター領域をルシフェラーゼレポーターベクターに組み込み、マウス肝臓細胞系を用いてCREB3L3によるルシフェラーゼ活性を検討した。さらにプロモーター上のCREB3L3のcis-Elementに欠失や変異を入れ、遣欧した。Kiss1プロモーターのCREB3L3のcis-Elementについてクロマチン免疫沈降(ChIP)アッセイ法、ゲルシフト・アッセイを行った。

4. 研究成果

【CREB3L3は高脂肪・高シヨ糖(HFHS)食による食事誘導性肥満を抑制する】

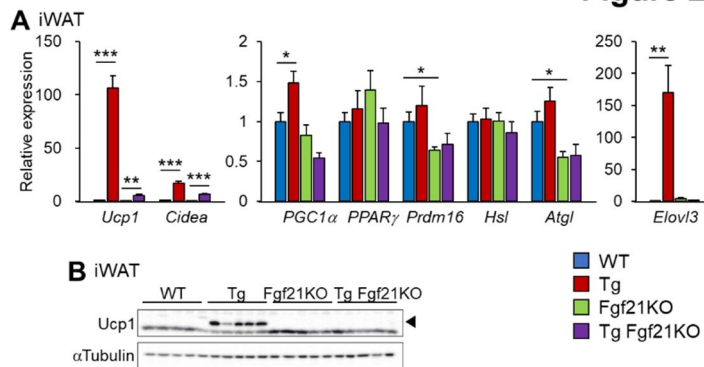
6週齢よりHFHS食を負荷し肥満を誘導した。CREB3L3-TgマウスはWTマウスと比較し、負荷期間中明らかな体重抑制が見られ、12週間の負荷後には肝臓重量に違いがないのに対し、脂肪組織重量はCREB3L3-Tgマウスで著しい抑制が観察できた(Figure 1)。FGF21 KOおよびCREB3L3-Tg FGF21 KOマウスはWTマウスと負荷期間中に体重の違いはなかった。12週間後、肝臓重量は

Figure 1

FGF21KO マウスでは WT マウスよりも増加するが、FGF21 KO マウスと CREB3L3-Tg FGF21 KO マウスの間では違いがなかった。脂肪組織重量

は WT マウス、FGF21 KO マウス、CREB3L3-Tg FGF21 KO マウスに違いはなく、CREB3L3-Tg マウスでの抑制効果は FGF21 欠損で消失した (Figure 1)。したがって、CREB3L3 による体重抑制は脂肪組織重量の抑制によるものであり、FGF21 が責任遺伝子であることが明らかとなった。

【CREB3L3 は FGF21 を介して白色脂肪組織のベージュ化を促進する】

Figure 2

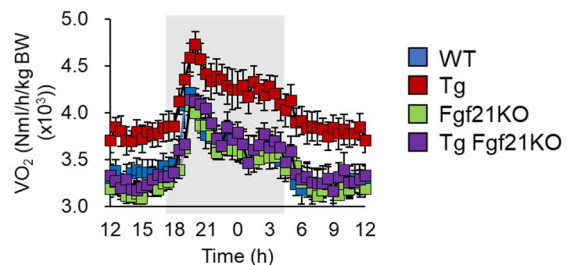
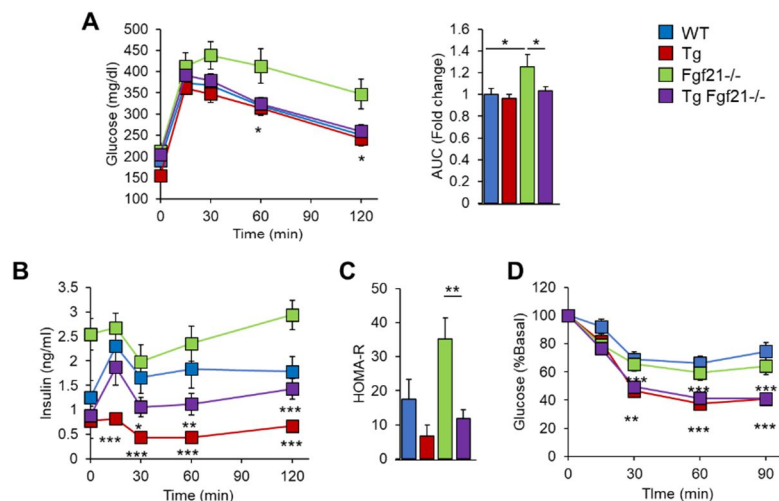
HFHS 食 12 週間負荷したマウスの iWAT のベージュ化に関わる遺伝子発現を評価した。CREB3L3-Tg マウスでは WT マウスと比較し、熱産生の律速遺伝子 Ucp1、Cidea の発現が顕著に上昇し (Figure 2A)、UCP1 タンパクの上昇を確認した (Figure 2B)。この変化は熱産生の増加を示唆した。また、熱産生に関連する PGC1、Prdm16 とミトコンドリア機能上昇のマーカー Elov13 の上昇も確認した (Figure 2A)。これら変化は

FGF21 欠損により、完全にキャンセルされており、FGf21 を介した効果であることが明らかとなった。

【CREB3L3-Tg マウスでは酸素消費量が増加する】

iWAT でのベージュ化促進による効果について酸素消費量を測定し確認した。CREB3L3-Tg マウスは他のマウス群よりも酸素消費量が 1 日中高値を示し、iWAT での熱産生関連遺伝子上昇との一致を確認した (Figure 3)。CREB3L3 の過剰発現が酸素消費量を増加させ、体重増加の抑制に結び付いたと考えられた。

【CREB3L3 はグルコース代謝を改善する】

Figure 3**Figure 4**

HFHS 食を負荷した各マウスに対し GTT および ITT を施行した。GTT ではグルコース負荷による血糖値維持では、FGF21 KO マウスで高値を示したが、その他のマウス間では違いはなかった。一方、血中インスリン値は CREB3L3 過剰発現で WT でも FGF21KO マウスでも低地を示した。ITT ではインスリン投与に応じた血糖値の低下が CREB3L3 の過剰発現で WT および FGF21 KO マウスともに観察された (Figure 4)。

【CREB3L3 過剰発現は脂肪組織の肥満誘導性の炎症を抑制する】

HFHS 食を負荷した eWAT では炎症性サイトカインの発現上昇と、それに伴う炎症、マクロファージの浸潤、線維化が促進する。CREB3L3-Tg マウスは WT と比較し炎症性サイトカインの発現が低下するとともに、脂肪組織に蓄積する脂肪敵の量、サイズが低下した。この変化は FGF21 KO マウスでも同様に観察できた。

【ob/ob マウスでも CREB3L3 過剰発現は糖代謝を改善する】

2 型糖尿病モデルマウスである ob/ob マウスと CREB3L3-Tg マウスを交配した。生後の体重の変化に違いは見られなかった。CREB3L3 の標的である FGF21 は肝臓での遺伝子発現、血中レベルで増加は見られたが、WT マウスの時のような劇的な上昇は見られなかった。FGF21 は ob/ob マウスではベースラインで非常に高く、CREB3L3 による影響が見えづらいことによるものである。また、FGF21 抵抗性が ob/ob マウスで生じているため、ob/ob マウスでは FGF21 作用が観察できないことも知られている。しかしながら、血糖値、血中インスリン値は有意差を持って低下した。さらに、GTT、ITT で CREB3L3-Tg ob/ob マウスはグルコース応答性・インスリン作用が改善しており、CREB3L3 には FGF21 を介さないでも糖尿病を改善する機能を有することが示唆された。

【CREB3L3 の標的としての Kisspeptin】

いくつかのマイクロアレイ解析から新たな CREB3L3 の標的を探索した。その結果、Kisspeptin を抽出した。CREB3L3-Tg マウスの肝臓で Kisspeptin の発現が上昇するのに対し、CREB3L3 KO マウスでは低下が観察できた。Kisspeptin のプロモーター上に CREB3L3 が直接作用するかをルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフトアッセイ、マウス肝臓を用いた ChIP アッセイで検証し、CREB3L3 の作用が直接的であることを明らかにした。

【CREB3L3-Kisspeptin の糖代謝に対する機能】

CREB3L3-FGF21 経路と Kisspeptin 機能を明確に区別するため、FGF21 KO、CREB3L3-Tg FGF21 KO マウスにアデノウイルス Kisspeptin shRNAi を導入し、GTT、ITT を行った。GTT では Kisspeptin shRNAi による変化は観察できなかった。一方、ITT では Kisspeptin shRNAi で CREB3L3 過剰発現によるインスリン感受性の亢進が抑制された。CREB3L3-Kisspeptin はインスリン感受性に寄与し、糖代謝改善を導くことが想定された。今後は Kisspeptin の効果を引き起こす標的組織の同定と、シグナル伝達機構が解明できれば、新たな生活習慣病治療戦略の標的となりえると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Nakagawa Y, Satoh A, Tezuka H, Han SI, Takei K, Iwasaki H, Yatoh S, Yahagi N, Suzuki H, Iwasaki Y, Sone H, Matsuzaka T, Yamada N, Shimano H. CREB3L3 controls fatty acid oxidation and ketogenesis in synergy with PPAR . *Scientific Reports* 2016;6:39182. doi: 10.1038/srep39182.
2. Kikuchi T, Orihara K, Oikawa F, Han SI, 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, Shimano H. Intestinal CREBH overexpression prevents high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia by reducing Npc1l1 expression. *Molecular Metabolism* 2016;5(11):1092-1102. doi: 10.1016/j.molmet.2016.09.004.
3. 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, Isaka 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. *Scientific Reports*. 2016;6:27857. doi: 10.1038/srep27857.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
筑波大学 医学医療系 内分泌代謝・糖尿病内科 HP
<https://www.u-tsuba-endocrinology.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：中川 嘉
ローマ字氏名：NAKAGAWA, Yoshimi
所属研究機関名：筑波大学
部局名：国際統合睡眠医科学研究機構
職名：准教授
研究者番号（8桁）：80361351

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。