

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14925

研究課題名(和文) 遺伝子転写因子 CRTC1 欠損による糖尿病発生病機構の解明

研究課題名(英文) Induction of diabetes by CRTC1 deficiency

研究代表者

松村 成暢 (Matsumura, Shigenobu)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：70467413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではCREB co-activatorであるCRTC1を欠損するマウスにおいてみられる糖尿病発症機構の解明に取り組んだ。CRTC1欠損マウスに高脂肪食を与えると非常に短期間で重度の高血糖が観察され、インシュリン抵抗性が惹起された。さらに顕著な脂肪肝、内臓脂肪の萎縮、脂肪組織の炎症が観察された。野生型マウスの脂肪組織を欠損マウスに移植するとCRTC1欠損マウスの糖尿病が改善された。以上の結果より高脂肪食は脂肪組織におけるCRTC1を活性化し、脂肪組織での炎症を抑制していることが明らかとなった。さらにCRTC1は血糖の維持に重要な遺伝子を調節していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We studied the induction mechanism of diabetes in CRTC1 knockout mouse. We found that High fat diet (HFD) induced severe hyperglycemia, hyperinsulinemia and insulin resistance in CRTC1KO mice. Furthermore, HFD elicited fatty liver, lipodystrophy and inflammation in visceral adipose tissue in CRTC1 KO mice. Transplantation of adipose tissue from Wild type animal into CRTC1 KO mice successfully cured diabetes. These results indicate that HFD may activate CRTC1 in adipose tissue, suppressing inflammation. Also, CRTC1 may regulate gene expression related to glucose homeostasis.

研究分野：栄養化学

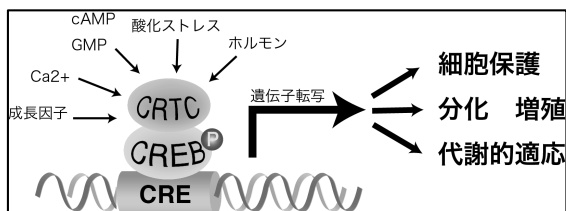
キーワード：糖尿病 高脂肪食 転写因子

1. 研究開始当初の背景

動物は常に環境変化や飢餓などのストレスにさらされている。このような外的、内的ストレスに適応するために動物の体内では遺伝子の調節が積極的に行われ、これにより生体の恒常性が維持されている。

この遺伝子発現調節に重要な役割を果たしているのが転写因子の一つである CREB (cAMP response element binding protein) である。CREB はホルモンや成長因子などに応答して増加した細胞内 cAMP および Ca²⁺ 濃度依存的に遺伝子発現を制御する(下図)。このため CREB 活性の低下は多種多様な環境やこれによって生じるストレスに適応するための遺伝子発現の低下を招き、その結果として様々な障害が生じ、時には疾病の引き金となる場合もある。

近年 CREB-coactivator である CRTC (CREB-regulated transcription coactivator) の重要性が注目されている。現在哺乳類では CRTC1, 2, 3 が同定されている(ref 1)。CRTC2 は膵臓や肝臓で強く発現がみられ、beta 細胞の分化やインシュリン合成、インクレチンシグナリング、肝臓においては糖新生に関わる遺伝子の調節を行っている(ref 2)。CRTC3 は脂肪組織で強く発現がみられ、脂肪細胞の分化成熟や脂肪燃焼に関わる遺伝子発現を調節することが報告されている(ref 3)。このように CRTC はそれぞれの組織で異なる遺伝子の発現を調節していることが明らかとなっている。CRTC ファミリーの中で CRTC1 は脳神経細胞でのみ発現がみられ、CRTC1 欠損マウスは軽度の肥満を示すことが報告されている(ref 4)。



CRTC1 欠損マウスは若年齢において肥満の表現型は顕著ではなく、加齢とともに少しずつ野生型と比較して体重が増加していく。しかしながら、血糖値やインシュリン値を調べると、このマウスは肥満の表現型が出現するより前の若年齢の段階で糖尿病を発症していることが Montminy との共同研究により我々が明らかにした。また、興味深いことに CRTC1 欠損マウスに高脂肪食を与えると肥満の表現型は消失し、さらに一週間という非常に短期間で重度の糖尿病(血糖値 >500 mg/dl)を発症することが明らかとなっている。CRTC1 は糖尿病の発症において非常に大きな役割を担っていると考えられるが、依然として詳細な機構は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、肥満を伴わず、高脂肪食およ

び加齢により重篤な糖尿病を発症する表現系を持つ遺伝子改変マウス(CRTC1 欠損マウス)を用いて未知の糖尿病発症機構の解明に取り組んだ。

世界的に見ても糖尿病患者の増加は著しく、もはや社会問題である。現在は先進国ほど患者数が多いが、増加率は発展途上国ほど多いことから今後爆発的に増加すると予想される。さらに糖尿病の合併症による失明や人工透析は著しく生活の質を下げ、医療費も増大の一途である。このため糖尿病の発症機構の解明、および新規の治療方法の確立、予防方法の確立は急務である。

糖尿病の主な発症原因は加齢、肥満、遺伝とされている。しかしながら、日本人は肥満が顕著でないにも関わらず糖尿病発症率が高い。肥満以外の他の因子によるものと考えられるが、このような糖尿病発症機構はいまだ不明な点が多い。肥満を伴わないが、高脂肪食および加齢により誘導される糖尿病は特にアジア系でみられる典型的な病態である。欧米でみられる肥満を伴う糖尿病と異なり肥満治療が糖尿病治療につながらないことが非常に大きな問題となっている。CRTC1 は cAMP 応答性転写因子である CREB の共役因子であるが、膵臓や筋肉などで既知の糖尿病遺伝子の発現を制御するものではない。よって CRTC1 欠損マウスの糖尿病発症機構を明らかにできれば肥満を伴わない糖尿病の新規な機構の解明、治療法につながると期待される。

3. 研究の方法

本研究は京都大学動物実験委員会および組換え DNA 実験安全委員会に本申請研究に該当する計画を申請し、審査を受け、倫理的に問題が無いことの承認を受けた上で、適切な設備のある実験施設において実験を行った。CRTC1 欠損マウスは米国 Salk Institute、Marc Montminy 教授より寄贈されたものを京都大学にて繁殖を行った。

糖尿病は血糖値が高くなることが一つの指標ではあるが疾患の症状、原因は多種多様である。CRTC1 欠損マウスが発症する重度の糖尿病の全体像を把握するため、はじめに CRTC1 欠損動物マウスのどこで何が起きているのかを検討した。

CRTC1 欠損マウス に六週齢より高脂肪食 (Research Diet, #D12492) を与え、血中成分分析(血糖値、インスリン値、レプチン)を行った。さらに、インシュリン耐性試験を行った。

mRNA 解析

肝臓、脂肪組織、筋肉、脳を採取し、Tripure Isolation Reagent (Sigma Aldrich) 中で破碎した。この破碎溶液から RNeasy(QIAGEN)を用いて mRNA を抽出生成を行った。糖尿病に関連する遺伝子の変化をリアルタイム PCR 解析システム (Lightcycler, ROCHE) により

SYBRgreen I を用いて mRNA を定量解析した。GAPDH の mRNA も同時に定量し、この値を基準値とした。

組織解析

脂肪組織および肝臓を採取し、4%パラホルムアルデヒドにより一晩固定した。スクロース溶液に置換したのちにマイクロトーム (Yamato-koki) により凍結切片を作製した。核染色 (DAPI、ヘマトキシリン) および脂肪染色 (BODIPY) を行い、組織的な病態変化を観察した。免疫染色には一次抗体に F4/80 特異的な抗体 (abcam, rat polyclonal antibody)、虹抗体には Alexa Fluor 633 Donkey anti rat antibody (Invitrogen) を用いた。染色後のスライドは共焦点レーザー顕微鏡 (olympus) により観察を行った。

脂肪移植

野生型マウスから副精巣周囲脂肪組織を採取し、100 mg 前後の大きさの断片を調整した。これを CRTC1 欠損マウスおよび野生型マウスの皮下に計八ヶ所移植した。脂肪移植後 2 週間の回復期間を設け、傷の消毒、体調の変化を毎日観察した。移植した脂肪が肥大せず、萎縮してしまった個体は実験より排除した。

4. 研究成果

CRTC1 欠損マウスに高脂肪食を与えると 4 週目以降に血糖値の上昇が観察された (図 1A)。このとき体重に大きな変化はみられなかった (data not shown)。血中インシュリン値は高脂肪食開始 2 週間後には顕著な上昇がみられた (図 1B)。これは高脂肪食が CRTC1 欠損マウスに対してごく短期間でインシュリン抵抗性を惹起し、さらに膵臓のインシュリン分泌不全を引き起こしたためだと考えられる。

次にインシュリン耐性試験を行ったところ、高脂肪食摂取開始一週間後には重度のインシュリン抵抗性が見られることが明らかとなった (図 1C)。

呼吸ガス分析装置 (Arco2000, Arcosystem) により全身のエネルギー代謝の測定を行った。糖、脂肪燃焼の指標となる呼吸交換比 (Respiratory exchange ratio) に変化はみられなかった (data not shown)。酸素消費量は野生型マウスに比して CRTC1 欠損マウスで低い傾向が観察された。

CRTC1 欠損マウスの臓器重量を計測したところ、肝臓の顕著な肥大がみられた。さらに組織学的解析により、肝臓の脂肪含量が増大していることが明らかとなった (図 2)。そこで肝臓の糖代謝に関連する遺伝子を検討したが予想に反して全く野生型と変化がみられず、且つ、脂肪合成に関する酵素の発現も変化がみられなかった (data not shown)。この結果は CRTC1 欠損マウスに見られる脂肪肝は

肝臓の遺伝子発現変化によるものではなく、肝臓以外の臓器不全による受動的なものであると推察される。

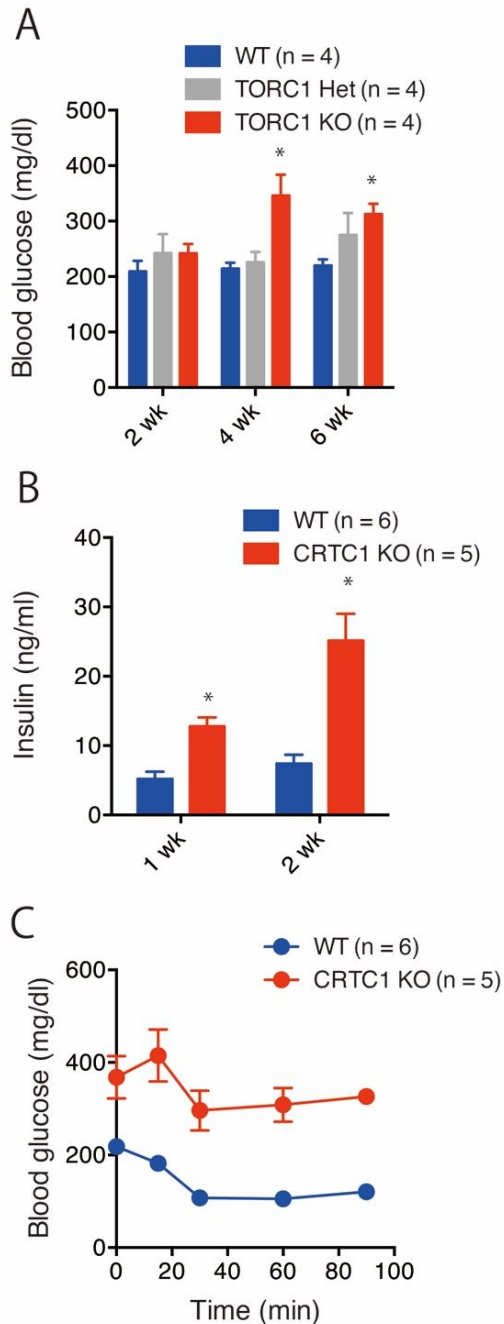


図 1 A: 高脂肪食摂取時の血糖値の変化。B: 高脂肪食摂取時の血中インシュリン値の変化。C: インシュリン耐性試験 (Insulin IP, 1 U/kg after 4 hour fasting). Values are means±SEM.

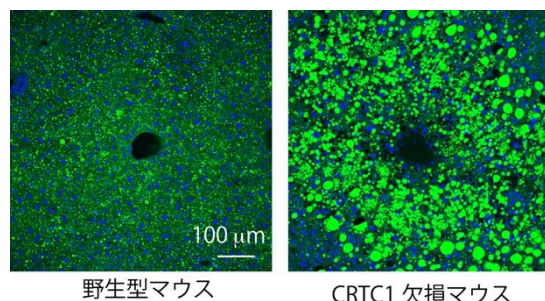


図2 CRTC1 欠損マウス肝臓組織切片像。高脂肪食 6 週間後に肝臓を採取した。脂肪滴 (BODIPY: green)、細胞核 (DAPI: blue) に染色した。

また、興味深いことに副精巣周囲脂肪の萎縮が観察された(図3)。このとき、皮下脂肪の一つである鼠蹊部脂肪、内臓脂肪である腎臓周囲脂肪、腸間膜脂肪、肩甲骨間褐色脂肪組織は野生型と比較して同程度もしくはわずかな肥大がみられたのみであった(図4)。

脂肪組織の組織学的解析をおこなったところ、副精巣周囲脂肪のみ顕著なマクロファージの浸潤がみられた(図5)。さらに多数の crown like structure が観察された。これは脂肪細胞が壊死した場所にマクロファージが集積するという現象であり、脂肪組織における炎症反応の一つである。



図3 高脂肪食摂取 6 週間後の野生型(左)および CRTC1 欠損マウス(右)の副精巣周囲脂肪組織

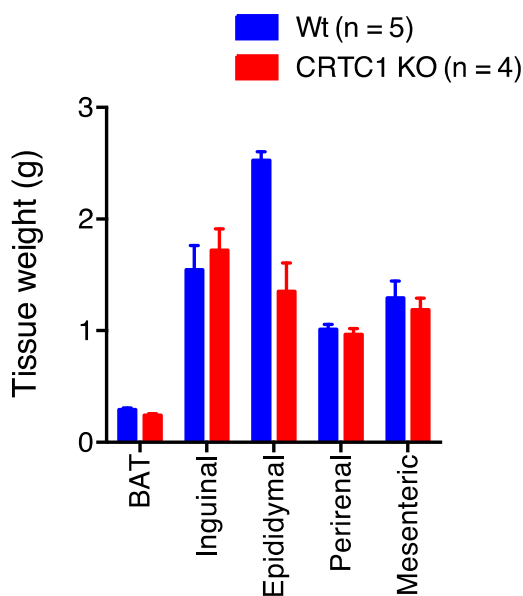


図4 高脂肪食摂取 6 週間後の野生型および CRTC1 欠損マウスの各脂肪組織重量。Values are means±SEM.

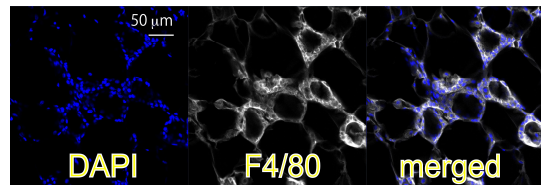


図5 CRTC1 欠損マウス副精巣周囲脂肪組織免疫染色像(Blue: DAPI 核染色、White: F4/80 マクロファージマーカー)。

上記の結果より、CRTC1 欠損マウスに見られる糖尿病は副精巣周囲脂肪組織を起点としており、CRTC1 はこの組織の遺伝子発現を調節していると推察された。そこで実際に副精巣脂肪組織に CRTC1 が発現しているのかを検討した。

野生型マウスに高脂肪食を与え、副精巣脂肪組織を採取し、CRTC1 タンパク含量を western blotting により検討した。CRTC1 タンパクが副精巣周囲脂肪組織に強く発現していることがはじめて明らかとなった。さらに高脂肪食摂取により CRTC1 タンパク発現の増加がみられた。わずかであるが、活性型 CRTC1 の増加が観察された(図6)。

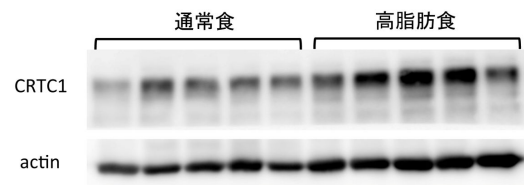


図6 野生型および CRTC1 欠損マウスの副精巣周囲脂肪組織における CRTC1 タンパク発現(CRTC1 antibody Western blotting)

次に野生型マウスより採取した脂肪組織を CRTC1 欠損マウスに移植し、糖尿病が治療できるか検討を行った。

CRTC1 欠損マウスおよび野生型マウスの皮下に脂肪組織移植を背側腹側計 8 箇所行い、回復期間 2 週間後より高脂肪食を与え、血糖値、インシュリン値を測定した。皮膚の切開と縫合のみを行い、脂肪組織移植を行わない偽手術群(sham)も同時に作成した。

偽手術群(sham)では CRTC1 欠損マウスのみ高脂肪食摂取開始から 4 週間後に糖尿病を発症した(図7, 8)。一方で CRTC1 欠損マウスの脂肪組織移植群(transplanted)では sham と比較して血糖値の上昇が顕著に抑制された。野生型マウスにおいては sham 群と transplanted 群で血糖値に有意な変化はみられなかった。しかしながら、高脂肪食摂取 6 週間後にインシュリン値が低く抑制される傾向が観察された(図8)。

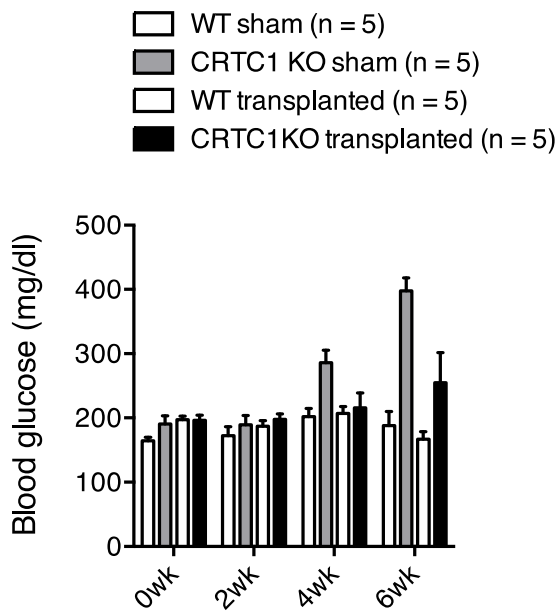


図7 脂肪組織移植偽手術群(sham)および移植群(transplanted)における高脂肪食摂食後の血糖値の変動。Values are means±SEM.

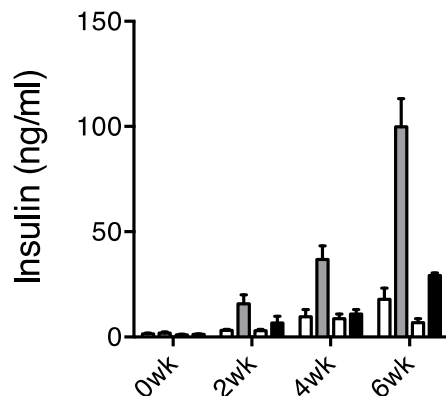


図8 脂肪組織移植偽手術群(sham)および移植群(transplanted)における高脂肪食摂食後の血中インシュリン値の変動。Values are means±SEM.

CRTC1 が副精巣周囲脂肪に発現し、高脂肪食により発現誘導されることが明らかとなった。また、CRTC1 欠損マウスでは高脂肪食により副精巣周囲脂肪で非常に強い炎症反応が引き起こされ、脂肪細胞の壊死が確認された。これに伴い、脂肪組織の萎縮が引き起こされたと考えられる。さらに脂肪組織の炎症は全身性のインシュリン抵抗性を誘導し、脂肪肝を引き起こしていると推測される。つまり、CRTC1 は脂肪組織の過度な炎症を抑制する役割を担っていると考えられる。

野生型マウスの脂肪組織を CRTC1 欠損マ

ウスに移植すると糖尿病の発症が抑制されたことも脂肪組織における CRTC1 の重要性を示唆している。脂肪組織における CRTC1 の活性調節、標的遺伝子はいまだ未解明な部分が多く残されているが糖尿病治療において脂肪組織が一つの標的となることが本研究により明らかとなった。

参考文献

(1). Role of the cAMP Pathway in Glucose and Lipid Metabolism. Ravnskjaer K, Madiraju A, Montminy M. *Handb Exp Pharmacol.* 2016;233:29-49.

(2). Feedback inhibition of CREB signaling promotes beta cell dysfunction in insulin resistance. Blanchet E, Van de Velde S, Matsumura S, Hao E, LeLay J, Kaestner K, Montminy M. *Cell Rep.* 2015 Feb 24;10(7):1149-57.

(3). cAMP-inducible coactivator CRTC3 attenuates brown adipose tissue thermogenesis. Yoon YS, Tsai WW, Van de Velde S, Chen Z, Lee KF, Morgan DA, Rahmouni K, Matsumura S, Wiater E, Song Y, Montminy M. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 May 21.

(4). The Creb1 coactivator Crtc1 is required for energy balance and fertility. Altarejos JY, Goebel N, Conkright MD, Inoue H, Xie J, Arias CM, Sawchenko PE, Montminy M. *Nat Med.* 2008 Oct;14(10):1112-7.

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 1 件)

① Sonntag T, Moresco JJ, Vaughan JM, Matsumura S, Yates JR 3rd, Montminy M. Analysis of a cAMP regulated coactivator family reveals an alternative phosphorylation motif for AMPK family members. *PLoS One.* 2017 Feb 24;12(2):e0173013. doi: 10.1371/journal.pone.0173013.

〔学会発表〕(計 1 件)

第 38 回日本肥満学会
松村 成暢, Montminy Marc
CRTC1 欠損マウスは高脂肪食により重度の糖尿病になる

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織
(1)研究代表者

松村 成暢（MATSUMURA SHIGENOBU）
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：70467413

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者
Marc Montminy
Salk Institute・Professor