

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19174

研究課題名（和文）遺伝子転写因子CRTC1欠損による雌性マウスの肥満誘導機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of obesity in female CRTC1 Knockout mice

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） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：我々はこれまでCREB coactivatorであるCRTC1を欠損したマウスに高脂肪食を与えるとメスのみ顕著な肥満になることを発見した。肥満の原因は主に摂食量の増加とエネルギー消費の低下により引き起こされる。そこでCRTC1欠損マウスを解析したところ、高脂肪食の摂取量が増加していることが明らかとなった。一方で、全身のエネルギー消費に影響は全くみられなかった。次に視床下部で摂食調節に関わる遺伝子の発現を検討したところ肥満遺伝子の一つであるMC4Rの発現上昇が確認された。以上の結果よりCRTC1は視床下部MC4R神経において機能し、摂食を調節していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により転写補因子であるCRTC1が肥満遺伝子のひとつであるMC4Rの下流に存在し、遺伝子発現調節を行うことにより、摂食を調節していることが示唆された。また、CRTC1欠損にともなう摂食量の増加はオスよりもメスの方が顕著であることから、CRTC1は女性における摂食調節に関与する因子であると推測される。これまでに女性の肥満に関する遺伝的因子はほとんど報告されておらず、女性に特化した肥満治療薬はあまりない。このため、CRTC1の活性化が女性における肥満治療の新たな標的分子になりうると期待される。

研究成果の概要（英文）： Previously, we found that the deficiency of CREB coactivator CRTC1 accelerated high-fat diet induced obesity in female mice. In general, an increase in food intake and decrease in energy expenditure causes obesity. Thus, we checked these factors in female CRTC1 knockout mice. We found that female CRTC1 KO mice consumed more high-fat diet than wild type animals. However, there was no change in energy expenditure between CRTC1 knockout mice and wild type mice. Next, we investigated the gene expression that relates to food intake regulation in hypothalamus. We found that MC4R was increased in the hypothalamus of CRTC1KO mice. In conclusion, we found that CRTC1 may act on hypothalamus regulating food intake.

研究分野：分子栄養学

キーワード：肥満 高脂肪食 転写因子

1. 研究開始当初の背景

肥満は世界的な問題である。肥満は糖尿病、脂肪肝、心筋梗塞など様々な合併症を招き、治療のための経済的負担は爆発的に増加している。肥満の主な原因は加齢、過食、運動不足、ストレスなど様々であるが未だ未解明な部分が多い。特に更年期の女性の肥満は男性と異なり女性ホルモンの減少が伴うため複雑であり、且つ、適切な動物モデルがないため研究が遅れている。

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ている。高脂肪食の摂取もストレスの一つであるととらえられ、高脂肪食摂取は遺伝子発現を様々な臓器で誘導する。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(2)。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 cyclic-AMP および Ca^{2+} 濃度依存的に遺伝子発現を制御する。このため、CREB 活性の低下は様々な疾病の引き金となる。

近年 CREB-coactivator である CRTC (CREB-regulated transcription coactivator) の重要性が注目されている(2)。CREB による遺伝子発現の誘導には CRTC が必須であるからである。CRTC ファミリーは現在のところ 3 つ同定されており、それぞれ発現場所と標的遺伝子、調節因子が異なる。例えば肝臓では CRTC2 および CRTC3 が強く発現し、グルカゴンによる糖新生関連遺伝子の発現を調節している(3)。このため CRTC2/3 を欠損すると絶食時に糖新生が正常に行われなため低血糖になり、逆に CRTC2/3 を過剰に活性化すると糖尿病になる。膵臓、ランゲルハンス島β細胞では CRTC2 が強く発現しており、これを欠損すると Glucagon like peptide-1 のようなインクレチンによる遺伝子発現が正常に行われず、結果としてインシュリン分泌能の低下が起こる(4)。

CRTC1 は CRTC2 や CRTC3 と異なり末梢組織ではほとんど発現がみられず、主に脳神経細胞において発現が確認されており、CRTC1 を欠損したオスマウスは肥満することが報告されている(5)。CRTC1 欠損メスマウスはオスと異なり、通常食では野生型と区別がつかない。ところが高脂肪食を与えると急激に肥満することを我々が新たに見出した。血糖値やインシュリン値に全く変化がみられず、体重だけが野生型の二倍近くにも上昇した。このようにオスとメスで表現型が全く異なることから、CRTC1 欠損メスマウスは女性特有のホルモンや臓器に問題があると推察される。

一般的に人では女性が太りやすい傾向にあるがマウスは逆で高脂肪食を与えてもほとんど太らない。このため女性の肥満研究に不向きであった。加えて、CRTC1 は脳神経細胞における機能しかこれまでのところ研究されていない。これまでに、実験には CRTC1 欠損オスマウスしか用いられていなかったため、メスにおける CRTC1 の機能についてはまだまだ未解明な機能が多く残されている。

2. 研究の目的

女性の肥満、特に更年期以降の肥満は心臓疾患や糖尿病などの生活習慣病のリスクが高まり非常に大きな問題である。一方で日本においては若年女性の痩せすぎが問題とされている。しかし、実際には体重は正常値であるのに体脂肪率が高い隠れ肥満が高頻度で報告されている。女性の肥満要因として加齢に伴う女性ホルモンの減少、油脂の過剰摂取、運動不足などが原因とされている。しかしながら、いまだ未解明な部分が多く特に遺伝的要因も含めた遺伝子レベルでの報告はほとんどない。一般的に実験に用いられる雌マウスは高脂肪食を与えても肥満せず、糖尿病にもほとんどならない。このため、マウスを利用した実験で女性に特化した肥満機構の解明は困難であった。我々が新たに発見したマウス(CRTC1 欠損マウス)はメスのみ、そして高脂肪食摂取時のみ顕著な肥満が誘導されるマウスである。そこで CRTC1 欠損メスマウスの肥満発症機構を解明することを本研究の目的とした。

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。

動物

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。明暗 12 時間サイクルにて飼育し、水と標準食 (MF: オリエンタル酵母、東京) は自由摂食にて与えた。

六週齢まで標準食で飼育した後、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。体重は一週間に一回測定した。

呼吸ガス分析

マウスを専用のアクリル製チャンバーに入れ、ポンプにより吸引し呼吸ガスを採取した。呼吸ガス分析は質量分析(Arco2000、アルコシステム)を用いて経時的に酸素消費量、二酸化炭素排出量を計測した。また、チャンバー上部に設置した赤外線センサーにより行動量も同時に測定した。

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。

4. 研究成果

結果

CRTC1 欠損メスマウスに高脂肪食を与え体重変化を観察した。野生型マウスと比較して CRTC1 欠損メスマウスは顕著な体重増加を示した。CRTC1 欠損オスマウスも同様に高脂肪食により顕著な体重増加を示したが一ヶ月後には野生型マウスとの体重差が消失した。

呼吸ガス分析によりエネルギー代謝を測定したところ CRTC1 欠損メスマウスはエネルギー消費は野生型マウスと比較して同程度であった。この時、自発行動量に変化はみられなかった。さらに 1 日あたりの高脂肪食の摂食量をしたところ CRTC1 欠損メスマウスは野生型マウスと比較して、有意に多くの高脂肪食を摂取していた。

CRTC1 欠損がメスに特有の女性ホルモンに影響を与えている可能性がある。そこで卵巣摘出手術を行った。卵巣摘出後に 2 週間の回復期間を経た後、高脂肪食を与え体重変化を検討した。卵巣摘出により野生型マウスにおいても体重増加が加速する傾向が観察されたが、CRTC1 欠損メスマウスより体重増加は緩やかであった。

次に血中成分の測定を行なった。高脂肪食 6 週間摂取後、血中トリグリセライド及び遊離脂肪酸の濃度を測定したが、CRTC1 欠損メスマウスと野生型マウスに大きな差は認められなかった。CRTC1 欠損メスマウスでは高脂肪食摂取後に野生型マウスに比して血中グルコース、レプチン、インスリン濃度の有意な上昇が認められた。

視床下部、下垂体は摂食や全身のエネルギー代謝を調節する働きをもつ。高脂肪食で飼育したマウスの視床下部及び下垂体におけるエネルギー代謝に関連する遺伝子の mRNA の発現量を測定した。CRTC1 欠損メスマウス視床下部において、摂食を促進し、エネルギー消費を抑制する NPY (Neuropeptide Y), AgRP (agouti related peptide) がそれぞれ増加もしくは増加傾向にあった。摂食を抑制し、エネルギー消費を促進する POMC(proopiomelanocortin)の発現が減少傾向にあった。一方で、摂食を抑制しエネルギー消費を促進する MC4R (melanocortin 4 receptor)の発現は CRTC1 欠損メスマウスで有意に増加した。視床下部での GHRH (growth hormone releasing hormone) の発現には変化はみられなかったが、下垂体における GHRH-R (及び GH (growth hormone)の発現量が有意に減少していた。

エネルギー代謝に関連する臓器である肩甲骨間褐色脂肪組織および卵巣周囲脂肪組織 (白色脂肪阻止 k) における各種エネルギー代謝に関連する mRNA 発現についても検討を行なった。野生型と CRTC1 欠損メスマウスとの間に mRNA 発現量の有意な差は認められなかった。

CRTC1 欠損メスマウスの下垂体において GH の mRNA 発現が低下していることから、GH の分泌不足が肥満の原因であると推測された。そこで、CRTC1 欠損メスマウスに対して皮下投与による GH の補填 (GH 補充療法) を行い、体重変化、組織重量、摂食量の測定を行った。

GH 投与群には毎日 1 mg/kg の GH を投与し、コントロール群には PBS を投与した。コントロール群においては、先の実験と同様に CRTC1 欠損メスマウスの有意な体重増加が観察された。GH 投与群において CRTC1 欠損メスマウスの体重増加が抑制されると予測されたが、コントロール群と同様に体重増加が観察され、GH 投与による影響は観察されなかった。

1 日あたりの摂食量及び総摂食量についてはコントロール群、GH 投与群のいずれにおいても CRTC1 欠損メスマウスにおいて増加傾向がみられた。脂肪・筋肉の組織重量については GH 投与により CRTC1 欠損メスマウス群で増加傾向が観察された。

考察

CRTC1 欠損メスマウスに高脂肪食を与えると野生型と比較して顕著な体重増加が観察された。一方で CRTC1 欠損オスマウスにおいてはこのような体重増加が観察されなかったことから、CRTC1 はメスにおいて体重増加を抑制する因子として機能していることが示唆された。またこ

の体重増加は摂食量の増加により影響を受けていることが明らかとなったことから、CRTC1 は遺伝子発現調節により摂食を抑制する機能があると推測される。また CRTC1 欠損メスマウスにおいてレプチンの血中濃度の増加が認められたことから、レプチン抵抗性を発症していることが示唆された。

mRNA 発現量の解析より、CRTC1 欠損メスマウスの視床下部において AgRP, NPY の増加、POMC の減少が確認された。また MC4R の増加が CRTC1 欠損メスマウスの視床下部において観察された。MC4R 刺激は摂食を抑制し、エネルギー消費を亢進させるにも関わらず、CRTC1 欠損メスマウスで mRNA の増加がみられたことから CRTC1 欠損メスマウスは MC4R シグナリングになんらかの異常があると推測される。

MC4R は G タンパク質共役型の受容体であり、リガンドとの結合で細胞内 cAMP を増加させる (6)。cAMP の増加は CREB および CRTC1 を活性化すると予測される。CRTC1 欠損メスマウスで MC4R mRNA の増加が観察され、さらに肥満したことから CRTC1 は MC4R 発現細胞において機能していると推測される。MC4R 刺激による遺伝子発現調節を行い、摂食調節およびエネルギー代謝調節を行っているのかもしれない。オスとメスの間で MC4R シグナリングの違いが認められるという結果はこれまで報告されていないが、今回の我々の研究よりオスとメスの肥満の違いに MC4R シグナリングが関与するということが示唆された。

5. 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. CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. Altarejos JY, Montminy M. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Mar;12(3):141-51.
3. Hepatic Insulin Resistance Following Chronic Activation of the CREB Coactivator CRTC2. Hogan MF, Ravnskjaer K, Matsumura S, Huising MO, Hull RL, Kahn SE, Montminy M. *J Biol Chem*. 2015 Oct 23;290(43):25997-6006.
4. 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.
5. The Creb1 coactivator Crtc1 is required for energy balance and fertility. Altarejos JY, Goebel N, Konkright MD, Inoue H, Xie J, Arias CM, Sawchenko PE, Montminy M. *Nat Med*. 2008 Oct;14(10):1112-7.
6. Molecular genetics of human obesity-associated MC4R mutations. Lubrano-Berthelie C, Cavazos M, Dubern B, Shapiro A, Stunff CL, Zhang S, Picart F, Govaerts C, Froguel P, Bougneres P, Clement K, Vaisse C. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Jun;994:49-57.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsumura Shigenobu, Ishikawa Fuka, Sasaki Tsutomu, Terkelsen Mike Krogh, Ravnskjaer Kim, Jinno Tomoki, Tanaka Jin, Goto Tsuyoshi, Inoue Kazuo	4. 巻 -
2. 論文標題 Loss of CREB coactivator CRTC1 in SF1 cells leads to hyperphagia and obesity by high-fat diet but not normal chow diet	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/endo/bqab076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kanki Hideaki, Sasaki Tsutomu, Matsumura Shigenobu, Kawano Tomohiro, Todo Kenichi, Okazaki Shuhei, Nishiyama Kumiko, Takemori Hiroshi, Mochizuki Hideki	4. 巻 40
2. 論文標題 CREB Coactivator CRTC2 Plays a Crucial Role in Endothelial Function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 9533 ~ 9546
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.0407-20.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
研究分担者	佐々木 勉 (Sasaki Tsutomu) (20534879)	大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授 (14401)	

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