

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09029

研究課題名(和文) CREBとその転写共役因子CRTCによる動脈硬化発症・進展抑制機序の解析

研究課題名(英文) Examination of the role of CRTC, a CREB coactivator, on arteriosclerosis

研究代表者

井形 元維 (Igata, Motoyuki)

熊本大学・病院・助教

研究者番号：40599099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：CREB coactivatorであるCRTCの動脈硬化症への役割を検討した。血管平滑筋細胞においてForskolinはCRTC2を活性化、血清刺激による増殖・遊走を抑制した。CREB標的遺伝子であり、血管新生促進因子であるCYR61に注目した。ForskolinはSIK2を介しCRTC2依存的にCYR61発現を抑制した。CRTC2はCREB非依存的にCYR61の発現を抑制、さらにForskolin非存在下でもCYR61の発現を抑制した。CRTC2はCREB co-activatorとして遺伝子発現を活性化するのみでなく、CREB非依存的に遺伝子発現を抑制する作用を有することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全世界における肥満、メタボリックシンドローム人口の増加は動脈硬化性疾患の発症の増加につながる。動脈硬化症発症・進展の機序を解明することは人類の健康寿命延長に大きく寄与することが想定される。これまで転写因子CREBの動脈硬化症における役割は明らかでなく、動脈硬化進展、動脈硬化抑制の両者への関与が報告されていた。今回の研究ではCREBの共役因子として知られるCRTCの動脈硬化症への関与と、そのCREB非依存的な作用を明らかにし、動脈硬化症におけるCREBの相反する作用を説明できる可能性をもたらした。

研究成果の概要(英文)：We examined the role of CRTC, a CREB coactivator, on arteriosclerosis. We confirmed expression of CREB / CRTC2 in vascular smooth muscle cells and CRTC2 activation by forskolin. Forskolin inhibited serum-induced proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. We focused on CYR61, which is a CREB target gene and angiogenic immediate early gene. Forskolin suppressed CRTC2-dependent CYR61 expression via SIK2 inhibition. CRTC2 suppressed CYR61 expression in a CREB-independent manner and also suppressed CYR61 in the absence of forskolin. CRTC2 was shown not only to activate gene expression as a CREB co-activator, but also to suppress gene expression independently of CREB.

研究分野：糖尿病、動脈硬化

キーワード：動脈硬化症 CRTC

1. 研究開始当初の背景

転写因子 CREB (cAMP responsive element binding protein) は生体の様々な細胞に広く発現しており、細胞の増殖や分化、生存を含む多様な細胞応答に関与している。その生理機能は神経系においてよく研究されているが、血管系、動脈硬化における役割の解明は不十分である。

CREB は cAMP-PKA シグナルによってリン酸化 (Ser 133) を受け、CBP (CREB binding protein) と結合、転写因子として活性化され下流の標的遺伝子発現を促進する。その後、CREB のリン酸化と独立して CRE (cAMP responsive element) 依存性の転写を活性化させる新規分子 CRTC (CREB regulated transcriptional coactivator) が報告され、その機能が注目されている。

2. 研究の目的

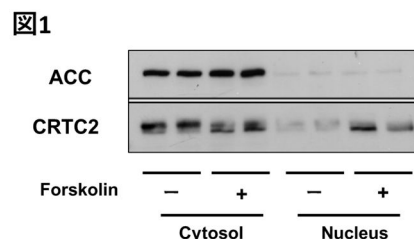
動脈硬化促進因子であるアンジオテンシン や腫瘍壊死因子 (TNF α) が CREB を活性化することが報告されている一方、抗糖尿病薬として市販され、動脈硬化抑制的な作用も報告されている GLP-1 (Glucagon like peptide-1) も CREB を活性化することが知られている。CREB の標的遺伝子発現制御には共役因子の相互作用が重要であることも想定し、本研究では CREB 共役因子 CRTC に注目、動脈硬化発症に関わる CREB 標的遺伝子の発現制御機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

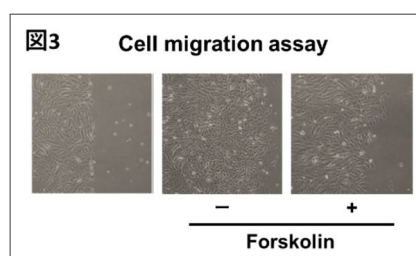
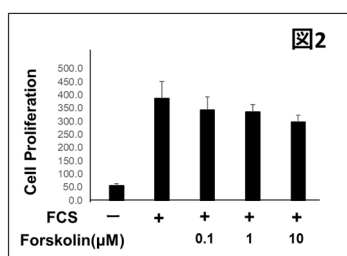
血管平滑筋細胞に対しアデニル酸シクラーゼ活性化作用を有し cAMP 濃度を上昇させる Forskolin で刺激し、CREB、CRTC の発現、リン酸化状態および細胞内局在を Western blotting 法、免疫染色法にて確認した。次に血清刺激による血管平滑筋細胞増殖・遊走における Forskolin の影響を検討した。さらにプロモーター上に CRE を有しかつ動脈硬化促進的に作用する因子の探索から血管新生促進因子 CYR61/CCN1 に注目、その発現制御における CREB、CRTC の役割を検討した。

4. 研究成果

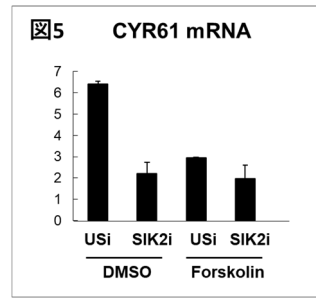
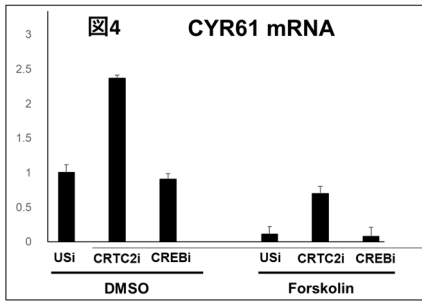
血管平滑筋細胞 A7r5 細胞を用い、Forskolin 刺激による cAMP-PKA シグナルを介した CREB リン酸化 (Ser133) を確認した。CRTC に関してはユビキタスに発現している CRTC2 を中心に検討を行った。CRTC2 は定常状態では Ser 171 がリン酸化された状態で細胞質内に存在するが、Forskolin 刺激により脱リン酸化され、細胞質から核内へ移行することを確認した (図 1)。



次に動脈硬化性病変形成に重要な役割を果たす血管平滑筋細胞の増殖・遊走に対する Forskolin の影響を検討した。増殖因子として FCS (fetal calf serum) を用いた。まず細胞増殖アッセイにて Forskolin は濃度依存性に FCS 刺激による細胞増殖を抑制した (図 2)。細胞遊走能に関してはスクラッチアッセイで評価を行い、Forskolin が FCS 刺激による細胞遊走を抑制することを確認した (図 3)。



さらに動脈硬化促進因子である CYR61 について発現制御メカニズムの解析を行った。CYR61 mRNA は Forskolin 刺激にて抑制された。CRTC2 をノックダウンした細胞では CYR61 の発現増加を認め、一方 CREB をノックダウンした細胞では CYR61 発現に変化は認めず、Forskolin が CRTC2 依存性的に、CREB 非依存的に CYR61 mRNA を抑制することが判明した (図 4)。また CRTC をリン酸化し、その活性を負に制御する SIK (Salt-inducible kinase) をノックダウンし、CYR61 の発現を検討した。SIK2 をノックダウンした細胞では CYR61 mRNA の発現低下を認め、Forskolin による CYR61 mRNA の発現低下を認めなかったことから Forskolin が SIK2 活性を阻害することで CYR61 発現を抑制することがわかった (図 5)。以上より、CRTC2 は cAMP 刺激下で CREB co-activator として遺伝子発現を活性化するのみでなく、CREB 非依存的に遺伝子発現を抑制する作用を有する可能性が示された。



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
研究分担者	荒木 栄一 (Araki Eiichi) (10253733)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授 (17401)	
研究分担者	本島 寛之 (Motoshima Hiroyuki) (40398201)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特任准教授 (17401)	

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