

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17529

研究課題名(和文) 甲状腺ホルモン結合蛋白(CRYM)欠損における肥満及びPPAR 上昇と機序の解明

研究課題名(英文) The association between CRYM and PPAR gamma rising.

研究代表者

大久保 洋輔 (Okubo, Yosuke)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・助教

研究者番号：70793925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,300,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺ホルモン結合蛋白 μ クリスタリン(CRYM)を欠損したマウスへ高脂肪食負荷を行うと、肝臓でのPPAR の発現増加、脂肪肝及び白色脂肪組織の増大が起こり、肥満を呈する。その原因を解明するために甲状腺機能低下と甲状腺機能亢進の表現型を評価した。各条件下のマウスで野生型に比べCRYM欠損では白色脂肪の有意な増加を認め、甲状腺機能低下状態においては摂餌量低下があったにもかかわらず脂肪肝を認めた。これらの結果はCRYMの甲状腺を介さない肥満機序の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は甲状腺ホルモン結合蛋白 μ クリスタリン(CRYM)を研究する中で、CRYM欠損が肥満を呈することを見出してきました。もともと甲状腺ホルモンの低下は脂肪沈着や脂肪肝といった代謝の低下を起こすことが知られており、CRYMの肥満の機序はホルモンの影響と考えられていました。しかし、今回の研究でCRYMの肥満の機序の一部が甲状腺ホルモンに関連しない事実が得られました。現時点でCRYMと直接関連した肥満の経路の解明には至れていませんが、CRYMが甲状腺ホルモンを介さない独自の肥満機序があることが示唆され、新規の肥満機序の解明、肥満症の発展につながる可能性を示唆しています。

研究成果の概要(英文)：Lack of μ -crystallin (CRYM), binding tri-iodothyronine, makes mice obese in feeding high-fat diets. The CRYM knock-out(KO) mice had fatty livers, and increasing fatty tissues. There was a high expression of the PPAR gene in their liver. To reveal the mechanism, we put the mice under hypothyroidism and hyperthyroidism. CRYM KO mice had more white adipose tissue than wild-type mice did under both situations. Furthermore, hypothyroidism made feeding amount decrease though, the CRYM KO mice had fatty livers. These results mean that there are other obesity mechanisms being non-related to thyroid hormones.

研究分野：肥満、甲状腺ホルモン

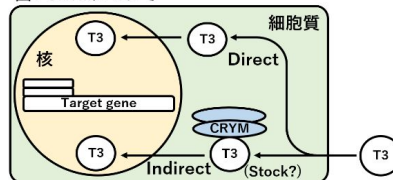
キーワード：肥満 甲状腺ホルモン 脂肪

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

甲状腺から放出された甲状腺ホルモンは、主にトリヨードサイロニン (T3) が核内受容体に結合することで甲状腺ホルモン応答蛋白の発現転写が活性化され、ホルモンの作用が発揮される。 μ -Crystallin (CRYM) は細胞質に存在し T3 に対する親和性の高い結合蛋白質であり、細胞質に蓄えられた T3 の調整を行っている (図 1) と考えられている。当研究室では、これまで CRYM の生理的機能を多角的に解析するために、CRYM ノックアウト (KO) マウスを作製、その表現型を解析して CRYM の生理的意義の解析を試みてきた。

図1 CRYMについて



2. 研究の目的

我々は CRYM を欠損したマウスへ高脂肪食負荷を行うと、肝臓での PPAR の発現増加とともに脂肪肝の形成及び白色脂肪組織の増大が起こり、肥満を呈することを報告した (BBRC, 508 (2019), pp. 914-20.). さらに摂餌量を野生型と同量にした場合 (pair-feeding) にも白色脂肪の有意な増加を認めた。

本研究では肝臓、白色脂肪に対して CRYM の有無による PPAR 周辺領域の遺伝子発現解析や *in vitro* での変化の確認を行い、その機序を解明することを目標とした。具体的に CRYM と甲状腺ホルモンの関連及び肝臓での PPAR を結ぶブラックボックスの解明を目指す。本研究は肥満の新たなメカニズム解明の端緒となる可能性がある。

3. 研究の方法

1) 肝臓組織での CRYM 有無での遺伝子変化をマイクロアレイで評価する。

白色脂肪のマイクロアレイにより canonical Wnt/ β -catenin シグナルでの変動の可能性が示唆されたため、同様に canonical Wnt/ β -catenin シグナルの有無を確認し、CRYM と PPAR を結ぶ可能性のある転写調節因子を qPCR で評価後、可能性の高いタンパク質に関して pull down assay 行う。

具体的な CRYM 結合蛋白として TERF1、ADRB2、CDC37、C7orf25、abeta_42_oligomer_human、MTNR1B、Atp6v1a、Ywhae、DIg4、PPP1CA、RNF126 (<https://www.ebi.ac.uk/intact/home.xhtml> で検索) がこれまでに報告されている。なお、精巣周囲周囲の白色脂肪のマイクロアレイで、これら蛋白質遺伝子発現について 2 群間で差は認められなかった。

2) CRYM は甲状腺ホルモン T3 に対してどのような反応をするか？

In vivo の実験として成獣で各臓器の甲状腺ホルモンとの関連を探ってきた。肝臓及び白色脂肪では脱ヨウ素酵素 (Dio1、Dio 2) の発現量や甲状腺ホルモン受容体 (TR α 、TR β) の発現量も確認したが、直接的な関連を示すデータは得られなかった。また、甲状腺ホルモンが関与する褐色脂肪組織での UCP-1 遺伝子発現にも差は認められなかった。以上よりこれまでの *in vivo* の実験で肝臓、白色および褐色脂肪において CRYM の作用と甲状腺ホルモンとの関連は認められていない。そこで甲状腺ホルモンを低下および過剰にした際の変化の有無を確認した。

具体的な実験

In vivo: 8 週齢のマウスに抗甲状腺薬 (1%チアマゾール水) と低ヨウ素食 (60%高脂肪食) を 5 週間負荷して甲状腺機能低下マウスを作成した。また同様に 8 週齢のマウスの T3 を 5 週間腹腔内投与することで甲状腺機能亢進症マウスを作成し、表現型及び各臓器での CRYM の反応性を確認した。

In vitro: 白色脂肪原基細胞 (3T3-L1 cell) の分化誘導過程へ T3 添加群と非添加群で CRYM の発現と甲状腺ホルモン受容体の変化を確認した。

4. 研究成果

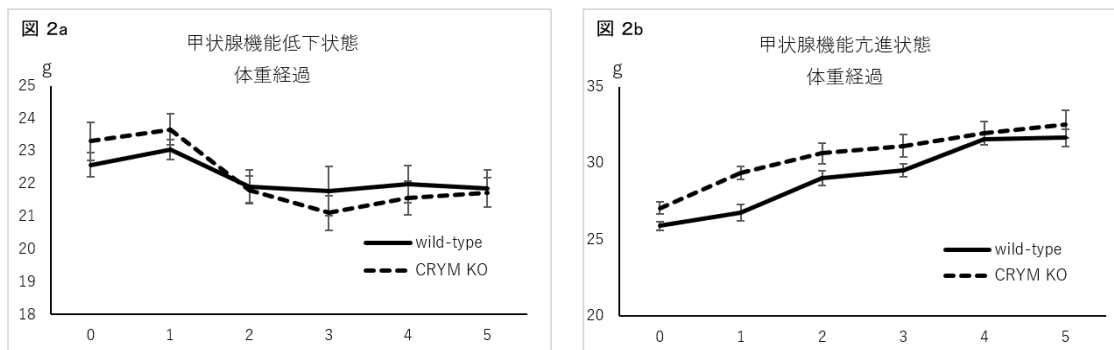
1) 肝臓での CRYM の有無による変化を CRYM の働きをマイクロアレイで評価する。

自由摂食の高脂肪食負荷後の CRYM 欠損マウスと野生型マウス、そして野生型マウスの摂餌量に合わせて pair-feeding を行った CRYM 欠損マウスの計 3 群で肝臓のマイクロアレイを行った。52,146 の因子のうち、CRYM 欠損マウスではこれまで報告してきた因子の変化を含め 115 の共通因子の増加、82 個の低下を認めた。しかし、上記で記載した CRYM と結合するタンパクや canonical Wnt/ β -catenin シグナルに関連するような因子の変化は肝臓では同定できなかった。そのため、2) 以降で行った甲状腺機能を調整した状態での CRYM 欠損マウス、野生型マウスとの比較を行うこととした。

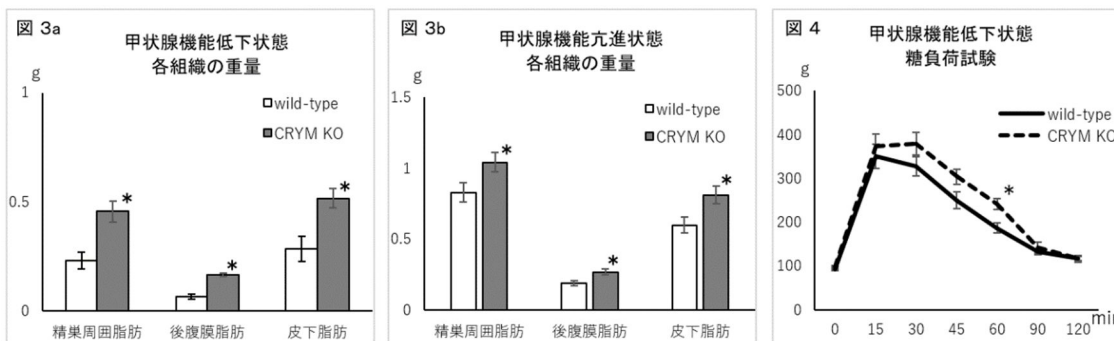
一方で白色脂肪のマイクロアレイでは脂肪細胞の分化に影響を与える Wnt1-inducible-signaling pathway protein 2 (wisp2) の有意な増加を認め、qPCR による遺伝子発現でも皮下脂肪で同様の結果を得た。Wisp2 は皮下脂肪の分化を抑制することで肥満を引き起こすといわれている因子であり、脂肪組織の分化異常が CRYM の欠損による肥満に影響している可能性を示した (80 回アメリカ糖尿病学会で報告した (1935-P)).

2) CRYM は甲状腺ホルモン T3 に対してどのような反応をするのか？

甲状腺機能低下マウス、甲状腺機能亢進症マウスを作成し、表現型の評価を行った。甲状腺機能低下状態でマウスの体重は野生型マウス 21.9 (±0.6)g、CRYM 欠損マウス 21.7 (±0.5)g と差はなく (図 2a)、同様に摂餌量も差は認めなかった。同様に甲状腺機能亢進状態でも野生型マウスは 31.6 (±0.6)g、CRYM 欠損マウス 32.6 (±0.9)g と差はなく (図 2b)、同様に摂餌量も差は認めなかった。



一方で体組成の評価は、どちらの条件下でも内臓脂肪 (精巣周囲脂肪、後腹膜脂肪)、皮下脂肪の脂肪量が有意に増加した (甲状腺機能低下: 図 2a、甲状腺機能亢進: 図 2b)。また、甲状腺機能低下マウスでは体重増加があまり見られなかったにもかかわらず脂肪肝を呈し、脂肪合成に関連する因子の ACC1 の遺伝子発現も増加し、さらにブドウ糖負荷試験で耐糖能の異常を示した (図 3)。(値については平均 (±標準誤差)、有意差は *: p<0.05 として記載している。)



また、CRYM 遺伝子の発現量については野生型マウスの甲状腺機能低下、機能亢進で糖脂質代謝に関連する肝臓や脂肪組織で、甲状腺機能低下状態で差はなく、機能亢進状態でわずかに低下を認める結果であった。一方で合わせて行った甲状腺ホルモンを調整する役割を持つ視床下部では甲状腺機能低下状態で CRYM 遺伝子発現量は約 600 倍程度の有意な上昇がみられた。このことから、甲状腺ホルモンに対する CRYM の動きは部位によって異なり、代謝に関連する肝臓や脂肪では視床下部に比べて CRYM の発現には甲状腺ホルモンの影響が少ない結果であった。

3T3-L1 cell 細胞株への T3 投与下での分化誘導で、CRYM および甲状腺受容体の遺伝子発現は低下した。これはこれまでの *in vivo* の結果と同様に T3 は CRYM の発現を低下させる結果であった。分化については分化誘導後 4 日目にオイルレッド染色による脂肪量の蓄積によって評価したが、T3 投与による短期間の分化の促進は見られなかった。

以上より、CRYM 欠損は甲状腺ホルモンとは無関係に脂肪蓄積をきたした。また、代謝にかかわる肝臓や脂肪組織での CRYM 遺伝子の発現は視床下部といった甲状腺ホルモンの調整部位とは大きく異なる反応性がみられた。今回の実験期間で CRYM の直接的な機序は解明できなかったが、これまで考えられていた甲状腺ホルモンとの関連以外に肥満機序が存在することが示され、今後の肥満の新しい機序の解明に寄与する結果であった。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 大久保洋輔	4. 巻 69
2. 論文標題 甲状腺ホルモンと肝脂質代謝	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 信州医学雑誌	6. 最初と最後の頁 67,70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 YOSUKE OHKUBO, SHIN-ICHI NISHIO, YASUHO SHIMADA, SATOSHI KUBOTA, JUNICHIRO KITAHARA, YUSUKE SHIBATA, KOHEI KITAJIMA, TAKASHI SEKIDO, SATORU SUZUKI, MITSUHISA KOMATSU.
2. 発表標題 Loss of μ -crystallin increases adipose tissues with inhibitory effects on adipocyte differentiation through catenin dependent mechanisms in high fat diet fed mice.
3. 学会等名 80st Scientific Sessions of American diabetes association. (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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