

腸—肝循環を介した動脈硬化疾患発症を制御する転写調節因子の機能解析

中川 嘉

筑波大学国際睡眠医科学研究機構

【研究の背景】

肝臓と腸はエネルギー代謝において非常に重要な臓器であり肝臓はエネルギー代謝を腸はエネルギー吸収を行う。そのため、CREB3L3 が全身のエネルギー代謝に寄与していることが推測される。今まで肝臓を中心に解析を行い CREB3L3 が脂質代謝調節に重要な転写制御を統括する PPAR α との相互作用を明らかにし、その中で生活習慣病全般を改善するホルモン FGF21 の発現を CREB3L3 と PPAR α が協調的に制御することを見出した。その結果、CREB3L3 は糖尿病、肥満を改善する機能を有することを明らかにした(Nakagawa et al., 2014)。

本課題ではさらに肝臓、腸管の両臓器に着目し、CREB3L3 の動脈硬化における影響を動脈硬化モデルマウスを用い解析を行う。エネルギー代謝における肝臓での代謝、腸管での吸収、そして、腸肝循環を介した組織連関から CREB3L3 を中心したメカニズムを解明し、新たな生活習慣病の治療応用を目指す。

【目的】

CREB3L3 は肝臓と腸管で発現している。今までの解析では肝臓を中心であり、腸管での解析は行われていなかった。腸と肝臓は脂質・コレステロール代謝を調節する重要な組織連関であり、これら組織でのみ発現する転写因子は CREB3L3 以外に報告はない。そのため、CREB3L3 が腸肝循環におけるキープレイヤーであることが予想される。本申請では CREB3L3 が肝臓、腸管での組織間クロストークから全身の代謝恒常性を制御するメカニズムを明らかにすることで、心動脈疾患に対する治療への発展を目指していく。

【方法】

【動脈硬化に対する CREB3L3 の影響の解析】

動脈硬化発症モデルである *Ldlr*^{-/-} と CREB3L3 遺伝子改変マウス (*Creb3l3*^{-/-} マウスおよび TgCREB3L3 マウス) を交配し、動脈硬化に対する影響を血中パラメーター、遺伝子発現などで検討する。

【結果】

動脈硬化形成における CREB3L3 の機能

動脈硬化モデルマウス (*Ldlr*^{-/-}) と CREB3L3 ノックアウトマウス (*Creb3l3*^{-/-}) を交配し、*Ldlr*^{-/-} *Creb3l3*^{-/-} マウスを作成した。*Ldlr*^{-/-} *Creb3l3*^{-/-} マウスに動脈硬化誘発食を短期間(5週間)負荷したのち、大動脈全体および心臓起始部における脂質沈着を評価した。*Ldlr*^{-/-} *Creb3l3*^{-/-} マウスはコントロールマウスと比べ、著しい脂質蓄積が観察された。すなわち、CREB3L3 欠損が動脈硬化の形成を促進した。この際、血中トリグリセライドおよびコレステロールは著しい増加を認めた。それに反して、生活習慣病の改善に機能するヘパトカイン FGF21 の血中濃度が著しく低下した。これらの変化は動脈硬化形成を促進した原因を説明できる。一方、小腸において、*Ldlr*^{-/-} *Creb3l3*^{-/-} マウスで形態的な異常は見られなかつたが、明らかな脂質の蓄積が見られた。このことからも腸管における CREB3L3 が脂質代謝に何らかの影響を与えることが示された。

逆に CREB3L3 を肝臓で過剰発現したマウス (TgCREB3L3) と *Ldlr*^{-/-} マウスとを交配し、*Ldlr*^{-/-} TgCREB3L3 マウスを作成し、動脈硬化誘発食を長期間(11 週間)負荷した。動脈硬化病巣を評価すると *Ldlr*^{-/-} *Creb3l3*^{-/-} マウスとは逆に脂質の蓄積

が抑制され、動脈硬化の形成が抑制されていた。また、血中トリグリセライドおよびコレステロールは負荷期間を通じて *Ldlr^{-/-}TgCREB3L3* マウスでコントロールマウスと比較し、低値を示した。また、血中 FGF21 濃度は著しい高値を示した。以上の結果から、CREB3L3 が血中脂質を低下させ、動脈硬化を改善する因子であることが示された。

CREB3L3 による脂質代謝制御機構

動脈硬化誘発食を負荷する前の *Ldlr^{-/-}Creb3l3^{-/-}* マウスではすでに絶食時、摂食時において血中トリグリセライド、コレステロールが *Ldlr^{-/-}* マウスと比べ著しい高値を示していた。HPLC 解析では血中カイロミクロン(CM)、VLDL、LDL の分画がトリグリセライドとともにコレステロールでも増加し、絶食時においては HDL-コレステロールが低下していた。VLDL 分画に含まれる ApoB100、ApoB48 も顕著に増加していた。想定通り、VLDL 合成能を測定したところ、*Ldlr^{-/-}Creb3l3^{-/-}* マウスでは VLDL 産生能が増加していた。遊離脂肪酸は *Ldlr^{-/-}Creb3l3^{-/-}* マウスで増加し、血中 FGF21 は動脈硬化誘発食負荷時と同様に絶食時に低下した。

動脈硬化形成における遺伝子発現に対する CREB3L3 の影響

上記の条件において肝臓の遺伝子発現を検討した。正常マウスでの以前の報告と同様に、脂肪酸酸化に関わる PPAR α とその下流遺伝子 Cpt1a は顕著に低下し、CREB3L3 と PPAR α の標的である Fgf21 も低下した。LPL 活性のモジュレーターである ApoA4、ApoC2、ApoC3 は LPL 活性が低下するような発現パターンを示した。脂肪酸・コレステロール合成を司る転写因子 SREBP1 および SREBP2 の発現は上昇していたが、その変化の割に SREBP の標的遺伝子の発現の増加は大きかった。SREBP1 および SREBP2 の未成熟型、活性型の蛋白量を測定すると、活性型である核分画蛋白の量が *Ldlr^{-/-}Creb3l3^{-/-}* マウスで増加していた。mRNA レベルとタンパクレベルでの量の相違が見られたが、標的遺伝子の発現上昇は SREBP 活性型タンパクの増加に起因することが明らかとなった。

【考 察】

CREB3L3 は LPL 活性を制御するアボリポプロテインの発現を制御し、血中 LPL 活性を増強させることができた。結果として血中トリグリセライドを低下させる。しかしながら、血中コレステロールには影響を与えないことも報告されている (Lee et al., 2011)。本課題では CREB3L3 が脂質代謝を変えることで動脈硬化病態を変化させると想定し、動脈硬化モデルマウス (*Ldlr^{-/-}* マウス) と CREB3L3 遺伝子改変マウスを交配し解析を行った。

Ldlr^{-/-}Creb3l3^{-/-} マウスでは以前の正常マウスでの解析 (Lee et al., 2011) と同様に血中トリグリセライドが LPL 活性の低下によるものと、肝臓から VLDL 分泌の増加によるものにより、著しく増加した。また、FGF21 の肝臓での発現低下による血中濃度の低下もこの効果を助長していると考えられる。また、肝臓で脂肪酸合成に関わる遺伝子群の発現の増加もまた、一因である。血中コレステロールの増加については肝臓での HMGCS および HMGCR といったコレステロール合成遺伝子群の発現の上昇が原因と考えられる。肝臓での脂肪酸・コレステロール合成系遺伝子の一連の発現上昇では上流に位置する SREBP1 および SREBP2 の発現は増加していないにも関わらず、タンパクレベルでは SREBP1、SREBP2 の活性型タンパク量は増加していた。CREB3L3 と SREBP はともに膜結合型タンパクであり、同じ切断酵素により膜貫通領域が切断され活性型となる。*Ldlr^{-/-}Creb3l3^{-/-}* マウスでは CREB3L3 の欠損により CREB3L3 と SREBP の間にあるバランスが崩れ、SREBP の切断プロセスが進行したと想定される。その結果、活性型タンパクの増加とそれに伴う標的遺伝子の発現上昇が血中脂質の増加を引き起こし、動脈硬化形成を進展させた。

本課題で血中脂質の恒常性に CREB3L3 が中心的な働きをし、生活習慣病の最終像である動脈硬化の発症進展に大きく寄与することを明らかにした。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

CREB3L3 はすでに脂質異常症の治療薬フィブラーの標的遺伝子 PPAR α と相互作用することを見出しており (Yang et al., 2013)、新たな脂質異常症治療への応用が目指せる。本課題で新たに CREB3L3 が血中コレステロール濃度を調節しうる因子であることを示した。また、動脈硬化の発症・進展においても CREB3L3 が重要な因子であり、しかも、その分子メカニズム

は脂肪酸・コレステロール合成を司る SREBP との相互作用が CREB3L3 にあり、CREB3L3 が SREBP の活性を抑制するものである。このことからも SREBP-CREB3L3 の相互作用を基にした新たな脂質代謝制御機能を標的とする治療薬の開発が考えられる。

【参考・引用文献】

- Lee, J.H., Giannikopoulos, P., Duncan, S.A., Wang, J., Johansen, C.T., Brown, J.D., Plutzky, J., Hegele, R.A., Glimcher, L.H., and Lee, A.H. (2011). The transcription factor cyclic AMP-responsive element-binding protein H regulates triglyceride metabolism. *Nature medicine* 17, 812-815.
- Nakagawa, Y., Satoh, A., Yabe, S., Furusawa, M., Tokushige, N., Tezuka, H., Mikami, M., Iwata, W., Shingyouchi, A., Matsuzaka, T., et al. (2014). Hepatic CREB3L3 Controls Whole-Body Energy Homeostasis and Improves Obesity and Diabetes. *Endocrinology* 155, 4706-4719.
- Yang, H., Wang, H., Shivalila, C.S., Cheng, A.W., Shi, L., and Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 154, 1370-1379.