

フィブラート系薬剤が標的とする新たな脂質代謝因子の同定と その生理的意義の検討

筑波大学大学院 人間総合科学研究科 診断生化学
中川 嘉

1. はじめに

欧米先進各国では、メタボリックシンドローム患者の増加が深刻な社会問題となっている。日本でも、食生活の欧米化に伴い欧米同様、生活習慣病患者が急速に増加している。生活習慣病患者の増大は医療費の増加といった社会的な問題とともに、患者自身のQOLの低下を引き起こし、個人のみならず、社会全体にとっても大きな問題となっている。生活習慣病の発症の原因としては、食生活の欧米化、老化、運動不足、生活におけるストレスである。しかし、現在の治療法ではライフスタイルを変えずに治療をすることができない。そのため、現在までに行われている治療以外に新たなライフスタイルを変えない治療法の確立が必要である。

我々は新たに食事摂取に伴う生体でのアミノ酸、脂肪酸、糖の変化が転写因子を介した遺伝子発現制御をどのように制御しているかを明らかにしていくための研究を行っている。新たな生活習慣病の治療標的として膜結合型転写因子であるCREBHに着目している。CREBHは我々が現在まで研究を行っているSREBPと同じ構造、同じ活性化機構を持つ。しかし、活性化される条件が異なる¹。CREBHは栄養欠乏時、SREBPは栄養過多時に活性が上昇するという相反する興味深い機構を持つ。CREBHはエネルギー代謝調節の責任臓器である肝臓に発現が限局¹することから、CREBHがエネルギー代謝、生活習慣病に関連があることが推測される。CREBHの機能としては、血糖値、インスリン値の低下とともに血中脂質の低下が引き起こされる。さらにCREBHの標的の一つとして生活習慣病改善因子FGF21の発現を上昇させるデータをすでに得ている(未発表)。FGF21は絶食時、CREBHと同様に発現が上昇し、生活習慣病を改善する機能を有すること、また、食欲などの行動性の低下が報告されている^{2,4}。それら効果からCREBHが生活習慣病の改善に寄与する可能性がある。FGF21はPPARαにより発現が上昇することから、PPARαアゴニストであるフェノフィブラートもFGF21の発現を上昇させる^{2,3}。

本研究ではCREBHが有するFGF21による生活習慣病の改善機能とPPARαとの関連性を明らかにすることで、フェノフィブラートの新たな作用メカニズムを解明する。このことからフェノフィブラートを起点とした新たな治療薬開発への応用につなげることを目的とした。

2. 方法

肝臓細胞(AML12)やマウスを用い、PPARαアゴニストであるフェノフィブラートがCREBHの発現にどのような影響を与えるか、ノーザンブロットイングやリアルタイムPCRで検討した。CREBHがPPARαの活性化に影響があるかをCREBHノックダウン(CREBH RNAi)アデノウイルス作成し、細胞やマウスへ導入する。その後、フェノフィブラートを投与することによるPPARαの活性化を遺伝子発現や血中FGF21濃度を測定することで評価した。

3. 結果

a. 細胞レベルでの解析

CREBHの発現は絶食時に発現が高いことから、CREBHの発現が脂肪酸に依存する可能性を想定し検討した。細胞レベルでの検討で各種脂肪酸(パルミチン酸、オレイン酸、エイコサペンタエン酸)を細胞に添加しCREBHの発現を検討したところ、これら脂肪酸によりその発現は上昇した。これら脂肪酸をリガンドとする転写因子PPAR α がCREBHの発現を直接的に制御するかをさらに検討した。PPAR α の活性化剤であるフィブラートを添加するとやはりCREBHの発現は細胞レベルで上昇した。CREBHのプロモーターを使い解析を進めたところとPPAR α が直接CREBHプロモーターに結合しその発現を上昇させる結果を得た。CREBHプロモーター上にPPAR α の結合配列PPREがあることを見出し、そこにPPAR α が結合し転写活性を調節していることをLuc assay, Gel shift assayさらにin vivo ChIP assayの実験方法から明らかにした⁵。

b. マウスにおける解析

CREBH過剰発現アデノウイルスを作成し、正常マウスへ投与するとPPAR α の標的遺伝子であるFGF21の発現と血中濃度の顕著な上昇が観察された。その際、PPAR α 自身の発現も上昇していた。

そこで、CREBH RNAiアデノウイルスを作成し、マウスへ投与した。その後、PPAR α アゴニストであるフェノフィブレードを投与した。GFPコントロールアデノウイルス(GFP)ではフェノフィブレードによるPPAR α およびFGF21の発現は顕著に増加するのに対し、CREBH RNAiではPPAR α 自身の発現も低下しており、それに伴いFGF21の発現も同様に低下した。このことは上記の細胞での解析と矛盾する結果である。つまり、PPAR α がCREBHの発現を誘導するだけでなく、CREBHが逆にPPAR α の発現を誘導するというお互いがお互いを制御しあう形を取っていること示している。このことを確かめるため、細胞レベルでPPAR α のプロモーター解析を行ったところ、CREBHはPPAR α のプロモーター活性を直接、上昇させており、PPAR α がCREBHの標的遺伝子であることが明らかとなった。

4. まとめ

CREBHの標的遺伝子として生活習慣病を改善するという肝臓からの分泌タンパクFGF21を見出した。糖尿病モデルマウスを使った実験からCREBHがFGF21を介し生活習慣病を改善させることが明らかとなっているが、CREBHの活性を制御する上流因子は今だ明らかとなっていない。本研究からPPAR α アゴニストであるフェノフィブレードがCREBHの発現を上昇させる因子であることを同定し、PPAR α がCREBHを上昇させる直接的な転写因子であることが明らかとなった⁵。さらにCREBHをRNAiで欠損させたマウスの肝臓ではフェノフィブレードによるPPAR α の活性化が抑制されており、PPAR α がCREBHを活性化させる結果と逆の結果となった。CREBH欠損時にはPPAR α の発現自体がほぼ完全に抑制されており、CREBHがPPAR α の発現を制御していることになる。つまり、それぞれがお互いの発現を直接制御するオートループを形成していることになる。

PPAR α の活性化剤であるフェノフィブレードは脂質異常症の治療薬としてすでに使用されており、このPPAR α とCREBHが作る活性化機構が新たに発見されたことは、フェノフィブレードで治療効果の新たなメカニズムとして、フェノフィブレードによるPPAR α の活性化がCREBHの発現を上昇させ、さらに上昇したCREBHはPPAR α の発現をさらに上昇させるオートループを形成しお互いの機能を増強し合っていること

が推測される。どちらか活性を増強すれば全体の活性は増強される。したがって、フェノフィブラートで効果が弱い患者に対し、CREBHの活性化剤を投与することでフェノフィブラートと同様の効果が得られることが予想される。このオートループを増強する新たな薬剤の開発が既存の治療薬よりも効果的な治療薬となりえると考ええる。

5. 発表論文

Danno H, Ishii KA, Nakagawa Y, Mikami M, Yamamoto T, Yabe S, Furusawa M, Kumadaki S, Watanabe K, Shimizu H, Matsuzaka T, Kobayashi K, Takahashi A, Yatoh S, Suzuki H, Yamada N, Shimano H.

The liver-enriched transcription factor CREBH is nutritionally regulated and activated by fatty acids and PPARalpha.

Biochem Biophys Res Commun. 2010;391(2):1222-7.

参考文献

- 1 Omori, Y. *et al.* CREB-H: a novel mammalian transcription factor belonging to the CREB/ATF family and functioning via the box-B element with a liver-specific expression. *Nucleic Acids Res* **29**, 2154-2162 (2001).
- 2 Badman, M. K. *et al.* Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab* **5**, 426-437,(2007).
- 3 Inagaki, T. *et al.* Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab* **5**, 415-425 (2007).
- 4 Kharitononkov, A. *et al.* FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest* **115**, 1627-1635 (2005).
- 5 Danno, H. *et al.* The liver-enriched transcription factor CREBH is nutritionally regulated and activated by fatty acids and PPARalpha. *Biochem Biophys Res Commun* **391**, 1222-1227 (2010).