

核内受容体およびその標的タンパクの機能解析

核内受容体の機能解析（課題番号：147015）

研究期間：平成 26 年 7 月 29 日～平成 29 年 3 月 31 日

研究代表者：松末公彦 研究員：本田伸一郎

【研究背景・目的】

核内受容体である liver X receptor (LXR) は転写因子として核内で機能しており、リガンドの結合により活性化され、その標的遺伝子群の発現を促進する(1)。LXR標的遺伝子は脂質代謝に関連するものが多く、特に *sterol regulatory element-binding protein-1c* (*Srebp-1c*) 及び *carbohydrate responsive element binding protein* (*ChREBP*) 遺伝子は、LXRによる脂質代謝制御に重要な役割を果たす。*Srebp-1c* 及び *ChREBP* は転写因子であり、2型糖尿病や肥満などに併発する脂肪肝において、*fatty acid synthase* (*Fas*) あるいは *acetyl-CoA carboxylase* (*Acc*) などの脂質合成に必須な遺伝子の発現を促し、肝臓の脂質合成を促進することでトリグリセリド (TG) の蓄積を促している(2)。事実、LXRリガンド T0901317 による LXR- *Srebp-1c*・*ChREBP* シグナルの活性化は、肝臓の TG レベルの増加に伴う脂肪肝の発症・悪化をもたらした(3)。

我々は、2型糖尿病モデルマウスで重篤な脂肪肝を発症している *ob/ob* マウスの脂肪肝から *fat specific protein 27* (*Fsp27*) 遺伝子の単離に成功し、本遺伝子は脂肪肝において核内受容体である peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) により直接的に制御されていることを見出した(4)。*Fsp27* 遺伝子の発現は、脂肪肝を発症していない通常のマウス正常肝では認められず、*ob/ob* マウスの脂肪肝でのみ認められた。さらに *Fsp27* をマウス初代肝細胞に強制発現させることにより、細胞内 TG レベル及び脂肪滴の増加が認められた(4)。

本研究の作業仮説は、活性化 LXR による脂肪肝発症・悪化には、我々により単離された *Fsp27* が関与しているというものである。それゆえ、本研究では *Fsp27* 遺伝子が LXR により発現制御されるのか否かを解明することを目的とした。

【結果】

1. 活性化 LXR は、肝臓において *Fsp27 α* 及び *Fsp27 β* 遺伝子の発現を促進する。

Fsp27 遺伝子発現における LXR の影響を確かめるため、LXR リガンド T0901317 をマウスに投与し、肝臓における *Fsp27* 遺伝子の発現を確かめた。近年、*Fsp27* には 2 つのアイソフォーム *Fsp27 α* 及び *Fsp27 β* の存在が報告されている(5)。それゆえ、本研究では両アイソフォームの mRNA を、それぞれ特異的なプライマーにより区別して定量した。マウス正常肝臓 (Normal) において、*Fsp27 α* の発現は、T0901317 投与によりおよそ 3.5 倍の上昇を認め、*ob/ob* マウス脂肪肝 (*ob/ob*) においてはおよそ 6.5 倍の上昇を認めた (Fig. 1A)。同様の傾向は *Fsp27 β* においても認められ、T0901317 投与により正常肝でおよそ 6.0 倍、*ob/ob* 脂肪肝で 9.0 倍の誘導が認められた (Fig. 1B)。この条件下、両マウスの肝臓における LXR α の発現は、T0901317 投与により若干の低下が認められた (Fig. 1C)。

LXR は脂質合成に関わる一連の遺伝子 *Srebp-1c*、*Fas*、*Scd1* 及び *glycerol-3-phosphate acyltransferase* (*Gpat*) の発現を正に制御している(2)。これらの遺伝子の発現は、*Fsp27 α* 及び *Fsp27 β* 遺伝子と同様に T0901317 投与により、いずれも両マウス肝臓において著しく上昇した (Fig. 1D-G)。

Ob/ob マウスの脂肪肝における *Fsp27 α* 遺伝子は、PPAR γ の標的伝子であることが報告されている(4)。そこで両マウス肝臓において、T0901317 投与による PPAR γ mRNA への影響を確かめたところ、T0901317 投与は両マウス肝臓における PPAR γ の発現には影響しなかった (Fig. 1H)。

2. 活性化LXRは、LXRE-1及びLXRE-3を介して*Fsp27* α 及び*Fsp27* β 遺伝子の発現を促進する。

Figure1の結果より、肝臓における*Fsp27* α 及び*Fsp27* β の発現は、LXRリガンドT0901317投与により著しく上昇した。よって、次に*Fsp27* α 及び*Fsp27* β 遺伝子の5'上流域を解析し、LXR応答配列(LXRE)の同定を試みた。はじめに両*Fsp27*遺伝子の上流域をデータベースにより解析したところ、推定上の3つのLXRE(LXRE-1, LXRE-2及びLXRE-3)を見出した(Fig. 2 left panels)。次にこれらのLXREが機能しているか否か確かめるために、*Fsp27* α 及び*Fsp27* β 遺伝子の5'上流域を段階的に欠損させたルシフェラーゼレポータープラスミドによるプロモーター活性を測定した(Fig. 2 right panels)。*Fsp27* α の転写開始点(+1)から-1698bpまでを含むA1プラスミドにおいて、T0901317処理下、LXR α 発現細胞の活性は、非LXR α 発現細胞に比べおよそ7.0倍に誘導された(Fig. 2A, A1)。しかしながら、LXRE-1を欠くA2からA4プラスミドにおいて、LXR α 発現細胞の活性誘導はコントロールに比べおよそ60%まで低下した(Fig. 2A, A2-4)。さらにLXRE-3を欠くA4-4プラスミドでは、LXR α 依存的なプロモーター活性誘導が完全に消失した(Fig. 2A, A4-4)。

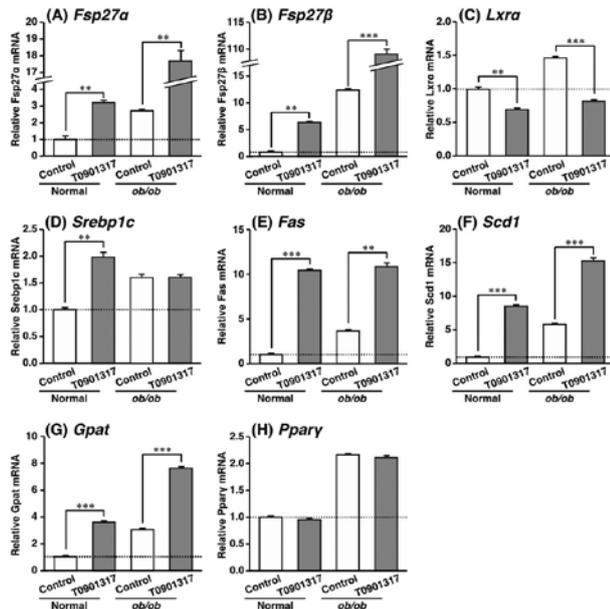


Figure 1. LXR ligand, T0901317 increases the expressions levels of *Fsp27* α and *Fsp27* β genes in the normal and *ob/ob* mouse livers. QPCR analyses of (A) *Fsp27* α , (B) *Fsp27* β , (C) *Lxr* α , (D) *Srebp1c*, (E) *Fas*, (F) *Scd1*, (G) *Gpat* and (H) *Ppar* γ mRNAs were performed using liver samples from T0901317-treated normal and *ob/ob* mice. Gene expression was normalized to 36B4 mRNA. Each bar represents the average \pm S.E.M. of 4 individual experiments. Normal, normal genetic background mice; *ob/ob*, leptin-deficient mice; Control, no T0901317 treatment. Significant differences from normal mice with Control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

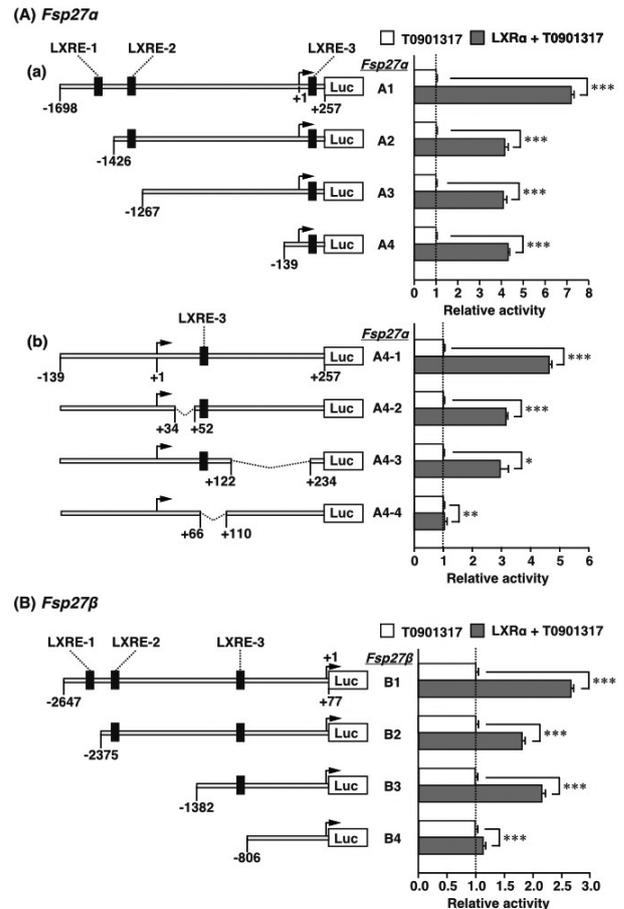


Figure 2. Induction of the promoter activity of *Fsp27* α and *Fsp27* β genes by T0901317 depends on two putative LXREs. (A) (a) Serially deleted *Fsp27* α A1-A4 and (b) internal deleted *Fsp27* α A4-1-4 reporter plasmids were transfected into HEK293FT cells with or without LXR α or RXR α expression plasmid. (B) Serially deleted *Fsp27* β B1-B4 reporter plasmids were transfected into HEK293FT cells with or without LXR α or RXR α expression plasmid. Each bar represents the average \pm S.E.M. of 3 individual experiments. Significant differences from without LXR α expression plasmid: * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

Fsp27 β の転写開始点(+1)から-2647bpまでを含むB1プラスミドにおいて、T0901317処理下、LXR α 発現細胞の活性は、非LXR α 発現細胞のおよそ2.5倍に誘導された(Fig. 2A, B1)。しかしながら、LXR α 発現細胞の活性誘導はLXRE-1を欠くB2プラスミドにおいて、コントロールに比べおよそ60%まで低下(Fig. 2B, B2 and B3)、LXRE-3を欠くB4プラスミドにおいてはほぼ消失した(Fig. 2B, B4)。

3. LXRは、*in vivo*脂肪肝においてもLXRE-1及びLXRE-3と相互作用する。

レポータープラスミドによる検討により、3つの推定上のLXREのうちLXRE-1及びLXRE-3は、T0901317処理による*Fsp27* α 及び*Fsp27* β 遺伝子発現の上昇に寄与していることが示唆された。それゆえ、LXRE-1及び

LXRE-3に対してLXRが直接的に結合できるか否か、Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) により確かめた。LXRE-1あるいはLXRE-3をプローブとして使用した結果、*in vitro*合成されたLXR α は、LXRE-1及びLXRE-3に直接的に結合した (data not shown)。さらに、T0901317処理*ob/ob*マウスの脂肪肝におけるLXR α は、*in vivo*条件下でLXRE-1及びLXRE-3に相互作用しているか、chromatin immunoprecipitation assay (ChIP) により確かめた。この結果、脂肪肝におけるLXR α は、確かにLXRE-1及びLXRE-3に相互作用していることを証明できた (data not shown)。

【考察】

本研究の成果により、脂肪肝の発症・悪化に寄与するLXRの標的遺伝子として、新たに*Fsp27a*及び*Fsp27b*遺伝子を同定した。これまでLXRによる脂肪肝発症・悪化は、従来からLXR標的遺伝子として知られていた脂質合成関連遺伝子*Srebp-1c*, *Fas*, *Scd1*及び*Gpat*等の発現上昇を介して、脂質合成を促すことに起因すると考えられてきた(6)。*Fsp27a*及び*Fsp27b*は、細胞内脂肪滴の膜に局在することで脂肪滴間の融合を促進する。その結果、脂肪滴の肥大化を助長し、細胞内TGの蓄積を促す(7)。それゆえ、本研究の結果はLXRシグナルの下流に*Fsp27a/b*が存在していることを示し、LXRによる脂肪肝の悪化が脂質合成の促進のみならず、*Fsp27a/b*を介したTG蓄積も関与していることを示唆するものである (Fig. 3)。

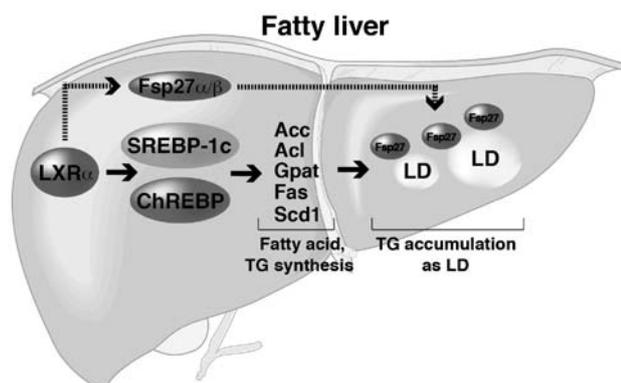


Figure 3. Schematic diagram illustrating the implication of hepatic fat accumulation through LXR α -Fsp27 pathway. It is likely that LXRs can promote not only the TG synthesis by lipogenic enzymes, but also effective TG accumulation through *Fsp27a* and *Fsp27b*.

今日、非アルコール性脂肪肝から、肝硬変及び肝ガンを併発する非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) への悪性化が危惧されている。現状ではNASHの治療法は確定しておらず、前病変である非アルコール性脂肪肝を改善することが効果的である。それゆえ、肝臓の脂肪蓄積メカ

ニズムに関する本研究は、NASHの治療あるいはその創薬の開発に対して重要な意義を持つと思われる。

【引用文献】

1. Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schutz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon, and R. M. Evans. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**: 835-839.
2. Baranowski, M. 2008. Biological role of liver X receptors. *J. Physiol. Pharmacol.* 31-55.
3. Matsusue, K., D. Aibara, R. Hayafuchi, K. Matsuo, S. Takiguchi, F. J. Gonzalez, and S. Yamano. 2014. Hepatic PPAR γ and LXR α independently regulate lipid accumulation in the livers of genetically obese mice. *FEBS Lett.* 2277-2281.
4. Matsusue, K., T. Kusakabe, T. Noguchi, S. Takiguchi, T. Suzuki, S. Yamano, and F. J. Gonzalez. 2008. Hepatic steatosis in leptin-deficient mice is promoted by the PPAR γ target gene *Fsp27*. *Cell Metab.* **7**: 302-311.
5. Xu, X., J. G. Park, J. S. So, and A. H. Lee. 2015. Transcriptional activation of *Fsp27* by the liver-enriched transcription factor CREBH promotes lipid droplet growth and hepatic steatosis. *Hepatology* **61**: 857-869.
6. Oosterveer, M. H., A. Grefhorst, A. K. Groen, and F. Kuipers. 2010. The liver X receptor: Control of cellular lipid homeostasis and beyond. *Prog. Lipid Res.* 343-352.
7. Sun, Z., J. Gong, H. Wu, W. Xu, L. Wu, D. Xu, J. Gao, J.-w. Wu, H. Yang, M. Yang, and P. Li. 2013. Perilipin1 promotes unilocular lipid droplet formation through the activation of *Fsp27* in adipocytes. *Nat. Commun.* 1594.

【研究業績】

1. Matsuo, K., K. Matsusue, D. Aibara, S. Takiguchi, F. J. Gonzalez, and S. Yamano. 2017. Insulin represses fasting-induced expression of hepatic fat-specific protein 27. *Biol. Pharm. Bull.*, **40**: 888-893.
2. 松末公彦(共著), 2015. 疾患モデルの作製と利用－脂質代謝異常と関連疾患(上巻)第15節 FSP27. 株式会社エル・アイ・シー: 270-278.
3. Xu, M. J., Y. Cai, H. Wang, J. Altamirano, B. Chang, A. Bertola, G. Odena, J. Lu, N. Tanaka, K. Matsusue, T. Matsubara, P. Mukhopadhyay, S. Kimura, P. Pacher,

- F. J. Gonzalez, R. Bataller, and B. Gao. 2015. Fat-Specific Protein 27/CIDEA Promotes Development of Alcoholic Steatohepatitis in Mice and Humans. *Gastroenterology* 149: 1030-1041.
4. Takiguchi, S., N. Korenaga, K. Inoue, E. Sugi, Y. Kataoka, K. Matsusue, K. Futagami, Y.-J. Li, T. Kukita, N. Teramoto, and H. Iguchi. 2014. Involvement of CXCL14 in osteolytic bone metastasis from lung cancer. *Int. J. Oncol.* 44: 1316-1324.
5. Matsusue, K., D. Aibara, R. Hayafuchi, K. Matsuo, S. Takiguchi, F. J. Gonzalez, and S. Yamano. 2014. Hepatic PPAR γ and LXR α independently regulate lipid accumulation in the livers of genetically obese mice. *FEBS lett.* 588: 2277-2281.
6. Uchiyama, H., Hiromura, M., Shiratani, T., Kuroki, H., Honda, S., Kosako, K., Soeda, S., Inoue, K., and Toda, A. 2015. Effect of adenosine system in the action of oseltamivir on behavior in mice. *Neurosci Lett.*, 599: 7-11.
7. Kurokawa, J., Sasano, T., Kodama, M., Li, M., Ebana, Y., Harada, N., Honda, S., Nakaya, H., Furukawa, T. 2015. Aromatase knockout mice reveal an impact of estrogen on drug-induced alternation of murine electrocardiography parameters, *J. Toxicol. Sci.*, 40: 339-348.