

令和元年6月14日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09363

研究課題名(和文) 新規な脂肪肝増悪因子GOS2蛋白によるインスリン抵抗性発症機序の解明

研究課題名(英文) GOS2 in liver regulates insulin sensitivity

研究代表者

佐藤 博亮 (SATO, HIROAKI)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：20323595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：GOS2蛋白はATGLを抑制する作用が報告され、脂質代謝における調節因子の一つとして注目されている。本研究ではアデノウイルスでGOS2蛋白を肝臓に過剰発現させ、GOS2蛋白が肝臓でのインスリン感受性や線維化に及ぼす影響及び作用機序について検討した。肝臓でのGOS2過剰発現により、肝臓でのみインスリン抵抗性が増悪した。組織学的評価ではGOS2過剰発現により2.5倍の脂肪沈着増加を認め、脂肪肝の悪化を認めたが、線維化が有意に抑制された。以上の結果より、肝臓でのGOS2蛋白の過剰発現は、脂肪肝を増悪させ、肝臓でのインスリン抵抗性を増悪させる一方で、肝臓での線維化を抑制することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、肝臓でのGOS2蛋白発現が脂肪肝の進展に関与し、肝臓でのインスリン抵抗性の増悪因子としての役割を果たすことを明らかにした。本研究の成果により、肝臓におけるGOS2蛋白と脂肪肝・インスリン抵抗性との関連が解明され、インスリン抵抗性の新たな発症機序の解明につながると期待される。さらに今後ますます重要と考えられるインスリン抵抗性の治療薬の開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of hepatic GOS2 on insulin sensitivity in male Wistar rats receiving a normal chow diet (NCD) or a high-fat diet (HFD). In the HFD-fed rats, during the clamp study, the glucose infusion rate required for euglycemia significantly decreased by 16% in the Ad-GOS2 group compared with the Ad-GFP group. The insulin-suppressed hepatic glucose output significantly increased in the Ad-GOS2 group. Moreover, Oil Red O-staining indicated that overexpression of GOS2 protein in the liver promoted hepatic steatosis by 2.5-fold in the HFD-fed rats. However, Masson's trichrome staining revealed that overexpression of GOS2 significantly ameliorated fibrosis in the livers of the HFD-fed rats. Consistent with histological data, the expression of TGF- β and Smad2 were significantly decreased in livers of the HFD-fed rats. These results indicate that hepatic GOS2 protein might promote hepatic insulin resistance by exacerbating hepatic steatosis, but ameliorating hepatic fibrosis.

研究分野：消化器内科

キーワード：脂肪肝 インスリン抵抗性 糖尿病 GOS2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国の2型糖尿病患者は、食生活の欧米化及び運動量の低下というライフスタイルの変化に伴い、ここ数年、増加の一途を示し、医療上の問題のみにとどまらず、社会的な問題となっている。糖尿病治療における最大の問題は慢性合併症の発症・進展を如何に抑制するかである。これまでの数々の大規模臨床試験により、心筋梗塞などの大血管障害の発症・進展にはインスリン抵抗性が密接に関与していることが報告されている。さらにインスリン抵抗性は、2型糖尿病ばかりでなく、高血圧、脂質異常症などのメタボリック・シンドロームの原因となることや閉経後の女性に増加することも広く知られており、糖尿病の病態において中心的意義を持つインスリン抵抗性をいかに改善させるかが、21世紀の糖尿病治療戦略にとって重要な問題であると考えられる。

近年、肝臓における脂肪蓄積、すなわち脂肪肝や非アルコール性脂肪性肝炎が、インスリン抵抗性の増悪要因として注目されている。肝臓はインスリンの主要な作用臓器の一つであり糖代謝において重要な役割を果たすことが知られている。しかしながら、脂肪肝や非アルコール性脂肪性肝炎とインスリン抵抗性の発症機序との関係に関しては、多岐に渡る点が多く、まだ十分に解明されていない。

一方、脂肪分解酵素の一つである adipose triglyceride lipase (ATGL) の低下が脂肪肝発症に関与すること、また、心筋においても ATGL が脂肪蓄積に関与することが報告され、ATGL が脂肪肝や非アルコール性肝炎の発症に重要な役割を果たしていると考えられる。

最近、G₀/G₁ switch gene 2 (G0S2) 蛋白がATGLの特異的な抑制因子であることが発見された。この報告以前は、G0S2蛋白は、脂肪組織や肝臓において発現していることが知られていたが、どのような働きをするかは不明であった。しかし、ATGLの特異的な抑制因子であることが明らかになったことにより、G0S2蛋白は、肝臓において脂肪肝や非アルコール性肝炎の発症、さらにインスリン抵抗性の発症に深く関与している可能性が推測される。

2. 研究の目的

本研究ではアデノウイルスを用いて G0S2 蛋白を肝臓で過剰発現させ、G0S2 蛋白が肝臓でのインスリン感受性や線維化に及ぼす影響および作用機序について検討した。

3. 研究の方法

6週齢、雄、Wistar ラットを通常餌もしくは高脂肪餌 (60%) で3週間飼育後、G0S2 蛋白を過剰発現するアデノウイルス(Ad-G0S2)もしくはコントロールウイルス(Ad-GFP)を投与した。1) 通常餌 + Ad-GFP 群、2) 通常餌 + Ad-G0S2 群、3) 高脂肪餌 + Ad-GFP 群、4) 高脂肪餌 + Ad-G0S2 群の4群について、アデノウイルス投与1週間後に、0.5 g/kg 経静脈的ブドウ糖負荷試験と高インスリン正常血糖クランプ検査にて、耐糖能及びインスリン感受性を評価した。高インスリン正常血糖クランプ検査後に採取した肝臓、骨格筋、脂肪組織を用いて、インスリンシグナルをウエスタンブロット解析および RT-PCR 解析にて検討した。肝臓組織に対しては Oil Red O 染色法、Masson's Trichrome 染色法を行い、肝臓での脂肪沈着および線維化を評価した。

4. 研究成果

我々は、まず、ウエスタンブロット分析により、コントロールラットの肝臓、骨格筋、および白色脂肪組織における G0S2 蛋白の発現を調べた。肝臓および白色脂肪組織において高脂肪餌を投与したラットの G0S2 蛋白レベルは、通常餌を投与したラットよりも有意に高かった。しかし、骨格筋中の G0S2 蛋白レベルは、通常餌を投与したラットと高脂肪餌を投与したラットとの間で有意な変化はなかった。Ad-G0S2 による G0S2 タンパク質発現を確認するために、Ad-G0S2 または Ad-GFP をヒト胚腎臓 (HEK) 293 細胞に感染させ、その細胞溶解物のウエスタンブロット分析を行った。G0S2 蛋白の発現は Ad-G0S2 に感染した細胞では検出されたが、Ad-GFP に感染した細胞では検出されなかったことより、Ad-G0S2 が細胞内で G0S2 タンパクを発現することを確認した。

次に Ad-G0S2 または Ad-GFP を投与したラットの肝臓を G0S2 抗体で免疫組織を行った。G0S2 蛋白は肝細胞の細胞質に局在していた。Ad-G0S2 を投与した肝組織の G0S2 蛋白発現レベルは、Ad-GFP を投与した肝組織よりも有意に高かった。

Ad-G0S2 投与群と Ad-GFP 投与群において、体重、肝臓重量、および食物摂取量に有意な差は認めなかったが、高脂肪餌負荷群ラットの体重および肝臓重量は通常餌群ラットと比較して有意に重かった。また、Ad-G0S2 投与群と Ad-GFP 投与群において、血糖値、インスリン値、インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR に有意な差は認めなかったが、高脂肪餌負荷群ラットの血糖値、インスリン値、HOMA-IR は、通常餌群ラットと比較して有意に高かった。

まず、静脈内投与ブドウ糖負荷試験 (ivGTT) を施行した。アデノウイルス投与7日後に、8時間絶食させ、ブドウ糖 (0.5 g/kg 体重) を頸静脈に注射したラットで ivGTT を施行した。通常餌群では、空腹時およびブドウ糖負荷後の血糖値は、Ad-G0S2 投与群と Ad-GFP 投与群との間に有意な差は認めなかった。さらに空腹時およびブドウ糖負荷後のインスリン値も Ad-G0S2 投与群と Ad-GFP 投与群との間に有意な差は認めなかった。一方、高脂肪餌負荷群では、Ad-G0S2 投与群と Ad-GFP 投与群との間に有意な差は認めなかったが、ブドウ糖負荷後15分および30分の血糖値は、Ad-G0S2 投与群で Ad-GFP 投与群と比較して有意に高かった。

(283.3 ± 11.4 vs 244.9 ± 10.7 mg / dl および 226.2 ± 9.4 vs 195.9 ± 8.7 mg / dl) が、空腹時およびブドウ糖負荷後のインスリン値も Ad-G0S2 投与群と Ad-GFP 投与群との間に有意な差は認めなかった。

次にインスリン感受性を評価するために正常血糖高インスリン血症クランプ検査を施行した。通常餌群では、Ad-G0S2 投与群は、Ad-GFP 投与群と比較して全身のインスリン感受性を示す Glucose Infusion Rate (GIR)、末梢組織でのインスリン感受性を示す Insulin-stimulated Glucose Disposal Rate (IS-GDR)、肝臓でのインスリン感受性を示す clamp Hepatic Glucose Output (cHGO) の有意な変化を認めなかった。一方、高脂肪餌負荷群では、Ad-G0S2 投与群は、Ad-GFP 投与群と比較して、GIR が約 15% 有意に減少し、全身のインスリン抵抗性の増悪を認めた。IS-GDR は、Ad-G0S2 投与群と Ad-GFP 投与群とに有意な差を認めなかったが、cHGO は、Ad-G0S2 投与群で Ad-GFP 投与群と比較して、約 30% 有意に増加し、肝臓でのインスリン抵抗性の悪化を認めた。

次に正常血糖高インスリン血症クランプ終了時にラットから肝臓、骨格筋および白色脂肪組織を採取し、ウエスタンブロット分析にてインスリンシグナル伝達系を検討した。インスリンシグナル伝達系で最も重要な分子である Akt (Ser473) のリン酸化を検討した。通常餌群では、肝臓、骨格筋、および白色脂肪組織の Akt リン酸化は、Ad-G0S2 投与群と Ad-GFP 投与群において有意な差は認めなかった。一方、高脂肪餌負荷群では、骨格筋および白色脂肪組織の Akt リン酸化は Ad-G0S2 投与群と Ad-GFP 投与群において有意な差は認めなかったが、肝臓の Akt リン酸化は、Ad-G0S2 投与群で、Ad-GFP 投与群と比較して、約 65% 有意に減少していた。これらの結果は、クランプ結果と一致していた。

肝臓の重量は、通常餌群では、Ad-G0S2 投与群は、Ad-GFP 投与群と比較して有意な差を認めなかった。一方、高脂肪餌負荷群では、Ad-G0S2 投与群は、Ad-GFP 投与群と比較して、肝臓の重量が有意に増加していた。次に肝臓の組織学的評価を行った。次に組織学的に肝臓を評価した。HE 染色では、通常餌群では、Ad-G0S2 投与群は、Ad-GFP 投与群と比較して有意な差を認めなかった。一方、高脂肪餌負荷群の Ad-G0S2 投与群では、脂肪肝の所見が目立っていた。さらに高脂肪餌負荷の Ad-G0S2 投与群では、高脂肪餌負荷の Ad-GFP 投与群と比較して、さらに脂肪肝の増悪が認められた。次にオイルレッド O 染色で脂肪蓄積を評価した。通常餌群では、Ad-G0S2 投与群は、Ad-GFP 投与群と比較して、肝臓内の脂肪沈着に有意な差を認めなかった。一方、高脂肪餌負荷群の Ad-G0S2 投与群では、肝臓内の脂肪沈着が有意に増加した。さらに高脂肪餌負荷の Ad-G0S2 投与群では、高脂肪餌負荷の Ad-GFP 投与群と比較して、肝臓内の脂肪沈着が約 2.5 倍有意に増加した。

次に肝臓の線維化を評価するためにマッソントリクローム染色を施行した。通常餌群では、Ad-G0S2 投与群は、Ad-GFP 投与群と比較して肝臓の線維化に有意な差を認めなかった。一方、高脂肪餌負荷群では、Ad-G0S2 投与群は Ad-GFP 投与群と比較して、肝臓の線維化が約 50% 有意に抑制されていた。さらに線維化に関与する遺伝子である TGF- β および Smad2 の発現をリアルタイム qRT-PCR 法にて解析した。それぞれの肝臓から RNA を抽出した。通常餌群では、Ad-G0S2 投与群は、Ad-GFP 投与群と比較して肝臓の TGF- β および Smad2 の mRNA の発現は有意な差を認めなかった。一方、高脂肪餌負荷群では、Ad-G0S2 投与群は Ad-GFP 投与群と比較して、肝臓の TGF- β および Smad2 の mRNA の発現は約 50% 有意に抑制されており、マッソントリクローム染色による評価と一致した。

以上の結果より、正常耐糖能状態では、肝臓での G0S2 蛋白の過剰発現はインスリン感受性に影響を及ぼさなかったが、高脂肪負荷によるインスリン抵抗性状態では、肝臓での G0S2 蛋白の過剰発現は、脂肪肝を増悪させ、肝臓でのインスリン抵抗性を増悪させることが明らかになった。一方で、高脂肪負荷によるインスリン抵抗性状態では、G0S2 蛋白の過剰発現は肝臓での線維化を抑制することが明らかになった。脂肪肝を伴ったインスリン抵抗性状態では、G0S2 がインスリン抵抗性の増悪因子となるが、肝臓での線維化は抑制する可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 26 件)

Moriya C, **Satoh H**: Teneligliptin Decreases Uric Acid Levels by Reducing Xanthine Dehydrogenase Expression in White Adipose Tissue of Male Wistar Rats. *J Diabetes Res* 2016:3201534, 2016. DOI: 10.1155/2016/3201534

Satoh H, Ohira T, Nagai M, Hosoya M, Sakai A, Watanabe T, Ohtsuru A, Kawasaki Y, Suzuki H, Takahashi A, Kobashi G, Ozasa K, Yasumura S, Yamashita S, Kamiya K, Abe M: Hypo-high-density Lipoprotein Cholesterolemia Caused by Evacuation after the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant Accident: Results from the Fukushima Health Management Survey. *Intern Med* 55:1967-1976, 2016. DOI: 10.2169/internalmedicine.55.6030

Satoh H, Ohira T, Moriya C, Inoue I, Kuribayashi S, Seino H, Hirai H, Hiyoshi T, Watada H, Group LCS: Effects of linagliptin vs. voglibose on daily glucose excursions during continuous glucose monitoring of Japanese type 2 diabetes patients (L-CGM): A randomized, open-label, two-arm, parallel comparative trial. *Diabetes Metab* 43:550-553, 2017. DOI: 10.1016/j.diabet.2017.07.010

Sugaya Y, **Satoh H**: Liver-specific G0 /G1 switch gene 2 (G0s2) expression promotes hepatic insulin resistance by exacerbating hepatic steatosis in male Wistar rats. *J Diabetes* 9:754-763, 2017. DOI: 10.1111/1753-0407.12482

Kudoh A, **Satoh H**, Hirai H, Watanabe T, Shimabukuro M: Preliminary Evidence for Adipocytokine Signals in Skeletal Muscle Glucose Uptake. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9:295, 2018. DOI: 10.3389/fendo.2018.00295

〔学会発表〕(計 35 件)

Moriya C, **Satoh H**. Teneligliptin decreases the uric acids levels by reducing xanthine dehydrogenase expression in White adipose tissue of the male Wistar rats. (568) 52nd Annual meeting of the European Association for the Study of Diabetes. Munich, Germany, 2016.09.13-16.

Satoh H, Ohira T, Moriya C, Inoue I, Kurabayashi S, Seino H, Hirai H, Hiyoshi T, Watada H. Effects of linagliptin on daily glucose excursion monitoring of Japanese type 2 diabetic patients (L-CGM study). (1181-P) 77th American Diabetes Association Scientific Sessions. San Diego, CA, USA, 2017.06.09-13.

Moriya C, **Satoh H**, Watada H. Febuxostat improves skeletal muscle insulin resistance via upregulating skeletal muscle PGC-1 α expression in high fat diet male Wistar rats. (480) 53rd Annual meeting of the European Association for the Study of Diabetes. Lisbon, Portugal, 2017.09.12-15.

Satoh H, Sugaya Y, Moriya C, Miyatsuka T, Watada H. Hepatic G0S2 Exacerbates Hepatic Insulin Resistance in Estrogen-Deficient Female Wistar Rats (1840-P) 78th American Diabetes Association Scientific Sessions. Orlando, FL, USA, 2018.06.22-26.

Waseda N, **Satoh H**, Yoshida C, Ikeda F, Kanazawa A, Watada H. Effects of SGLT2 Inhibitors on Insulin Secretion and Insulin Resistance: Results from a Cross-Sectional Study (1187-P) 78th American Diabetes Association Scientific Sessions. Orlando, FL, USA, 2018.06.22-26.

〔図書〕(計 6 件)

佐藤博亮, 綿田裕孝. 特集 炎症と臓器障害：尿酸と血糖の関与 『血糖による炎症の臓器障害』. 尿酸と血糖 Vol. 3, no. 3, 31-34 (159-162), 2017.

佐藤博亮, 綿田裕孝. 特集 高齢者の糖尿病治療の現在と未来—高齢者糖尿病の診療ガイドラインを踏まえて— Seminar6. 『高齢者糖尿病のメトホルミンと SGLT 阻害薬の使い方』 Geriatr. Med (老年医学), 55 (8): 895-900, 2017.

佐藤博亮. 特集 糖尿病治療の UPDATE 『糖尿病治療薬の効果と選択 ~ 糖尿病患者の病態に応じた薬物選択 ~』 CILINIC magazine No.584, Vol.2, 9-14, 2018.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。