

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16213

研究課題名(和文) 睡眠障害による肝脂肪蓄積を標的としたインスリン抵抗性の病態解明

研究課題名(英文) Mechanisms of hepatic steatosis and insulin resistance induced by sleep deprivation in mice

研究代表者

鳴山 文華 (SHIGIYAMA, Fumika)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：70808188

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウスのElov13遺伝子配列に特異的な siRNAと、negative controlのsiRNAとを用いて、肝臓におけるElov13の発現抑制が肝脂肪蓄積と耐糖能に与える影響をC57BL/6Jマウスを用いて検証していった。Elov13のsiRNAは投与後Elov13の発現抑制をコントロールと比較して有意に抑制することを確認した。肝臓における中性脂肪はElov13抑制群においてnegative control群と比較して有意に減少していた。両群で耐糖能を評価する腹腔内糖負荷試験を実施したところ、負荷後30分の血糖値がElov13抑制群で有意に低下しており耐糖能の改善が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果から、マウス肝臓においてElov13の発現を抑制することで睡眠障害により生じる肝脂肪蓄積が減少し耐糖能が改善することが明らかとなった。これまで、睡眠障害による糖代謝悪化のメカニズムについて、インスリン抵抗性の関与が示唆されてきたが、未解明の部分も多く具体的な介入法は確立されていなかった。睡眠障害により発症・増悪する2型糖尿病に対して、睡眠薬に頼らない、汎用性のある新規治療ターゲットとして、肝臓でのElov13の糖・脂質代謝への役割の一部が解明されたことで、ヒトの日常生活における睡眠障害による糖代謝異常への応用も見据えた効果的な治療法の確立に貢献しうると期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the effect of down-regulation of hepatic elov13 on hepatic lipid accumulation and glucose metabolism during sleep deprivation. In order to suppress the expression of elov13 in liver, elov13 specific siRNA was injected through tail vein to 13-weeks old C57BL/6J mice (elov13 group), and non-coding siRNA was injected to control mice (control group). After single 6 hours sleep deprivation in fasted and moving-restricted condition, hepatic triglyceride content was significantly reduced in elov13 group compared to control group( $P<0.01$ ). Although no significant difference was observed regarding hepatic gluconeogenesis assessed by pyruvate challenge test, the blood glucose level at 30 minutes in intraperitoneal glucose tolerance test was significantly lower in elov13 group( $P<0.05$ ). These data suggest that the suppression of elov13 may ameliorate the sleep deprivation induced hepatic steatosis, but its effects on glucose metabolism was limited.

研究分野：糖尿病・代謝・内分泌学

キーワード：2型糖尿病 睡眠障害 脂肪肝

### 1. 研究開始当初の背景

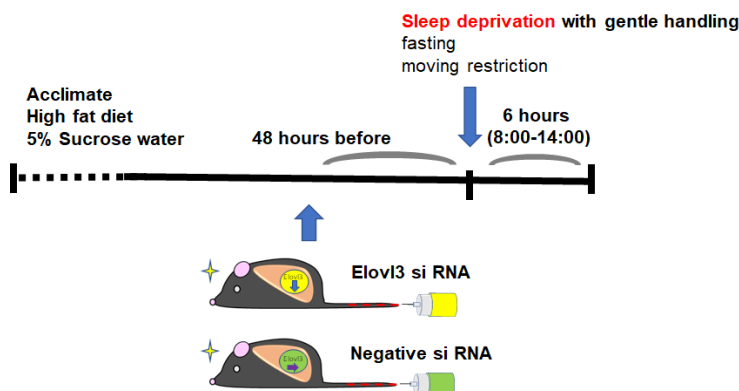
近年、食生活の欧米化、ストレス社会による、職場や家庭での様々な問題が人間の基本的な生活習慣(食事・運動・睡眠)を脅かし、生活習慣病と呼ばれる今までなかった病気が増加傾向にある。これまで、食事・運動習慣への介入については多くの検討がなされてきたが、睡眠については検討が不十分でいまだに十分な対策が行われていないのが現状である。国内外でのヒト及びげっ歯類での検討から、睡眠障害による代謝異常の病態に食欲増加、エネルギー消費の減少が関与していることが示唆されているが、インスリン標的臓器(肝臓・筋肉・脂肪組織)ごとの検討は十分に行われていなかった。我々は、ヒトでの解析が困難である、睡眠障害による糖・脂質代謝悪化の分子メカニズムに関して、遺伝子改変マウスを用いずに C57BL/6J 雄性マウスを用いて物理的な睡眠障害による検討を実施し、睡眠障害により脂肪合成の遺伝子の1つである **Elovl3(Elongation of very long chain fatty acid-like 3)**の発現が上昇し、肝脂肪蓄積とインスリン抵抗性が惹起されたことを明らかにした。(Shigiyama F, *et al. Am J Physiol Endocrinol Metab* 2018) Elovl3 は、概日リズムに強く関与しているとされ、睡眠障害により有意に変化し、脂肪合成に関与すると報告されている。(Anzulovich A, *et al. Journal of Lipid Research* 2006) また、Elovl3 の発現抑制は脂肪燃焼遺伝子である ABCD2 (ATP binding cassette subfamily D member 2) の発現亢進と関連することも報告されている。

### 2. 研究の目的

本研究ではこの **Elovl3** に着目し、**Elovl3** 特異的な **siRNA** を尾静脈より投与し、インスリン標的臓器の一つである肝臓特異的に **Elovl3** を発現抑制して、脂肪蓄積と肝インスリン抵抗性をどの程度改善するかを検討し、睡眠障害による耐糖能悪化メカニズムの解明、2型糖尿病患者の健康寿命の改善に貢献することを目指す。

### 3. 研究の方法

**12~14** 週齢の **C57BL/6J** 雄性マウスを用いる。実験の **2** 週間前からマウスを高脂肪食、**5%** スクロース水で飼育する。実験の **48** 時間前に尾静脈から **Elovl3** の **siRNA** と **Negative control** の **siRNA** を投与し、肝臓特異的に **Elovl3** の発現を抑制した群と **negative control** 群のマウスを作成する。それらのマウスに対し、**siRNA** 投与から **48** 時間後に既報と同様のタッピング法を用いて朝 **8** 時~**14** 時までの間 **6** 時間の急性睡眠障害をかけ、耐糖能やインスリン感受性を評価していく。



糖代謝の評価としてはグルコースをマウスの腹腔内に注射し評価を行うグルコース負荷試験、同様に腹腔内にピルビン酸を投与することで肝臓の糖新生を評価するピルビン酸負荷試験とインスリン負荷試験を実施し、睡眠障害による脂肪肝及び肝インスリン抵抗性に対する **Elovl3** の発現抑制の効果を評価していく。また同様の条件におけるマウスの肝臓を採取し、肝臓中性脂肪含有量とジアシルグリセロールの測定を実施する。さらに、**Elovl3** の発現を抑制した状態での糖新生遺伝子、脂肪合成遺伝子、脂肪燃焼遺伝子についても **RT-PCR** を実施し、2群間で遺伝子発現レベルの比較検討を実施する。

#### 4. 研究成果

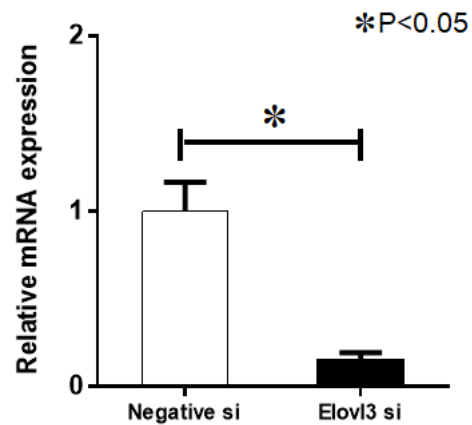
マウスの **Elovl3** 遺伝子配列に特異的な **siRNA** と、**negative control** の **siRNA** とを用いて、肝臓における **Elovl3** の発現抑制が肝脂肪蓄積と耐糖能に与える影響を **C57BL/6J** マウスを用いて検証していった。まず、**Elovl3** の **siRNA** は投与後約 **48** 時間で **Elovl3** の発現抑制を **negative control** と比較して約 **75%** 抑制することを確認した(図 1)。

この **Elovl3** と **negative control** の **siRNA** を、**2** 週間高脂肪食とスクロース水で飼育した **13** 週齢の **C57BL/6J** マウスに投与した。投与から **2** 日後に約 **6** 時間の睡眠障害をかけてマウスの肝臓を採取したところ、肝臓における中性脂肪は **Elovl3** 抑制群群において **negative control** 群と比較して約 **70%** 近く減少していた (**n=7 vs 13**、**Elovl3** 抑制群群 vs **negative control** 群、**P<0.05**)。さらに同様の手法を用いて **siRNA** を投与し、その **2** 日後に **6** 時間の睡眠障害をかけたのち腹腔内グルコース負荷試験を実施したところ、肝臓での **Elovl3** の発現を抑制したマウスではグルコース負荷から約 **30** 分後の血糖値が **negative control** と比較して有意に低値であった (**n=8 vs 8**、**P<0.05**)。

腹腔内グルコース負荷試験における **Area under the curve** においては **2** 群間で有意な差は認めなかった。同様に **Elovl3** ならびに **negative control** の **siRNA** を投与したマウス群を用いて行った肝臓での糖新生を評価するピルビン酸負荷試験においては **Elovl3** 抑制群と **negative control** 群では有意な差は認められず、インスリン感受性を評価するインスリン負荷試験においても **2** 群で有意差は認めなかった。**Elovl3** 抑制群と **negative control** 群において睡眠障害後の肝臓組織を採取し、肝臓における糖新生遺伝子、脂肪合成遺伝子、脂肪燃焼遺伝子の発現を調べたところ、糖新生遺伝子については **2** 群間で有意な差は認められなかった。脂肪合成遺伝子に関しては、**fatty acid synthase (FAS)** 遺伝子が **Elovl3** 抑制群において有意に上昇していたが、その他の **lipin 1 (Lpin1)**, **acyl-CoA thioesterase 1 (Acot1)**, **perilipin 4 (Plin4)**, and **perilipin 5 (Plin5)** では **2** 群間で有意な差は認めなかった。脂肪燃焼遺伝子である **acetyl-CoA carboxylase 1, 2 (ACC1, 2)** と **peroxisome proliferator-activated receptor (PPARα)** に関しても **2** 群間で有意な差は認めなかった。

本研究結果から、マウス肝臓で **Elovl3** の発現を抑制することで、睡眠障害により惹起される肝脂肪蓄積が改善することが明らかとなった。**Elovl3** 発現抑制下での糖負荷試験で血糖値の低下は劇的なものではなく、睡眠障害による耐糖能異常には、肝脂肪蓄積のみならず様々な要素が関与している可能性が示唆された。睡眠障害を有するヒトにおいて **Elovl3** の発現の変化が肝脂肪蓄積にどのような影響を与えるかはまだ不明であり、今後さらなる検討が必要と考えられる。

図 1.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Igarashi H, Shigiyama F, Wakui N, Nagai H, Shibuya K, Shiraga N, Hirose T, Kumashiro N	4. 巻 2019 Dec
2. 論文標題 Whole hepatic lipid volume quantification and color mapping by multi-slice and multi-point magnetic resonance imaging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 HepatoI Res	6. 最初と最後の頁 1374-1385
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hepr.13408	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 淵上彩子, 嶋山文華, 熊代尚記	4. 巻 49
2. 論文標題 メトホルミンの肝臓におけるミトコンドリア complex I 阻害非依存性作用	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 内分泌・糖尿病・代謝内科	6. 最初と最後の頁 184-188
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shigiyama F, Kumashiro N, Tsuneoka Y, Igarashi H, Yoshikawa F, Kakehi S, Funato H, Hirose T	4. 巻 315
2. 論文標題 Mechanisms of sleep deprivation-induced hepatic steatosis and insulin resistance in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Physiol Endocrinol Metab	6. 最初と最後の頁 E848-E858
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpendo.00072.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Igarashi H, Shigiyama F, Hiruma S, Hirose T, Kumashiro N
2. 発表標題 Impact of lean hepatic volume on hepatic insulin resistance in human NAFLD
3. 学会等名 79th American Diabetes Association Scientific Sessions（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 嶋山文華、熊代尚記、五十嵐弘之、蛭間重典、渋谷和俊、弘世貴久
2. 発表標題 日本人NAFLDの網羅的解析による新規の肝インスリン感受性規定因子、徐脂肪肝臓体積の同定
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shigiyama F, Kumashiro N, Yoshikawa F, Tsuneoka Y, Funato H, Hirose T
2. 発表標題 Mechanisms of Hepatic Steatosis and Insulin Resistance Induced by Sleep Deprivation in Mice
3. 学会等名 78th Scientific Sessions American Diabetes Association (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 嶋山文華、熊代尚記、弘世貴久
2. 発表標題 肝脂肪蓄積時の肝インスリン感受性保持機構の探求
3. 学会等名 第36回内分泌代謝学サマーセミナー (招待講演)
4. 発表年 2018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
---------	---------