

令和 3 年 4 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16229

研究課題名（和文）GPIアンカー特異的切断酵素；GPI-PLDの生理病態学的意義の解明

研究課題名（英文）Significance of glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D in metabolic disorders

研究代表者

藤島 裕也（Fujishima, Yuya）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10779789

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：GPI-PLD遺伝子は肝臓で高発現しており、脂肪肝や糖尿病状態では肝臓での遺伝子発現と血中濃度が有意に上昇することが分かった。また、初代培養肝細胞を用いた細胞実験やGPI-PLD欠損マウスを用いた検討により、GPI-PLDは生理活性脂質である肝ジアシルグリセロール（DAG）量を直接的に変化させることで、脂肪肝進展やインスリン抵抗性に関与している可能性があることを初めて明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝GPI-PLDの生理・病態的な役割はこれまで未知であったが脂肪肝や糖尿病の発症・進展に関わる可能性ならびに、その想定されるメカニズムの一端を、本研究により明らかにすることができた。GPI-PLDは酵素であることから、その阻害薬による糖尿病や脂肪肝の治療展開も期待され、新たな治療薬の開発につながる可能性が導かれた。

研究成果の概要（英文）：GPI-PLD is an enzyme which specifically cleaves GPI anchors. However, the biological roles of GPI-PLD have not been elucidated. GPI-PLD mRNA was most highly expressed in liver, and hepatic mRNA level and circulating concentration of GPI-PLD were significantly augmented in diabetic conditions. Mice lacking GPI-PLD (GP-KO mice) exhibited the amelioration of glucose intolerance and hepatic steatosis in diet-induced obesity model. Furthermore, diacylglycerol (DAG) content was significantly decreased in livers of GP-KO mice. In vitro experiments using rat primary hepatocytes showed the GPI-PLD-dependent regulation of intracellular DAG content. Finally, serum GPI-PLD levels were strongly and independently associated with serum ALT and triglyceride (TG) levels in the male subjects with metabolic syndrome. In conclusion, up-regulation of hepatic GPI-PLD leads to DAG accumulation in liver, which may play a causal role in impaired hepatic insulin signaling and progression of fatty liver.

研究分野：糖尿病・内分泌・代謝学

キーワード：GPI-PLD 脂肪肝 肥満症 2型糖尿病 メタボリックシンドローム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

当教室は、「メタボリックシンドローム」の病態基盤として、内臓脂肪蓄積を上流とするアディポサイトカイン分泌異常を介して、インスリン抵抗性・脂質代謝異常・動脈硬化症など様々な病態が生じることを明らかとしてきた。アディポサイトカインの中でも、申請者は主にアディポネクチンに関する研究を行ってきた。APN は心血管保護作用を有しており、対象臓器である心臓組織 (ATVB 2008) や動脈の内皮 (PLoS One 2013)、動脈硬化病変部位の増殖型平滑筋 (Sci Rep 2014) に、APN が集積していることを見出した。申請者は、このような APN の組織集積には、GPI-アンカー型蛋白である T-cadherin が必須の分子であること (Endocrinology 2015)、そして T-cadherin の欠損は、APN の血管組織への集積を消失させ、アポ E 欠損マウスの動脈硬化をより増悪させることを報告した (FASEB J 2017)。

一方で、APN の抗糖尿病作用の一つとして、肝臓のインスリン感受性を亢進させることが報告されているが、その機序は十分には解明されていない。GPI-PLD は GPI アンカーを特異的な基質として、そのイノシトールリン酸結合を加水分解する唯一の酵素であり、肝臓で高発現している。申請者は、血中 GPI-PLD 濃度が APN 欠損マウスで有意に高値であり、APN 補充により低下することを示した (Endocrinology 2015)。また、糖尿病患者や非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) 患者では、血中 GPI-PLD 濃度が上昇していることが報告されていることから、GPI-PLD は糖代謝や脂質代謝と関連する可能性があるが、生体内における GPI-PLD の生理・病態学的な役割については未だ解明されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、GPI-PLD の糖代謝や脂質代謝に対する生理作用機序を解明することを主な目的とする。特に GPI-PLD は小胞体の GPI アンカー脂質プールを加水分解することにより、生理活性脂質・ジアシルグリセロール (DAG) を直接的に産生することが想定されることから、肝臓のインスリン抵抗性や脂肪肝進展における GPI-PLD の意義を生体レベルで明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (3-1) GPI-PLD による肝 DAG 産生作用、および糖代謝、脂質代謝調節機構の解明

db/db マウス、高脂肪高蔗糖食負荷・肥満モデルマウス、streptozotocin (STZ) 投与・インスリン分泌不全糖尿病モデルマウスにおける GPI-PLD の肝臓での発現変化および血中濃度の変化を検討した。また、GPI-PLD 欠損 (GP-KO) マウスおよびラット初代培養肝細胞を用いて、in vivo・in vitro 双方から解析を行った。

#### (3-2) ヒトにおける血中 GPI-PLD 濃度測定の臨床的意義の検討

当院外来通院中の患者を対象として、ELISA により血中 GPI-PLD 濃度を測定し、各種臨床指標との相関を検討した。

### 4. 研究成果

#### (4-1) GPI-PLD による肝 DAG 産生作用、および糖代謝、脂質代謝調節機構の解明

まず、WT マウスにおける GPI-PLD の遺伝子発現の組織分布を調べたところ、肝臓において圧倒的に高発現していた。さらに、インスリン抵抗性糖尿病モデルである db/db マウスや高脂肪高蔗糖食負荷マウスおよびインスリン欠乏性糖尿病モデルである STZ 負荷マウスでは、肝臓での GPI-PLD mRNA 発現の上昇とともに、その血中濃度が有意に増加した。

続いて、GP-KO マウスを樹立し解析を行った。まず、GP-KO マウスにおける GPI アンカー蛋白・T-cadherin の蛋白発現を検討したところ、大動脈や心臓においては野生型マウスと差はなかったが、GPI-PLD の主な産生臓器である肝臓では約 2.5 倍と有意に上昇していた。このことから当初の想定とは異なり、GPI-PLD は血中では GPI アンカーを切断する酵素活性を発揮せず、心血管組織の T-cadherin 発現量やアディポネクチンの集積量を変化させることはないと考えられた。その一方で、少なくともその発現臓器である肝臓においては、GPI アンカー蛋白の制御に関与しているものと思われる。

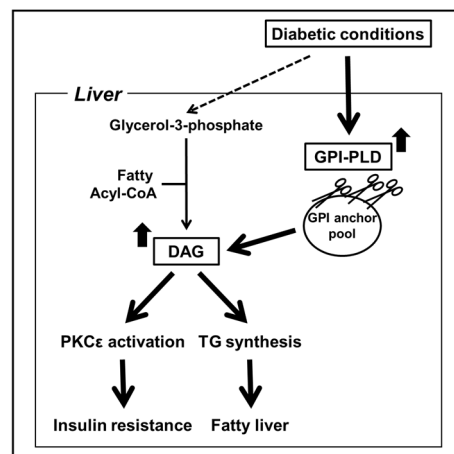
続いて、高脂肪高蔗糖食 (HF/HS) を負荷した GP-KO マウスでは、野生型マウスに比して、体重の推移には変化がない一方で、血中 TG 値の上昇が有意に抑制され、かつ肝臓の脂肪変性の程度が軽度にとどまっていた。さらに、経口糖負荷試験の結果、GP-KO マウスでは血糖値の上昇が有意に抑制されており、良好な耐糖能を示した。既報では、GPI-PLD は小胞体やゴルジ体といった細胞内の分泌経路において、GPI アンカーを加水分解することで、DAG 産生を促すことが報告されている (Biochem J 1999)。また、肝臓における過剰な DAG の蓄積は、中性脂肪 (TG) 合成の基質となるとともに、PKC 活性化によるインスリンシグナル抑制を介してインスリン抵抗性を惹起することが報告されている。そこで、肝 DAG 含量を thin-layer chromatography (TLC) によ

り測定・定量したところ、HF/HS 負荷に伴う DAG の増加が、GP-KO マウスにおいて有意に抑制されていた。またこのとき、GP-KO マウスでは、肝臓でお主に発現している PKC アイソザイムである PKC の膜移行が有意に低下しており、PKC 活性化が抑制されていた。さらに、インスリン投与後の肝臓での AKT リン酸化が亢進しており、肝インスリンシグナルの改善を認めた。続いて、ラット肝初代培養細胞を用いた細胞実験を行ったところ、siRNA による GPI-PLD のノックダウンにより細胞内 DAG 量は有意に減少した。一方で、GPI-PLD 発現アデノウイルスによる過剰発現系においては、特に GPI の生合成に関わる脂肪酸側鎖であるアラキドン酸添加時に顕著に増加し、PKC 活性化の亢進を伴っていた。

#### (4-2) ヒトにおける血中 GPI-PLD 濃度測定の臨床的意義の検討

当院外来通院中の男性患者 86 名 (68 名は 2 型糖尿病を合併) を対象として、ELISA により血中 GPI-PLD 濃度を測定した。その結果、血中 GPI-PLD 濃度は BMI や血中 TG 値、血中 AST・ALT 値と有意な正相関を示す一方で、血中 APN 濃度とは有意な負の相関を示した。さらに多変量解析の結果、血中 GPI-PLD 濃度の独立した規定因子として、血中 TG 値と血中 ALT 値が抽出された。

肥満や糖尿病における肝インスリン抵抗性を発症するメカニズムとして、肝脂質の質的变化の重要性、特に DAG の蓄積が原因の一つであることが提唱されている。しかし、肝 DAG 蓄積に関する分子病態基盤については不明な点が多かった。本研究の結果より、「糖尿病状態における肝 DAG 上昇のかなりの部分が、小胞体中存在する GPI アンカープールから GPI-PLD によって切断・生成され、肝インスリン抵抗性と脂肪肝の増悪を惹起する」という、全く新しい概念が提唱される (図)。以上より、GPI-PLD の抑制や阻害は、肝インスリン抵抗性を根本的に治療し、現在のところ治療法が確立していない脂肪肝や NAFLD に対する新たな治療・予防薬になりうることを示した (AJP-Endo. 2019)。



また、現在 GPI-PLD と同様に肝臓において特異的に高発現しているキサンチン酸化還元酵素(XOR) に注目した検討を行っている。XOR はプリン代謝の最終段階において、ヒポキサンチンをキサンチンに、キサンチンを尿酸に代謝する酵素であり、尿酸産生抑制薬の標的となっている。XOR には、XDH (脱水素酵素) と XO (酸化酵素) の酵素型が存在するが、特に XO は反応過程において活性酸素種を産生することや、血管内皮細胞への結合が示されていることから、動脈硬化性心疾患などの病態形成に関与していることが示唆されてきた。

2 型糖尿病教育入院患者の臨床検体を用いて、LC-TQMS 法により血中 XOR 活性の測定を行った結果、2 週間の糖尿病治療により血中 XOR 活性は有意に低下し、その変化は血中 AST・ALT 値といった肝逸脱素の変化により強く規定されることを明らかとした (J Diabetes Investig. in press)。これらの結果から、脂肪肝や NAFLD といった病態では、肝細胞が破壊され逸脱することにより血中 XOR 活性の上昇を来すと考えられる。このような高 XOR 血症が、メタボリックシンドロームや動脈硬化性心血管疾患の進展に直接的に関与する可能性を想定し、検討を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tsugawa-Shimizu Y, Fujishima Y, Kita S, Minami S, Sakaue TA, Nakamura Y, Okita T, Kawachi Y, Fukada S, Namba-Hamano T, Takabatake Y, Isaka Y, Nishizawa H, Ranscht B, Maeda N, Shimomura I.	4. 巻 320
2. 論文標題 Increased vascular permeability and severe renal tubular damage after ischemia-reperfusion injury in mice lacking adiponectin or T-cadherin.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Am J Physiol Endocrinol Metab.	6. 最初と最後の頁 E179-E190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpendo.00393.2020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawachi Y, Fujishima Y, Nishizawa H, Nagao H, Nakamura T, Akari S, Murase T, Taya N, Omori K, Miyake A, Fukuda S, Takahara M, Kita S, Katakami N, Maeda N, Shimomura I.	4. 巻 -
2. 論文標題 Plasma xanthine oxidoreductase activity in Japanese patients with type 2 diabetes across hospitalized treatment.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13467.	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 Nakamura Y, Kita S, Tanaka Y, Fukuda S, Obata Y, Okita T, Nishida H, Takahashi Y, Kawachi Y, Tsugawa-Shimizu Y, Fujishima Y, Nishizawa H, Takakura Y, Miyagawa S, Sawa Y, Maeda N, Shimomura I.	4. 巻 28
2. 論文標題 Adiponectin Stimulates Exosome Release to Enhance Mesenchymal Stem-Cell-Driven Therapy of Heart Failure in Mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Ther.	6. 最初と最後の頁 2203-2219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymthe.2020.06.026.	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 Nakamura Yuto, Kita Shunbun, Tanaka Yoshimitsu, Fukuda Shiro, Obata Yoshinari, Okita Tomonori, Kawachi Yusuke, Tsugawa-Shimizu Yuri, Fujishima Yuya, Nishizawa Hitoshi, Miyagawa Shigeru, Sawa Yoshiki, Sehara-Fujisawa Atsuko, Maeda Norikazu, Shimomura Ichihiro	4. 巻 318
2. 論文標題 A disintegrin and metalloproteinase 12 prevents heart failure by regulating cardiac hypertrophy and fibrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology	6. 最初と最後の頁 H238 ~ H251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpheart.00496.2019	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 Masuda S, Fujishima Y, Maeda N, Tsugawa-Shimizu Y, Nakamura Y, Tanaka Y, Obata Y, Fukuda S, Nagao H, Kita S, Nishizawa H, Shimomura I	4. 巻 316
2. 論文標題 Impact of glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D on hepatic diacylglycerol accumulation, steatosis, and insulin resistance in diet-induced obesity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism	6. 最初と最後の頁 E239-E250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpendo.00319.2018	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8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 川知祐介、藤島裕也、村瀬貴代、中村敬志、宮崎安弘、西澤 均、喜多俊文、前田法一、土岐祐一郎、下村伊一郎
2. 発表標題 2型糖尿病・高度肥満症の治療による血漿XORの変化
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤島裕也、川知祐介、長尾博文、西澤 均、中山康宗、馬場健史、永森収志、金井好克、喜多俊文、前田法一、福崎英一郎、下村伊一郎
2. 発表標題 肥満脂肪組織におけるコリントランスポーター発現とコリン代謝動態の変化
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤島裕也、小幡佳也、福田士郎、喜多俊文、西澤 均、前田法一、下村伊一郎
2. 発表標題 アディポネクチンの組織集積のメカニズムと、その抗糖尿病作用および臓器保護作用の解明
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 清水有理、藤島裕也、沖田朋憲、川知祐介、中村勇斗、田中紀實、増田重樹、小幡佳也、福田士郎、喜多俊文、西澤 均、前田法一、下村伊一郎
2. 発表標題 腎臓におけるAdiponectin・T-cadherinの局在と機能解析
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 藤島裕也、増田重樹、喜多俊文、西澤 均、前田法一、下村伊一郎
2. 発表標題 GPIアンカー特異的切断酵素；GPI-PLDは、肝ジアシルグリセロール蓄積と耐糖能異常に関与する
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増田重樹、藤島裕也、喜多俊文、西澤 均、前田法一、下村伊一郎
2. 発表標題 肝臓におけるGPIアンカー切断酵素GPI-PLDの機能解析
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川知祐介、長尾博文、藤島裕也、西澤 均、中山康宗、馬場健史、永森収志、金井好克、喜多俊文、福田士郎、前田法一、福崎英一郎、下村伊一郎
2. 発表標題 肥満脂肪組織におけるコリン代謝の変化
3. 学会等名 第39回日本肥満学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水有理、藤島裕也、中村勇斗、小幡佳也、増田重樹、田中紀實、長尾博文、福田士郎、喜多俊文、西澤 均、前田法一、下村伊一郎
2. 発表標題 腎臓におけるAdiponectinの局在と機能解析
3. 学会等名 第39回日本肥満学会
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