

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17999

研究課題名（和文）鉄代謝制御を介した肝臓におけるインスリン抵抗性の分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of hepatic insulin resistance via iron metabolism

研究代表者

佐久間 一基（Sakuma, Ikki）

千葉大学・大学院医学研究院・特任准教授

研究者番号：70791721

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）：非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）・糖尿病ではインスリン抵抗性増大に伴う肝糖新生亢進が高血糖の一因となるが、その病態は複雑で十分には解明されていない。本研究では鉄代謝制御を介した肝臓におけるインスリン抵抗性の分子機構を解明することを目的とした。鉄代謝調節作用を有するferredoxin reductase（FDXR）に着目して、肝臓特異的FDXR過剰発現マウスとFDXRノックダウンマウスを用いて解析を行った。本研究の結果から、FDXRは肝臓への鉄蓄積の抑制と糖新生抑制を行うことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満及びメタボリックシンドロームの増加に伴い非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）の有病率が上昇しているが、NAFLDの治療選択肢は限られている。新たな肝臓におけるインスリン抵抗性の制御機構の解明は新規のNAFLD治療薬・糖尿病治療薬の開発につながる重要な課題である。本研究では、肝臓特異的FDXR過剰発現マウスとFDXRノックダウンマウスを用いた解析から、FDXRが肝臓への鉄蓄積の抑制と糖新生抑制を行うことが示唆された。本研究の成果が、新規NAFLD治療薬・糖尿病治療薬への臨床応用に展開するための基盤になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In one-third of NAFLD patients, iron liver deposition was found, possibly related to dietary iron overload and genetic factors. High iron links oxidative damage. Disruption of some iron regulatory genes was shown to cause diabetes and liver abnormality. Studies regarding the effects of iron regulatory genes on NAFLD and diabetes may lead to the new mechanisms of hepatic insulin resistance and therapeutic targets. Then, we focused on FDXR that was mitochondrial iron regulator. We generated and examined liver-specific FDXR overexpression mice and FDXR knockdown mice, respectively. The results of this study suggest that FDXR suppresses hepatic iron accumulation in the liver and inhibits gluconeogenesis.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝疾患 糖尿病 鉄代謝

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ウイルス性肝炎の予防及び治療は進歩したが、慢性肝疾患の発症及び末期肝疾患による合併症は増加している。その背景として、肥満及びメタボリックシンドロームの増加に伴い、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の有病率が上昇 (6~37%) していることが挙げられる。非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は、肝臓関連死亡率の上昇を伴う NAFLD の病型の 1 つで、NAFLD 患者の約 30% に発症することが報告されているが、NASH は現在承認されている治療法がなく、病態を解明し新たな治療法を開発することが期待されている。一方、糖代謝の観点において、肝臓は非常に重要な役割を果たす。肥満や糖尿病の病態では、肝臓におけるインスリン抵抗性を認め、高率に NAFLD を伴う。NAFLD におけるインスリン抵抗性の主な病態として、脂肪蓄積による酸化ストレスの増大が挙げられ、NASH への進展にも寄与すると考えられているが、その病態は複雑で十分には解明されていない。肝臓におけるインスリン抵抗性増大は糖新生亢進をきたし、高血糖の一因になることから、新たな肝臓におけるインスリン抵抗性の制御機構の解明は新規の NAFLD 治療薬・糖尿病治療薬の開発につながる重要な課題である。

## 2. 研究の目的

肝臓は生体内で最も多くの貯蔵鉄を有し、NAFLD において肝鉄過剰蓄積が高頻度に見られる。鉄は生体内において、ヘム・鉄硫黄クラスターとして多彩な細胞生理機能を担うが、過剰な  $Fe^{2+}$  はフリーラジカルの産生源となり細胞傷害性に作用する。本研究では鉄代謝制御を介した肝臓におけるインスリン抵抗性の分子機構を解明することを目的とした。p53 下流遺伝子で鉄代謝調節作用を有する ferredoxin reductase (FDXR) に着目して、NAFLD 病態における p53-FDXR の活性化による鉄代謝制御を介した肝臓におけるインスリン抵抗性の分子機構について検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 高脂肪食負荷肥満モデルマウスを用いた p53 活性化と FDXR の発現解析

高脂肪食負荷肥満モデルマウスを構築し、耐糖能評価、マウスの肝臓における遺伝子発現解析、脂肪蓄積、鉄蓄積、酸化ストレスの評価を行った。高脂肪食負荷は生後 9 週齢の C57BL6 マウスに高脂肪食を継続的に投与した。

### (2) *in vitro* 解析による FDXR による鉄代謝制御、ミトコンドリア機能制御解析

CRISPR/Cas9 システムを用いて p53KO 肝がん細胞株 HepG2 細胞を樹立し、FDXR の蛋白発現、遺伝子発現を評価した。続いて、HepG2 細胞を用いて FDXR ノックダウンにおける細胞内鉄代謝と酸化ストレスへの影響を検討した。また、蛍光免疫染色による FDXR の細胞内局在の評価とミトコンドリア超分子複合体解析による FDXR とミトコンドリア超分子複合体の会合の有無を評価した。

### (3) アデノウイルスを用いた肝特異的 FDXR 過剰発現、FDXR ノックダウンマウスにおける肝鉄代謝と糖代謝の評価

FDXR 過剰発現アデノウイルス、FDXR shRNA 発現アデノウイルスをそれぞれ作製した。生後 9 週齢の C57BL6 マウスの尾静脈からアデノウイルスを静注し、マウス肝臓での FDXR 過剰発現、FDXR ノックダウンする系を確立した。FDXR の肝臓における鉄代謝、糖代謝に及ぼす影響を検討するために、これらのマウスを用いて、ブドウ糖負荷試験、ピルビン酸負荷試験、肝臓の鉄蓄積を評価した。

### (4) アデノウイルスベクターと CRISPR/Cas9 を組み合わせた肝特異的 FDXR ノックアウトマウス作製

shRNA アデノウイルスによるノックダウン効果は短期的であるため、FDXR の NAFLD 病態の過程 (脂肪肝→肝線維化→癌) における役割を評価することを目的に、アデノウイルスベクターに CRISPR/Cas9 システムを組み込む系を構築した。FDXR gRNA 発現アデノウイルスをマウス尾静脈

から投与し、肝臓で FDXR ノックアウトを行った。このマウスを用いて、グルコースクランプ試験の予備実験を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 高脂肪食負荷肥満モデルマウスを用いた p53 活性化と FDXR の発現解析

高脂肪食負荷により、肝臓への脂肪蓄積・血糖上昇、鉄蓄積、酸化ストレスの亢進、p53 活性化に伴う FDXR の発現上昇を認めた。

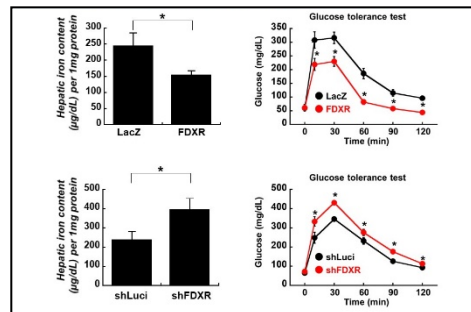
##### (2) *in vitro* 解析による FDXR による鉄代謝制御、ミトコンドリア機能制御解析

CRISPR/Cas9 システムを用いて p53KO 肝がん細胞株 HepG2 細胞を樹立し、FDXR の p53 依存的発現誘導を確認した。*in vitro* 解析から FDXR は細胞内鉄センサー IRP を抑制し細胞内鉄量を負に調節しフリーラジカルを抑制する結果が得られた。また、蛍光免疫染色を行い、FDXR はミトコンドリア呼吸鎖の各複合体と共局在を認めた。加えて、ミトコンドリア超分子複合体解析でも、FDXR が複合体 I IIIIV、複合体 IIIIV との会合が観察され、FDXR のミトコンドリア機能制御が示唆された。

##### (3) アデノウイルスを用いた肝特異的 FDXR 過剰発現、FDXR ノックダウンマウスにおける肝鉄代謝と糖代謝の評価 (図 1)

肝臓特異的 FDXR 過剰発現マウスでは、肝鉄量の低下と糖負荷試験で有意な耐糖能改善とピルビン酸負荷試験で糖新生抑制を認め、逆に shRNA による肝臓特異的 FDXR ノックダウンでは、肝鉄蓄積と耐糖能障害悪化・糖新生亢進を認めた。以上から、FDXR は肝臓への鉄蓄積の抑制と糖新生抑制を行うことが示された。

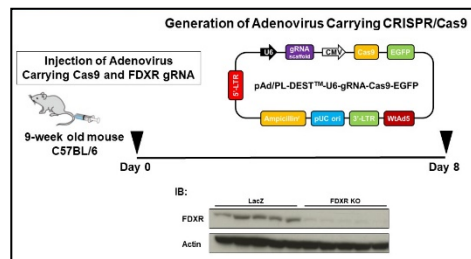
図 1 FDXR の肝鉄代謝・糖代謝における役割



##### (4) アデノウイルスベクターと CRISPR/Cas9 を組み合わせた肝特異的 FDXR ノックアウトマウス作製 (図 2)

アデノウイルスベクターに CRISPR/Cas9 システムを組み込む系を構築した。FDXR gRNA・Cas9 発現アデノウイルスをマウス尾静脈から投与し、肝臓での FDXR ノックアウト効果を確認した。肝臓で特異的に FDXR を過剰発現もしくはノックアウトを行ったグルコースクランプ試験の予備実験で、インスリン投与による肝糖産生の抑制率が FDXR 過剰発現で大きく、FDXR ノックアウトで小さくなる傾向を示し、FDXR による肝インスリン抵抗性の改善が示唆された。

図 2 肝特異的 FDXR ノックアウトマウス作製



本研究の結果から、FDXR は肝臓への鉄蓄積の抑制と糖新生抑制を行うことが示唆される。FDXR による肝鉄代謝制御が新たな糖尿病治療の創薬標的として期待される。今後肝特異的 FDXR ノックアウトマウスの肝代謝フラックス解析を進めて、さらにその機序を明らかにしていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4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 Deguchi-Horiuchi H, Koide H, Sakuma I, Gao Y, Higuchi S, Nagano H, Hashimoto N, Horiguchi, K, Iwadate Y, Inoshita N, Yokote K, Tanaka. T.	4. 巻 68
2. 論文標題 Two cases of symptomatic secondary hypophysitis due to Rathke's cleft cysts treated with glucocorticoids: long-term follow-up.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrine Journal,	6. 最初と最後の頁 269-279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endorcj.EJ20-0361	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 Nagano H, Kono T, Saiga A, Kubota Y, Fujimoto M, Felizola S, Ishiwata K, Tamura A, Higuchi S, Sakuma I, Suzuki S, Koide H, Takeshita N, Sakamoto S, Yokote K, Nakamura Y, Ichikawa T, Uno Takashi, and Tanaka T.	4. 巻 105
2. 論文標題 Aldosterone Reduction Rate After Saline Infusion Test May Be A Novel Prediction In Patients With Primary Aldosteronism.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Endocrinol Metab.	6. 最初と最後の頁 e319-e327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/clinem/dgz092	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 Yoshida T, Nakayama A, Tamura A, Higuchi S, Sakuma I, Nagano H, Saulo J.A. Felizola, Takemoto M, Tatsuno I, Koide H, Yokote K, Tanaka T.	4. 巻 105
2. 論文標題 A case of Hashimoto's thyroiditis with multiple drug resistance and high expression of efflux transporters.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Endocrinol Metab.	6. 最初と最後の頁 399-406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/clinem/dgz073	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 Sakuma I, Nagano H, Yoshino I, Yokote K, Tanaka T.	4. 巻 58
2. 論文標題 Ceritinib Aggravates Glycemic Control in Insulin-treated Patients with Diabetes and Metastatic ALK-positive Lung Cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Intern Med.	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) 10.2169/internalmedicine.1870-18	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 佐久間 一基, 姚 躍, 藤本 真徳, 永野 秀和, 横手 幸太郎, 田中 知明	4. 巻 95
2. 論文標題 FBPase欠損症におけるミスセンス変異の分子病態の解明	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本内分泌学会雑誌	6. 最初と最後の頁 115-117
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Ikki Sakuma, Yue Yao, Masanori Fujimoto, Hidekazu Nagano, Koutaro Yokote and Tomoaki Tanaka
2. 発表標題 Characterization and Categorization Based on Genotype-Biochemical Phenotype Association in Fructose-1,6-Bisphosphatase Deficiency
3. 学会等名 END02019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐久間一基、姚躍、藤本真徳、永野秀和、横手幸太郎、田中知明
2. 発表標題 FBP1ミスセンス変異によるFBPase欠損症発症メカニズムの解明
3. 学会等名 92回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>千葉大学大学院医学研究院分子病態解析学  <a href="https://www-shinsei.jsps.go.jp/kaken/index.html">https://www-shinsei.jsps.go.jp/kaken/index.html</a></p>
---

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			
米国	Yale University			