

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10424

研究課題名（和文）生活習慣病におけるメタロチオネインの役割解明：新たな治療戦略の構築を目指して

研究課題名（英文）Elucidating the Role of Metallothionein on Lifestyle-Related Diseases

研究代表者

川上 隆茂（KAWAKAMI, Takashige）

徳島文理大学・薬学部・講師

研究者番号：40441589

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）：本研究では、亜鉛補充による糖尿病および脂肪肝改善作用について以下の成果を得た。1）亜鉛補充による高脂肪食誘導性の糖尿病の改善および脂肪肝や肝線維化の予防・抑制には、亜鉛によって誘導されたメタロチオネイン（MT）の寄与が大きい。2）肝臓において、亜鉛によって誘導されたMTは、脂質代謝、ステロイドおよびストレス応答などに関わる様々な遺伝子の調節に関与することが示唆された。3）亜鉛-MT複合体は、既存の亜鉛補充療法よりも有効な手段となり得る可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪肝と2型糖尿病は互いに悪循環を形成する関係にあり、これらの進行は肝がんや心臓血管疾患発症のリスクとなる。これまで、亜鉛補充により脂肪肝や2型糖尿病が改善することが報告されてきたが、その詳細なメカニズムは不明であった。本研究結果から、亜鉛補充による糖尿病および脂肪肝の改善作用において、MTが大きく関与するという分子機構の一端が明らかになっただけでなく、MTにフォーカスした生活習慣病に対する新規治療法と予防の開発に結びつくことが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we obtained the following results regarding the improvement of diabetes and fatty liver by zinc (Zn) supplementation: 1) Zn supplementation contributed to the improvement of high-fat diet-induced diabetes and the prevention/inhibition of fatty liver and liver fibrosis through the induction of metallothionein-1/2 (MT). 2) In the liver, Zn-induced MT was suggested to be involved in the regulation of various genes related to lipid metabolism, steroids, and stress responses. 3) Treatment with Zn-MT complex would be a potentially more effective approach than existing Zn supplementation therapy.

研究分野：生活習慣病

キーワード：メタロチオネイン 亜鉛 高脂肪食 非アルコール性脂肪肝 糖尿病

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

亜鉛の生活習慣病に対する重要性は、様々な基礎研究や疫学研究から示されている。具体的には、ヒトへの亜鉛投与によって糖尿病発症のリスク低減 (Sun et al., *Diabetes Care*, 2009) や非アルコール性脂肪肝の改善が認められる。近年、細胞内での亜鉛恒常性に重要な役割を担う亜鉛輸送体 (ZnT8) の機能低下による「亜鉛シグナル」の不調を起因とする新たな2型糖尿病発症メカニズムが報告されている (Tamaki et al., *J Clin Invest*, 2013)。このことは、亜鉛摂取が生活習慣病発症リスクの低減に寄与する一方、単純な亜鉛摂取では説明できない細胞内の亜鉛調節機構の重要性も明らかになりつつある。

メタロチオネイン (MT) は、分子量約 6500 の低分子量タンパク質であり、細胞内での亜鉛の恒常性は、亜鉛輸送体や MT により厳密に制御されていると考えられている。マウスおよびヒトの MT には4つのアイソフォーム (1~4) があり、亜鉛は有害金属であるカドミウムなどと同様に MT1 および 2 を誘導する。この MT-1/2 の生理的機能には、1. 亜鉛や銅などの必須金属の代謝調節機能、2. 重金属毒性の解毒作用、3. ストレスへの生体防御作用が知られている。

一方、従来から薬物による糖尿病発症モデル動物への亜鉛の前投与は、糖尿病発症を予防することが報告されている (Yang and Cherian, *Life Sci*, 1994)。これは、亜鉛によって誘導された MT が、上記の作用を発揮することで糖尿病が予防されるというシンプルな構図が想定される。しかし、MT 欠損条件下の高脂肪食による生活習慣病発症に対する亜鉛の効果の程度や、どの MT アイソフォームが重要であるかについてはまだ明らかではない。本研究では、亜鉛補充における MT の役割を解明することで、生活習慣病に対する亜鉛の予防や治療における新たな概念を導入することになると考えるに至った。

2. 研究の目的

我が国では、脂肪肝に対して承認されている予防薬や治療薬は存在しない。一方、申請者は、亜鉛による糖尿病および脂肪肝改善作用の感受性決定因子として、MT が関与する可能性を見出している。比較的安価である亜鉛製剤の適用は、糖尿病および脂肪肝に対する効果的な予防と治療戦略において、新たな鍵となると想定される。そこで、本研究は、マウス個体 (MT-1/2 欠損 (MTKO) マウス) および細胞 (MT 遺伝子を欠損させた肝細胞) を用いて、MT による糖尿病および脂肪肝改善作用の機序解明、および MT 誘導因子である亜鉛の補充における新たな治療戦略を研究することを目的とした。

3. 研究の方法

動物実験では、野生型 (WT; 129S1/SvImJ) および MTKO (129S7/SvEvBrd-Mt1^{tm1Bri} Mt2^{tm1Bri}/J) マウスを用いた。全ての実験は、徳島文理大学動物実験指針に従って行った。

(1) 野生型および MTKO マウスを用いた高脂肪食誘導性の耐糖能異常および脂肪肝発症に対する亜鉛補充効果の比較解析

雄性、8週齢の WT および MTKO マウスに高脂肪食 (HFD; HFD-32、日本クレア) と亜鉛を含む飲料水 (0、92 および 460 ppm) を 10 週間自由摂取させた。また、同期間、対照食餌 (CE-2; 日本クレア) を摂取させた群を通常食 (STD) 群とした。実験開始 6 週目に糖負荷試験 (2g/kg bw) を行った。HE 染色法を用いて肝臓の組織学的検索を行った。亜鉛濃度は ICP-MS を用いて測定した。また、一部の肝臓 (亜鉛補充を行った WT および MTKO マウス) から Total RNA を抽出し、ライブラリー作製を行った後、イルミナ社の NovaSeq でトランスクリプトーム解析 (RNA-seq) を実施した。

(2) 脂肪肝形成後に対する亜鉛の改善作用の可能性と MT の関与

雄性 8 週齢の WT および MTKO マウスに HFD を 6~8 週間自由摂取させ、両系統マウスに同程度の脂肪肝を形成させた。その後、HFD とともに亜鉛を含む水道水 (0 および 92 ppm) を 10 週間自由摂取させた。脂肪肝の程度は HE 染色法を用い、肝線維化の評価はアザン・マロリー染色にて行った。血漿中のトリグリセリド (TG)、遊離脂肪酸 (NEFA) 値の測定は、LabAssay™ (富士フィルム 和光純薬社) を使用した。また、線維化の原因となるコラーゲンの産生および分解に関与し、線維化マーカーである (COL1A1、Timp1、Acta2) mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR により検討した。

(3) 脂肪酸の細胞障害および脂肪蓄積作用に対する MT-1 および MT-2 の寄与

マウス肝細胞株 AML-12 に、Cas9 ノックアウトおよび MT1 と MT2 に対するガイド RNA の発現ベクターあるいは空ベクターを用いて、mock、MT-1/2、MT-1 および MT-2 欠損細胞を樹立した。パルミチン酸 (PA) あるいはオレイン酸 (OA) を各細胞に 24 時間曝露し、脂肪酸による細胞毒性 (MTT 法) や脂肪蓄積 (Nile Red 染色および Oil Red O 染色) の影響を検討した。また、硫酸亜鉛を 1 時間前処理後、500 μM OA を 48 時間曝露し、細胞内の脂肪蓄積量を評価した。

(4) 亜鉛-MT 複合体投与による糖尿病および脂肪肝改善の可能性

硫酸亜鉛 (400 μmol/kg) を2日間投与したICRマウスの肝臓から、SephadexG75 ゲルろ過カラムを用いて亜鉛と結合したMT (亜鉛-MT複合体) を精製した。MTKOマウスに中程度の脂肪肝を形成させ、生理食塩水 (生食) 硫酸亜鉛 (0.072 および 1.0 mg/kg) あるいは亜鉛-MT複合体 (0.072 mg/kg) を6日間、腹腔内投与した。解剖時に肝臓および内臓脂肪組織 (WAT) の重量と空腹時血糖を測定した。肝臓について組織学的検索 (HE染色) を行い、さらにRT-PCR法によるMT-1および2 mRNA発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) 野生型および MTKO マウスを用いた高脂肪食誘導性の耐糖能異常および脂肪肝発症に対する亜鉛補充効果の比較解析

1-1. 肝臓の組織学的検索: WTマウスでは、HFD誘発性脂肪肝の軽減が認められたが、MTKOマウスでは改善しなかった (図1A)。1-2. 糖負荷試験: 亜鉛補充によってWTマウスではHFD誘発性の耐糖能異常に改善が認められたが、MTKOマウスではその効果が乏しかった (図1C)。1-3. 肝臓中亜鉛濃度: 両系統マウスともHFD摂取により肝臓中亜鉛濃度の減少が認められたが、その程度は、MTKOマウスでより顕著であった (図1B)。WTマウスでは、高濃度の亜鉛補充によりSTDレベルまで肝臓中の亜鉛濃度が回復したが、MTKOマウスでは回復しなかった (図1B)。1-4. DEG (Differentially Expressed Gene) 解析: 亜鉛補充を行ったWTマウスおよびMTKOマウスの肝臓のRNA-seq解析から、MTは、脂質代謝、ステロイドおよびストレス応答などに関わる様々な遺伝子の調節に関与することが示唆された。さらに詳細な解析を進めることで、亜鉛補充によるMTを介した脂肪肝改善の分子メカニズム解明につながると考えられた。

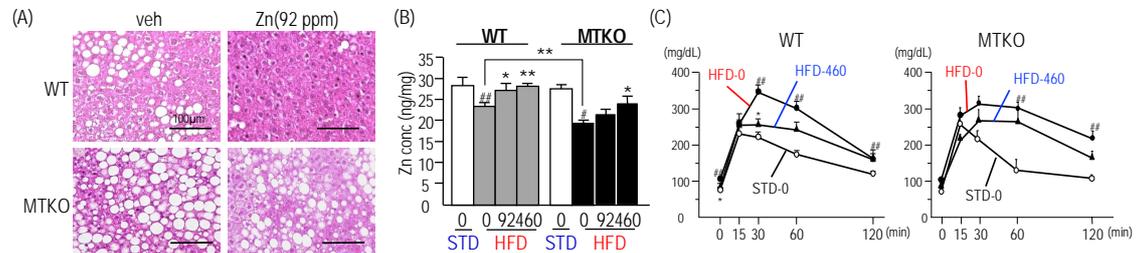


図1 野生型およびMTKOマウスを用いた高脂肪食誘導性の耐糖能異常および脂肪肝発症に対する亜鉛効果の比較解析
 (A) 肝臓の組織切片像: WTマウスは、HFDによって生じた肝臓中の脂肪滴が亜鉛補充によって減少した。一方、MTKOマウスでは、亜鉛補充による肝臓中の脂肪滴の減少は認められなかった。
 (B) 肝臓中の亜鉛濃度: HFDにより、亜鉛濃度が減少した (減少率: MTKO>WT)。WTマウスでは、亜鉛処理によりSTDレベルまで回復した。
 (C) 耐糖能試験: WTマウスでは、亜鉛補充によって最高血糖値上昇の抑制および、耐糖能異常の改善が認められた。一方、WTマウスと比較しMTKOマウスでは、耐糖能異常改善が緩やかであった。

(2) 脂肪肝形成後に対する亜鉛の改善作用の可能性とMTの関与

2-1. 肝臓の組織学的検索: WTマウスは、HFDによる肝線維の形成は確認されなかったが、亜鉛補充により脂肪肝の顕著な改善が認められた。MTKOマウスでは、HFDによる激しい脂肪肝や肝線維化が認められたが、亜鉛補充によるこれらの改善は認められなかった (図2A)。2-2. 血中TG, NEFA 値の変化: HFD摂取させたMTKOマウスは、同条件のWTマウスと比較し、TGおよびNEFA値とも4倍以上の増加が認められた。また、MTKOマウスの亜鉛補充群では、両値とも30%程度低下した。2-3. RT-qPCR: 肝線維化マーカーの解析から、WTマウスでは、HFDにより亢進したTimp1とActa2 mRNA発現量が、亜鉛補充により通常食摂取レベルまで低下した (図2B)。HFD摂取群間での比較解析の結果、MTKOマウスは野生型マウスよりも、全ての肝線維化マーカーの有意な増加が認められた。MTKOマウスへの亜鉛補充は、線維化マーカーmRNA発現量に影響を与えなかったが、あるいは低下させてもその抑制率はWTマウスよりも低値であった (図2B)。以上、亜鉛補充は脂肪肝形成後の肝線維化進展に対して有効な予防・治療薬となりうるが、その効果発現にはMTが重要な役割を担うことが示唆された。

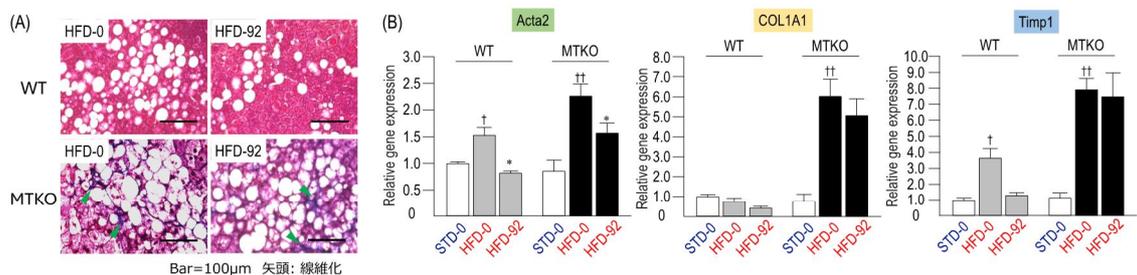


図2 脂肪肝形成後に対する亜鉛の改善作用の可能性とMTの関与
 (A) 肝臓の線維化: MTKOマウスでは、HFD摂取により肝臓の線維化が認められたが、亜鉛補充による改善は認められなかった。
 (B) 線維化マーカーmRNA発現量: WTマウスでは、HFD摂取によって増加したActa2, Timp1 mRNA発現量は、亜鉛補充によりSTDレベルまで低下した。MT欠損マウスでは、HFD-92群はHFD-0群と比較して、Acta2, COL1A1, Timp1 mRNA発現量の減少傾向が認められたが、STDレベルまでの低下は認められなかった。

(3) 脂肪酸の細胞障害および脂肪蓄積作用に対する MT-1 および MT-2 の寄与

3-1. OA 曝露による脂肪酸蓄積の比較解析: OA 処理した MT-1/2KO 細胞内の脂肪蓄積量は mock 細胞と比較して有意に高く、MT-1/2KO 細胞と mock 細胞間の脂肪蓄積量の差は OA の濃度依存的に拡大した (図 3A)。また、硫酸亜鉛前処理 (25 および 50 μM) 後に OA を曝露した場合、mock 細胞における脂肪蓄積量は未処理時と比較して有意に減少したのに対し、MT-1/2KO 細胞では変動が認められなかった (図 3B)。mock 細胞における脂肪蓄積量は、亜鉛処理による MT タンパク質の誘導に応じて減少したと考えられる。MT-1 および MT-2KO 細胞は mock 細胞と比較して、脂肪蓄積量に著しい差は認められなかった。3-2. PA に対する細胞毒性: 解析に用いた全ての細胞 (mock、MT-1 および MT-2 欠損細胞) において、PA 用量依存的な細胞生存率の低下が認められた (図 3C)。また、各細胞間における細胞生存率を比較した結果、高用量域では MT-2KO 細胞が最も感受性が高く、続いて MT-1KO 細胞であり、mock 細胞は最も抵抗性を示した (図 3C)。以上、PA による細胞障害に対して、MT アイソフォームに依存した感受性差が存在する可能性が示唆された。また、これまでに複数の細胞株を樹立しており、これらの細胞株を用いて再現性を得る必要があると考えられた。

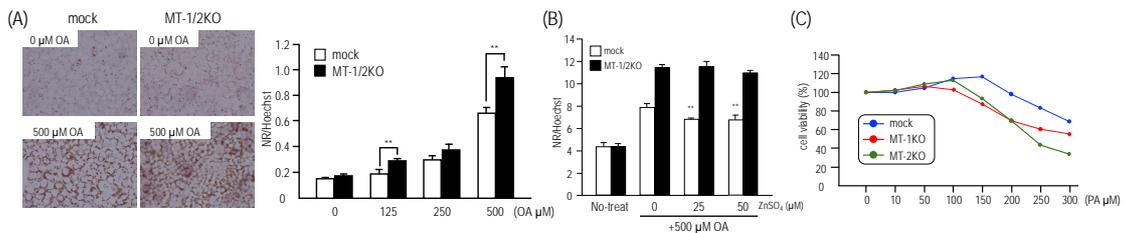


図3 脂肪酸の細胞障害および脂肪蓄積作用に対する MT-1 および MT-2 の寄与

- (A) OA 処理による脂肪蓄積量の比較: MT-1/2KO 細胞および mock 細胞内の脂肪蓄積量は、OA の濃度依存的に増加した。MT-1/2KO 細胞内の脂肪蓄積量は、OA を 125 および 500 μM 処理時に mock 細胞と比較して有意に増加した。
 (B) 硫酸亜鉛を前処理したときの脂肪蓄積量の比較: 25、50 μM の硫酸亜鉛前処理後に OA を曝露した場合、mock 細胞における脂肪蓄積量は、OA 単独処理と比較して有意に減少したのに対し、MTKO 細胞では変動が認められなかった。
 (C) PA 処理による細胞障害の比較: 全ての細胞において PA 処理による用量依存的な細胞障害が認められた。PA の高用量域において、MT-2KO 細胞が最も細胞障害の感受性が高かった。

(4) 亜鉛-MT 複合体投与による糖尿病および脂肪肝改善の可能性

in vivo および *in vitro* 解析から、亜鉛補充による HFD 誘導性の脂肪肝や耐糖能異常改善作用には、亜鉛と結合した MT が必要である可能性を見出した。本項目では、脂肪肝および耐糖能異常を生じさせた MTKO マウスに精製した亜鉛-MT 複合体を投与し、マウス個体レベルでの高血糖および脂肪肝改善効果を検討した。

結果、全ての群間で肝臓重量に著しい差は認められなかったが、亜鉛-MT 複合体群は他群と比較して、WAT 重量の低下傾向が認められた (図 4A)。MT-I および II mRNA 発現量は、亜鉛-MT 複合体群の肝臓で増加しており (図 4C)、亜鉛-MT 複合体が肝細胞に取り込まれていると考えられた。また、亜鉛-MT 複合体投与により、空腹時血糖値の低下傾向を伴う脂肪肝の改善が認められた (図 4B および D)。硫酸亜鉛は、上記の解析項目に影響を与えなかった。以上、亜鉛-MT 複合体は、高脂肪食誘導性の脂肪肝および耐糖能異常を改善したことから、既存の亜鉛補充療法よりも有効な手段となり得る可能性が示唆された。

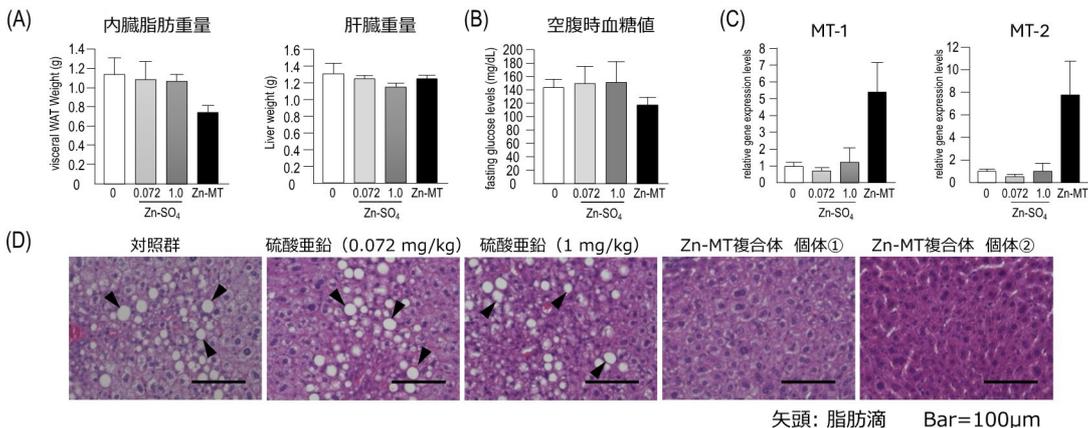


図4 亜鉛-MT複合体投与による糖尿病および脂肪肝改善の可能性

- (A) 各組織重量および空腹時血糖値: 亜鉛-MT 処理により内臓脂肪重量の低下が認められた。肝臓重量は全ての群間において差は認められなかった。また、亜鉛-MT 複合体投与により空腹時血糖値の低下傾向が認められた。
 (B) MT-1 および MT-2 mRNA 発現量: Zn-MT 投与により、肝臓中の MT-1 mRNA 発現量が約 5 倍、MT-2 mRNA 発現量が約 8 倍増加した。
 (C) 肝臓の組織像: 硫酸亜鉛投与群では、形成した肝臓中の脂肪滴の抑制は認められなかったが、Zn-MT 群では顕著な抑制が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤野真希、川上隆茂、門田佳人、角大悟、藤代瞳、鈴木真也、井上正久
2. 発表標題 メタロチオネインは亜鉛補充による脂肪肝改善に重要である
3. 学会等名 第22回亜鉛栄養治療研究会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川上隆茂、佐藤実紗、門田佳人、藤代瞳、角大悟、鈴木真也
2. 発表標題 MT欠損マウスにおける亜鉛補充の肝線維化およびアディポカイン発現量に対する影響
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢野 あすか、門田 佳人、川上 隆茂、鈴木 真也
2. 発表標題 メタボロミクスから判明したメタロチオネイン遺伝子欠損マウスのカルニチン代謝能異常
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉野 航未、川上 隆茂、門田 佳人、藤代 瞳、角 大悟、鈴木 真也
2. 発表標題 亜鉛補充下での高脂肪食誘導性の肝線維化に対するメタロチオネインの役割
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川上 隆茂、深瀬 依華、藤代 瞳、門田 佳人、阿部 友美、角 大悟、鈴木 真也、井上 正久
2. 発表標題 高脂肪食誘導性の脂肪肝および耐糖能に対する亜鉛 - MT複合体の影響解析
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024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
---------	---------