

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 5月 12日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790847

研究課題名（和文） 高血糖に伴う肝細胞の脂肪肝細胞への分化に対するインスリンシグナルの関与の解明

研究課題名（英文） Investigation of the role of insulin signaling molecules on development of hepatocytes into hepatocytes with fatty changes

研究代表者

藤 城 緑 (FUJISHIRO MIDORI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50420211

研究成果の概要（和文）：我々は既に、高血糖の持続により肝細胞のインスリン受容体が著明に増加することを発見している。この変化が、インスリン抵抗性→NASH→肝硬変→肝細胞癌の連鎖に関与するメカニズムについて検討した。長時間高グルコース刺激負荷をした各種インスリン作用臓器由来の細胞を用いて、インスリン受容体のプロモータ領域に結合サイトがあると予測されている転写因子と、それらに関与する Cofactor について解析を行ったが、発現量が有意に変化する蛋白は同定できなかった。今後の検討課題として、高グルコース刺激に、さらに高インスリン刺激を加えた負荷を加えた状態で、再度解析を行っている。

研究成果の概要（英文）：We have found that chronic hyperglycemia induced marked increase of insulin receptor expression in the liver cells. I investigated if the mechanism of this change involved in a vicious cycle of hepatic insulin resistance. First, I analyzed protein expression levels of transcription factors predicted to bind with insulin receptor promoter regions and their cofactors of the various insulin acting organs with chronic high glucose stimulation, but could not identify the protein that changed its expression levels during such stimulation. Now I am further analyzing the changes during chronically high glucose stimulation with hyperinsulinemia,

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：エネルギー・糖質代謝異常

## 1. 研究開始当初の背景

我が国を始めとした世界の先進国において、糖尿病・高血圧・脂質異常症といったインスリン抵抗性症候群の患者の急増は極めて大きな社会問題となっている。この病態は高齢化のほか、運動不足や高脂肪の食事、肥満等

の文明的背景によって引き起こされており、インスリン抵抗性が中心的な役割を果たしている。インスリン抵抗性は、肝臓や筋肉、脂肪における糖代謝の悪化のみならず、血管において動脈硬化の病態形成にも大きく関与している他、発癌との関連性も示唆されて

いる。従って、インスリン抵抗性の分子メカニズムの解明、さらにはそれを正常化させる薬剤の開発は、極めて重要な研究テーマである。

インスリンはまず、細胞膜上に存在するインスリン受容体と結合することにより、糖取込み、グリコーゲン合成、DNA 合成の促進、アポトーシスの抑制など多様な作用を發揮する。インスリン受容体のインスリン抵抗性への関与については古くから研究が盛んであるが、例えば Dexamethasone による転写レベルからの up-regulation (J Biol Chem 263: 13185-90, 1988, J Clin Invest 81: 499-504, 1988) が、どのような機序で生じているのか完全には解明されていない。近年では、インスリン受容体の発現を増加させることでインスリン抵抗性を改善させる新規の抗糖尿病分子の報告 (Metabolism 58(1):109-19, 2009)がある。さらに最近、抗腫瘍標的分子としてのインスリン受容体の役割が指摘される (Endocr Relat Cancer 15(1):325-35, 2008)など、インスリン受容体に関する研究は近年多方面に展開している。我々はこれまでに、糖尿病モデル動物や培養細胞におけるインスリンシグナル伝達系の解析や糖輸送蛋白 (GLUT) の機能解析、発現調節などを明らかとし、新規 PI3 キナーゼサブユニット (J Biol Chem 271(10):5317-20, 1996; J Biol Chem 272(12):7873-82, 1997) や Akt 結合蛋白 (J Biol Chem 280(18): 18525-35, 2005) のクローニングなどを進めてきた。また、3T3-L1 脂肪細胞を用いたインスリン抵抗性機序解明の研究では、肥満などのインスリン抵抗性の原因物質の一つと考えられている TNF $\alpha$  により活性化される 3 種類の MAP キナーゼの役割について詳細に検討することにより、3 種の中でも特に MEK1-ERK 系は、インスリンシグナルの下流レベル (J Biol Chem 276(23):19800-6, 2001) だけでなく、インスリン受容体レベルで発現量を減少させることにより、インスリン抵抗性を發揮していることを世界に先駆けて証明した (Mol Endocrinol 17(3):487-97, 2003)。

厚生労働省は、生活習慣病が誘因となり引き起こされる様々な合併症が健康長寿の最大の阻害要因となるだけでなく、国民医療費にも大きな影響を与えていることを重視して、メタボリックシンドローム (内臓脂肪症候群) 等の該当者・予備群に対する保健指導を徹底するため、2008 年 4 月より、特定健診・保健指導を始めた。糖尿病予備群の状態であるメタボリックシンドロームは、著明なインスリン抵抗性を惹起し、多くの場合肝臓は脂肪肝 (NAFLD) を呈し、その約 10% が非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に移行するとされ、NASH になると 5~10 年で高率に肝硬変、

肝細胞癌へと進展すると考えられている。

## 2. 研究の目的

このような社会的背景から私は、糖尿病や糖尿病予備群で見られる長期間の高血糖持続状態において、肝臓に生じている変化を調べるために、HepG2 ヒト肝細胞を低グルコース培地で継代した後に 24~48 時間高グルコース培地に置き換えた予備実験を行なったところ、インスリン受容体の発現量が mRNA レベルから著明に増加していることを発見した。さらに興味深いことに、長時間高グルコース培地に置換した細胞は、脂肪滴が増加しており、Oil-Red O 染色により定量化することで、「高血糖持続による肝細胞の脂肪化」を確認した。脂肪細胞分化の際にインスリン受容体が増加することからも、肝細胞でも同様の現象が生じる可能性が示唆される。

これらの予備実験の結果から、私は、インスリンシグナル伝達の鍵蛋白としてだけでなく、癌関連蛋白としても注目されているインスリン受容体に着目し、高血糖が持続した「ブドウ糖毒性の状態」において、特に肝細胞のインスリン受容体蛋白に関連する変化を詳細に検討することで、最大のインスリン作用臓器である肝臓におけるインスリン抵抗性発症の機序の解明とともに、新たなインスリン抵抗性改善薬の開発に応用できる可能性と、インスリン抵抗性→脂肪肝 (NAFLD) →NASH→肝硬変・肝細胞癌への連鎖の原因に迫ることができると考え、本計画を着想するに至った。

## 3. 研究の方法

22年度は「高血糖状態におけるインスリン受容体発現誘導に関与する転写因子についての機能解析 (vitro/vivo)」、23年度以降は「NAFLD/NASH の発症進展に重要な因子と 22年度に解析した転写因子の関心の解析・治療応用性の探究」を行っていきたい。具体的には、期間内に下記を進めていく。

1) 高血糖状態で変化する転写因子の探索：インスリン受容体 (IR) 遺伝子とそのプロモーター領域に結合する転写因子のいくつかについては既に報告がある。中でも、C/EBP (CCAAT/ enhancer-binding Protein)  $\alpha$  及び  $\beta$  は、肝細胞においてインスリンプロモーター活性を調節していることが報告されている。また、C/EBP  $\alpha$  は脂肪細胞分化に直接関与していることが知られており、3T3-L1 脂肪細胞の分化の際に IR 遺伝子の発現が増強されることと考え合わせ、IR 遺伝子と脂肪化との関連が示唆される。一方 C/EBP  $\beta$  は、活性型 (LAP; liver-enriched transcriptional activating protein) と不活性型 (LIP; liver-enriched transcriptional inhibitory protein) アイ

ソフォームがあり、肝細胞での IR 発現調節に深く関わっていることが知られており、インスリンは不活性型の LIP を増加させることが報告されている (J Biol Chem 277: 32234-42, 2002)。しかし、いずれの転写調節因子も、高血糖状態で IR の発現調節にどのように関与しているかについては明らかとなっていない。私は既にこの研究に着手し、長時間の高グルコース刺激で肝活性型の C/EBP $\beta$  が増加する結果を得ており、期待を持ってさらに研究を展開していきたいと考えている。

2) 関連が示唆される転写因子の培養細胞への過剰発現により、高血糖刺激と IR 発現変化の関係を検討する。 3) siRNA を用いた同転写因子の発現抑制により、高血糖刺激での IR 発現誘導に対する抑制の効果を解析する。 4) ルシフェラーゼアッセイにより、高血糖状態における同転写因子の、IR 発現調節への直接関与について検討を行う。 5) アデノウイルスの手法により同転写因子の活性型変異蛋白をマウス肝臓に過剰発現した際の、IR 発現誘導及びインスリン抵抗性と脂肪肝化への関与を検討する。 6) 糖尿病モデル動物での、IR および同転写因子の発現変化について解析する。 7) 高グルコース刺激+高インスリン刺激で誘導される変化について解析する。 8) 脂肪肝 (NAFLD) が脂肪性肝炎 (NASH) に移行する際に重要な働きをしている炎症細胞や伊東細胞、類洞内皮細胞などに対する、同転写因子の活性型変異蛋白過剰発現及び発現抑制の効果の検討を行う。

#### 4. 研究成果

まずは、インスリン受容体のプロモータ領域に結合サイトがあると予測されている転写因子と、それらに関与する Cofactor について、文献及び KeyMolnet による分子間相互作用および発現調節のシミュレーション解析を行った。候補に挙げた蛋白の発現変化について、長時間高グルコース刺激負荷をした HepG2 ヒト培養肝細胞や Fao ラット培養肝細胞、マウス初代培養肝細胞において、RT-PCR 法を用いて検討したが、いずれの蛋白も発現に有意差が生じないことが判明した。そこで、3T3-L1 脂肪細胞や C2C12 筋肉細胞など、他のインスリン作用臓器由来の細胞も用いて、再度解析の段階からのやり直しを行ったが、やはりいずれの蛋白も発現に有意差を生じないことが判明した。現在は、高グルコース刺激に、さらに高インスリン刺激を加えた負荷を加えた状態で、再度解析を行っている。NAFLD から NASH への移行の経過は two hit theory として知られている (Gastroenterology 114(4): 842-5, 1998)。すなわち、first hit として脂肪肝 (NAFLD) があり、そこにインスリン抵抗性、酸化スト

レス、炎症性サイトカイン、鉄、エンドトキシンなどの second hit が複雑に絡み合って NASH が発症するとされているが、そのメカニズムは未解明の部分が多い。我々はこれまでに、インスリン抵抗性発症機転の一因である「高血糖の持続」状態において、肝細胞でインスリン受容体の発現が増強されることを確認しており、インスリン受容体のプロモータ領域に結合する転写因子や Cofactor について網羅してその相互関係まで調べることで、インスリン抵抗性を基盤とした肝細胞への脂肪蓄積 (NAFLD) から NASH、肝硬変、肝細胞癌へ至る連鎖の機序が明らかになる可能性があり、その結果として、肝臓をターゲットとした新規のインスリン抵抗性改善薬の開発に寄与できると期待される。また、インスリンシグナルは細胞増殖などにも重要な役割を果たすことから、本研究の継続によりインスリン抵抗性と発癌との関連性についても新たな知見が得られる可能性があり、学術的な関心のみならず、社会的にも大きな貢献が得られると期待している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

① Takako Kikuchi, Jun Zhang, Hideyuki Sakoda, Yuko Koketsu, Midori Fujishiro, Akifumi Kushiya, Yusuke Nakatsu, Hideaki Kamata, Ken Inoki, Shin-Ichiro Takahashi, Hiroki Kurihara, Hideki Katagiri, Yoshitomo Oka, Tomoichiro Asano, LST8levelcontrolsbasalp70 S6 kinase and Akt phosphorylations, and mTORC1 and mTORC2 negatively regulate each other by competing for association with LST8, Obesity Research & Clinical Practice, 査読有、In Press、DOI: 10.1016/j.orcp.2011.10.002

② Akifumi Kushiya, Hirofumi Okubo, Hideyuki Sakoda, Takako Kikuchi, Midori Fujishiro, Hirokazu Sato, Sakura Kushiya, Misaki Iwashita, Fusanori Nishimura, Toshiaki Fukushima, Yusuke Nakatsu, Hideaki Kamata, Shoji Kawazu, Yukihito Higashi, Hiroki Kurihara, Tomoichiro Asano, Xanthine oxidoreductase is involved in macrophage foam cell formation and atherosclerosis development, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 査読有、32(2)、2012、291-298、DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.234559

③ Misaki Iwashita, Hideyuki Sakoda, Akifumi Kushiya, Midori Fujishiro, Haruya Ohno, Yusuke Nakatsu, Toshiaki

Fukushima, Sonoko Kumamoto, Yoshihiro Tsuchiya, Takako Kikuchi, Hiroki Kurihara, Hiroshi Akazawa, Issei Komuro, Hideaki Kamata, Fusanori Nishimura, and Tomoichiro Asano, Valsartan, independently of AT1 receptor or PPAR $\gamma$ , suppresses LPS-induced macrophage activation and improves insulin resistance in cocultured adipocytes, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 査読有、302(3)、2012、E286- E296、DOI: 10.1152/ajpendo.00324.2011

④ Yusuke Nakatsu, Hideyuki Sakoda, Akifumi Kushiya, Jun Zhang, Hiraku Ono, Midori Fujishiro, Takako Kikuchi, Toshiaki Fukushima, Masayasu Yoneda, Haruya Ohno, Nanao Horike, Machi Kanna, Yoshihiro Tsuchiya, Hideaki Kamata, Fusanori Nishimura, Toshiaki Isobe, Takehide Ogihara, Hideki Katagiri, Yoshitomo Oka, Shin-ichiro Takahashi, Hiroki Kurihara, Takafumi Uchida and Tomoichiro Asano, Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1 associates with insulin receptor substrate-1 and enhances insulin actions and adipogenesis, *J Biol Chem*, 査読有、286(23)、2011、20812-2022、DOI: 10.1074/jbc.M110.206904

⑤ Haruya Ohno, Yusuke Nakatsu, Hideyuki Sakoda, Akifumi Kushiya, Hiraku Ono, Midori Fujishiro, Yuichiro Otani, Hirofumi Okubo, Masayasu Yoneda, Toshiaki Fukushima, Yoshihiro Tsuchiya, Hideaki Kamata, Fusanori Nishimura, Hiroki Kurihara, Hideki Katagiri, Yoshitomo Oka, and Tomoichiro Asano, 4F2hc stabilizes GLUT1 protein and increases glucose transport activity, *Am J Physiol Cell Physiol*, 査読有、300(5)、2011、C1047- C1054、DOI: 10.1152/ajpcell.00416.2010

[学会発表] (計1件)

藤城 緑、長時間高グルコース刺激による肝細胞内インスリン受容体遺伝子発現調節機構の解明、第53回日本糖尿病学会年次学術集会、2010年5月28日、岡山市デジタルミュージアム(岡山県)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計◇件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤城 緑 (FUJISHIRO MIDORI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 50420211

研究者番号:

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: