

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19545

研究課題名（和文）肝グルコース取り込みによる新規代謝制御の解明

研究課題名（英文）Investigation of the regulatory mechanism of hepatic glucose response

研究代表者

井上 啓（Inoue, Hiroshi）

金沢大学・新学術創成研究機構・教授

研究者番号：50397832

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：肝臓はグルコースを取り込み、肝臓代謝のみならず、遺伝子転写から他臓器との連関などのグルコース応答を惹起する。過栄養・肥満では、肝グルコース応答が障害され、その障害は耐糖能障害・インスリン抵抗性の病因となる。本研究では肝グルコース応答の制御メカニズムとしてGck調節タンパク質（GKRP）の役割の解明に取り組んだ。GKRPは過栄養・肥満によって126番リジン残基（K126）アセチル化が増加する。GKRPのK126R変異ノックインマウスは、肝糖代謝に明らかな変化を示さないものの、トランスクリプトーム解析では遺伝子発現変化を来した。GKRPが新規なグルコース応答制御分子であ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

肝グルコース応答障害は、耐糖能障害からインスリン抵抗性・脂肪肝などの様々な生活習慣病の病因となる。肝グルコース応答の制御分子としてGckが知られてきたが、Gckを標的とした生活習慣病治療薬の開発は十分な成果が得られていない。本研究において、新規な肝グルコース応答のメカニズム分子候補としてGKRPを見出すことは、生活習慣病の新規治療標的の解明に繋がる。さらに、生活習慣病の発症と増悪において、肝グルコース応答とその障害が果たす役割の解明へと繋がる。

研究成果の概要（英文）：The liver takes up glucose and triggers glucose responses, including not only hepatic metabolism but also transcriptional regulation and inter-organ crosstalk with other organs. In overnutrition and obesity, hepatic glucose response is impaired, which contributes to the pathogenesis of glucose intolerance, insulin resistance, and fatty liver. This study aimed to elucidate the role of glucokinase regulatory protein (GKRP) in the control mechanism of hepatic glucose response. GKRP undergoes increased acetylation at lysine 126 (K126) due to overnutrition and obesity. Although K126R mutant knock-in mice of GKRP did not show significant changes in hepatic glucose metabolism, transcriptome analysis revealed changes in gene expression. This suggests that GKRP may be a novel glucose response control molecule.

研究分野：健康科学および栄養代謝内分泌学

キーワード：肝臓 糖取り込み

1. 研究開始当初の背景

肝臓はグルコースを取り込み、それに応答して、肝臓内外の糖・エネルギー代謝を変化させる(以後、この代謝変化を「肝グルコース応答」と記述)。グルコース取り込みを契機として、脂肪利用・糖産生から脂肪産生・糖利用へと、肝内代謝を変換する。また、肝グルコース取り込みに続いて、自律神経や内分泌を介した臓器連関を誘導し、全身の糖・エネルギー代謝を変化させる。実際に、肝グルコース取り込みに伴い、摂食抑制や脂肪燃焼が誘導され、そのメカニズムに求心性迷走神経やヘパトカイン FGF21 を介した肝-脳連関が関与することが明らかにされている。

肝グルコース取り込みの制御因子として、グルコキナーゼ(Gck)が知られている。Gck は、細胞質でグルコースからグルコース-6リン酸(G6P)への代謝反応を触媒する酵素である。肝細胞でグルコースは、GLUT2 輸送担体を介して、細胞内外に移行することができる。しかし、Gck が、グルコース濃度依存性に酵素活性を増加させる特性を持つことから、高グルコース環境下で、グルコースを G6P へと置換することで、細胞内外のグルコースの濃度勾配を内向きに維持することができる。一方で、正常グルコース濃度(細胞内外のグルコースレベルが 100 から 120g/dL 程度)では、Gck 活性は制限され、肝グルコース取り込みは起こらない。G6P は、解糖系反応の最初の代謝物であるとともに、肝グルコース応答の強力なアロステリック代謝物である。実際に、G6P が、グリコーゲン代謝酵素、解糖系代謝酵素や転写因子 ChREBP などの活性を制御することが知られている。そのため、グルコース濃度に依存して G6P 生成を調節する Gck は、肝内代謝変化から臓器連関に及び肝グルコース応答の制御因子と考えられている。

過栄養・肥満では、肝グルコース取り込みとその応答が障害される。それらの障害は、肝糖・脂肪産生の恒常的増強や臓器連関障害による脂肪燃焼の減少などを惹起し、耐糖能障害・インスリン抵抗性・脂肪肝の病因となる。この肝グルコース取り込みと応答の障害の原因が、肝 Gck の活性化障害に起因すると考えられたため、かつて、肝 Gck は 2 型糖尿病やインスリン抵抗性の治療標的として注目された。しかし、肝 Gck 活性化剤は、耐糖能障害や脂肪肝をむしろ増悪させ、その開発は悉く失敗に終わっている。このことは、肝臓では、Gck とは異なる肝グルコース応答の制御メカニズムが存在し、そのメカニズムの障害が過栄養・肥満の病態に関与することを示唆している。

Gck の活性制御分子として、Gck 調節タンパク質(GKRP)が知られている。GKRP は、肝細胞特異的に発現し、正常グルコースレベルで肝細胞 Gck 活性を強力に抑制する。詳細には、GKRP は、正常グルコース環境では Gck と結合し、核に局在するが、グルコース濃度が増加すると、Gck から解離し、細胞質へと局在を変える。研究代表者らは、過栄養・肥満で、GKRP がアセチル化され、肝 Gck 活性化を恒常的に抑制することを明らかにした(Nat Commun 2018;9:30)。脂肪肝では、GKRP の 126 番リジン(K126)アセチル化が増加し、グルコース濃度依存的な Gck-GKRP 解離が阻害され、Gck 活性が恒常的に抑制される。また、GKRP 非アセチル化変異体(GKRP の K126 を R に置換)の肝臓過剰発現では、過栄養・肥満による肝グルコース取り込みを増加させ、GKRP アセチル化変異体(GKRP の K126 を Q に置換)の肝臓過剰発現では、肝グルコース取り込みを減少させる。GKRP はグルコース濃度に依存し、Gck との結合・解離を起こし、細胞内局在を変える。前述の研究代表者らの知見など、GKRP が肝グルコース取り込みに密接に関与することを示す報告は多い。しかし、GKRP の肝グルコース応答に果たす役割は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、GKRP アセチル化を介した肝臓グルコース応答とその破綻の解明を目的とする。具体的には、既に作出を済ませた GKRP の K126R / K126Q のそれぞれのノックインマウスの表現型解析とともに、肝遺伝子発現解析を行い、その肝グルコース応答における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 動物実験

動物実験は、金沢大学実験動物施設において、金沢大学動物実験規程に従い、金沢大学動物実験委員会による審査、金沢大学長からの承認を得て、実施した。マウスは、自由摂餌・自由給水で 12 時間の明暗サイクルと温度管理した環境下で飼育した。非肥満マウスは、10-12 週齢まで、通常餌(9%脂肪(CRF-1)、オリエンタル酵母、東京)の自由摂餌・自由給水で飼育した。肥満マウスは、7 週齢健康マウスに、12 週間、高脂肪餌(60%脂肪(D12429)、リサーチダイエツト、ニューブランズウィック、ニュージャージー)を与え、作成した。体重 35 グラム以上に育ったマウスのみを、肥満マウスとして用いた。グルコース負荷テストは、16 時間絶食の後に、経腹腔的にグルコースを 2 グラム/kg 体重となるように投与し、120 分まで血中グルコース値を計測し、同時に血液サンプルを採取した。

2) 血漿パラメータおよび肝臓中性脂肪量の解析

血液サンプルは、尾静脈からアプロチニンおよび EDTA の存在下でヘマトクリット管を用いて採取し、血漿サンプルは -80 で保存した。血中グルコース値測定にはグルコカード G プラスメーター(アークレイ株式会社、京都)を使用した。血中インスリン値をマウスインスリン ELISA キ

ット(森永生科学研究所、横浜)により測定した。肝トリグリセリド量は、凍結した肝臓を粉碎後、イソプロパノールでトリグリセリドを抽出し、TG E-テストワコーキット(富士フィルム和光純薬、大阪)により、測定した。

3) 肝臓遺伝子発現解析

-80 で凍結保存をした肝臓から、SV Total RNA Isolation System(プロメガ、ウィスコンシン)を用いて、RNAを採取した。cDNAは、PrimeScript Rt-PCR Kit(タカラ、草津)により作製した。定量的PCRは、SYBR Select Master Mix(Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ)を用い、内部標準として *Rplp0* 遺伝子を用いた。網羅的な遺伝子発現解析のために、TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit(イルミナ、カリフォルニア)を用い、NovaSeq 6000(イルミナ)によるシーケンス解析を行った。

4) 統計解析

全データは、平均値 ± 標準誤差で表記した。統計解析は IBM SPSS Statistics 24(IBM)を用いて、2群間の比較はスチューデント t 検定を用い、3群以上の比較には ANOVA およびダネット検定またはチューキー検定により行った。有意水準は 5%未満とした。

4. 研究成果

GKRP アセチル化変異を模倣する K126Q マウスは、通常餌飼育下 8 週齢において、随時摂餌下の血中グルコース値およびインスリン値は統計的に有意ではないものの、増加傾向を呈した。また、肝中性脂肪量は対照と比して、変化を示さなかった。経腹腔的グルコース負荷テストでは、グルコース投与後 30 分および 60 分で血中グルコース値・インスリン値が、120 分で血中インスリン値が高値を呈した。

一方で、K126R マウスは、通常餌飼育下 8 週齢において、随時摂餌下の血中グルコース値およびインスリン値、肝臓中性脂肪量のいずれにおいても変化は示さなかった。また、経腹腔的グルコース負荷テストにおいても、血中グルコース値・インスリン値の両者ともに、対照との差は示さなかった。しかし、高脂肪餌飼育下では、投与期間中血中グルコース値に明らかな変化はないものの、投与開始 8 週間以降で、血中インスリン値が低値を呈した。高脂肪餌飼育 12 週間後での経腹腔的グルコース負荷テストでは、負荷後 30 分および 60 分で、血中グルコース値・インスリン値は対照と比し低値を示した。また、肝臓中性脂肪量も有意な低値を示した。

通常餌飼育下の K126Q マウスおよび K126R マウスの肝臓において、網羅的な遺伝子発現解析を行った。野生型マウスと比して、2 倍以上の発現変化を示す遺伝子を抽出すると、K126Q マウスで発現が低下し、K126R マウスで増加するものは、71 遺伝子であった。また、K126Q マウスで発現が増加し、K126R マウスで低下するものは、198 遺伝子であった。ヘパトカインである FGF21 の遺伝子発現は、K126Q マウスで発現が低下し、K126R マウスで増加していたが、この発現変動は、定量的 PCR においても同様であった。通常食飼育下において、K126R はほぼ表現型の変化を持たず、耐糖能障害やインスリン抵抗性を示さないが、肝臓遺伝子発現は、明らかな変化を呈する。この知見から、GKRP がアセチル化を介して、肝臓遺伝子発現制御に関与する可能を示唆した。GKRP は、Gck とともに、肝グルコース応答と密接に関連している。本萌芽研究から、GKRP アセチル化依存性の肝臓遺伝子発現制御の役割解明の必要性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Inaba Y, Hashiuchi E, Watanabe H, Kimura K, Oshima Y, Tsuchiya K, Murai S, Takahashi C, Matsumoto M, Kitajima S, Yamamoto Y, Honda M, Asahara S, Ravnkjaer K, Horike S, Kaneko S, Kasuga M, Nakano H, Harada K, Inoue H.	4. 巻 14
2. 論文標題 The transcription factor ATF3 switches cell death from apoptosis to necroptosis in hepatic steatosis in male mice.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 167
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-35804-w.	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 該当する

1. 著者名 Kokaji T, Eto M, Hatano A, Yugi K, Morita K, Ohno S, Fujii M, Hironaka KI, Ito Y, Egami R, Uematsu S, Terakawa A, Pan Y, Maehara H, Li D, Bai Y, Tsuchiya T, Ozaki H, Inoue H, Kubota H, Suzuki Y, Hirayama A, Soga T, Kuroda S.	4. 巻 12
2. 論文標題 In vivo transomic analyses of glucose-responsive metabolism in skeletal muscle reveal core differences between the healthy and obese states.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 13719
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-17964-9	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 Bai Yunfan, Morita Keigo, Kokaji Toshiya, Hatano Atsushi, Ohno Satoshi, Egami Riku, Pan Yifei, Li Dongzi, Yugi Katsuyuki, Uematsu Saori, Inoue Hiroshi, Inaba Yuka, Suzuki Yutaka, Matsumoto Masaki, Takahashi Masatomo, Izumi Yoshihiro, Bamba Takeshi, Hirayama Akiyoshi, Soga Tomoyoshi, Kuroda Shinya	4. 巻 27
2. 論文標題 Trans-omic analysis reveals opposite metabolic dysregulation between feeding and fasting in liver associated with obesity	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 109121 ~ 109121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2024.109121	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 Qiu Yujia, Sajidah Elma Sakinatus, Kondo Sota, Narimatsu Shinnosuke, Sandira Muhammad Isman, Higashiguchi Yoshiki, Nishide Goro, Taoka Azuma, Hazawa Masaharu, Inaba Yuka, Inoue Hiroshi, Matsushima Ayami, Okada Yuki, Nakada Mitsutoshi, Ando Toshio, Lim Keesiang, Wong Richard W.	4. 巻 13
2. 論文標題 An Efficient Method for Isolating and Purifying Nuclei from Mice Brain for Single-Molecule Imaging Using High-Speed Atomic Force Microscopy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 279 ~ 279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells13030279	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 Matsukawa Toshiya, Yagi Takashi, Uchida Tohru, Sakai Mashito, Mitsushima Masaru, Naganuma Takao, Yano Hiroyuki, Inaba Yuka, Inoue Hiroshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Hepatic FASN deficiency differentially affects nonalcoholic fatty liver disease and diabetes in mouse obesity models	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e161282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.161282	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 Park Gyu-jin, Fukasawa Kazuya, Horie Tetsuhiro, Masuo Yusuke, Inaba Yuka, Tatsuno Takanori, Yamada Takanori, Tokumura Kazuya, Iwahashi Sayuki, Iezaki Takashi, Kaneda Katsuyuki, Kato Yukio, Ishigaki Yasuhito, Mieda Michihiro, Tanaka Tomohiro, Ogawa Kazuma, Ochi Hiroki, Sato Shingo, Shi Yun-Bo, Inoue Hiroshi	4. 巻 8
2. 論文標題 l-Type amino acid transporter 1 in hypothalamic neurons in mice maintains energy and bone homeostasis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e154925
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.154925	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2件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 井上啓
2. 発表標題 迷走神経性臓器連関による糖代謝恒常性維持とその破綻
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上啓
2. 発表標題 Modal shift of hepatocyte death in nonalcoholic fatty liver disease
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢大学新学術創成研究機構栄養・代謝研究ユニット https://inoue.w3.kanazawa-u.ac.jp/

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