様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ６ 月　 ２ 日現在

機関番号：１１５０１
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2013～2015
課題番号：２５６７０１５８

研究課題名（和文）ヘム欠乏により惹起される糖代謝異常の分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Clarification of the molecular mechanism on the impaired glucose metabolism induced by heme deficiency

研究代表者
中島　修（Nakajima, Osamu）

山形大学・医学部・教授

研究者番号：８０３１２８４１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：重要な生体分子であるヘム量を調節している、5-アミノレブリン酸合成酵素（ALAS)の遺伝子破壊マウスが糖尿病であることを発見し、このマウスの解析から、細胞内のヘムが欠乏すると、グリコーゲンの合成が異常になるため、糖尿病になることが判った。また、この異常はALASによって合成される5-アミノレブリン酸の投与により改善され、5-アミノレブリン酸が糖尿病薬として働くのはグリコーゲンの合成を促進しているためであることを明らかにした。。

研究成果の概要（英文）：In vertebrates, the initial step in heme biosynthesis is the production of 5-aminolevulinic acid (ALA) by ALA synthase (ALAS). The ALAS1 gene encodes a ubiquitously expressed isozyme. Mice heterozygous null for ALAS1 (ALAS1+/-s) experience mitochondrial dysfunction (MD), impaired glucose tolerance (IGT) and insulin resistance (IR) past 20-weeks of age (aged-ALAS1+/-s). IGT/IR in aged-ALAS1+/-s was remedied by the oral administration of ALA for 1-week. By contrast, MD required 6-weeks of ALA-administration before improvements could be observed, indicating the IGT/IR phenotype is not due to MD. Aged-ALAS1+/-s showed impaired glycogen metabolism (IGyM) in skeletal muscle (SM)/liver and data indicate a defect in de novo glycogen synthesis that could account for the IGT/IR phenotype. Together, our data reveals an unexpected metabolic link between heme and glucose metabolism.

研究分野：分子生物学

キーワード：糖尿病　糖代謝異常　ヘム　5-アミノレブリン酸　5‐アミノレブリン酸合成酵素　耐糖能異常　グリコーゲン　糖尿病治療

１．研究開始当初の背景

最初のヘム生合成前駆体である 5-アミノレブリン酸（ALA）はミトコンドリア内で、ALA 合成酵素（ALAS）により合成され、ALA 合成が律速段階であることから、細胞内のヘム量は、ALA 合成によって調節されている。

前糖尿病病態患者および軽度二型糖尿病患者に対する、ALA 経口投与のコホート研究から、ALA が耐糖能や HbA1c 値を改善する糖尿病治療薬となりうることが示された。グルコースがヘム代謝を調節することは、グルコース投与によりポルフィリン症での急性症状が抑えられることが古くから知られており、グルコースによるヘム代謝の調節機構があることは知られているが、ヘムによるグルコース代謝調節機構は現在まで、明らかになっていない。ALAS には 2 種のアイソザイムがあり、それぞれの遺伝子は、別々の遺伝子座にコードされている。ALAS1 は非組織特異型ですべての組織に発現し、ミトコンドリア電子伝達系のヘムタンパク質等へのヘム供給に関わる。ALAS2 は赤血球系組織特異的に発現し、主に、ヘモグロビンへのヘム供給に関わっている。我々はすでに ALAS1 および ALAS2 の遺伝子破壊マウスを確立し、表現型解析を行っており、ともに完全欠失体は胎生致死であった。

２．研究の目的

本研究では、ALA による前糖尿病患者・二型糖尿病患者の治療効果に関わる、ヘムによる糖代謝調節の分子機構を解明し、ALA の糖尿病治療効果の作用メカニズムを明らかにすることを目指す。

３．研究の方法

本研究では、インスリン標的臓器である肝臓、筋肉、脂肪組織で発現している ALAS アイソザイムである ALAS1 遺伝子破壊マウスヘテロ接合体（ALAS1+/-マウス）の糖代謝を解析して糖代謝異常の有無を明らかにし、ALAS1+/-マウスでの糖代謝異常をもたらす分子機構を解析した。

４．研究成果

（１）ALAS1+/-マウスでの ALAS1 発現

ALAS1+/-マウスでの肝臓および骨格筋での ALAS1 発現は mRNA およびタンパク質レベルで野生型と比較して、半減以下となっており、また、尿中に排泄される１日当たりの ALA 量は野生型と比べ有意に低下していた。

（２）ALAS1+/-マウスの耐糖能およびインスリン応答能

ALAS1+/-マウスの随時血糖や絶食時血糖には異常は認められなかったが、経口糖負荷試験（OGTT）では、15 週齢以下の若齢では異常は認められなかったが、20 種齢以降の加齢した ALAS1+/-マウスで、糖負荷後の血糖値が野生型と比べ有意に上昇し、耐糖能異常が観察された。インスリン負荷試験（ITT）においても、加齢した ALAS1+/-マウスでインスリン抵抗性が認められた。

（３）ALAS1+/-マウスの耐糖能異常およびインスリン抵抗性に対する ALA 投与の影響

加齢した ALAS1+/-マウスに対して、１週間、ALA を経口投与した後、OGTT および ITT を行ったところ、耐糖能およびインスリン応答能が野生型とほぼ同等まで改善が認められ、加齢した ALAS1+/-マウスでの糖代謝異常が ALA 依存的な病態であることが明らかとなった。

（４）ALAS1+/-マウス骨格筋でのグルコーストランスポーターおよびインスリンシグナル関連分子の発現およびリン酸化状態の解析

ALAS1+/-マウス骨格筋でのグルコーストランスポーターGlut4 の発現は野生型と有意な差は無く、また、インスリンシグナルに関わる Akt、GSK3β の発現レベルおよびリン酸化状態も野生型と顕著な違いは認めらえなかった。

（５）ALAS1+/-マウスにおけるグリコーゲン顆粒の形態

透過電子顕微鏡解析から、加齢した ALAS1+/-マウス骨格筋におけるグリコーゲン顆粒の形態に異常が認められた。このグリコーゲン顆粒の形態異常は、糖代謝異常の表現型と連鎖しており、若齢の ALAS1+/-マウスや ALA 投与した ALAS1+/-マウスの骨格筋では認められなかった。

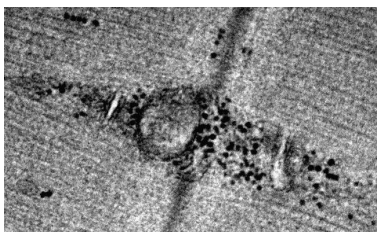

図１．野生型骨格筋でのグリコーゲン顆粒
ミトコンドリア周囲に散在する黒い点がグリコーゲン顆粒

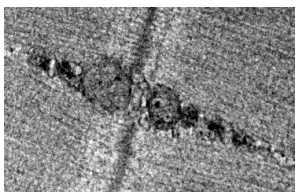

図２．ALAS1+/-マウス骨格筋でのグリコーゲン顆粒
小さい顆粒が凝集した異常構造を示す

加齢 ALAS1+/-マウスの肝臓のグリコーゲン顆粒の形態についても、異常な形態を示した。

（６）ALAS1+/-マウスでのグリコーゲン代謝

通常飼育条件下での骨格筋でのグリコーゲン含量を解析したところ、加齢 ALAS1+/-マウスでは野生型より、有意に高値を示したが、ALA 投与加齢 ALAS1+/-マウスでは野生型レベルまで低下した。肝臓のグリコーゲン含量についても同様であった。

骨格筋でのインスリン依存的なグリコーゲン合成は、インスリンによる血糖低下作用において主要なグルコース処理の経路であることから、ITT おいて、インスリン投与前と投与１時間後の骨格筋でのグリコーゲン含量を測定することで、骨格筋における de novo グリコーゲン合成を解析した。野生型骨格筋でグリコーゲン含量は、インスリン投与前後で有意に上昇したのに対し、加齢した ALAS1+/-マウス骨格筋では、インスリン投与前後でのグリコーゲン含量に有意な差が認

められず、インスリン依存的な de novo グリコーゲン合成が異常であることが判った。一方、ALA 投与加齢 ALAS1+/-マウス骨格筋では野生型と同様にインスリン依存的な de novo グリコーゲン合成が認められた。肝臓での de novo グリコーゲン合成については、OGTT 時に絶食させたマウスの糖負荷前後の肝臓におけるグリコーゲン含量を比較することで評価し、骨格筋と同様に加齢した ALAS1+/-マウスの肝臓における de novo グリコーゲン合成能が有意に低下していることを観察し、ALA 投与した加齢 ALAS1+/-マウスの肝臓での de novo グリコーゲン合成能は、野生型レベルまで回復していることを確認した。

（７）ALAS1+/-マウス骨格筋・肝臓におけるグリコーゲンシンターゼ活性の解析

グリコーゲン合成の律速酵素であるグリコーゲンシンターゼ（GS）は細胞内での最初のグルコース代謝物であるグルコース 6－リン酸（G6P）によりアロステリックな活性化を受けることにより、グリコーゲン合成能が十分に上昇し、血糖をグリコーゲンへ変換し、血糖値の低下を促すと考えられている。そこで、骨格筋および肝臓のタンパク抽出物における GS 酵素活性を G6P 低濃度および高濃度存在下で測定することで、GS に対する G6P 活性化能の異常の有無を解析した。野生型骨格筋・肝臓では G6P 依存的な GS 活性の上昇が観察されたのに対して、加齢 ALAS1+/-マウスでは両組織とも、G6P 濃度に依存した GS 活性の有意な変化は認められなかったが、ALA 投与した加齢 ALAS1+/-マウス骨格筋では野生型同様の G6P 依存的な GS 活性の上昇が観察された。

（８）ALAS1 ノックダウン筋芽細胞 C2C12 におけるグリコーゲン代謝の解析

加齢 ALAS1+/-マウスに認められたグリコーゲン代謝異常が cell-autonomous な異常かシステミックな異常かを検証するために、我々は筋芽細胞 C2C12 株の ALAS1 ノックダウン株を確立し、筋細胞への分化誘導後の通常培養条件下でのグリコーゲン含量を解析したところ、加齢 ALAS1+/-マウスと同様に、ALAS1 ノックダウン株のグリコーゲン含量がコントロール株と比較して、有意に上昇しており、ALA 処理によって野生型レベルまで低下することを見出した。さらに、インスリン依存的な de novo グリコーゲン合成を解析したところ、ALAS1 ノックダウン株では、コントロール株と比較して有意の合成能が低下していることが確認された。ALAS1 ノックダウン株のこれらの異常は培養液中へ ALA を添加することで、正常に戻されることが確認された。

（９）C2C12 細胞グリコーゲン代謝に対するヘム生合成阻害剤およびヘム処理の影響

通常培養条件下では、培地中へのヘム生合成阻害剤スクシニルアセトン（SA）を添加すると、コントロール株におけるグリコーゲン含量が有意に上昇すること、また、ALAS1 ノックダウン株に対する ALA 添加の効果が SA 添加によりキャンセルされることを観察した。また、インスリン依存的な de novo グリコーゲン合成についても SA の作用は同様であった。さらに、通常培養条件下の ALAS1 ノックダウン株に対し、培地中へヘミン（ヘム）を添加すると、グリコーゲン含量が正常レベルまで低下することを確認した。以上から、ALA の作用は細胞内でヘムに変換されてから、発揮されることが示唆された。

（１０）加齢 ALAS1+/-マウス骨格筋でのミトコンドリア異常

若齢 ALAS1+/-マウスでは観察されなかったが、加齢 ALAS1+/-マウス骨格筋において、ミトコンドリアゲノムレベルが、野生型と比較して有意に低下しているのが観察された。また、ミトコンドリア形成制御因子である PGC1α mRNA 発現レベルも有意に低下しているのを認めた。さらに、透過電子顕微鏡解析からも骨格筋でのミトコンドリアの形態が萎縮しており、電子密度が低下しているのが観察された。さらに、トレッドミルテストでは、加齢 ALAS1+/-マウスにおいて、耐運動負荷能の低下が認められた。さらに、運動負荷後の血中乳酸値も、野生型と比較して有意に上昇していた。以上から、加齢 ALAS1+/-マウスの骨格筋ではミトコンドリア異常機能異常があることが示唆された。

（１１）ALA 投与の、加齢 ALAS1+/-マウスでのミトコンドリア異常への影響

加齢 ALAS1+/-マウスに認められた糖代謝異常は 1 週間の ALA 投与により野生型レベルまで改善されたが、ミトコンドリア異常については、1 週間の ALA 投与では、骨格筋ミトコンドリア DNA レベルの有意な上昇認められず、6 週間の ALA 投与により、有意に上昇した。一方、骨格筋での PGC1α mRNA レベルは 1 週間および 6 週間の ALA 投与により有意に上昇した。以上の解析から、ミトコンドリア異常は糖代謝異常の発症と深く関連していることが指摘されているが、加齢した ALAS1+/-マウスにおける糖代謝異常の発症については、ミトコンドリア異常は必須な条件ではないことが明らかとなった。

【結論】

本研究により、生体内でのヘム欠乏により、糖代謝異常が発症することが示された。また、このヘム欠乏により惹起される糖代謝異常はグリコーゲン合成の異常が原因であることが示された。これまで、二型糖尿病などの糖代謝異常で認められるグリコーゲン合成の異常は、主にインスリンシグナルの異常の結果とみなされていたが、ヘム欠乏により、インスリンシグナル異常を介さないグリコーゲン合成異常の惹起により糖代謝異常が発症することが明らかとなった。また、本研究により、ALA がこれまでの糖尿病治療薬の作用メカニズムとは異なり、グリコーゲン合成を促進させることで耐糖能異常を改善していることが本研究から明らかとなった。さ

らに、ヘムによる糖代謝の制御は現在まで報告されておらず、本研究は、全く新しい代謝連関を明らかにした。

この研究成果は、英文論文として、現在、投稿中である。

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　　件）

〔学会発表〕（計　９件）

① 斉藤真一, 中野博, 野原豪和, 白澤信行, 岡野聡, 高橋究, 田中徹, 中島元夫, 中島修：生体内での 5-アミノレブリン酸欠乏はミトコンドリア異常と、耐糖能異常・インスリン抵抗性の原因となるグリコーゲン合成異常を惹起する. 第 6 回ポルフィリン－ALA 学会年会, 東京大学医科学研究所（東京都港区）; 2016 年 4 月

② Osamu Nakajima, Shinichi Saitoh, Takekazu Nohara, Nobuyuki Shirasawa, Hiroshi Nakano, Kiwamu Takahashi, Tohru Tanaka, Motowo Nakajima: In vivo 5-aminolevulinic acid deficiency causes impaired glycogen synthesis leading to impaired glucose tolerance and insulin resistance. 3rd International ALA and Porphyrin Symposium, Honolulu USA; December 2015.

③ 中島修, 斉藤真一, 野原豪和, 中野博, 白澤信行, 岡野聡, 高橋究, 田中徹, 中島元夫：5-アミノレブリン酸合成酵素 ALAS1 遺伝子破壊マウスにおける、グリコーゲン代謝異常と関連した耐糖能異常とインスリン抵抗性の惹起. BMB2015, 神戸ポートアイランド（兵庫県神戸市）; 2015 年 12 月

④ 斉藤真一, 野原豪和, 中野博, 白澤信行, 岡野聡, 高橋究, 田中徹, 中島元夫, 中島修：5-アミノレブリン酸合成酵素 ALAS1 遺伝子破壊マウスにおける、グリコーゲン代謝異常と関連した耐糖能異常とインスリン抵抗性の惹起. BMB2015, 神戸ポートアイランド（兵庫県神戸市）; 2015 年 12 月

⑤ 斉藤真一, 野原豪和, 中野博, 白澤信行, 岡野聡, 高橋究, 田中徹, 中島元夫, 中島修：ALA 合成酵素遺伝子破壊マウスにおけるインスリン抵抗性と骨格筋ミトコンドリア異常. 第 5 回ポルフィリン－ALA 学会年会, 早稲田大学理工学部（東京都新宿区）; 2015 年 4 月

⑥ Osamu Nakajima, Shinichi Saitoh, Takekazu Nohara, Nobuyuki Shirasawa, Hiroshi Nakano, Kiwamu Takahashi, Tohru Tanaka, Motowo Nakajima: 5-ALA administration ameliorates insulin-resistance but mitochondrial dysfunction in 5-aminolevulinate synthase 1 (ALAS1) gene-targeted heterozygous mice. 2st International ALA and Porphyrin Symposium, Tokyo; Decenber 2014

⑦ 斉藤真一, 中野博, 高橋究, 田中徹, 中島元夫, 中島修: 組織非特異型 ALA 合成酵素（ALAS1）遺伝子破壊マウスヘテロ接合体での耐糖能異常. 第 3 回ポルフィリン－ALA 学会年会, 神戸ポートアイランドセンター・ニチイ学館（兵庫県神戸市）; 2014 年 4 月

⑧ Saitoh S, Nakajima O: Impaired glucose tolerance and insulin-resistance in 5-aminolevulinate synthase 1(ALAS1) gene-targeted heterozygous mice. 1st International ALA and Porphyrin Symposium, Bahrain; October 2013

⑨ 斉藤真一, 中野博, 高橋究, 田中徹, 中島元夫, 中島修: 組織非特異型 ALA 合成酵素（ALAS1）遺伝子破壊マウスヘテロ接合体での耐糖能異常. 第 3 回ポルフィリン－ALA 学会年会, 東京工業大学すずかけ台キャンパス（神奈川県横浜市）; 2013 年 4 月

〔図書〕（計　１件）

中島　修：第Ⅲ部　代謝影響とヘルス・メディカルケア 23 章「5-アミノレブリン酸およびヘムの代謝への影響」. ポルフィリン-ALA 学会編, 現代化学増刊 45「機能性アミノ酸 5-アミノレブリン酸の科学と医学応用－がんの診断・治療を中心に－」. 東京化学同人, 2015 年：127-134

〔産業財産権〕

○出願状況（計　　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
http://www.id.yamagata-u.ac.jp/Gen/top.html

６．研究組織

(1)研究代表者

中島　修（NAKAJIMA, Osamu）
山形大学・医学部・教授
研究者番号：８０３１２８４１

(2)研究分担者

（　　）

研究者番号：

(3)連携研究者

（　　）

研究者番号：