

令和元年5月27日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00846

研究課題名(和文) 脂肪細胞による肝における胆汁酸と糖代謝の制御

研究課題名(英文) Contribution of adipocytes on regulating bile acid metabolism in liver and glucose homeostasis

研究代表者

李 恩瑛 (LEE, Eun Young)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：60583424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病はインスリンの分泌あるいは作用の障害により発症する。脂肪組織は主要なインスリン標的組織であり糖代謝制御に重要な役割を果たしている。我々は、インスリン受容体変異マウス(mIR)に高脂肪食(HFD)負荷すると顕性糖尿病を発症することを発見し、このマウス(mIR/HFD)を用いて糖尿病の発症機序を解析した。本研究では、mIR/HFDに野生型マウス(WT)の脂肪組織を移植すると高血糖が有意に改善することを発端にその機序を解析し、脂肪移植により胆汁酸代謝が変化し、特定の胆汁酸が増加し、増加した胆汁酸が肝臓での糖新生を抑制し血糖降下作用を示すことを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪感受性糖尿病モデルマウスであるmIR/HFDマウスの解析から、脂肪組織のインスリン抵抗性が胆汁酸代謝異常を介して、糖代謝の破綻に寄与していることが明らかになった。この結果により、脂肪組織のインスリン抵抗性解除が、胆汁酸代謝を介して、糖尿病を改善させる新たな分子機序が示され、大きな学術的意義を有している。また、脂肪移植により増加した胆汁酸BをmIR/HFDへ投与することにより、肝臓の糖新生を抑制され血糖が改善した。同様の効果がヒト糖尿病患者でも見られることが考えられ、胆汁酸Bは新たな糖尿病治療薬として有効である可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Recent increase of the patients with diabetes mellitus is partly attributable to excessive fat intake. However, its pathogenesis remained unclarified due to the lack of good animal models. We previously found that insulin receptor mutant mice (mIR mice) develop hyperglycemia under high fat diet (HFD). Interestingly, hyperglycemia of these mice (mIR/HFD) was significantly attenuated by fat transplantation. We also found that fat transplantation ameliorated increased gluconeogenesis and increased hepatic expression of Cyp7a1, the rate limiting enzyme for bile acid synthesis. A subset of bile acids, including bile acid B, was increased in the plasma by fat transplantation. Administration of bile acid B to mIR/HFD significantly suppressed hyperglycemia associated with the increase in the expression of Hmgcoar, the rate limiting enzyme for cholesterol synthesis in the liver. Our data suggested that adipose tissue impacts glucose metabolism by modulating bile acid metabolism in the liver.

研究分野：糖尿病

キーワード：糖新生 脂肪移植 胆汁酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂肪組織や骨格筋などのインスリン標的組織でのインスリン作用は、糖代謝の恒常性維持に重要な役割を果たしている。糖尿病は血糖値が慢性的に上昇した代謝疾患であるが、糖尿病の患者数は近年、増加の一途を辿っており、この原因として食生活や運動不足などの環境因子の関与が疑われている。特に脂肪の過剰摂取は糖尿病発症の原因となる。しかしながら、**HFD** 負荷により糖尿病を発症する動物モデルがこれまでほとんどなく、解析の障壁となっていた。申請者らは、インスリン受容体変異マウス(**mIR**)に **HFD** を負荷すると顕性の糖尿病を発症することを発見した。すなわち、**mIR** は高脂肪感受性の糖尿病発症モデルであると考えられ、このマウス **mIR/HFD** で糖尿病発症の機序を解析した。

興味深いことに、我々は **mIR/HFD** に野生型マウスの皮下脂肪組織を移植することにより高血糖が有意に改善することを発見した。**mIR/HFD** の内在性の脂肪組織は脂肪移植後もインスリン抵抗性を示したが、移植した脂肪組織のインスリンシグナルは保たれていた。すなわち、正常な機能を有する脂肪組織を付与することにより **mIR/HFD** の全身の糖代謝が改善したことが分かった。既に我々の解析から、**(1)mIR/HFD** では脂肪組織の脂肪分解が亢進していること。**(2)肝臓の糖新生酵素である G6pc** の発現が亢進し、中性脂肪分解により産生されたグリセロールが糖新生基質となり高血糖が誘発されること。**(3)mIR/HFD** では肝臓での胆汁酸代謝が変化しており、コール酸投与により高血糖が有意に改善することを見だしていた。このことから **mIR/HFD** では、脂肪移植によって肝臓での胆汁酸代謝が変化し糖尿病が改善しているのではないかと考え、本研究で脂肪組織による胆汁酸代謝・糖代謝の制御機構の解明を目指した。

2. 研究の目的

上記の通り、脂肪移植が **mIR/HFD** の肝臓での糖新生を改善し、血糖値を改善させたことから、我々は正常な脂肪組織機能を付与することにより、肝臓での糖代謝が改善したと考えた。さらに、**mIR/HFD** の肝臓では胆汁酸合成の律速酵素である **Cyp7A1** の発現が著明に減少していたが、脂肪移植により **Cyp7A1** の発現は有意に改善した。従って、脂肪組織が肝臓での胆汁酸代謝に影響を与えることも示唆された。しかしながら、**脂肪移植が、胆汁酸代謝を変化させ、mIR/HFD** の高血糖を改選させているのかは全く不明であった。そこで本研究で脂肪組織による胆汁酸代謝・糖代謝の制御機構と病態生理学的意義の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 脂肪移植 **mIR/HFD** の糖代謝、胆汁酸代謝の解析

我々はまず、**mIR/HFD** の糖代謝と胆汁酸代謝が脂肪移植によりどのように変化するかを解析した。この目的で、7週齢の **mIR** あるいは野生型 (**WT**) マウスの皮下に、2匹の **WT** マウスから採取した大腿皮下脂肪組織を移植し、8週齢時から体重と随時血糖値を測定しながら **60% HFD** で飼育後サンプリングし、脂肪組織と肝臓のサンプリングを行い、血清の胆汁酸組成を **LC-MS/MS** で測定した。

(2) 胆汁酸 B 投与 **mIR/HFD** の糖代謝、胆汁酸代謝の解析

上記の脂肪移植 **mIR/HFD** の血中胆汁酸組成解析の結果、脂肪移植により特定の胆汁酸 (胆汁酸 A と胆汁酸 B) の比率が増加していることが明らかになった。既に報告したとおり、脂肪移植により **mIR/HFD** の高血糖が有意に改善したことから、胆汁酸 A と胆汁酸 B の増加が血糖改善に寄与している可能性を考えた。そこで、胆汁酸 B を **mIR/HFD** マウスに 8週齢時から 1% の混餌で投与し、このマウス (**mIR/HFD**+胆汁酸 B マウス) を 16 週間飼育後に血液、肝臓、脂肪組織等採取し解析を行った。具体的には、胆汁酸 B 投与開始時より 2 週間ごとに体重と随時血糖値を測定し、サンプリング前に経口ブドウ糖負荷試験により耐糖能を評価し、インスリン負荷試験によりインスリン感受性を評価した。また、肝臓での糖新生を評価する目的で、1 晩の絶食時と、絶食後に 3 時間再摂食した条件で、肝臓を採取し、糖新生に関わる酵素の遺伝子発現を **qPCR** 解析した。また、**mIR/HFD+HDCA** マウスの肝臓で胆汁酸合成に関わる遺伝子群の発現を定量解析し、胆汁酸を吸収する回腸での胆汁酸代謝関連遺伝子の発現を定量解析した。

4. 研究成果

(1) 脂肪移植 **mIR/HFD** の糖代謝、胆汁酸代謝の解析

mIR/HFD に脂肪移植したところ、再摂食時の **G6pc** の奇異性の増加は消失し、高血糖は有意に改善した。その時、胆汁酸合成の律速酵素である **Cyp7a1** の発現も減少していたことから、**脂肪移植が胆汁酸代謝を変化させる**ことが明らかになった。そこで、脂肪移植 **mIR/HFD** の血清胆汁酸分画を測定した (図 1) すると興味深いことに**脂肪移**

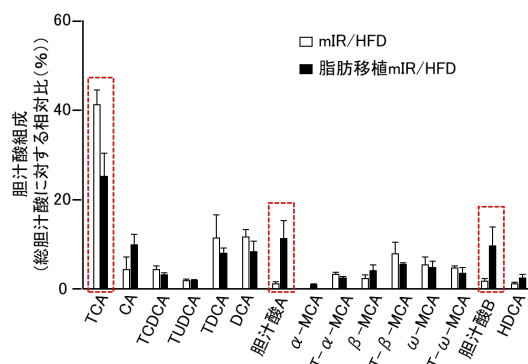


図1 脂肪移植によるmIR/HFDマウスの血清胆汁酸組成の変化

植により特定の胆汁酸（胆汁酸 A と胆汁酸 B）の比率が増加していることが明らかになった。

これらの胆汁酸は二次胆汁酸であり、腸内細菌叢の機能により一次胆汁酸より合成される。従って、脂肪移植により、宿主（マウス）の腸内環境が変化し、腸内細菌叢の産生する胆汁酸の分画が変化したことが示唆された。さらに、移植した脂肪組織と腸管は距離的に離れていることから、脂肪組織での代謝の変化が何らかの液性因子の作用を介して胆汁酸代謝を変化させたことが推察された。しかしながら、脂肪移植による腸管での炎症マーカー等の遺伝子発現解析では、胆汁酸代謝を変化させる原因となり得る異常は同定されなかった。脂肪移植による腸管で生じる変化については今後も解析を続ける必要がある。

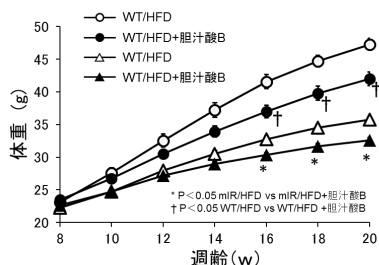


図2 胆汁酸B投与の体重への影響

(2) 胆汁酸 B 投与 mIR/HFD の糖代謝、胆汁酸代謝の解析

胆汁酸 B 投与による mIR/HFD の個体レベルの糖・エネルギー代謝の表現型
上記の通り、脂肪移植 mIR/HFD の血中では特定の胆汁酸の分画が増加していた。一方、総胆汁酸量は変化がなく、胆汁酸を感知し合成を制御して胆汁酸量を維持する機構には障害がないことが明らかになった。しかしながら、この胆汁酸の増加が、脂肪移植 mIR/HFD の高血糖改善に寄与しているかどうかは全く不明であった。そこで、増加していた**胆汁酸 B を mIR/HFD マウスへ混餌で投与し、体重、血糖値、肝臓での糖・エネルギー代謝の変化を解析した。**胆汁酸 B 投与により mIR マウスの HFD による体重増加は有意に抑制された（図 2）。さらに野生型マウスでもほぼ同程度の体重増加抑制が見られた。また、mIR/HFD マウスは HFD 負荷後 4 週後から明らかに随時血糖値は高値を示したが、**胆汁酸 B 投与により血糖値は有意に低下した（図 3）** mIR マウスは HFD 負荷時の体重増加が野生型マウスより少なく肥満抵抗性であるが、体重と血糖値の間に正の相関がある。従って、mIR/HFD+胆汁酸 B マウスの高血糖改善は、体重減少による二次

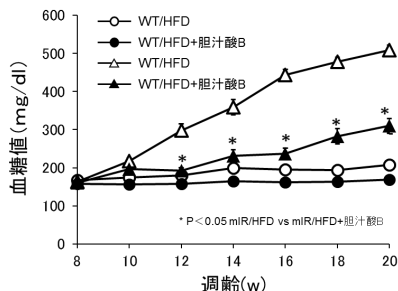


図3 胆汁酸B投与の随時血糖値への効果

的に有意に抑制された（図 2）。さらに野生型マウスでもほぼ同程度の体重増加抑制が見られた。また、mIR/HFD マウスは HFD 負荷後 4 週後から明らかに随時血糖値は高値を示したが、**胆汁酸 B 投与により血糖値は有意に低下した（図 3）** mIR マウスは HFD 負荷時の体重増加が野生型マウスより少なく肥満抵抗性であるが、体重と血糖値の間に正の相関がある。従って、mIR/HFD+胆汁酸 B マウスの高血糖改善は、体重減少による二次

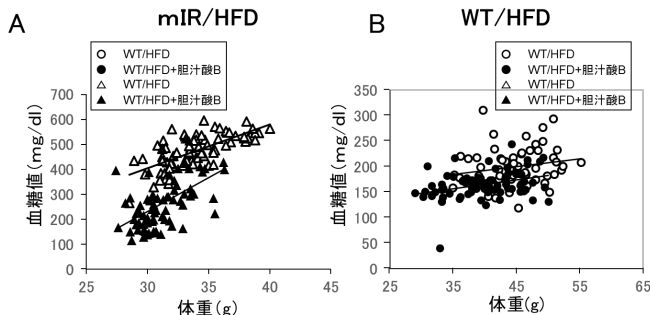


図4 体重と血糖値の相関に対する胆汁酸B投与の効果

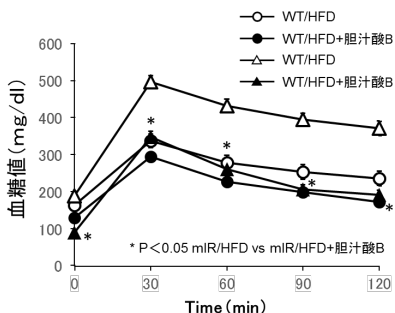


図5 経口ブドウ糖負荷試験

投与による mIR/HFD マウスの耐糖能の改善を検討する目的で、経口ブドウ糖負荷試験を行った（図 5）ところ、**mIR/HFD マウスでは耐糖能障害が認められたが、胆汁酸 B 投与により耐糖能は有意に改善した。**特に mIR/HFD マウスの空腹時の血糖値の低下は顕著であった。次に胆汁酸 B 投与によるインスリン抵抗性の改善をインスリン負荷試験で解析した（図 6）。すると、**胆汁酸 B 投与 mIR/HFD マウスではインスリン抵抗性が有意に改善した。**これらの結果から、胆汁酸 B は mIR/HFD マウスの血糖改善効果があり、脂肪移植により増加した胆汁酸 B は抗糖尿病

的なものである可能性も考えられた。そこで、mIR/HFD マウスと mIR/HFD+胆汁酸 B マウスの体重と随時血糖の関係を散布図で検討した（図 4 A）。すると、同等の体重のマウス同士と比較しても mIR/HFD+胆汁酸 B マウスの血糖値は mIR/HFD マウスと比較して低値であり、胆汁酸 B は体重減少による効果以外の機序でも mIR/HFD マウスの高血糖を改善していることが示唆された。また、HFD 負荷 WT マウス（WT/HFD マウス）でも、mIR/HFD マウスより効果は小さいものの、胆汁酸 B は血糖値の降下作用を示した（図 4 B）。さらに胆汁酸 B

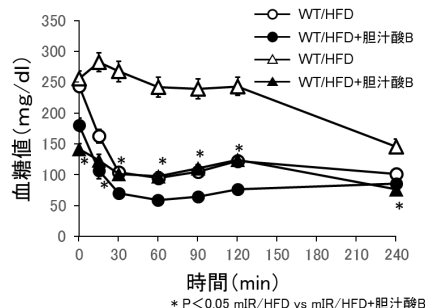


図6 インスリン負荷試験

作用を有しており、胆汁酸 B 投与 mIR/HFD マウスの高血糖改善に寄与している可能性が考えられた。

胆汁酸 B の肝臓での糖、脂肪、コレステロール代謝に対する効果

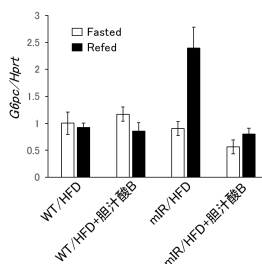


図7 肝臓でのG6pcの遺伝子発現

ることが明らかになった。

さらに我々は、WT マウスと mIR マウスの両方で、胆汁酸 B 投与により、HFD 負荷による脂肪肝が顕著に抑制されることを発見した。そこで、肝臓の中性脂肪含量を測定したところ、HFD 負荷による肝臓の中性脂肪含量増加は、胆汁酸 B 投与により著明に抑制された (図 9)。すなわち胆汁酸 B 投与は HFD による脂肪肝の抑制効果があり、これが間接的に mIR/HFD マウスの高血糖の改善に寄与している可能性も考えられた。胆汁酸 B 投与が HFD 負荷時の肝臓の中性脂肪含量が低下させる機序を解明する目的で、肝臓での胆汁酸・コレステロール代謝酵素の変化を解析したところ、胆汁酸 B 投与はコレステロール合成の律速酵素である

3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase Hmgcr (Hmgcoar) の遺伝子発現を顕著に増加させることが明らかになった (図 10)。コレステロールは胆汁酸合成の基質であり、HMGOAR は acetyl-CoA を基質にコレステロールを合成する。従って、胆汁酸 B 投与により胆汁酸組成あ

るいは量が変化し、何らかの機序を介して HMGOAR が増加し、糖から産生された acetyl-CoA が脂肪合成に利用される代わりにコレステロール合成に利用され、結果として血糖値の改善と脂肪肝の改善を引き起こした可能性が考えられた。

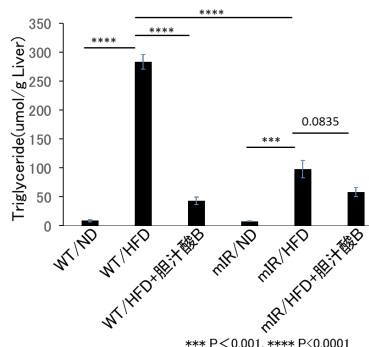


図9 肝臓の中性脂肪含量

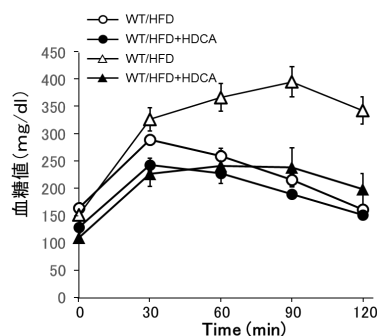


図8 グリセロール負荷試験

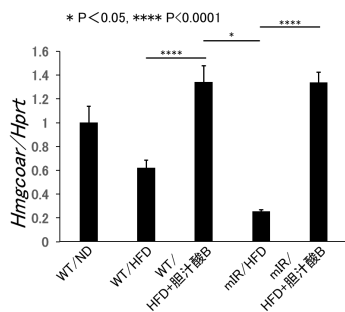


図10 肝臓でのHMGOARの遺伝子発現

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Lee, E.Y., Zhang, X., Miyamoto, J., Kimura, I., Taknaka, T., Furusawa, K., Jomori, T., Fujimoto, K., Uematsu, S., Miki, T. Gut carbohydrate inhibits GIP secretion via a microbiota/SCFA/FFAR3 pathway. *J Endocrinol* 239:267-76, 2018. 査読有

Kitamoto, T., Sakurai, K., Lee E.Y., Yokote, K., Accili, D., Miki, T. Distinct roles of systemic and local actions of insulin on pancreatic β -cells. *Metabolism* 81:100-10, 2018. 査読有

Miki, T., Lee, E.Y., Eguchi, A., Sakurai, K., Sawabe, Y., Yoshida, T., Saito, K., Yokoh, H., Ishikawa, K., Yokote, K., Kuzuya, T., Miki, E., Mori, C., Nomura, F. Accelerated oligosaccharide absorption and altered serum metabolites during oral glucose tolerance test in young Japanese with impaired glucose tolerance. *J Diabetes Investig* 9: 512-521, 2018. 査読有

Morimoto, M*, Lee, E.Y.*(*equally contributed), Zhang, X., Inaba, Y., Inoue, H., Ogawa, M., Shirasawa, T., Yokosuka, O., Miki, T. Eicosapentaenoic acid ameliorates hyperglycemia in high-fat diet-sensitive diabetes mice in conjunction with restoration of hypoadiponectinemia. *Nutrition & Diabetes* 27;6:e213, 2016. 査読有

Yoshida, M., Lee, E.Y., Kohno, T., Tanaka, T., Miyazaki, M., Miki T. Importance of hepatocyte nuclear factor 4 in glycerol-induced glucose-6-phosphatase expression in liver. *Biomed Res* 37:85-93, 2016. 査読有

[学会発表](計 4 件)

Lee, E.Y., Miyamoto, J., Kimura, I., Miki, T. Gut microbiome induced by intra-intestinal carbohydrates suppresses glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion. 53rd EASD Annual Meeting, 2018.

李恩瑛、張錫麟、宮本潤基、木村郁夫、三木隆司 腸内細菌叢を介した GIP 分泌抑制のメカニズム 第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会、2018.

三木隆司、李恩瑛、江口哲史、櫻井健一、三木英司、葛谷健、横手幸太郎、森千里、野村文夫 無水ブドウ糖と澱粉部分水解物による経口糖負荷試験に差はあるか？ 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会、2017.

Lee, E.Y., Morimoto, M., Miki, T. Mechanism for anti-diabetic action of eicosapentaenoic acid in the high-fat diet-sensitive diabetes mouse model. 51st EASD Annual Meeting, 2016.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等：<https://www.m.chiba-u.ac.jp/class/physiol/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：三木 隆司

ローマ字氏名：**MIKI, Takashi**

所属研究機関名：千葉大学

部局名：大学院医学研究院

職名：教授

研究者番号(8桁)：**50302568**

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。