

令和元年5月30日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09773

研究課題名(和文) 非アルコール性脂肪性肝疾患の肝臓におけるインスリンシグナル関連遺伝子発現の解析

研究課題名(英文) Selective insulin resistance with differential expressions of IRS-1 and IRS-2 in human NAFLD livers

研究代表者

澤田 正二郎 (Sawada, Shojiro)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：60509420

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)：非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)ではinsulin receptor substrate (IRS)-2が減少するとともに、糖新生に関連するPEPCKやG6Paseが増加しインスリンシグナルの減弱が示唆された。一方で、FASなどの脂肪酸合成に関連する遺伝子発現は増加し、さらにIRS-1と正相関を認めたことから、脂肪酸合成においてはNAFLDでインスリンシグナルの亢進が示唆された。以上のことから、ヒト脂肪肝の病態において「肝選択的インスリン抵抗性」が認められ、インスリン作用の糖新生抑制経路または脂肪酸合成促進経路への調整にはIRS1またはIRS2が関与していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NAFLDは2型糖尿病とともに世界的に増加している疾患であり、両疾患は疫学的にも密接な関連性を認める。一方、脂肪肝モデル動物による病態解析では肝脂肪化とインスリン作用を主とした糖代謝異常との間に共通の病態基盤が存在することが知られていたが、ヒトにおいても同様の病態が存在するかどうかは不明であった。今回の研究でNAFLDの病態形成に「肝選択的インスリン抵抗性」の存在をヒトで明らかにしたことは、今後の脂肪肝診療に重要な学術的および社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In NAFLD patients, insulin receptor substrate (IRS)-2 expression was decreased, while those of key enzymes for gluconeogenesis were increased. The alterations in the expressions of IRS-2 and gluconeogenesis enzymes showed strong negative correlations. In contrast, fatty acid synthase (FAS) expression was not decreased in NAFLD, despite IRS-2 downregulation, but correlated strongly with IRS-1 expression. Thus, IRS-1 signaling, which is not impaired in NAFLD, appears to modulate FAS expression. These analyses revealed that selective insulin resistance is present in human NAFLD livers. The effect of insulin, during the IRS step, on gene expressions for lipogenesis and gluconeogenesis are apparently distinct and preferential downregulation of IRS-2 may contribute to selective resistance to the suppressive effects of insulin on gluconeogenesis.

研究分野：糖尿病学

キーワード：脂肪肝 選択的インスリン抵抗性

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 非アルコール性脂肪肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease : NAFLD) は、明らかな飲酒歴がなく (エタノール摂取量 < 20g/日) 肝細胞に中性脂肪が蓄積することにより肝障害をきたす疾患の総称であり、肥満やインスリン抵抗性と関連し発症する為、メタボリックシンドロームを形成する一病態に位置づけられる。メタボリックシンドロームの進展において、脂肪組織にインスリン抵抗性が惹起されると脂肪組織で脂肪分解が亢進するため「高脂血症」を引き起こし、筋組織にインスリン抵抗性が惹起されると筋組織での糖利用が低下するため「高血糖」を引き起こし、肝臓にインスリン抵抗性が惹起されると肝糖新生が亢進するため「高血糖」を引き起こす。NAFLD 患者は肝インスリン抵抗性を合併していることが多く、NAFLD の病態形成にインスリンシグナルが関与している可能性があった。

(2) インスリン作用と肝臓における糖脂質代謝の分子メカニズムについては以下のことが分かっていた。インスリンが肝臓のインスリン受容体 (insulin receptor : IR) に結合後、受容体自身のチロシンキナーゼを活性化し、次にインスリン受容体基質 (insulin receptor substrate : IRS) のチロシンキナーゼのリン酸化を促す。IRS には種々の isoform が存在するが、高い相動性を有する IRS-1 と IRS-2 は肝臓に豊富に存在する。IR によりチロシンリン酸化を受けた IRS-1 と IRS-2 は phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) に結合し phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) の活性化を介して Akt が活性化される。Akt 依存性リン酸化や転写因子 forkhead box-containing protein O subfamily-1 (FOXO-1) の核外移行は phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCK)、glucose-6-phosphatase (G6Pase) の発現を負に転写調節し、肝における糖放出を抑制する。一方で、インスリンは fatty acid synthase (FAS) は発現を調節する転写因子である sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) を刺激する。さらに、インスリンは glucokinase (GCK) の発現を促進することにより、グルコースをリン酸化して glucose-6-phosphate を形成し、肝臓の糖利用と脂肪酸合成を活性化する。

(3) これまでの脂肪肝モデル動物における検討では、肝臓における糖新生抑制経路はインスリン抵抗性によりインスリンシグナルが障害され高血糖を呈する一方、肝臓における脂肪酸合成経路はインスリンシグナルが障害されておらず、むしろ亢進し肝脂肪化に繋がっていることから、「肝選択的インスリン抵抗性」と呼ばれる。

2. 研究の目的

肝臓における「選択的インスリン抵抗性」がヒトでも存在するかどうかは不明であるため、NAFLD 患者の肝生検標本を用いて、インスリンシグナルに関連する鍵分子の遺伝子発現を網羅的に調べることにした。それらの遺伝子発現量と肝病理学的重症度や臨床指標などとの関連性を解析することにより、ヒト NAFLD におけるインスリンシグナルとその病態における関連性について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 過去に NAFLD の診断がついているホルマリン固定パラフィン包埋処理がされた肝生検組織を研究対象とした。健常コントロールとして肝移植ドナーの肝生検組織をコントロールとした。糖尿病治療薬や糖代謝異常の影響を排除する為、糖尿病患者は除外した。NAFLD の病理学的重症度は肝臓病理を専門とする 1 人の病理医によって、患者情報を遮蔽した状況で連続的に Matteoni 分類に準拠し、simple steatosis(SS)群と non-alcoholic steatohepatitis(NASH)群に分類した。組織学的特徴は Kleiner's score および Blunt's staging に従い点数化した。すなわち、肝脂肪化は 0-3 点、小葉内炎症は 0-3 点、肝細胞風船様変性は 0-2 点、線維化は 0-4 点に分類した。

(2) 遺伝子発現解析はホルマリン固定パラフィン包埋処理がされた組織標本から RNA を抽出し cDNA を合成した。ホルマリン固定は RNA を架橋し酵素反応が阻害されること、パラフィン包埋の際の高温加熱で RNA が断片化されていることを考慮した定量的 PCR 法を用いて、IR、IR type-A、IR type-B、IRS-1、IRS-2、PEPCK、G6Pase、GCK、FAS の遺伝子発現量を測定した。

4 . 研究成果

(1) 対象者の臨床的特徴

解析対象は Control 群 9 名、SS 群 19 名、NASH 群 23 名であった。体格指数(BMI)は Control 群に比して SS 群、NASH 群で高値であった。高血圧症の有病率は Control 群、SS 群、NASH 群の順に高頻度であった。血清 AST 及び ALT は Control 群に比して SS 群、NASH 群で高値で、血清 IV 型コラーゲンは SS 群に比して NASH 群で高値であった。HbA1c は Control 群に比して NASH 群で高値であった。空腹時のインスリン値は SS 群に比して NASH 群で高値であり、インスリン抵抗性指標である HOMA-IR も NASH 群で高値であった。

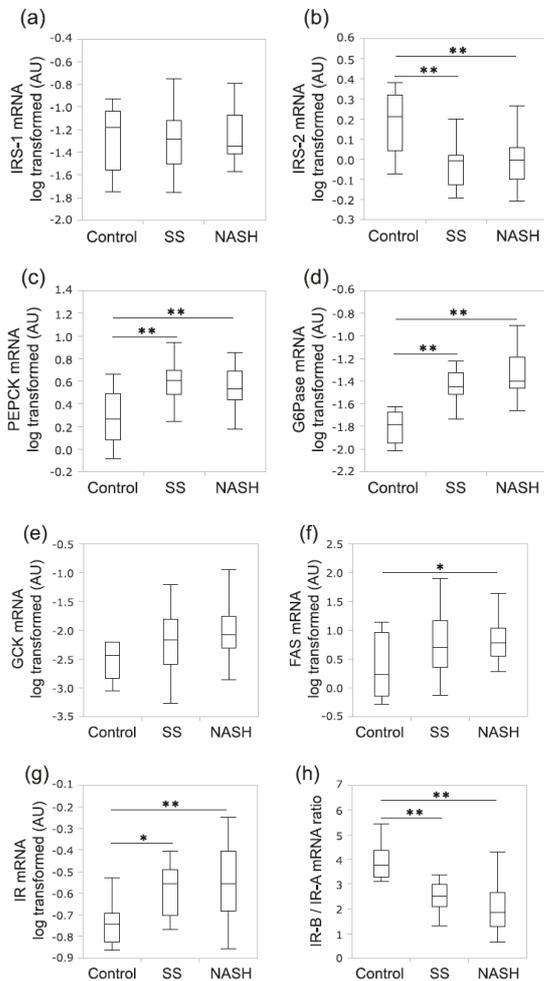
(2) 病理学的特徴

病理学的重症度の点数は、Control 群、SS 群、NASH 群に進展するに伴い高得点であった。

(3) 遺伝子発現の特徴 (図)

IR は Control 群に比して SS 群、NASH 群で高値であった。IRS-1 は 3 群間で差を認めなかったが、IRS-2 は Control 群に比して SS 群、NASH 群で低値であった。PEPCK と G6Pase は Control 群に比して SS 群、NASH 群で高値であった。FAS は Control 群に比して NASH 群で高値であった。IRS2 が低下し PEPCK と G6Pase が亢進していることから肝糖新生抑制経路におけるインスリンシグナルは減弱していることが認められた。一方、FAS は NASH 群で高値であり脂肪酸合成経路におけるインスリンシグナルは促進されていることから、「選択的インスリン抵抗性」の存在が示唆された。さらに、IR には 2 つのアイソフォームがあり、IR-A は細胞増殖に、IR-B は糖代謝に強く関連することが知られている。IR-B と IR-A の比 (IR-B/IR-A) は、Control 群、SS 群、NASH 群に進展するに伴い低下した。

(図) 3 群間の遺伝子発現比較

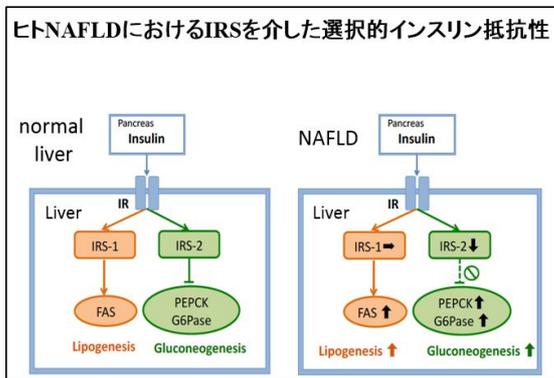


(4) 遺伝子発現と各指標との関連

血清 AST は G6Pase と正の相関を、血清 ALT は PEPCK、G6Pase と正の相関を IRS-2 と負の相関を認めた。血清総コレステロールは GCK と負の相関を認めた。肝脂肪化スコアは IR、PEPCK と正の相関、IRS-2 と負の相関を認めた。小葉内炎症スコアは IR、PEPCK、G6Pase、GCK と正の相関を IRS-2 と負の相関を認めた。肝細胞風船様変性スコアは G6Pase と正の相関を、線維化スコアは IR、PEPCK、G6Pase と正の相関を認めた。

(5) まとめ

NAFLD は糖尿病とともに世界的に増加している疾患であり、その病態基盤における共通性も認められることから、異なる IRS (IRS-1 または IRS-2) を介した「肝選択的インスリン抵抗性」をヒトで明らかにしたことは、今後の脂肪肝診療に重要な意義があると考えられる。さらに、本研究において、NAFLD (特に NASH) では IR-B と IR-A の比率が低いことが見いだされ、IR-A は細胞増殖に關与するアイソフォームであることから NASH における癌化における機序の一つである可能性が示唆された。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件) Honma M, Sawada S, Ueno Y, Murakami K, Yamada T, Gao J, Kodama S, Izumi T, Takahashi K, Tsukita S, Uno K, Imai J, Kakazu E, Kondo Y, Mizuno K, Kawagishi N, Shimosegawa T, Katagiri H. Selective insulin resistance with differential expressions of IRS-1 and IRS-2 in human NAFLD livers. *International Journal of Obesity*, 査読有、Vol. 42, No. 9, 2018, pp. 1544-1555.

doi: 10.1038/s41366-018-0062-9

〔学会発表〕(計1件) 澤田正二郎、NAFLDにおける選択的インスリン抵抗性、第60回日本糖尿病学会年次学術集会、2017年5月、名古屋国際会議場(名古屋市)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

宇野 健司 (UNO, Kenji)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：50596632

高 俊弘 (GAO, Junhong)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・教

研究者番号：70455781

(2)研究協力者

本間 緑 (HONMA, Midori)

上野 義之 (UENO, Yoshiyuki)

村上 圭吾 (MURAKAMI, Keigo)

山田 哲也 (YAMADA, Tetsuya)

児玉 慎二郎 (KODAMA, Shinjiro)

井泉 知仁 (IZUMI, Tomohito)

高橋 圭 (TAKAHASHI, Kei)

突田 壮平 (TSUKITA, Sohei)

今井 淳太 (IMAI, Junta)

嘉数 英二 (KAKAZU, Eiji)
近藤 泰輝 (KONDO, Yasuteru)
水野 恵 (MIZUNO, Kei)
川岸 直樹 (KAWAGISHI, Naoki)
下瀬川 徹 (SHIMOSEGAWA, Toru)
片桐 秀樹 (KATAGIRI, Hideki)