

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K20182

研究課題名（和文）肥満糖尿病で認められる脂肪組織肥大に対する銅濃度変化の寄与と機序の解明

研究課題名（英文）The contribution of copper to the adipose tissue expansion in obese and diabetic mice

研究代表者

市原 克則 (ICHIHARA, Yoshinori)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：50710711

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：これまでに肥満糖尿病患者の血清銅濃度が上昇していることが示されているが、銅への介入による肥満糖尿病の予防・治療への効果とそのメカニズムは未解明である。本研究では、高脂肪食誘発性肥満マウスの肥満および脂質代謝に対する銅キレート剤の効果を評価した。本知見は、銅のキレート剤が肝臓の脂質代謝の変化を介して、肥満糖尿病の発症の予防に寄与することを明らかにしたものであり、この研究結果は銅への介入が肥満糖尿病の予防・治療に有効である可能性を示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は肥満病態での銅の代謝の変化の可能性と、必須微量元素である銅と脂質代謝の関連を明らかにしたものであり、銅の生体内での意義のさらなる解明に寄与するものである。さらに実験動物モデルを用いて、銅への介入が肥満糖尿病の予防・治療に有効である可能性を示すことができたため、本知見を応用することで、将来の新規の肥満・糖尿病の治療薬の開発に繋がる可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：Although it has been shown that serum copper concentrations are elevated in obese and diabetic patients, the effect of copper intervention on the prevention and treatment of obesity and diabetes and its mechanisms remain unresolved. In this study, we evaluated the effects of a copper chelator on obesity and lipid metabolism in high-fat diet-induced obese mice. The findings of this study demonstrate that a copper chelator contributes to the prevention of the development of obesity and diabetes through changes in lipid metabolism in the liver, and the findings of this study suggest that copper might be the possible target for the prevention and treatment of obesity and diabetes.

研究分野：薬理学

キーワード：銅 肥満 糖尿病 脂質代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 内臓脂肪が過剰に蓄積した内臓脂肪型肥満を呈し、肝臓において異所性に脂肪が蓄積した肥満糖尿病患者は世界的にも増加しており、公衆衛生上の大きな問題となっている。肝臓での異所性脂肪は、非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) を誘発し、脂質異常症、糖尿病だけでなく、心血管疾患、肝硬変やそれに伴う肝がんを含む多くの合併症を引き起こす。したがって、肥満糖尿病に対して筋萎縮を伴うことなく、肝臓の異所性脂肪蓄積を含めて脂肪量を特異的に減少させ、耐糖能異常を改善する抗肥満・抗糖尿病薬の開発が期待されている。

(2) 肝臓はコレステロールや脂肪酸などの脂質を代謝する。肝臓の脂肪酸は、脂肪酸酸化を経てアセチル-CoA に異化され、その後ミトコンドリアで酸化的リン酸化とケトン体合成、細胞質でコレステロールが合成される。肝臓のコレステロールは、古典的経路の Cyp7a1 および Cyp8b1、代替経路の Cyp7b1 および Cyp27a1 を介して胆汁酸に異化代謝される。肥満状態では、コレステロールと脂肪酸の代謝の変化により、過剰なコレステロールと脂肪酸由来のトリグリセリドが肝臓に蓄積する。さらに、Cyp7a1 ノックアウトマウスが高コレステロール血症と肝臓への脂質蓄積を示すように、胆汁酸合成の乱れは脂質代謝の乱れも引き起こすことが報告されている。さらに、肝臓における脂質異化作用の亢進は、肥満、肝脂肪症、2 型糖尿病のターゲットとなりえることが示唆されている。例えば、マウスの肝臓で脂肪酸酸化関連遺伝子である CPT1 を過剰発現させると、肝臓や脂肪組織での脂質の沈着が減少し、高脂肪食 (HFD) 負荷後のインスリン抵抗性の進行が抑制される。また、胆汁酸合成の促進も肥満、肝脂肪症、糖尿病の進行を抑制することが示唆されており、Cyp7a1 の過剰発現によりマウスの HFD 後の胆汁酸合成が増加し、肥満の進行を抑制することが報告されている。これらのように、肝臓での脂質代謝経路への介入により、肥満を抑制することが可能となると示唆される。

(3) 銅は必須微量元素の 1 つであり、遺伝子異常・栄養バランス不良等による重篤な銅欠乏症として低血糖・貧血・白血球減少・神経変性等の症状を示す。また、銅濃度の変化と肥満・糖尿病病態との関連が示唆されている。例えば、ヒト糖尿病患者での血中銅濃度の上昇と、血中銅濃度と高血糖の指標である HbA1c に正の相関が認められる。また、軽度の肥満患者では、非肥満の対照群と比較して肝臓および内臓脂肪組織中の銅含有量が高いことも報告されている。これらの報告は、銅が肥満や 2 型糖尿病の発症を抑制するターゲットとなる可能性を示唆するが、銅への介入が肥満糖尿病の予防・治療に効果的か、またその機序は明らかではない。申請者はこれまでの神経科学的な研究を進めるうえで、銅のキレート剤であるクプリゾンを用いてきた (Ichihara et al., J Cell Physiol. 2017)。これまでに、クプリゾンは普通食下でも体重をわずかに減少させることが報告されているが、クプリゾンを用いた銅への介入が代謝機能に与える影響は解明されていない。

2. 研究の目的

銅への介入が肥満・糖尿病の予防・治療に寄与する可能性を明らかにするために、銅のキレート剤であるクプリゾン投与が肥満・糖尿病モデルマウスの病態を改善するかを評価し、その機序を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) すべての化合物は、Sigma-Aldrich、Cayman Chemical、MedChemexpress、Selleck

Chemicals、ナカライテスク、東京化成工業または和光より購入した。クプリゾンは、Sigma-Aldrich (#C9012) から購入した。

(2) 雄の C57BL/6J マウスを日本 SLC から購入した。動物を用いた実験はすべて鳥取大学動物愛護管理委員会の承認を得ている。すべてのマウスは、 22 ± 2 度、12 時間の明暗サイクル、湿度一定 ($55 \pm 10\%$) で維持され、水と各種げっ歯類飼料に自由にアクセスさせた。通常組成食 (NCD) または 60 kcal%高脂肪食 (HFD; Research diet, #D12492) にクプリゾンを 0.2% (w/w) 混合した飼料を、Oriental Yeast または Research diet 社で作製した。8 週齢の雄マウスに各食餌を与えた。各試験は 4~6 週間でいった。

(3) ブドウ糖負荷試験は、6 時間絶食後、ブドウ糖 (2 g/kg 体重) を腹腔内投与した。インスリン負荷試験には、ヒトインスリン (0.5 U/kg 体重) を 6 時間絶食後、腹腔内投与した。ピルビン酸負荷試験には、ピルビン酸ナトリウム (2 g/kg 体重) を 6 時間絶食後、腹腔内投与した。血糖値はグルコメーター (三和化学研究所) を用いて各時点で測定した。in vivo での脂肪分解測定は、4 時間絶食後、isoproterenol (10 mg/kg) を腹腔内投与し、0 分と 15 分に血清を採取した。非エステル化脂肪酸 (NEFA) は NEFA アッセイキット (和光) を用いてメーカーの説明書にしたがって測定した。マウスを 5 時間絶食させ、メドトミジン (0.3 mg/kg 体重)、ミダゾラム (4.0 mg/kg 体重)、プロポフォール (5.0 mg/kg 体重) をもちいた 3 種混合麻酔を腹腔内投与し、麻酔下で解剖を行った。採血後、精巣上体白色脂肪組織 (eWAT)、鼠径部白色脂肪組織 (iWAT)、肝臓、ヒラメ筋、腓腹筋の組織重量を測定した。各組織は生化学分析のために液体窒素に、または組織学的分析のために 4%パラホルムアルデヒドにより固定した。

(4) 血清は遠心分離 (4000 rpm, 20 分) により単離し、使用するまで -80 度で凍結した。血清パラメータは、特に記載がない限り、オリエンタル酵母工業株式会社長浜ライフサイエンス研究所にて測定した。血清インスリン濃度は、マウスインスリン用 ELISA キット (M1102; 森永製菓) を用いて、メーカーの説明書にしたがって測定した。血清銅濃度は 3-5 DiBr-PAESA を用いた比色銅測定キット (CU04M; Metallogenics) により測定した。

(5) 採取した核組織は、4%パラホルムアルデヒドを 4 度で一晩浸透することにより固定した。肝臓、eWAT、iWAT の組織において、パラフィン包埋スライス切片からのヘマトキシリン・エオジン染色を実施した。

(6) マウス初代肝細胞を 2-4 ヶ月齢で雄の C57BL/6J マウスからコラゲナーゼ 1 型 (037-17603、和光) を用いて分離し、Percoll で精製した後、10% FBS、100 U/mL penicillin、100 U/mL streptomycin、292 μ g/mL L-glutamine を添加したウィリアム E 培地で、6 ウェルプレートに 30×10^4 cells per well で播種した。1 時間培養して接着させた後、100 U/mL ペニシリン、100 U/mL ストレプトマイシン、292 μ g/mL L-グルタミンを添加し、10% FBS を加えた DMEM 中で一晩培養した。PBS による洗浄後、DMEM に懸濁したクプリゾンを、終濃度 0, 100, 500 μ M となるように処置した。

(7) Isogen または Isogen II (ニッポンジーン) を用いて培養細胞またはマウス組織から全 RNA を単離し、PrimeScript RT Master Kit (タカラバイオ) を用いて製造者の指示に従って逆転写を行った。この cDNA を Thermal Cycler Dice Real Time System (タカラバイオ) を用いたリアルタイム PCR アッセイで鋳型として使用した。各アンプリコンの発現量を Actb 発現量に

対して正規化し、各実験における対照試料と比較した相対値で表示した。

(8) すべての値は、平均値 \pm SEM として示した。2 群間の差の有意性は Student *t*-test で、3 群以上の差は一元配置分散分析と post hoc test (Tukey's correction) または二元配置分散分析と post hoc test (Bonfferoni's correction) で計算した。

4 . 研究成果

(1) 肥満・糖尿病を誘導するマウスモデルとして、高脂肪食負荷モデルを使用した。高脂肪食により、血中銅濃度の増加が認められた。

(2) 銅のキレート剤であるクプリゾン投与により、通常組成食下ではわずかに、高脂肪食下では顕著に体重が減少した。クプリゾン投与は高脂肪食で誘発される精巣上体脂肪および鼠径部脂肪の重量増加を抑制した。このとき、腓腹筋およびヒラメ筋の重量には優位な変化を認めなかった。

(3) クプリゾン投与 6 週間後の肝臓では、脂肪酸酸化関連遺伝子、コレステロール合成関連遺伝子、胆汁酸合成関連遺伝子の発現増加が認められた。一方、精巣上体脂肪組織では、脂質代謝関連遺伝子の発現量に顕著な変化を認めなかった。

(4) 初代培養肝細胞へのクプリゾン処置により、胆汁酸合成関連遺伝子の発現増加が認められた。

(5) クプリゾン投与により、高脂肪食で誘導される高血糖・血清高インスリン値が抑制された。さらに、糖負荷試験およびインスリン負荷試験により評価した耐糖能異常・インスリン抵抗性が、クプリゾン投与により抑制された。

(6) 以上のデータは、銅のキレート剤であるクプリゾンが肝臓の脂質代謝の変化を介して、肥満・糖尿病の発症の予防に寄与することを明らかにしたものであり、この研究結果は銅への介入が肥満・糖尿病の予防・治療に有効である可能性を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Iwasaki Hirotaka, Ichihara Yoshinori, Morino Katsutarō, Lemecha Mengistu, Sugawara Lucia, Sawano Tatsuya, Miake Junichiro, Sakurai Hidetoshi, Nishi Eiichiro, Maegawa Hiroshi, Imamura Takeshi	4. 巻 11
2. 論文標題 MicroRNA-494-3p inhibits formation of fast oxidative muscle fibres by targeting E1A-binding protein p300 in human-induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-80742-y	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 市原克則、澤野達哉、周余航、三明淳一郎、今村武史
2. 発表標題 銅キレート剤のクプリソンは高脂肪食による肥満に伴う体脂肪増加と耐糖能異常を抑制する
3. 学会等名 第4回黒潮カンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市原克則、澤野達哉、周余航、三明淳一郎、今村武史
2. 発表標題 銅キレート剤のクプリソンは高脂肪食による肥満に伴う体脂肪増加と耐糖能異常を抑制する
3. 学会等名 第72回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市原 克則、澤野 達哉、周 余航、アゲン プリヨノ、三明 淳一郎、今村 武史
2. 発表標題 銅キレート剤クプリソンの脂肪分化へのin vitroでの効果
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀧川 和子, 広瀬 彩, 石田 健太郎, 市原 克則, 澤野 達哉, 周 余航, プリヨノ アグン, 三明 淳一朗, 今村 武史
2. 発表標題 高脂肪食負荷マウスにおけるクプリゾンの抗肥満作用
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 低分子化合物クプリゾンおよびその誘導体による体脂肪量減少効果	発明者 今村 武史, 市原 克則	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-215470	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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