

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K20204

研究課題名（和文）フルクトース過剰摂取による代謝障害の分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanisms of metabolic disorder caused by excessive intake of fructose

研究代表者

松川 隼也（Matsukawa, Toshiya）

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：00817653

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）：本研究では、フルクトース代謝におけるAldolase Bの役割とその欠損に伴う代謝障害の分子機構の解明を試みた。

過剰なフルクトースを摂取することで起こるフルクトースの代謝障害によって酸化ストレスが惹起されることで、肝障害やそれに伴う血糖の低下などの代謝障害が起こること。また、ChREBPを介した遺伝子転写が亢進し、特に脂質合成系の遺伝子の遺伝子転写が増加することが示された。さらに、培養肝細胞を用いた解析より、フルクトースの代謝障害によって惹起される酸化ストレスは抗酸化剤の処理で改善できることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フルクトースの代謝障害によって惹起される酸化ストレスは抗酸化剤の処理で改善できることから、今後、詳細な解析は必要ではあるがメタボリックシンドロームなどのフルクトースの代謝障害に対して疾患の治療・予防に対して抗酸化剤が有効な治療法の一つになる可能性が示唆された。また、抗酸化剤は遺伝的なフルクトース代謝障害であるフルクトース不耐症の新たな治療法の一つになる可能性も示された。

研究成果の概要（英文）：This research investigated that the function of Aldolase B, has an important role in fructose metabolism, using Aldolase B KO mice to elucidate of molecular mechanisms of metabolic disorder caused by excessive intake of fructose.

Oxidative stress, is occurred by the metabolic disorder of fructose caused by excessive intake of fructose, which become a cause of metabolic disorders such as liver disorder and hypoglycemia. Additionally, KO mice increased the expression of target genes of ChREBP such as lipid synthesis-related genes. Furthermore, oxidative stress caused by fructose metabolic disorders could be improved by treatment with antioxidants. These results suggested that antioxidants may become an effective tool for treatment and or care of metabolic disorders such as metabolic syndrome.

研究分野：栄養生化学

キーワード：フルクトース 代謝障害 メタボリックシンドローム 2型糖尿病 肥満 肝臓 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

哺乳類は生命活動に必要なエネルギー源である ATP を産生するために、摂食により栄養素を取り込み、それらを代謝している。ヒトにおいて代謝の対象となる栄養素のうち、ブドウ糖(グルコース)や果糖(フルクトース)などからなる炭水化物(糖質)は脂質やタンパク質に比べその摂取量が多い。フルクトースはグルコースよりも甘味が強いことから甘味料として清涼飲料水などに汎用されており、その摂取量の増大に伴い、メタボリックシンドロームの患者数が増加することや(Lim JS et al., Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2010)、その発症リスクが増加すること(世界保健機関: WHO 報告書 2016)が報告されている。

Aldolase B はフルクトースの代謝に重要な役割を担う酵素のひとつである。報告者はこれまでにメタボリックシンドロームを呈する様々なモデルのマウスの肝臓において Aldolase B の発現量が増加することを見出した(図1)。

一方で発現量が増大するにも関わらずフルクトースの摂取量に比例して、メタボリックシンドロームの発症リスクも増加する。つまり、生体は過剰に摂取したフルクトースの代謝を適切に行うために Aldolase B の発現量を増加させるが、代謝さ

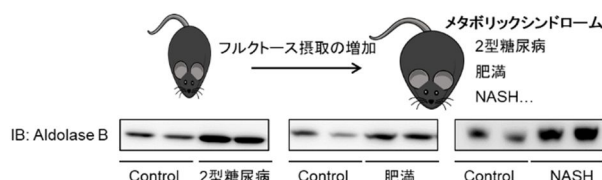


図1: メタボリックシンドロームを呈するマウスの肝臓でAldolase Bの発現は増加する

れずに蓄積した代謝産物が生体に悪影響を与えていると考えられる。例えば、フルクトース不耐症は遺伝的に Aldolase B の重篤な活性障害をきたす疾患であるが、患者はフルクトースを摂取すると急性の低血糖、慢性的には成長障害、肝障害などが引き起こされることが知られている(Lanaspa et al., J Clin Invest, 2018)。これらのことから、こうした条件下(フルクトースの過剰摂取)におけるフルクトースの代謝産物を介した生体障害性の存在が想定されるが、その分子機構の多くは未解明のままである。

こうしたことから、フルクトース代謝についての影響を評価する上において Aldolase B の機能について解析を行うことは、フルクトース代謝障害に関わる疾患の発症メカニズムの解明や治療法の確立に有効であると考えられている。2018年にLanaspaらがAldolase B ノックアウトマウスを用いて、フルクトース代謝障害の際にフルクトース1リン酸が蓄積すること、フルクトースをフルクトース6リン酸に変換するケトヘキソキナーゼの活性を阻害すると症状が抑制されることを報告しているが(Lanaspa et al., J Clin Invest, 2018)、研究例は非常に少ないのが現状である。そのため、フルクトース不耐症でフルクトース摂取により、低血糖や肝障害などが引き起こされるメカニズムについても大部分が明らかになっていない。

これらのことから、フルクトース過剰摂取に伴うメタボリックシンドロームの予防・改善および遺伝性フルクトース不耐症の病態の新知見と新たな治療法の確立のために、フルクトースがどのような分子機構で生体に悪影響を与えているのか。フルクトース代謝障害とメタボリックシンドロームの諸症状の関連性とその分子機構はどうなっているのか。という疑問を明らかにする必要があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、フルクトース過剰摂取に伴うメタボリックシンドロームの予防・改善および遺伝性フルクトース不耐症の病態の新知見と新たな治療法の確立のために、フルクトースの代謝産物がどのような分子機構で生体に悪影響を与えているのか。フルクトース代謝障害とメタボリックシンドロームの諸症状の関連性はどうなっているのか。という疑問を明らかにすることを目的とし、フルクトースの代謝に重要な役割を担う酵素 Aldolase B に着目した。そして、マウス及び、初代培養肝細胞を用いて生化学的、分子生物学的手法により、フルクトース代謝における Aldolase B の役割とその欠損に伴う代謝障害の分子機構の解明に迫ること。そして、遺伝性フルクトース不耐症の病態メカニズムの解明に繋がる重要な知見を得ることで、本研究成果が臨床への橋渡しとなることを最終目標とした。

3. 研究の方法

本研究の目的はフルクトースの代謝における Aldolase B の役割とその欠損に伴う代謝障害の分子機構をマウス及び、初代培養肝細胞を用いて生化学的、分子生物学的手法により解明することである。本研究では以下の3点に着目し、解析を行った。

Aldolase B ノックアウトマウスの代謝表現型の解析

まず、Aldolase B のノックアウトマウスは C57BL/6J マウスに対して CRISPR/Cas9 system を用いて作出した。この Aldolase B ノックアウトマウスを用いて、フルクトース非摂取下において Aldolase B の欠損が生体にどのような代謝変化をもたらすのかを評価した。Aldolase B ノックアウトマウスの摂食時、空腹時の肝臓における糖、脂質、アミノ酸代謝関連遺伝子の発現を DNA マイクロアレイ法で網羅的に解析する。さらに、肝臓のコレステロール、中性脂肪、グリコーゲンの蓄積を病理切片を用いた組織学的検討と生化学的な定量とにより評価する。体重、血糖値な

どの代謝パラメーターと共に、インスリン感受性試験、糖負荷試験などにより代謝変化の詳細について総合的に評価した。

メタボリックシンドロームの諸症状と Aldolase B の関連性の解析

Aldolase B の発現はフルクトースの過剰摂取により促進されるメタボリックシンドロームを呈する肝臓で増加することから、メタボリックシンドロームと Aldolase B の関連性が推察される。そこでメタボリックシンドロームの病態における Aldolase B の役割を明らかにする必要があると考えられた。そこで、Aldolase B ノックアウトマウスに高脂肪食を与え肥満を誘発したマウス、および過食によって糖尿病・肥満の症状を呈する ob/ob の遺伝的背景を導入したマウス(ob/ob; Aldolase B ノックアウトマウス)を作成し、その代謝表現系の解析を行った。これらマウスは肥満や糖尿病などのメタボリックシンドロームを呈する状態で Aldolase B が欠損していることになる。耐糖能異常への影響や脂肪蓄積、遺伝子発現量の変化を評価することでメタボリックシンドロームにおける Aldolase B の役割・意義に迫った。

フルクトースが Aldolase B 欠損に与える影響の培養肝細胞を用いた解析

さらに、フルクトースがどのように Aldolase B の発現を増加させ、どのような細胞内変化を引き起こすのかをノックアウトマウスより単離した初代培養肝細胞に対してフルクトース処理を行うことで評価を行った。

4. 研究成果

Aldolase B ノックアウトマウスの代謝表現型の解析

先ず、CRISPER-Cas9 システムを用いて Aldolase B ノックアウトマウスを作製した。作出したノックアウトマウスに対してフルクトースを投与したところ、フルクトース投与 30 分後に血糖が 50 mg/dL 以下となり重篤な低血糖を示した (図 2)。これはフルクトース不耐症の患者と同様であることから、フルクトース代謝障害を示していると考えられた (Lanaspa et al., J Clin Invest, 2018)。

このノックアウトマウスを使用して、フルクトース非存在下における肥満・2 型糖尿病に関連した代謝表現型や肝臓中の遺伝子や代謝産物の変化を解析した。まず、ノックアウトマウスの耐糖能を評価したところ、血中のインスリン値には変化がないものの耐糖能は良好になっていた。しかしながら、ノックアウトマウスの肝臓では肝障害伴う、肝腫大が認められた。さらに、肝臓の DNA マイクロアレイを行なったところ、中性脂肪合成や酸化ストレス、小胞体ストレスに関連した遺伝子発現の亢進していた。変動していた遺伝子群の Pathway 解析を Gene Spring で行ったところ、FASN (Fatty acid synthesis), SCD (Steroyl-CoA Desaturase), Elv16 (Elongation of Very Long Chain Fatty Acids) といった脂質生合成系の遺伝子群が変動しており、多くは転写因子 ChREBP (Carbohydrate Responsive Element-Binding Protein) の標的遺伝子であった。全身性 ChREBP ノックアウトマウスでは通常マウスと比較して、各組織の糖・脂質代謝関連遺伝子の発現量が低下するとともに、肝臓 TG 量や脂肪組織重量が著しく減少することが報告されている (Iizuka K et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 2004)。つまり、フルクトース代謝過程で生じた何らかの代謝産物が ChREBP を介した遺伝子転写に寄与している可能性が想定された。

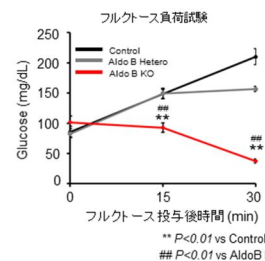


図2: Aldolase B 欠損マウスはフルクトース負荷によって低血糖を示す

メタボリックシンドロームの諸症状と Aldolase B の関連性の解析

メタボリックシンドロームの病態における Aldolase B の役割を明らかにするために、A ノックアウトマウスに過食によって糖尿病・肥満の症状を呈する ob/ob の遺伝的背景を導入したマウス (ob/ob; Aldolase B ノックアウトマウス) を作成し、耐糖能異常や遺伝子発現への影響を評価した。その結果、ob/ob の遺伝的背景によって引き起こされる血糖値の上昇や耐糖能異常は Aldolase B ノックアウトマウスにより改善した。ob/ob の遺伝的背景を導入したマウスとは異なり肝重量の増大は認められなかった。一方で、ob/ob バックグラウンドのノックアウトマウスにおいても転写因子 ChREBP の標的となる脂質生合成系の遺伝子の発現が亢進していた。このことからフルクトース代謝過程で生じた何らかの代謝産物が ChREBP を介した遺伝子転写に寄与している可能性が想定された。また、ノックアウトマウスでは血糖値の上昇や耐糖能異常は改善することから、フルクトースの代謝障害はメタボリックシンドロームにおける血糖上昇には影響していないと考えられた。また、ノックアウトマウスは ob/ob の遺伝的背景によって引き起こされる血糖値の上昇や耐糖能異常を改善させた。このことから、メタボリックシンドロームに伴う、血糖値異常に対しては Aldolase B の機能阻害や抑制は有効的な手段になり得る可能性を示している。

フルクトースが Aldolase B 欠損に与える影響の培養肝細胞を用いた解析

ノックアウトマウスの肝臓では肝障害伴う、肝腫大が認められるとともに中性脂肪合成や酸化ストレスに関連していた。既報において、肝障害の原因として酸化ストレスの関与が報告されている(Parola and Robino., 2001)。この現象を培養細胞レベルでも確認すべく、ノックアウト細胞より初代培養肝細胞を単離して検討を行った。

ノックアウトマウスから単離した初代培養肝細胞

(Aldo B KO 肝細胞)中の中性脂肪含量を Oil Red O 染色によって評価したところ、野生型マウスに比べて中性脂肪の蓄積量が増加していた(図3)。

さらに、フルクトース代謝障害と酸化ストレスの関係を評価するために、Aldo B KO 肝細胞にフルクトース処理を行ったところ

フルクトースにตอบสนองして細胞内のROS(活性酸素種)産生量が1.52倍に増加した(図4)。このことから、フルクトースの代謝障害によって酸化ストレスが惹起されていると考えられた。そこで、フルクトース処理を行う前の Aldo B KO 肝細胞に抗酸化剤である N-

アセチルシステイン(NAC)1 mM の共処理を行ったところ、細胞内のROS産生の増加はキャンセルされた。これらのことから、フルクトースの代謝障害に対して抗酸化剤は有効である可能性が示唆された。ROS産生の原因はまだ明らかにできていないが、Chunyan Guo らは過剰に産生されたROSによってミトコンドリアDNA損傷などが誘導され、ミトコンドリア機能障害が引き起こされることを報告している(Guo et al., 2013)。

Aldo B KO によるフルクトース代謝障害によってROS産生が起き、ミトコンドリアの機能障害が引き起こされているのかも知れない。ミトコンドリア複合体、から漏れ出した電子がROSを産生することが知られており(Waypa et al., 2016)、ミトコンドリアでの電位異常などから酸化ストレスが誘導されているのではないかと推察される。

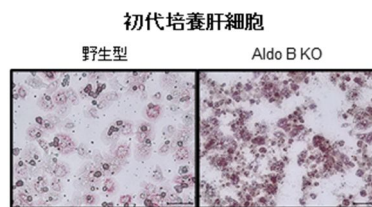


図3: Aldolase B欠損の初代培養肝細胞では脂質の蓄積が認められる

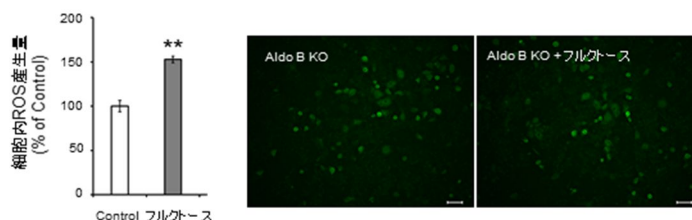


図4: フルクトースによってAldo B KO 肝細胞で細胞内ROS産生量が増加する

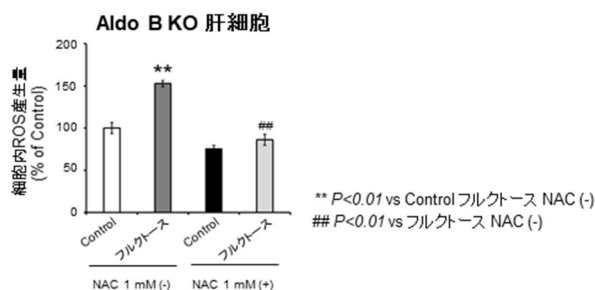


図5: Aldo B KO 肝細胞におけるフルクトースによる細胞内ROS産生量の増加は抗酸化剤の処理でキャンセルされる

今回、詳細な解析は行えていないがノックアウトマウスの肝臓で小胞体ストレスに関連した遺伝子群の転写が亢進することも見出している。肝障害の出現には酸化ストレスやERストレスが寄与すると報告がある(Malhi H et al., J Hepatol, 2011,). このことから、小胞体ストレスとフルクトース代謝障害の関連性についても検討を行う必要がある。ROSにより亢進した小胞体ストレスによってミトコンドリアのアポトーシスが誘導されることが報告され、小胞体ストレスとミトコンドリアをつなぐ因子としてPERKの重要性が提唱されている(Verfaillie et al., 2012)。フルクトース代謝障害により初めにROSが産生され、ついで小胞体ストレス依存的なPERKの活性化を介してミトコンドリアの機能異常が引き起こされる可能性もあり、今後の検証が必要であると考えられる。

本研究結果をまとめると、フルクトース代謝に重要な役割を担うAldolase Bのノックアウトマウスを使用した解析より、過剰なフルクトースを摂取することで起こるフルクトースの代謝障害によって酸化ストレスが惹起されることで、肝障害やそれに伴う血糖低下などの代謝障害が起こること。また、ChREBPを介した遺伝子転写が亢進し、特に脂質合成系の遺伝子の遺伝子転写が増加することが示された。さらに、培養肝細胞を用いた解析より、フルクトースの代謝障害によって惹起される酸化ストレスは抗酸化剤の処理で改善できることが示された。つまり、フルクトースの代謝障害によって惹起される酸化ストレスは抗酸化剤の処理で改善できることから、今後、詳細な解析は必要ではあるがメタボリックシンドロームなどのフルクトースの代謝障害に対して疾患の治療・予防に対して抗酸化剤が有効な治療法の一つになる可能性が示唆された。また、抗酸化剤は遺伝的なフルクトース代謝障害であるフルクトース不耐症の新たな治療法の一つになる可能性も示された。

参考文献

- 世界保健機関: WHO 報告書 2016.
- Guo et al., Neural Regen Res. 2013.
- Iizuka K et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 2004.
- Lim JS et al., Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2010.
- Malhi H et al., J Hepatol, 2011.
- Parola and Robino., J Hepatol. 2001.
- Verfaille et al., Cell Death Differ. 2012.
- Waypa et al., Mol Aspects Med. 2016.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 Kimura Kumi, Inaba Yuka, Watanabe Hitoshi, Matsukawa Toshiya, Matsumoto Michihiro, Inoue Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Nicotinic alpha 7 acetylcholine receptor deficiency exacerbates hepatic inflammation and fibrosis in a mouse model of non alcoholic steatohepatitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 659 ~ 666
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.12964	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsukasaki M, Huynh NCN, Okamoto K, Muro R, Terashima A, Kurikawa Y, Komatsu N, Pluemsakunthai W, Nitta T, Abe T, Kiyonari H, Okamura T, Sakai M, Matsukawa T, Matsumoto M, Kobayashi Y, Penninger JM, Takayanagi H	4. 巻 2
2. 論文標題 Stepwise cell fate decision pathways during osteoclastogenesis at single-cell resolution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Metabolism	6. 最初と最後の頁 1382 ~ 1390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42255-020-00318-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 -

1. 著者名 13. 松本道宏, 長沼孝雄, 松川隼也	4. 巻 2
2. 論文標題 肝臓による糖新生の制御 update	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 糖尿病・内分泌代謝科	6. 最初と最後の頁 16-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 松川 隼也, 酒井 真志人, 長沼 孝雄, 赤星 志織, 満島 勝, 八木 孝, 矢野 宏行, 春日 雅人, 松本 道宏
2. 発表標題 グルカゴン応答性メチル化酵素SETXを介した肝臓の糖代謝・発癌の制御機構の解明
3. 学会等名 第55回日本臨床分子医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本 道宏, 松川 隼也, 酒井 真志人, 長沼 孝雄, 満島 勝, 赤星 志織, 八木 孝, 矢野 宏行, 春日 雅人
2. 発表標題 グルカゴン応答性メチル化酵素SETXはSIRT1を介して代謝と肝腫瘍形成を制御する
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松川 隼也, 酒井 真志人, 長沼 孝雄, 満島 勝, 矢野 宏行, 春日 雅人, 松本 道宏.
2. 発表標題 グルカゴン応答性メチル化酵素SETXはSIRT1の活性化を介して肝糖新生を制御する
3. 学会等名 第57回日本臨床分子医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松川 隼也, 酒井 真志人, 長沼 孝雄, 満島 勝, 赤星 志織, 矢野 宏行, 春日 雅人, 松本 道宏
2. 発表標題 グルカゴン応答性メチル化酵素SETXはSIRT1の活性化を介して肝糖新生を制御する.
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会.
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------