

令和 5 年 4 月 6 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04102

研究課題名（和文）生活習慣病における肝糖取り込み制御機構の役割解明

研究課題名（英文）Investigation of roles of hepatic glucose uptake in the pathogenesis of lifestyle-related diseases

研究代表者

井上 啓 (Inoue, Hiroshi)

金沢大学・新学術創成研究機構・教授

研究者番号：50397832

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、肥満・インスリン抵抗性における肝糖取り込み障害が、グルコキナーゼ活性化障害に起因すること、さらに、グルコキナーゼ活性化障害のメカニズムとして、グルコキナーゼ結合蛋白質GKRPのアセチル化が重要であることを見出している。我々はGKRPのアセチル化部位が126番リジン残基であることを見出し、GKRP非アセチル化を模倣するK126Rマウスおよび、アセチル化を模倣するK126Qマウスを作製した。本研究において、GKRP非アセチル化変異が、肥満・糖尿病マウスでのインスリン抵抗性・脂肪肝を軽減し、GKRPアセチル化変異が、耐糖能障害を起こすことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GKRPのK126非アセチル化が、高脂肪食摂餌肥満マウスでの耐糖能異常・インスリン抵抗性を軽減することは、GKRP-K126のアセチル化制御機構が、肥満に伴う耐糖能異常・インスリン抵抗性の治療標的となることを示唆している。グルコキナーゼの恒常的活性化は、脂肪肝を増悪させ、インスリン抵抗性を増悪することから、今日では、グルコキナーゼは肥満・インスリン抵抗性の治療標的分子と考えられていない。GKRP-K126非アセチル化は、肥満でのGK活性化障害を抑制するが、その恒常的活性化は起こさない。本研究の知見は、グルコキナーゼおよびGKRPの肥満・インスリン抵抗性治療標的としての再評価へとつながる。

研究成果の概要（英文）：The master regulator of hepatic glucose uptake is glucokinase, a hepatic enzyme which converts glucose to glucose-6-phosphate. We have found that impaired hepatic glucose uptake is caused by impeded activation of glucokinase in obesity and insulin resistance and that this impediment to glucokinase activation is induced by an acetylation of GKRP, a glucokinase-binding protein. We have also identified K126 as the acetylation site of GKRP. Here, we generated mice with K126R or K126Q mutation of GKRP as deacetylation- or acetylation mimicking mutant, respectively, to investigate the role of hepatic glucose uptake and GKRP in the pathogenesis of obesity-induced insulin resistance. K126Q mutation resulted in glucose tolerance, and K126R mice resisted insulin resistance and hepatic steatosis under the condition of high-fat diet induced obesity. These findings indicate that the regulatory mechanism of GKRP acetylation is a therapeutic target of insulin resistance in obesity.

研究分野：健康科学および栄養代謝内分泌学

キーワード：肝臓 糖取り込み 生活習慣病

1. 研究開始当初の背景

食後高血糖が、心血管合併症や致死率の増加と密接に関連することが知られている。肝臓は、食事由来の外来性グルコースの三分の一を取り込んでおり、骨格筋とともに、食後における血糖値恒常性の維持に重要な役割を担っている。肥満・2型糖尿病では、骨格筋における糖取り込みだけでなく、肝臓の糖取り込みも障害されており、食後高血糖の誘因となっている。骨格筋における糖取り込みは、インスリンに依存しており、肥満・2型糖尿病における骨格筋糖取り込みの障害は、炎症などに伴うインスリン抵抗性に起因する。一方で、肝臓における糖取り込みは、インスリンだけでなく、グルコースにも依存しており、肝糖取り込み障害の詳細な分子メカニズムは明らかにされていない。

肝臓への糖の取り込みは、グルコースをグルコース-6-リン酸に置換する反応を触媒するグルコキナーゼと、その逆反応を触媒し糖新生系酵素としても知られているグルコース-6-リン酸脱リン酸化酵素のバランスにより制御されている。しかし、グルコース-6-リン酸脱リン酸化酵素活性は食後90分までは有意な変化を示さないことが知られており、食後早期の肝臓糖取り込みにおいては、グルコキナーゼ活性の増加が重要な役割を果たしている。グルコキナーゼは、肝臓・膵島・視床下部などで発現しており、肝臓におけるグルコキナーゼ欠損が高血糖を引き起こすことが報告されている。肝臓におけるグルコキナーゼ活性はホルモンによる遺伝子転写発現調節とグルコキナーゼ調節蛋白質(GKRP)による活性調節により制御されている。GKRPは、グルコキナーゼと結合し、その活性を阻害し、グルコース濃度依存的に、グルコキナーゼと解離することで、その活性を増強する。食直後などでの急速なグルコースレベルの変化には、特に、GKRPによるグルコキナーゼ活性調節が重要な役割を担うことが知られている。

グルコキナーゼは若年発症成人型糖尿病の原因分子として知られているが、肥満・2型糖尿病における肝糖取り込み障害も肝臓グルコキナーゼの活性化障害に起因する。そのため、グルコキナーゼ活性化剤は、2型糖尿病治療薬の新規治療薬剤として注目されてきた。実際に、グルコキナーゼ活性化剤は、肝糖取り込みを増加させることで、短期的には耐糖能を増強する。しかし、グルコキナーゼ活性化剤の耐糖能増強作用も半年ほどで消失し、その後、むしろ耐糖能異常・インスリン抵抗性を悪化させる。さらに、グルコキナーゼ活性化剤は、脂肪肝や脂肪肝炎といった非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)・高中性脂肪血症を引き起こす。これらの問題点から、グルコキナーゼおよび肝糖取り込みを標的とした2型糖尿病・インスリン抵抗性治療薬の開発は十分に進んでいない。

研究代表者らは、世界に先駆け、肥満・2型糖尿病における肝臓グルコキナーゼ活性障害が、GKRPアセチル化の亢進に起因することを、マウスモデルを用いて解明した。GKRPは、アセチル化状態では、高グルコース状態においてもグルコキナーゼと解離できず、その結果、グルコキナーゼ活性化が障害される。また、研究代表者らは、肥満・2型糖尿病で増強するGKRPアセチル化修飾部位として、126番リジン残基(K126)を見出している。近年、グルコキナーゼ・GKRP結合の解離を促進する低分子化合物が、正常血糖マウスでは低血糖を引き起こさずに、肥満・糖尿病モデルマウスでのみ血糖降下作用を示すことが報告され、GKRPの糖尿病治療標的としての重要性が指摘されている。しかし、肥満・2型糖尿病におけるGKRPおよびGKRPアセチル化の役割は解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、GKRPのK126アセチル化/非アセチル化を模倣する遺伝子改変マウスを作製し、その表現型解析により、GKRPおよびそのアセチル化の2型糖尿病・インスリン抵抗性治療標的としての有用性を解明する。具体的には、GKRPのK126アセチル化/非アセチル化を模倣する遺伝子改変マウスとして、それぞれK126Q/K126Rマウスを作製し、研究に供した。

3. 研究の方法

1) 動物実験

動物実験は、金沢大学実験動物施設において、金沢大学動物実験規程に従い、金沢大学動物実験委員会による審査、金沢大学長からの承認を得て、実施した。マウスは、自由摂餌・自由給水で12時間の明暗サイクルと温度管理した環境下で飼育した。

GKRP-K126R/K126Qマウスは、CRISPR-Cas9システムを用いて作出した。非肥満マウスは、10-12週齢まで、通常食(9%脂肪(CRF-1)、オリエンタル酵母、東京)の自由摂餌・自由給水で飼育した。肥満マウスは、7週齢健常マウスに、6-8週間、高脂肪食(60%脂肪(D12429)、リサーチダイエツト、ニューブランズウィック、ニュージャージー)を与え、作成した。体重35グラム以上に育ったマウスのみを、肥満マウスとして用いた。

2) 血漿パラメータおよび肝臓中性脂肪量の解析

血液サンプルは、尾静脈から採取し、血漿サンプルは-80℃で保存した。血糖値測定にはグルコカードGプラスメーター(アークレイ株式会社、京都)を使用した。血中インスリン値をマウスインスリンELISAキット(森永生科学研究所、横浜)により測定した。肝トリグリセリド量は、

凍結した肝臓を粉碎後、イソプロパノールでトリグリセリドを抽出し、TG E-テストワーカーキット（富士フィルム和光純薬、大阪）により、測定した。肝糖取り込みは、経静脈的に、グルコース（非肥満マウスでは2 g/kg 体重、肥満マウスでは1 g/kg 体重）を、その10分後に2-デオキシグルコース（2-DG, 200 μ mol/kg 体重）をそれぞれ投与し、肝臓2-DG取り込み量により評価した。肝2-DG取り込み量は、2-DG取り込み測定キット（コスモバイオ、東京）を用いた。

3) マウス単離肝細胞の解析

マウス単離肝細胞は、コラゲナーゼ環流法を用いて、採取した。糖取り込みは、2-DG (25 mM) を含むリン酸緩衝液中で、3分間の取り込み時間で計測した。ニコチンアミド(20 μ M)は、2-DG取り込み前6時間より添加した。遺伝子導入は、アデノウィルスベクターを用いた。アデノウィルスベクターの作製は、Adenovirus Dual Expression Kit (タカラ、大津)を用いて行った。

4) 統計解析

全データは、平均値 \pm 標準誤差で表記した。統計解析は IBM SPSS Statistics 24(IBM)を用いて、2群間の比較はスチューデント t 検定を用い、3群以上の比較にはANOVA およびダネット検定またはチューキー検定により行った。有意水準は5%未満とした。

4. 研究成果

単離肝細胞において、GKRP-K126R 変異体または野生型 GKRP を、アデノウィルスベクターを用いて過剰発現させ、解析に供した。GKRP-K126R 変異体は、低グルコース培養条件でグルコキナーゼと結合し、高グルコース培養条件によりグルコキナーゼと解離した。ニコチンアミドによる sirtuin 阻害によって、GKRP-K126 アセチル化は増強するため、野生型 GKRP では、グルコース依存的なグルコキナーゼとの解離障害が起こるが、K126R 変異体では、高グルコース培養条件でのグルコキナーゼとの解離障害は起こらなかった。ニコチンアミド添加は、野生型 GKRP 過剰発現肝細胞において2-DG取り込みの減少を起こすが、K126R 変異体発現肝細胞では2-DG取り込み障害が軽減していた。肥満2型糖尿病 db/db マウス由来単離肝細胞は、細胞内に脂肪滴を多数有し、肝糖取り込み障害を呈する。このdb/dbマウス由来単離肝細胞では、野生型 GKRP は培養液中のグルコース濃度に関わらず、2-DG と結合しているが、K126R 変異体は培養液中のグルコース濃度依存的に、グルコキナーゼと解離した。また、db/db マウス由来単離肝細胞において、K126R 変異体は2-DG取り込みを増加させた。一方で、K126Q 変異体は、高グルコース培養条件において、ニコチンアミド添加と同程度に、強固にグルコキナーゼと結合し、2-DG取り込みを減少させた。K126R またはK126Q マウス由来の単離肝細胞は、肝2-DG取り込みについて、K126R 変異体またはK126Q 変異体の過剰発現単離肝細胞と同様の結果を示した。

K126Q マウスは、随時摂食下において、血糖値および血中インスリン値の増加を呈した。また、肝臓グルコキナーゼおよびグルコース-6リン酸脱リン酸化酵素の遺伝子発現に変化を与えず、糖負荷に伴う肝臓2-DG取り込みが減少し、血糖値の上昇および血中インスリン値の増加を来した。一方で、K126R マウスは、随時摂食下での血糖値および血中インスリン値、糖負荷に伴う肝臓2-DG取り込み、血糖値、血中インスリン値に明らかな変化を示さなかった。一方で、高脂肪食摂餌肥満マウスにおける肝臓K126R マウスでは、血糖値および血中インスリン値が減少し、インスリン感受性の亢進を呈した。また、肝臓2-DG取り込みの増加に伴い糖負荷試験においても、血糖値および血中インスリン値が減少を示した。高脂肪食摂餌肥満条件で、K126R マウスは、野生型と比較し、肝臓中性脂肪量の減少を示した。

GKRP の K126R が、高脂肪食摂餌肥満条件での耐糖能異常・インスリン抵抗性・肝中性脂肪量を軽減するは、GKRPK126のアセチル化制御機構が、肥満に伴う耐糖能異常・インスリン抵抗性・脂肪肝の治療標的となることを示唆している。グルコキナーゼの恒常的活性化は、脂肪肝を増悪させ、インスリン抵抗性を増悪する。GKRPK126非アセチル化は、肥満でのグルコキナーゼ活性化障害を抑制するが、その恒常的活性化は起こさないことが、グルコキナーゼ恒常的活性化との表現型の違いにつながったと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Inaba Y, Hashiuchi E, Watanabe H, Kimura K, Oshima Y, Tsuchiya K, Murai S, Takahashi C, Matsumoto M, Kitajima S, Yamamoto Y, Honda M, Asahara S, Ravnskjaer K, Horike S, Kaneko S, Kasuga M, Nakano H, Harada K, Inoue H.	4. 巻 14
2. 論文標題 The transcription factor ATF3 switches cell death from apoptosis to necroptosis in hepatic steatosis in male mice.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 167
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-35804-w	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 該当する
1. 著者名 Kokaji T, Eto M, Hatano A, Yugi K, Morita K, Ohno S, Fujii M, Hironaka KI, Ito Y, Egami R, Uematsu S, Terakawa A, Pan Y, Maehara H, Li D, Bai Y, Tsuchiya T, Ozaki H, Inoue H, Kubota H, Suzuki Y, Hirayama A, Soga T, Kuroda S.	4. 巻 12
2. 論文標題 In vivo transomic analyses of glucose-responsive metabolism in skeletal muscle reveal core differences between the healthy and obese states.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 13719
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-17964-9	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 Fujita S, Karasawa Y, Fujii M, Hironaka KI, Uda S, Kubota H, Inoue H, Sumitomo Y, Hirayama A, Soga T, Kuroda S.	4. 巻 8
2. 論文標題 Four features of temporal patterns characterize similarity among individuals and molecules by glucose ingestion in humans.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 NPJ Syst Biol Appl.	6. 最初と最後の頁 6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41540-022-00213-0.	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 Sheng J, Kohno S, Okada N, Okahashi N, Teranishi K, Matsuda F, Shimizu H, Linn P, Nagatani N, Yamamura M, Harada K, Horike SI, Inoue H, Yano S, Kumar S, Kitajima S, Ajioka I, Takahashi C.	4. 巻 74
2. 論文標題 Treatment of RB1-intact hepatocellular carcinoma with CDK4/6 inhibitor combination therapy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 1971-1993
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/hep.31872.	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 Kanno A, Asahara SI, Furubayashi A, Masuda K, Yoshitomi R, Suzuki E, Takai T, Kimura-Koyanagi M, Matsuda T, Bartolome A, Hirota Y, Yokoi N, Inaba Y, Inoue H, Matsumoto M, Inoue K, Abe T, Wei FY, Tomizawa K, Ogawa W, Seino S, Kasuga M, Kido Y.	4. 巻 5
2. 論文標題 GCN2 regulates pancreatic β -cell mass by sensing intracellular amino acid levels.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JCI Insight.	6. 最初と最後の頁 e128820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.128820.	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 Matsumoto A, Kuwata H, Kimura S, Matsumoto H, Ochi K, Moro-Oka Y, Watanabe A, Yamada H, Ishii H, Miyazawa T, Chen S, Baba T, Yoshida H, Nakamura T, Inoue H, Ogawa Y, Tanaka M, Miyahara Y, Suganami T.	4. 巻 3
2. 論文標題 Hollow fiber-combined glucose-responsive gel technology as an in vivo electronics-free insulin delivery system.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Commun Biol.	6. 最初と最後の頁 313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-1026-x.	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 Kokaji T, Hatano A, Ito Y, Yugi K, Eto M, Ohno S, Fujii M, Hironaka K, Egami R, Inoue H, Uda S, Kubota H, Suzuki Y, Ikeda K, Arita M, Matsumoto M, Nakayama KI, Ohishi M, Ueno A, Endo K, Hirayama A, Soga T, Kuroda K.	4. 巻 13
2. 論文標題 Transomics analysis reveals allosteric and gene regulation axes for altered hepatic glucose-responsive metabolism in obesity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Signal.	6. 最初と最後の頁 eaaz1236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.aaz1236.	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 Hashiuchi E, Watanabe H, Kimura K, Matsumoto M, Inoue H, Inaba Y.	4. 巻 12
2. 論文標題 Diet Intake Control Is Indispensable for the Gluconeogenic Response to Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibition in Male Mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig.	6. 最初と最後の頁 35-47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13319. Epub 2020 Jul 23.	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 Egami R, Kokaji T, Hatano A, Yugi K, Eto M, Morita K, Ohno S, Fujii M, Hironaka KI, Uematsu S, Terakawa A, Bai Y, Pan Y, Tsuchiya T, Ozaki H, Inoue H, Uda S, Kubota H, Suzuki Y, Matsumoto M, Nakayama KI, Hirayama A, Soga T, Kuroda S.	4. 巻 24
2. 論文標題 Trans-omic analysis reveals obesity-associated dysregulation of inter-organ metabolic cycles between the liver and skeletal muscle.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102217.	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7件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 井上啓
2. 発表標題 迷走神経性臓器連関による糖代謝恒常性維持とその破綻
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上啓
2. 発表標題 Modal shift of hepatocyte death in nonalcoholic fatty liver disease
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上啓
2. 発表標題 Role of Brain-liver interaction in obesity-related hepatic disorders
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋内咲実、稲葉有香、井上啓
2. 発表標題 SGLT2阻害剤の肝糖新生応答制御に対する食事量制限の重要性
3. 学会等名 第39回日本内分泌学会内分泌代謝学サマーセミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲葉有香、橋内咲実、渡邊一史、井上啓
2. 発表標題 高度脂肪肝で生じる細胞死誘導メカニズムの解明
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上啓
2. 発表標題 Role of Brain-liver cross-talk in glucose homeostasis and its deterioration
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上啓
2. 発表標題 臓器連関と肥満
3. 学会等名 第41回日本肥満学会・第38回日本肥満症治療学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢大学新学術創成研究機構栄養・代謝研究ユニット
<https://inoue.w3.kanazawa-u.ac.jp/index.html>

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			
デンマーク	南デンマーク大学			