

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08892

研究課題名(和文) microRNAを介した肝糖新生の新規抑制機構の解明

研究課題名(英文) Exploring new pathway for the regulation of hepatic gluconeogenesis via microRNAs

研究代表者

永島 秀一 (Nagashima, Shuichi)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30406136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：コレステロール合成に關与するHMG-CoA還元酵素(HMGCR)およびスクアレン合成酵素の肝細胞特異的欠損マウスでは、肝機能障害に伴い、血糖が低下することを明らかにした。この血糖低下機序には肝臓の糖新生抑制が關与している可能性をしめした。RNA sequence法により、肝細胞特異的なHMGCR欠損マウス肝臓における、コレステロール合成抑制と糖新生抑制の連関にはあるマイクロRNAクラスターmiR-96/182/183の発現亢進が關与している可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コレステロール合成経路を抑制するHMG-CoA還元酵素(HMGCR)阻害薬スタチンによって、耐糖能が悪化することが明らかになっており、コレステロール代謝と糖代謝の関連性が注目されている。この一方で、我々はコレステロール合成を肝臓で抑制すると血糖が低下し、この機序として、あるmicroRNAクラスターの高発現が肝糖新生を抑制させた可能性を示した。これは新たな糖新生抑制経路の発見、さらには新たな糖尿病治療薬の開発につながる研究成果であり社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：HMG-CoA reductase (HMGCR) and squalene synthase (SS) are the rate-limiting enzyme in the cholesterol synthesis pathway. We showed that liver-specific HMGCR (L-HMGCR) or SS gene knockout mice exhibited low blood glucose with liver injury and genes associated with hepatic glucose production were decreased in the liver. To investigate the role of HMGCR in the hepatic glucose production, we used the RNA-sequencing technology which can generate comprehensive transcriptomic information. We found out that one microRNA cluster miR-96/182/183 was induced in the liver of L-HMGCR knockout and it may reduce the genes for hepatic glucose production.

研究分野：diabetes

キーワード：HMG-CoA還元酵素 スタチン 糖新生 糖尿病 micro RNA

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体内コレステロール合成の律速酵素は HMG-CoA 還元酵素(HMGCR)である。この阻害薬スタチンは脂質異常症治療及び動脈硬化症の予防薬として広く使用されている。しかし近年、スタチンによって耐糖能が悪化することが明らかになったことから、コレステロール合成経路と糖代謝経路の連関が注目されている。我々は、スタチンの薬剤としての HMGCR 以外への作用、すなわち標的外作用を除外しつつ、HMGCR の各臓器への作用を明らかにするために脾細胞、組織マクロファージ、及び肝細胞特異的な HMGCR 遺伝子欠損モデル動物を作製して糖代謝の評価を行ってきた。脾細胞特異的な HMGCR 欠損マウスは、脾細胞の分化異常をきたし、インスリン分泌能の低下から重度の耐糖能悪化をきたした(Takei S, et al. Diabetes 69;2352-2363, 2020)。また組織マクロファージ特異的な HMGCR 欠損マウスは、脂肪組織へのマクロファージの集積の減少によって脂肪組織の炎症性変化が起こりにくくなり、結果として全身のインスリン抵抗性が減弱して耐糖能が改善した(Takei A, et al. Diabetes 69; 158-164, 2020)。さらに肝臓細胞特異的な HMGCR 欠損マウスにおいては肝障害と致死的な低血糖をきたした(Nagashima S, et al. Arterioscler Thromb Vasc 32; 1824-31, 2012)。以上からコレステロール合成経路と糖代謝経路の連関は臓器ごとに異なり、特に肝臓におけるコレステロール合成経路の抑制による血糖低下の機序が明らかになれば、新たな糖尿病の治療ターゲットになりうると考えた。

### 2. 研究の目的

我々の基礎検討では、肝細胞特異的な HMGCR 欠損マウスの肝臓において、糖新生にかかわる遺伝子群の発現低下が認められた。肝臓のコレステロール合成経路抑制と糖新生を結びつける機序のなかで、既知のものとしては、核内受容体 LXR- $\beta$  の糖代謝への作用が挙げられる。LXR- $\beta$  はコレステロールの代謝産物であるオキシステロールを生理的なリガンドとする転写因子である。肝臓に高発現しており、胆汁酸合成、細胞内のコレステロールの搬出、そして脂肪酸合成に関わる転写因子 SREBP-1c 遺伝子を誘導する。肝糖新生に重要な酵素である G6Pase や PEPCK はインスリンのほか、この LXR- $\beta$  によっても抑制される。コレステロール合成の抑制はオキシステロールの産生を抑制することから、LXR- $\beta$  経路も抑制され、G6Pase や PEPCK は誘導される可能性があり、この機序では肝臓 HMGCR 抑制による糖新生の抑制の説明はできない。

近年、microRNA (miR)による遺伝子発現調節機構に関する研究が大きく展開している。miR はタンパク質をコードしないノンコーディング領域に存在し、多くが 21~23 塩基の小さな RNA である。miR は標的とする遺伝子の mRNA の 3' UTR にある相補的な配列と結合して、その mRNA の切断や翻訳抑制により蛋白発現を抑制する。肝臓における miR は、肝臓の発生、肝機能の維持、肝炎及び肝細胞癌の発症に関わるほか、複数の miR が肝脂質と糖代謝双方に関与していることが明らかになっている。

以上のことから既知の遺伝子発現の挙動では説明のできないコレステロール合成経路抑制と糖新生抑制を関連させる因子の探索を、miRNA 領域も含めて行うことを本研究の目的とした。

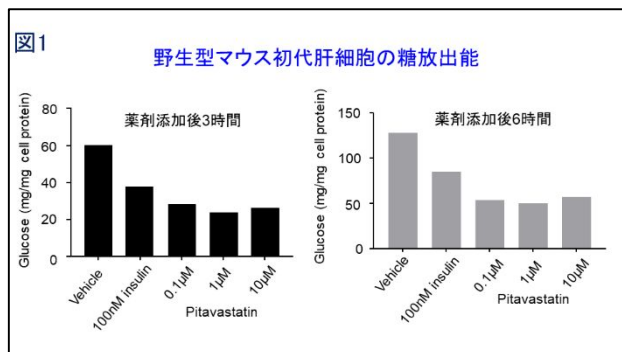
### 3. 研究の方法

野生型マウスの初代肝細胞、そしてコレステロール合成経路の上流に位置する HMGCR 遺伝子の肝細胞特異的な欠損(L-HMGCRKO) マウス、およびコレステロール合成経路の下流に位置するスクアレン合成酵素(SS)の肝細胞特異的な欠損 (LSSKO)マウスを用いて、これらの糖代謝、遺伝子発現、さらには non-coding lesion まで含めた網羅的な RNA-sequence 解析を行い肝臓におけるコレステロール合成経路の抑制が糖新生抑制に繋がる機序を解明する。

### 4. 研究成果

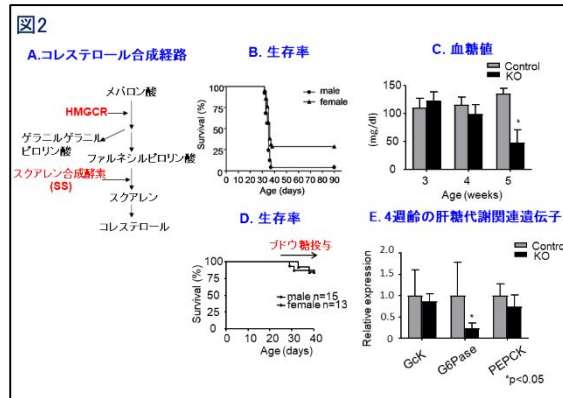
野生型マウス初代肝細胞を用いた糖新生の解析

HMGCR 阻害薬スタチンを野生型マウスから単離した初代肝細胞に添加したところ糖放出能が低下していた(図 1)



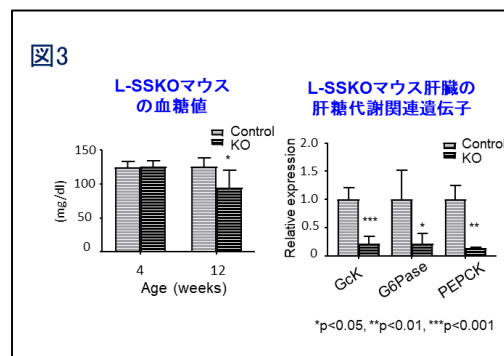
### L-HMGCRKO マウスの生存率と糖代謝

HMGCR はコレステロール合成経路の上流に位置する律速酵素である(図 2A)。この肝細胞特異的欠損(L-HMGCRKO) マウスは生後 5 週までに多くが死亡した(図 2B)。重度の肝障害を伴っていたが血糖低下もみられた(図 2C)。ブドウ糖を経口投与したところ生存率の大幅な上昇が認められた(図 2D)ため、主な死亡原因は低血糖であったと考えられた。低血糖の原因を探るため肝臓における糖代謝関連遺伝子の発現を調べたところ、対照と比較して L-HMGCRKO 肝臓で糖新生に関わる G6Pase mRNA 発現の 77%の低下を見出した(図 2E)。



### L-SSKO マウスの糖代謝

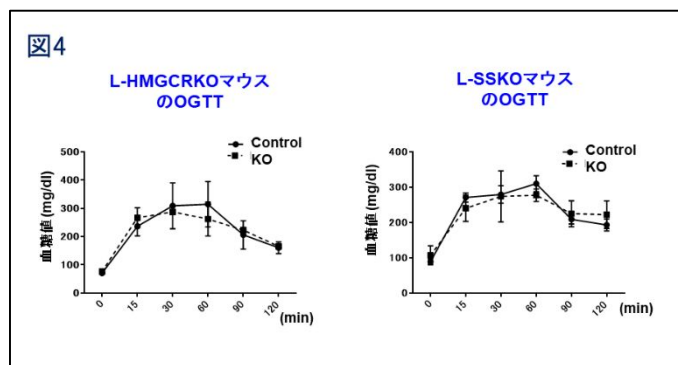
SS はコレステロール合成経路のより下流に位置してコレステロール合成により特異的に関与する酵素である(図 2A)。肝細胞特異的 SS 欠損(L-SSKO) マウスは HMGCR と異なり致死的ではなかったが、肝障害とともに 12 週齢で血糖低下を認めた(図 3A)。加えて糖新生に関わる G6Pase と PEPCK の mRNA はいずれも約 80%の低下を認めた(図 3B)。



以上の結果から薬理的にコレステロール合成経路を抑制した場合、そして遺伝子レベルでコレステロール合成経路を抑制した場合のいずれでも肝糖新生は抑制されたことになる。

### L-HMGCRKO および L-SSKO マウスの経口ブドウ糖負荷試験(OGTT)

L-HMGCRKO において、5 週齢を超えて生存し、さらに肝障害が沈静化した 12 週齢マウス、そして L-SSKO においても 12 週齢以降で肝障害が沈静化したマウス、それぞれについて経口ブドウ糖負荷試験を行った。これらのマウスでは対照に比べて耐糖能に差異を認めなかった。以上のことから血糖の低下は肝障害とともに出現する現象と考えられた。



### RNA-sequence 法をもちいた網羅的解析

L-HMGCRKO 肝臓組織から RNA を抽出して、RNA-sequence 法にて網羅的に non-coding lesion を含めた遺伝子変化を調べた。L-HMGCRKO と対照マウスとの間で多くの mRNA、microRNA (miRNA) の変化が見られたが、miRNA のクラスター解析にて、ある一つの miRNA クラスターの発現が 8 倍と亢進が認められた(miR-96/182/183)。この miRNA クラスターの高発現は FOXO1 を介して、肝糖新生を抑制することが知られている。発現の亢進がみられた miRNA クラスターはこれのみであったため、この miRNA クラスター-miR-96/182/183 の関与がコレステロール合成抑制と糖新生を関連させる新たな分子機序である可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Yamada H, Yoshida M, Suzuki D, Funazaki S, Nagashima S, Masahiko K, Kiyoshi O, Hara K	4. 巻 13
2. 論文標題 Effectiveness and Safety of Once-Weekly Semaglutide in Japanese Patients with Type 2 Diabetes in Treatment Intensification: A Retrospective Observational Single-Center Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diabetes Ther	6. 最初と最後の頁 1779-1788
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13300-022-01313-0	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 Takahashi M, Yamamuro D, Wakabayashi T, Takei A, Takei S, Nagashima S, Okazaki H, Ebihara K, Yagyu H, Takayanagi Y, Onaka T, Goldberg IJ, Ishibashi S.	4. 巻 298
2. 論文標題 Loss of myeloid lipoprotein lipase exacerbates adipose tissue fibrosis with collagen VI deposition and hyperlipidemia in leptin-deficient obese mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 102322
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.102322	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 Hatano Y, Sawayama N, Miyashita H, Kurashina T, Okada K, Takahashi M, Matsumoto M, Hoshide S, Sasaki T, Nagashima S, Ebihara K, Mori H, Kario K, Ishibashi S	4. 巻 6
2. 論文標題 Sex-specific Association of Primary Aldosteronism With Visceral Adiposity.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Endocr Soc	6. 最初と最後の頁 bvac098
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/jendso/bvac098	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 Shibuya K, Ebihara K, Ebihara C, Sawayama N, Isoda M, Yamamuro D, Takahashi M, Nagashima S, Ishibashi S	4. 巻 298
2. 論文標題 AAA-ATPase valosin-containing protein binds the transcription factor SREBP1 and promotes its proteolytic activation by rhomboid protease RHBDL4.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 101936
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.101936	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 Funazaki S, Yoshida M, Yamada H, Kakei M, Kawakami M, Nagashima S, Hara K, Dezaki K.	4. 巻 13
2. 論文標題 A novel mechanism of imeglimin-mediated insulin secretion via the cADPR-TRP channel pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Jornal of Diabtes Investigation	6. 最初と最後の頁 34-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13669.	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 Isoda M, Ebihara K, Sawayama N, Murakami A, Ebihara C, Shibuya K, Takei A, Takei S, Wakabayashi T, Yamamuro D, Takahashi M, Nagashima S, Ishibashi S.	4. 巻 11
2. 論文標題 Leptin sensitizing effect of 1,3-butanediol and its potential mechanism.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-96460-y.	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 Yamaoka K, Nagashima S, Okada N, Sawayama N, Saito S, Takahashi M, Okada K, Endo K, Koizumi M, Sasanuma H, Ebihara K, Kasajima A, Fukushima N, Sata N, Ishibashi S.	4. 巻 9
2. 論文標題 A case of insulinoma with hypoglycemia that was better managed with lanreotide than octreotide	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Case Reports	6. 最初と最後の頁 e04118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ccr3.4118.	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 Takahashi M, Ozaki N, Nagashima S, Wakabayashi T, Iwamoto S, Ishibashi S.	4. 巻 4
2. 論文標題 Normal plasma apoB48 despite the virtual absence of apoB100 in a compound heterozygote with novel mutations in the MTTP gene	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Lipidology	6. 最初と最後の頁 569-573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacl.2021.04.013.	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 Wakabayashi Tetsuji, Takei Akihito, Okada Nobukazu, Shinohara Miki, Takahashi Manabu, Nagashima Shuichi, Okada Kenta, Ebihara Ken, Ishibashi Shun	4. 巻 2021
2. 論文標題 A novel SOX10 nonsense mutation in a patient with Kallmann syndrome and Waardenburg syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrinology, Diabetes & Metabolism Case Reports	6. 最初と最後の頁 In print
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/EDM-20-0145	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 Takei Shoko, Nagashima Shuichi, Takei Akihito, Yamamuro Daisuke, Wakabayashi Tetsuji, Murakami Akiko, Isoda Masayo, Yamazaki Hisataka, Ebihara Chihiro, Takahashi Manabu, Ebihara Ken, Dezaki Katsuya, Takayanagi Yuki, Onaka Tatsushi, Fujiwara Ken, Yashiro Takashi, Ishibashi Shun	4. 巻 69
2. 論文標題 -Cell Specific Deletion of HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A) Reductase Causes Overt Diabetes due to Reduction of -Cell Mass and Impaired Insulin Secretion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 2352 ~ 2363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2337/db19-0996	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 Yamamuro Daisuke, Yamazaki Hisataka, Osuga Jun-ichi, Okada Kenta, Wakabayashi Tetsuji, Takei Akihito, Takei Shoko, Takahashi Manabu, Nagashima Shuichi, Holleboom Adriaan G., Kuroda Masayuki, Bujo Hideaki, Ishibashi Shun	4. 巻 61
2. 論文標題 Esterification of 4 -hydroxycholesterol and other oxysterols in human plasma occurs independently of LCAT	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Research	6. 最初と最後の頁 1287 ~ 1299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1194/jlr.RA119000512	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 Yamamuro Daisuke, Takahashi Manabu, Nagashima Shuichi, Wakabayashi Tetsuji, Yamazaki Hisataka, Takei Akihito, Takei Shoko, Sakai Kent, Ebihara Ken, Iwasaki Yusaku, Yada Toshihiko, Ishibashi Shun	4. 巻 15
2. 論文標題 Peripheral circadian rhythms in the liver and white adipose tissue of mice are attenuated by constant light and restored by time-restricted feeding	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0234439 ~
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0234439	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 Nagashima Shuichi, Wakabayashi Tetsuji, Saito Naoko, Takahashi Manabu, Okada Kenta, Ebihara Ken, Ishibashi Shun	4. 巻 11
2. 論文標題 Long term efficacy of the sodium?glucose cotransporter?2 inhibitor, ipragliflozin, in a case of type?A insulin resistance syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 1363 ~ 1365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13241	査読の有無 無
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2件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 永島 秀一
2. 発表標題 膵 細胞の HMG-CoA 還元酵素欠損は膵 細胞の減少とインスリン分泌能の低下による 糖尿病を誘発する
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永島 秀一
2. 発表標題 第41回日本肥満学会・第38回日本肥満症治療学会
3. 学会等名 脂肪組織マクロファージのHMG-CoA還元酵素は食事誘発性肥満のインスリン抵抗性を改善する(招待講演)
4. 発表年 2021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
---------	---------