

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02976

研究課題名（和文）肥満・2型糖尿病に伴うcAMPを介した新規脂肪肝発症の分子機構の解明

研究課題名（英文）Molecular Mechanisms of cAMP-mediated Hepatic Steatosis with Obesity and Type 2 Diabetes

研究代表者

窪田 直人（Kubota, Naoto）

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：50396719

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：肥満や2型糖尿病で認められる脂肪肝発症には肝臓のインスリン受容体シグナルが必須と考えられているが、その分子機構はなお十分に解明されていない。我々は肥満・インスリン抵抗性に伴う高インスリン血症がMrp4の発現を低下させ、それにより肝臓のcAMPレベルが上昇し、これがPPAR α の発現を誘導し脂肪肝が形成されていることを見出した。実際肥満モデル動物の脂肪肝ではcAMPが有意に高く、cAMPの上昇はPPAR α の発現を誘導し、脂肪蓄積を増加させた。本研究ではインスリンシグナルによるMrp4の発現調節機構およびcAMPによるPPAR α 発現調節機構の分子メカニズムを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

代謝機能障害関連脂肪肝疾患（MASLD）はインスリン抵抗性を基盤病態としたメタボリックシンドロームの肝病変と位置付けられ、2型糖尿病との合併も5割を超えるという報告もある。一部は脂肪肝炎（MASH）、さらに肝硬変・肝癌へと進行するため、その対策は急務である。本研究により細胞内のセカンドメッセンジャーとして知られるcAMPがインスリンシグナルによって調節を受け、さらにPPAR α の発現調節を通して脂肪肝形成に関与していることが明らかとなり、増加の一途をたどるMASLDの新しい治療法・予防法の開発、MASH・肝硬変・肝癌への進展抑制が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Insulin receptor signaling in the liver is thought to be essential for the development of steatotic liver with obesity and type 2 diabetes, but the molecular mechanism is still poorly understood. We found that hyperinsulinemia associated with obesity and insulin resistance decreased Mrp4 expression, which in turn increased cAMP levels in the liver and induced PPAR α expression, leading to steatotic liver. In fact, cAMP was significantly higher in the steatotic liver of obese animal models, and elevated cAMP induced PPAR α expression and increased TG contents in the liver. In this study, we elucidated the molecular mechanisms of the regulation of Mrp4 expression by insulin signaling and PPAR α expression by cAMP.

研究分野：Diabetes

キーワード：糖尿病 肥満 脂肪肝 インスリン抵抗性

1. 研究開始当初の背景

肝臓は糖・脂質代謝において中心的な役割を果たしている臓器の1つであり、インスリンは糖産生を抑制し脂肪合成を促進する。実際、肝臓特異的インスリン受容体 (IR) 欠損マウス (Mol. Cell 6:87, 2000) や、肝臓特異的インスリン受容体基質 (IRS) -1/IRS-2 ダブル欠損マウス (Cell Metab. 8:49, 2008) 肝臓特異的 Akt2KO マウス (Cell Metab. 10:405, 2009) では、いずれも糖産生の亢進と脂肪合成の低下が認められる。ところが 2 型糖尿病ではしばしば空腹時の高血糖と脂肪肝の合併が認められる。これはインスリン作用の面からみると、肝臓における糖産生抑制は障害されている、すなわち「インスリン作用が低下している」ものの、脂肪合成に関してはむしろ活性化している、すなわち「インスリン作用が亢進している」という、一見相反する病態が共存している状態である。この現象は糖代謝においてのみインスリン抵抗性(糖産生の抑制障害)を呈していることから、「選択的インスリン抵抗性」と言われ、総説などにも広く取り上げられているが (Cell Metab. 7:95, 2008) その分子機構はいまだ十分に解明されていない。我々は metabolic zonation に着目し、肥満・2 型糖尿病の肝臓では門脈領域ではインスリンシグナルが障害される一方、中心静脈領域ではむしろインスリンシグナルが亢進していることを発見した (Nat. Commun. 7:12977, 2016)。すなわち門脈領域は主に糖新生を担っているため、この領域のインスリン作用障害は高血糖の原因となる一方、中心静脈領域は主に脂肪合成を担っているため、この領域のインスリン作用亢進は脂肪肝の原因となり、これが肝臓における「選択的インスリン抵抗性」の分子機構の1つであることを明らかにした (Nat. Commun. 7:12977, 2016、Cell Metab. 25:797, 2017)。しかし今なお肥満・2 型糖尿病の肝臓においてインスリン作用亢進がどのような分子機構で脂肪合成を促進させるかについて、十分に解明されていないのが現状である。

2. 研究の目的

脂肪肝も含めた肝臓における主要な脂肪合成調節転写因子として SREBP1 や PPAR が報告されている (Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 16: 678, 2015、Cell Metab. 27: 22, 2018、Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 124: 528, 2019)。しかしインスリンシグナルが完全に遮断されている肝臓特異的 IRS-1/IRS-2 ダブル欠損マウスは高脂肪食を負荷しても脂肪肝を呈さないが、SREBP1c やその調節下にある ACC や FAS の発現は保たれており、SREBP1c はインスリンシグナル非依存的に調節されており、インスリン作用亢進による脂肪肝形成の分子機構を説明できない。一方脂肪肝を呈さないこのマウスにおいて PPAR やその下流の FSP27、CD36 はいずれも有意に抑制されており、PPAR の発現はインスリンシグナルによって調節されていること、本来発現がほとんど認められない肝臓の PPAR の発現上昇が肥満・2 型糖尿病に伴う脂肪肝の原因であることが示唆される。実際、我々はマウス・ヒトいずれにおいても脂肪肝では PPAR やその下流の遺伝子発現が有意に上昇していることを確認した。PPAR は肝臓において脂質代謝調節因子として、de novo 脂肪合成や脂肪酸流入に関与する遺伝子を標的としており、脂肪合成促進・脂肪肝形成に作用する。また肝臓特異的 PPAR 欠損マウスでは脂肪肝が抑制されることが報告されている。しかし、どのような分子機構でインスリンシグナルが PPAR の発現を調節しているのかはなお不明である。

3. 研究の方法

我々は肝臓を用いた網羅的解析から脂肪肝では cAMP レベルが有意に上昇していることを見出した。肝臓において主要な cAMP 分解酵素である PDE4B の発現には両群間で相違は認められず、cAMP を細胞外に能動的に輸送する ABC トランスポーター (ATP-binding cassette transporters) の1つである Mrp4 の発現が脂肪肝で有意に低下していた。Mrp4 の発現はインスリン濃度依存的に低下し、インスリンシグナルが遮断されている肝臓特異的 IRS-1/IRS-2 ダブル欠損マウスではその発現が有意に上昇していた。そして cAMP レベルを上昇させると、非常に興味深いことに PPAR の発現が誘導され、それに伴って中性脂肪含量が上昇した。これらの結果は高インスリン血症による Mrp4 発現低下により肝臓の cAMP レベルが上昇し、これが PPAR の発現を誘導し脂肪肝が形成されていることを強く示唆していた。そこで本研究ではまず (I) インスリンシグナルによる Mrp4 の発現調節機構を解明し、続いて (II) cAMP による PPAR 発現調節機構の分子メカニズムを検討した。

4. 研究成果

(I) インスリンシグナルによる Mrp4 の発現調節機構

インスリンシグナルが完全に遮断されている肝臓特異的 IRS-1/IRS-2 ダブル欠損マウスの肝臓ではインスリンによる Mrp4 の発現低下は認められなかった。上流のシグナルが確かにインスリン受容体であることを確認するために我々が既に樹立した肝臓特異的 IR 欠損マウスで確認するとともに、下流のシグナル伝達機構を解析するため、IRS の下流に存在すると考えられる、PI3K/Akt/FoxO1 経路について、インスリン刺激後の Akt や FoxO1 のリン酸化、免疫組織染色に

よる FoxO1 の局在変化、constitutively active (CA) FoxO1 や FoxO1 ノックダウンの系による Mrp4 の発現変化や cAMP レベルの変化を検討した。PI3K 阻害薬の LY294002 の添加によりインスリンによる Mrp4 の発現低下が抑制されることを初代肝細胞で確認し、Mrp4 は PI3K/Akt/FoxO1 シグナルによって調節されている可能性が高いと考えられた。さらに FoxO1 を介した発現調節機構を検討するため、Mrp4 プロモーター領域をクローニングし、ラット肝がん細胞由来の H4IIE 細胞を用いて FoxO1 による活性化を検討するとともに、FoxO1 結合領域を同定し、mutation を入れることでその活性が失われることを確認した。さらにこの領域を用いて CHIP assay を行い、確かに FoxO1 がこの領域に結合することを証明するとともに、EMSA 解析により FoxO1 と complex を形成している分子についても検討を行った。

(II) cAMP による PPAR 発現調節機構の分子メカニズム

肝臓特異的 IRS-1/IRS-2 ダブル欠損マウスの肝臓を用いた網羅的発現解析から、PPAR や FSP27 や CD36 とともに、転写因子 FoxO6 の発現が有意に低下していることを見出した。この FoxO6 は PPAR の発現が高い脂肪肝でその発現が上昇しており、cAMP レベルを上昇させると PPAR と同じようにその発現が上昇した。この結果は cAMP が FoxO6 を介して PPAR の発現を上昇させていることを示唆していた。そこで初代肝細胞を用いて、siRNA や shRNA を用いて FoxO6 の発現をノックダウンした際に cAMP 刺激後に上昇する PPAR の発現が抑制されるか、TG 含量とともに検討した。cAMP-FoxO6-PPAR の経路が確認されたことをふまえ、次に FoxO6 の発現が cAMP によって活性化されることが報告されている PKA や EPAC のどちらの経路によって調節されているのか、PKA 阻害薬/EPAC 抑制薬、PKA や EPAC の siRNA を用いて検討した。さらに肝臓特異的 IRS-1/IRS-2 ダブル欠損マウスの肝臓や上記で使用した cAMP 刺激後の初代肝細胞を用いて RNAseq を行い FoxO6 の転写調節因子の候補分子の絞り込みを行った。候補の転写調節因子について、cAMP 刺激後に上昇し PKA 阻害薬/EPAC 阻害によって FoxO6 の発現が低下するのかどうかについて検討するとともに、この候補分子の siRNA や shRNA を用いて、cAMP 刺激後に上昇する FoxO6 の発現が抑制され、TG 含量が低下するのかどうかについて検討した。同時に、FoxO6 のルシフェラーゼアッセイを行い、転写調節因子のプロモーター領域の結合領域の絞り込み、point mutation によって結合領域の同定を試みた。さらに Chip-qPCR にて転写調節因子と FoxO6 が本当に結合しているのかどうか *in vitro* や *in vivo* にて確認した。また高脂肪食負荷マウスの肝臓で候補分子の発現が上昇しているか、逆に肝臓特異的 IRS-1/IRS-2 ダブル欠損マウスでその発現が低下しているかを確認し、候補分子や FoxO6 を肝臓特異的 IRS-1/IRS-2 ダブル欠損マウスの肝臓に過剰発現させることにより、PPAR の発現が上昇し脂肪肝を呈するかどうかについて検討した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 1.Jinnouchi T, Sakurai Y, Miyoshi K, Koizumi C, Waki H, Kubota N, Yamauchi T.	4. 巻 61
2. 論文標題 A Case of Chronic Intestinal Pseudo-obstruction with Mitochondrial Diseases.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Intern. Med.	6. 最初と最後の頁 469-474
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 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 2.Iwamoto M, Kubota T, Sakurai Y, Wada N, Shioda S, Yamauchi T, Kadowaki T*, Kubota N	4. 巻 10
2. 論文標題 The sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor tofogliflozin suppresses atherosclerosis through glucose lowering in ApoE-deficient mice with streptozotocin-induced diabetes.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmacol. Res. Perspect.	6. 最初と最後の頁 e00971
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 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 3.Igarashi M, Nakagawa-Nagahama Y, Miura M, Kashiwabara K, Yaku K, Sawada M, Sekine R, Fukamizu Y, Sato T, Sakurai T, Sato J, Ino K, Kubota N, Nakagawa T, Kadowaki T & Yamauchi T	4. 巻 8
2. 論文標題 Chronic nicotinamide mononucleotide supplementation elevates blood nicotinamide adenine dinucleotide levels and alters muscle function in healthy older men.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 npj Aging	6. 最初と最後の頁 5
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 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3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 窪田直人
2. 発表標題 2型糖尿病への臨床栄養学の進歩 糖尿病の食事療法 最新の知見も含めて
3. 学会等名 第44回日本臨床栄養学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 窪田直人
2. 発表標題 2型糖尿病の病態と薬物治療
3. 学会等名 第67回日本内科学会信越支部生涯教育講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 窪田直人
2. 発表標題 肥満症の食事療法・栄養指導
3. 学会等名 第43回日本肥満学会
4. 発表年 2022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
---------	---------