

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05975

研究課題名(和文)クロムによるインシュリン抵抗性抑制とエリスロポエチンの関係

研究課題名(英文) Relationship between suppression of insulin resistance by chromium and erythropoietin

研究代表者

西村 和彦 (Kazuhiko, Nishimura)

大阪公立大学・大学院獣医学研究科 ・准教授

研究者番号：30285308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：3価クロム(Cr)はインシュリン抵抗性を改善すること、エリスロポエチン(EPO)も同様の作用が報告されている。EPO産生細胞のHepG2細胞を用いて、Cr添加のインシュリン抵抗性獲得への影響とEPOの関与について解析した。Crはペルオキシソーム増殖因子活性化受容体(PPAR)に依存してHepG2細胞のインシュリン抵抗性獲得を阻害した。CrはEPO産生も促進し、EPOレセプターを介してインシュリン抵抗性獲得の抑制に寄与していた。4週間以上Crを長期投与した場合、CrによるPPARとEPO産生促進効果は持続していた。Crのインシュリン抵抗性獲得の阻害作用は長期間持続すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

3価クロムはサプリメントとして利用されているが、その効果については意見が分かれており、細胞での3価クロムの作用機序の解明も進んでいない現状で、本研究の成果は3価クロムの有用性を示す一助になると考えられる。また、3価クロムを長期処置しても作用が減弱しないことから、インシュリン抵抗性の予防や治療に3価クロムの利用の可能性が見いだされた。

研究成果の概要(英文)：Trivalent chromium (Cr) has been reported to work to improve insulin resistance, and erythropoietin (EPO) has also been reported to have a similar effect. Using HepG2 cells, which are EPO-producing cells, we analyzed the effect of Cr addition on the acquisition of insulin resistance and the involvement of EPO. Addition of Cr inhibited the acquisition of insulin resistance in HepG2 cells depending on peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR). Cr also promoted EPO production and contributed to suppressing the acquisition of insulin resistance via the EPO receptor. When Cr was administered long-term for more than 4 weeks, the promoting effect of Cr on PPAR and EPO production persisted. The inhibitory effect of Cr on the acquisition of insulin resistance was thought to last for a long time.

研究分野：毒性学

キーワード：3価クロム インシュリン抵抗性 エリスロポエチン PPAR

### 1. 研究開始当初の背景

3価クロム (Cr) は哺乳動物において消化管からの吸収が悪くまた体内濃度も低く、必須微量元素であることに関してコンセンサスは得られていない。しかし、細胞には Cr に特異的に結合するクロモジュリンが存在し、何らかの機能を持つと考えられる。実際、Cr は脂肪、筋肉、肝臓でペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR) を活性化させ、インシュリン抵抗性の改善に関わることが報告されている (Tsava et al. J Inorg Biochem. 163:323-331. 2016、Turgut et al. J Int Soc Sports Nutr. 15(1):45. 2018)(図1)。脂肪、筋肉、肝臓等のインシュリン抵抗性の増加は2型糖尿病発症の重要な因子であり、インシュリン抵抗性の抑制は2型糖尿病の予防や治療に重要である。また、人肝がん由来細胞系である HepG2 細胞においてリコンビナントエリスロポエチン (EPO) の投与が PPAR を介してインシュリン抵抗性を減弱させることも報告されている (Ge et al. Sci Rep. 5:17878. 2015)(図1)。

EPO は骨髄での赤血球合成を促進するホルモンであり、主に腎臓で産生され、肝臓、脾臓、血管内皮、神経細胞などでの産生能が知られている。近年、EPO は造血促進だけでなく腎臓をはじめ、神経や心筋など様々な細胞で細胞保護作用を発揮し、ストレス防御効果があることが報告されている (Wu et al. Cytokine 49, 155-

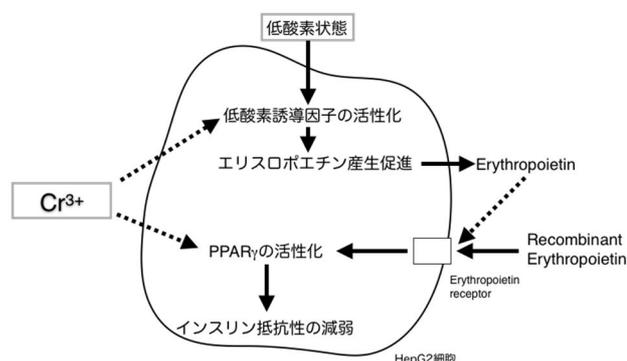


図1 3価クロムによるエリスロポエチン産生の促進とインシュリン抵抗性の減弱

162. 2010, Shiou et al. J Biol Chem. 286, 12123-32. 2011)。申請者は、種々の金属の EPO 産生への影響を調べる中で、HepG2 細胞において Cr の添加が EPO 産生を促進することを見いだした。しかしその作用機序については不明である (図1)。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は HepG2 細胞を用いて、Cr 投与によりインシュリン抵抗性の抑制が起こることを確認し、Cr による EPO 産生促進がインシュリン抵抗性の抑制に関与しているか、関与する場合どのような機序なのか明らかにすることである。さらに、Cr が直接 PPAR を活性化および EPO 産生の促進を介してインシュリン抵抗性を減弱させるならば、インシュリン抵抗性の抑制について相加的、相乗的な効果が期待できるか解析を進める。

### 3. 研究の方法

(1) 培養: EPO 産生細胞として、ヒト肝ガン由来 HepG2 細胞を用いた。DMEM supplemented with 0.5 μM パルミチン酸 Na に 1% fatty acid-free BSA を加えた培地をインシュリン抵抗性誘導に用いた。対照には 1% fatty acid-free BSA を含む DMEM 培地を用いた。2 × 10<sup>5</sup> cells / ml の HepG2 細胞に各試薬を添加し、インシュリン抵抗性誘導培地あるいは対照培地で 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 24 時間培養し、細胞を回収した。また、培養 24 時間後に Insulin を添加し、6 時間後に細胞を回収し、インシュリン抵抗性の誘導を評価した。siEPO, siEPO receptor (EPOR), および negative control siRNA は Lipofectamine RNAiMAX Reagent を

各試薬の添加の72時間前に細胞に取り込ませた。

また、Cr長期処置はHepG2細胞を各濃度のCrを添加したDMEM培地で8週間継代培養し、 $2 \times 10^5$  cells / ml で調整し、24時間後に各試薬を添加し、更に24時間後に細胞を回収した。

(2) mRNAの測定: Real-time RT-PCRを用いてmRNA発現量を測定した。各値はGAPDH mRNA発現量を内部標準として相対値を算出した。

(3)タンパク量の測定: Western blottingにより評価した。

#### 4. 研究成果

### (1) CrはEPO産生を介してインシュリン抵抗性を減弱させるか

#### 1-1 Cr添加によるEPO産生の促進

HepG2細胞においてCrを種々の濃度で添加すると、100  $\mu$ Mまで、EPO mRNA発現量は濃度依存的に増加し、更に濃度を上げると低下した(図2)。また、PPARの阻害剤SR202を同時に添加するとCrの効果は消失した。HIF-1タンパク量、EPOタンパク量もmRNA発現と同様の変化をしており、Cr添加によってEPO産生がPPAR、HIF-1を介して増加することが示唆された。

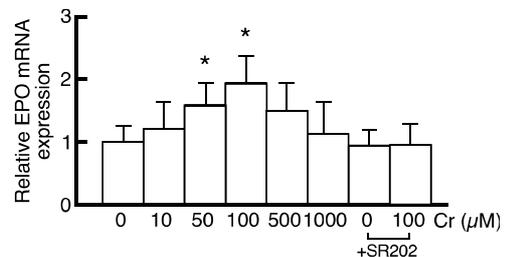


図2 Crの24時間処置によるEPO mRNA発現量の変化。カラムは平均+ S.D. (n = 4)。\*は0  $\mu$ M Cr(無処置)に対する有意差を示す(p < 0.05)。

#### 1-2 Cr添加によるインシュリン抵抗性獲得の阻害

インシュリン抵抗性獲得は、glucose-6-phosphatase(G-6-Pase)およびphosphoenolpyruvate carboxykinase(PEPCK)のmRNA発現量、およびセリン-トレオニンキナーゼAktのリン酸化タンパク(p-Akt)量の増加を指標とした。インシュリン添加によってこれらの指標が増加すれば、インシュリンに対して応答したと判断し、応答性の低下を抵抗性獲得と判断した。

インシュリン抵抗性誘導時に、EPO産生促進効果のあった100  $\mu$ M Crを添加するとG-6-Pase mRNA発現量の増加が抑制され、その後のインシュリン添加において、クロム無処置ではインシュリンによる増加が認められない一方で、Cr添加ではインシュリンによりG-6-Pase mRNA発現量は増加し、インシュリン抵抗性の獲得が阻害されることが示された(図3)。さらにSR202をCrと同時に添加すると、Crによるインシュリン抵抗性獲得阻害が抑制された。また、PEPCK mRNAおよびp-Aktタンパク量においても同様の結果が得られた。これらの結果から、CrはPPARを介してインシュリン抵抗性の獲得を阻害することが示唆された。

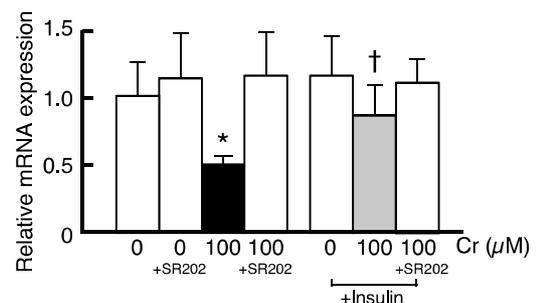


図3 インシュリン抵抗性誘導時におけるCr処置によるG-6-Pase mRNA発現量の変化。カラムは平均+ S.D. (n = 4)。\*は0  $\mu$ M Cr(無処置)に対する有意差を示す(p < 0.05)。†はインシュリン無添加に対する有意差を示す(p < 0.05)。

#### 1-3 CrによるEPO産生促進がインシュリン抵抗性獲得に及ぼす影響

Cr添加によるEPO産生促進がインシュリン抵抗性獲得阻害に関与しているか調べるために、前もってEPOのsi-RNA(siEPO)を処置したHepG2細胞を用いてインシュリン抵抗性誘導を行い、インシュリン抵抗性の獲得を評価した。通常のHepG2細胞において、インシュリン抵抗性誘導時においてもCrの添加はEPO mRNA発現量を増加させ、PPAR阻害によりその効果は抑制さ

れた。si-EPO 処置に寄ってインシュリン抵抗性誘導の有無に関わらず、EPO mRNA 発現量の増加は抑制された。

si-EPO 処置した HepG2 細胞において、Cr 添加によるインシュリン抵抗性獲得阻害の効果は有意に減弱し、産生された EPO がインシュリン抵抗性獲得阻害に関わっていることが示唆された(図3)。また、EPOR の si-RNA (siEPOR) の処置によっても同様の結果が得られたため、Cr 添加によって HepG2 細胞で産生された EPO が HepG2 細胞の EPO レセプターに作用することでインシュリン抵抗性獲得の阻害に関与していたことが示唆された。

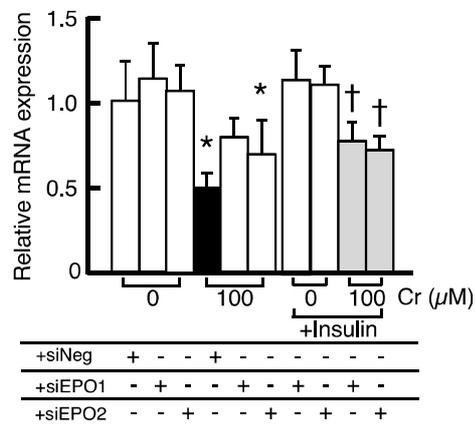


図3 si-EPO 処置がインシュリン抵抗性誘導時の Cr 処置による G-6-Pase mRNA 発現量への影響 si-EPO は2種類用いた。カラムは平均+ S.D. (n = 4)。\*は0 μM Cr(無処置)に対する有意差を示す(p < 0.05)。†はインシュリン無添加に対する有意差を示す(p < 0.05)。

## (2) Cr 添加時の PPAR と HIF の相互作用

HIF-1 阻害剤(PX478)およびAkt 阻害剤(AktI)の添加はCrによるEPO mRNA 発現量の増加を阻害した(図4)また、どちらの阻害剤もCr添加によるPPAR mRNA 発現の増加を抑制した(図4)。したがって、Cr添加によるHIF-1の増加はPPARの増加を促す、ポジティブフィードバックがあると考えられた。一方で、Cr添加によるPPARの増加はHIF-1を増加させるため、PPAR とHIF-1には互いに相手を増加させる作用があると考えられた。

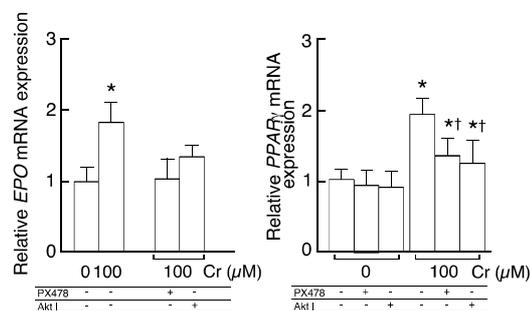


図4 Cr 処置による各 mRNA 発現量への阻害剤の影響 PX478,AktI の存在下で Cr を 24 時間処置した時の各 mRNA 発現量を示す。カラムは平均+ S.D. (n = 4)。\*は0 μM Cr(無処置)に対する有意差を示す(p < 0.05)。†は阻害剤無添加に対する有意差を示す(p < 0.05)。

## (3) Cr の長期処置が HepG2 細胞に及ぼす影響

### 3-1 Cr の長期処置の EPO 産生への影響

Cr はサプリメントとして長期間摂取されることがあるが、その効果については見解が一致しておらず、長期間曝露の影響についての解明は進んでいない。また、EPO には赤血球産生の促進以外に、細胞保護作用を始め様々な作用が報告されている。HepG2 細胞において Cr の 24 時間処置によって PPAR が増加し、EPO 産生が促進したが、長期的な Cr の EPO 産生への影響は明らかではない。そこで継代しながら Cr を 4 週間以上処置した HepG2 細胞において、PPAR や EPO 産生への影響を解析した。

Cr 処置によって 8 週まで PPAR および EPO mRNA 発現量は有意に高く維持された。図5はCr処置4週目での各 mRNA 発現量を示している。Cr 処置 4 週目における低酸素状態やコバルト添加による EPO 産生刺激に対する EPO mRNA 発現の増加量は無処置に比べて低下したものの、発現量自体は通常細胞を刺激した場合と差はなかったが、EPO 産生刺激に対する応答も持続していることが示唆された。

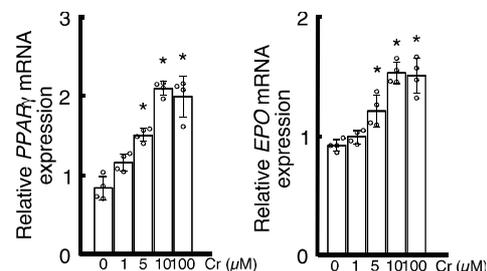


図5 Cr の 4 週間処置における各 mRNA 発現量の変化 カラムは平均+ S.D. (n = 4)。は各値を示す。\*は0 μM Cr(無処置)に対する有意差を示す(p < 0.05)。

### 3-2 Cr の長期処置時の EPO 産生における sirtuin-1 の関与

細胞保護に関わる調節因子である sirtuin-1 (SIRT-1) は PPAR や HIF の相互作用が報告されており、EPO 産生に影響する報告もある。Cr の長期処置により、SIRT-1 mRNA 発現量は減少し、PPAR 阻害剤の SR202 でその効果が消失したこと (図 6) から、Cr は PPAR を介して SIRT-

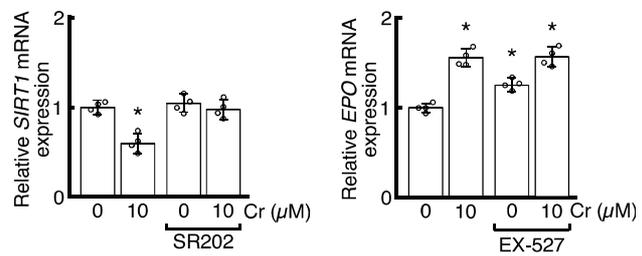


図 6 Cr の 4 週間処置における阻害剤の各 mRNA 発現量への影響。カラムは平均± S.D. (n = 4)。は各値を示す。\* は 0 μM Cr (無処置) に対する有意差を示す (p < 0.05)。

1 産生を抑制することが示唆された。また、EX527 により SIRT-1 を阻害すると Cr 無処置における EPO mRNA 発現量は増加したが、Cr 長期処置では差がなかった (図 6)。これらの結果から、Cr 処置は PPAR を介して、SIRT-1 を抑制し、SIRT-1 の抑制が HIF-1 の増加につながり、EPO 産生が促進していると考えられた。

#### (4) 総括

これまでの報告と本研究の成果を模式図にまとめたのが図 7 となる。Cr は PPAR と Akt を活性化させ、直接的にインシュリン抵抗性獲得の阻害に働いている。加えて、HIF の活性化を通じた EPO 産生の増加は EPOR を介して作用し、Akt を活性化し、インシュリン抵抗性獲得の阻害に寄与すると考えられた。また、PPAR と HIF の間には相互作用が認められ、本研究においては相互に促進するポジティブフィードバックがあると考えられた。

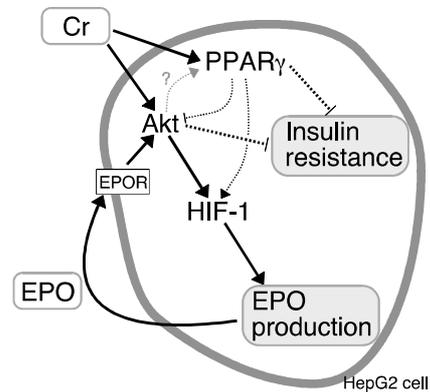


図 7 Cr によるインシュリン抵抗性の阻害と EPO 産生促進の機序

#### 引用文献

図に関しては次の論文より引用、修正している。

Effect of trivalent chromium on erythropoietin production and the prevention of insulin resistance in HepG2 cells. Arch Biochem Biophys. 2021 Sep 15;708:108960. doi: 10.1016/j.abb.2021.108960.

Effect of long-term treatment with trivalent chromium on erythropoietin production in HepG2 cells. Nishimura K, Iitaka S, Sakaki T, Tsuji K, Yoshimoto A, Haque MA, Nakagawa H. Arch Biochem Biophys. 2024 Feb;752:109872. doi: 10.1016/j.abb.2023.109872.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 0件）

1. 著者名 Nishimura Kazuhiko, Iitaka Suzuka, Nakagawa Hiroshi	4. 巻 708
2. 論文標題 Effect of trivalent chromium on erythropoietin production and the prevention of insulin resistance in HepG2 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 108960 ~ 108960
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2021.108960	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 Nishimura Kazuhiko, Iitaka Suzuka, Sakaki Takuya, Tsuji Keigo, Yoshimoto Akari, Haque Md Anamul, Nakagawa Hiroshi	4. 巻 752
2. 論文標題 Effect of long-term treatment with trivalent chromium on erythropoietin production in HepG2 cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 109872 ~ 109872
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2023.109872	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 -

〔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 西村和彦、吉本あかり、Md. Anamul Haque、中川博史
2. 発表標題 3価クロムの長期処置がHepG2細胞のエリスロポエチン産生に及ぼす影響
3. 学会等名 第167回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Kazuhiko Nishimura, Akari Yoshimoto, Md. Anamul Haque, Hiroshi Nakagawa
2. 発表標題 Effect of long-term treatment of trivalent chromium on PPAR and erythropoietin production in HepG2 cells
3. 学会等名 第50回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西村和彦, 飯高 涼, Md. Anamul Haque、中川博史
2. 発表標題 HepG2細胞における3価クロムによるエリスロポエチン産生調節とPPAR の関係
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村和彦、飯高涼、中川博史
2. 発表標題 HepG2細胞におけるエリスロポエチン産生の3価クロムによる調節とインシュリン抵抗性獲得の阻害
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
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
---------	---------