

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08524

研究課題名（和文）非アルコール性脂肪肝と肝糖代謝制御を標的としたFDXRによる鉄代謝調節機構の役割

研究課題名（英文）Role of FDXR in Iron Metabolism and Glucose Metabolism in Liver

研究代表者

佐久間 一基（Sakuma, Ikki）

千葉大学・大学院医学研究院・特任准教授

研究者番号：70791721

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）：非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）は、肝臓関連死亡率の上昇を伴うNAFLDの病型の1つで、NAFLD患者の約30%に発症するが、NASHは現在承認されている直接的治療法がなく、病態メカニズムに基づく治療法開発が希求されている。本研究では、「ミトコンドリアの鉄代謝調節分子FDXRのNASHの病態進展、肝臓糖代謝制御における役割を解明することを目的とした。本研究の結果から、FDXRノックダウンは、肝臓への鉄・中性脂肪蓄積、酸化ストレス亢進、ミトコンドリア機能酸素消費の低下を引き起こし、インスリン抵抗性/耐糖能の悪化を惹起することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国のNAFLDの有病率は約30%と増加傾向で、肝病態の進展とともに発癌リスクは上昇し、NASHでは約5/1000人・年とされている。新規NASH治療薬の開発は、肝臓がん発症の抑制という社会的、経済的なメリットが期待できる。本研究では、FDXRノックダウンは、肝臓への鉄・中性脂肪蓄積、酸化ストレス亢進、ミトコンドリア機能酸素消費の低下を引き起こし、インスリン抵抗性/耐糖能の悪化を惹起することが示唆された。本研究の成果が、新規NAFLD治療薬・糖尿病治療薬への臨床応用に展開するための基盤になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is aggressive phenotype of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) that is linked to a higher risk of liver-related death. It affects about 30% of NAFLD patients. However, there is currently no officially approved treatment specifically for NASH. Developing treatments based on the underlying disease mechanisms is required. The objective of this work was to investigate the involvement of FDXR, a regulator of mitochondrial iron metabolism, in the regulation of glucose metabolism in the liver and NASH development. The findings of this study indicate that FDXR knockdown in liver leads to the buildup of iron and triglycerides in the liver, heightened oxidative stress, and reduced mitochondrial oxygen consumption, resulting in insulin resistance and glucose intolerance.

研究分野：内分泌代謝、非アルコール性脂肪性肝疾患

キーワード：鉄代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肥満及びメタボリックシンドロームの増加に伴い、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の有病率が上昇 (6~37%) している。特に、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は、肝臓関連死亡率の上昇を伴う NAFLD の病型の 1 つで、NAFLD 患者の約 30% に発症するが、NASH は現在承認されている直接的治療法がなく、病態メカニズムに基づく治療法開発が希求されている。一方で、肝臓は生体内で最も多くの貯蔵鉄を有する臓器である。鉄は生体内において、ヘム・鉄硫黄クラスターとして多彩な細胞生理機能を担い、ミトコンドリアは鉄利用オルガネラとして、鉄硫黄クラスターの合成を担う。エンドソームからミトコンドリアに放出される Fe^{2+} が、エンドソーム-ミトコンドリア間のクロストークを制御していることが報告された (*Cell* 180 214-216, 2020)。過剰な Fe^{2+} はフリーラジカルの産生源となり細胞傷害性に作用する。NAFLD 患者の約 30% に肝鉄過剰蓄積を認め (*J Hepatol* 55 920-32 2011)、動物実験では鉄負荷が肝糖新生を惹起し、そのメカニズムとして酸化ストレス増大によるミトコンドリア傷害が示唆されている (*J Nutr Biochem.* 26 1414-23 2015)。従って、ミトコンドリア鉄代謝による肝糖代謝への影響を標的としたメカニズム研究は、肝臓におけるインスリン抵抗性の新たな制御機構の解明とそれに基づく治療法開発につながる可能性を着想した。

2. 研究の目的

申請者はこれまでにミトコンドリアでのヘム・鉄硫黄クラスター合成に作用する ferredoxin reductase (FDXR) に着目して、研究を推進してきた。ミトコンドリア複合体における鉄代謝調節やその制御メカニズムは不明な部分が残されており、特に、ヘム・鉄硫黄クラスター合成に作用する FDXR の NAFLD や糖尿病病態や肝インスリン抵抗性との関わりなど、十分に明らかにされていない。そこで、本研究の目的は、「ミトコンドリアの鉄代謝調節分子 FDXR の肝臓糖代謝制御における役割は何か? 肝細胞の鉄代謝 インスリン標的臓器 (肝臓) 糖代謝調節 (病態) にどのようなメカニズムで作用するのか?」を掲げた。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* 解析による FDXR によるミトコンドリア機能制御と鉄代謝制御の解析

肝がん細胞株 HepG2 細胞において、siRNA による FDXR ノックダウン、アデノウイルスによる FDXR 過剰発現をそれぞれ行い、細胞外フラックスアナライザーによるミトコンドリア酸素消費量の測定を行った。加えて、肝がん細胞株 HepG2 細胞において、siRNA による FDXR ノックダウンを行い、Mito-FerroGreen Assay を用いたミトコンドリア鉄量測定と CM-H2DCFDA を用いた活性酸素の測定をそれぞれ行った。

(2) 通常食下での肝臓特異的 Fdxr ノックダウンマウスの解析

生体での FDXR の意義を明らかにする目的で、GalNAC 修飾したアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) による肝臓特異的 Fdxr ノックダウンマウスを樹立し、ブドウ糖負荷試験、肝臓鉄量、ヘム量、ミトコンドリア OXPHOS の蛋白発現の評価を行った。

(3) コリン欠乏高脂肪食負荷における肝臓特異的 Fdxr ノックダウンマウスの解析

NASH 病態モデルであるコリン欠乏高脂肪食を肝臓特異的 Fdxr ノックダウンマウスとコ

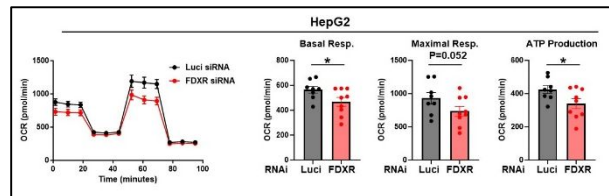
ントロールマウスにそれぞれ 1 週間負荷を行い、肝臓中性脂肪量、酸化ストレス (TBARS) の測定を行った。加えて、肝臓組織を用いたプロテオーム解析を行い、蛋白の網羅的発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) *in vitro* 解析による FDXR によるミトコンドリア機能制御と鉄代謝制御の解析

HepG2 細胞での FDXR ノックダウンにより、コントロール群とくらべて酸素消費量の低下を認めた。逆に、FDXR 過剰発現で、酸素消費と ATP 産生の増加を認めた。以上より、HepG2 細胞において、FDXR はミトコンドリアにおいて酸素消費と ATP 産生作用を持つことが示された。

図 1 FDXR ノックダウンによるミトコンドリア酸素消費量低下

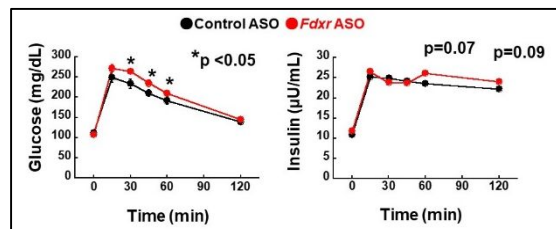


FDXR ノックダウンでは、コントロール群とくらべてミトコンドリア鉄量の上昇と活性酸素の上昇をそれぞれ認めた。以上より、HepG2 細胞において、FDXR はミトコンドリア鉄量と酸化ストレスの制御作用を持つことが示された。

(2) 通常食下での肝臓特異的 Fdxr ノックダウンマウスの解析

肝臓特異的 Fdxr ノックダウンマウスは、ブドウ糖負荷試験で、耐糖能の軽度悪化とインスリンの軽度上昇を認め、インスリン抵抗性が示唆された。肝臓特異的 Fdxr ノックダウンマウスの肝臓では、コントロールマウスと比べて鉄蓄積を認める一方で、ヘム量の低下を認めた。ミトコンドリア OXPHOS の蛋白発現において、コンプレックス (NDUFB8) とコンプレックス (SDHB) の発現低下を認め、生体の肝臓において Fdxr ノックダウンがミトコンドリア機能酸素消費を低下させることが示唆された。

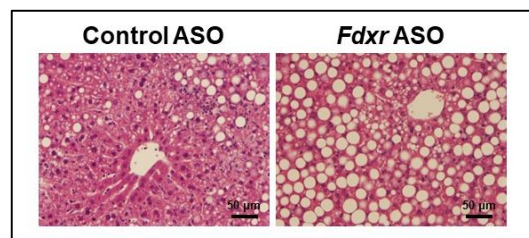
図 2 Fdxr ノックダウンマウスのブドウ糖負荷試験



(3) コリン欠乏高脂肪食負荷における肝臓特異的 Fdxr ノックダウンマウスの解析

NASH 病態モデルであるコリン欠乏高脂肪食を肝臓特異的 Fdxr ノックダウンマウスとコントロールマウスにそれぞれ負荷すると、コントロールマウスと比べて肝臓特異的 Fdxr ノックダウンマウスでは、肝臓脂肪の蓄積、酸化ストレス (TBARS) の亢進を認めた。肝臓組織を用いたプロテオーム解析で、肝臓特異的 Fdxr ノックダウンマウスでは、コントロールマウスと比べて、鉄代謝調節分子 IRP2 の発現上昇、細胞内鉄取り込みトランスポーター (TFRC) の発現上昇、細胞内鉄排出トランスポーター (FPN) の発現低下を認めた。これらの発現プロファイルは、Fdxr ノックダウンマウスの肝臓において鉄蓄積に作用する知見である。

図 3 Fdxr ノックダウンマウスによる肝臓脂肪の蓄積



本研究の結果から、FDXR ノックダウンは、肝臓への鉄・中性脂肪蓄積、酸化ストレス亢進、

ミトコンドリア機能酸素消費の低下を引き起こし、インスリン抵抗性/耐糖能の悪化を惹起することが示唆された。

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 2件）

1. 著者名 Aersilan Alimasi, Hashimoto Naoko, Yamagata Kazuyuki, Yokoyama Masataka, Nakayama Akitoshi, Shi Xiaoyan, Nagano Hidekazu, Sakuma Ikki, Nohata Nijiro, Kinoshita Takashi, Seki Naohiko, Rahmutulla Bahityar, Kaneda Atsushi, Zhahara Siti Nurul, Gong Yingbo, Nishimura Motoi, Kawauchi Shoichiro, Kawakami Eiryu, Tanaka Tomoaki	4. 巻 12
2. 論文標題 MicroRNA-874 targets phosphomevalonate kinase and inhibits cancer cell growth via the mevalonate pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18443
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-23205-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 -

1. 著者名 Fujimoto Masanori, Yokoyama Masataka, Kiuchi Masahiro, Hosokawa Hiroyuki, Nakayama Akitoshi, Hashimoto Naoko, Sakuma Ikki, Nagano Hidekazu, Yamagata Kazuyuki, Kudo Fujimi, Manabe Ichiro, Lee Eunyong, Hatano Ryo, Onodera Atsushi, Hirahara Kiyoshi, Yokote Koutaro, Miki Takashi, Nakayama Toshinori, Tanaka Tomoaki	4. 巻 13
2. 論文標題 Liver group 2 innate lymphoid cells regulate blood glucose levels through IL-13 signaling and suppression of gluconeogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5408
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-33171-6	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 Yamamoto Tetsuya, Sakurai Kenichi, Watanabe Masahiro, Sakuma Ikki, Kanahara Nobuhisa, Shiina Akihiro, Hasegawa Tadashi, Watanabe Hiroyuki, Iyo Masaomi, Ishibashi Ryoichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Cyclothymic Temperament is Associated with Poor Medication Adherence and Disordered Eating in Type 2 Diabetes Patients: A Case Control Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diabetes Therapy	6. 最初と最後の頁 2611-2624
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13300-021-01121-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 -

〔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 瀧 由樹, 河野 貴史, 照山 杏子, 一城 貴政, 河野 聡美, 高 躍, 藤本 真徳, 橋本直子, 佐久間一基, 永野秀和, 田中知明
2. 発表標題 アルドステロン症スクリーニングにおける測定法の違いとその影響
3. 学会等名 第32回臨床内分泌代謝update
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 瀧 由樹, 河野 貴史, 照山 杏子, 一城 貴政, 河野 聡美, 高 躍, 藤本 真徳, 橋本直子, 佐久間一基, 永野秀和, 田中知明
2. 発表標題 アルドステロン症スクリーニング検査における測定法の違いとその影響に関する検討
3. 学会等名 第23回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河野聡美, 村田和貴, 藤本真徳, 中山哲俊, 樋口誠一郎, 橋本直子, 佐久間一基, 永野秀和, 田中知明
2. 発表標題 シングルセル解析から捉えた副腎性クッシング症候群の分子病態
3. 学会等名 第31回臨床内分泌代謝Update
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋本直子, 河野聡美, 河野貴史, 樋口誠一郎, 佐久間一基, 永野秀和, 田中知明
2. 発表標題 クッシング症候群5例におけるオシロドロスタットの有用性の検討
3. 学会等名 第31回臨床内分泌代謝Update2021
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
研究分担者	田中 知明 (Tanaka Tomoaki) (50447299)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	

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
---------	---------