

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17790

研究課題名（和文）脂肪酸合成酵素欠損マウスを用いた果糖過剰摂取による代謝障害の分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism of excessive fructose intake-induced metabolic disorders using fatty acid synthase-deficient mice

研究代表者

松川 隼也（Matsukawa, Toshiya）

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：00817653

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、脂肪酸の新規合成の中心的な役割を担う、脂肪酸合成酵素(FAS)の高シヨ糖高脂肪食(HSHF食)誘発性の肥満・2型糖尿病に対する役割を評価した。慢性的な肝臓特異的FAS欠損マウスを作製し、HSHF食で飼育したところ、FASの欠損によりHSHF食によって惹起されるインスリン抵抗性や脂肪肝、肝障害は改善した。この時、肝臓や骨格筋などのインスリンシグナルの亢進が認められた。さらに、タモキシフェン誘導性肝臓特異的FAS欠損マウスを用いた検討から、病態形成後にFASを欠損させてもインスリン抵抗性や脂肪肝は改善したので、亜急性のFAS欠損による治療効果が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フルクトースの過剰摂取によって引き起こされるインスリン抵抗性や脂肪肝などを症状とする脂肪肝合併2型糖尿病は脂肪酸合成酵素の阻害で治療・改善できることから、脂肪酸合成酵素の抑制は近年我が国で増加にある欧米型肥満に対する治療標的となる可能性を示している。

研究成果の概要（英文）：In this study, we evaluated the role of fatty acid synthase (FAS), which plays a central role in de novo lipogenesis, in high sucrose high fat diet (HSHF diet)-induced obesity and type 2 diabetes. Firstly, we generated liver-specific FAS-deficient mice. Mice were fed with the HSHF diet to induce obesity and type 2 diabetes. In the results, the insulin resistance, fatty liver, and liver damage induced by the HSHF diet were ameliorated by the FAS deficiency. At this time, the insulin signaling in the liver and skeletal muscle were enhanced. Furthermore, tamoxifen-induced liver-specific FAS-deficient mice showed that insulin resistance and fatty liver improved when FAS was deficient after pathogenesis, indicating a therapeutic effect of subacute FAS deficiency. These results indicate that inhibition of FAS may be a potential therapeutic target for the treatment of Western-style obesity, which has been on the rise in Japan in recent years.

研究分野：栄養生理学

キーワード：フルクトース 肝臓 2型糖尿病 非アルコール性脂肪性肝疾患 インスリン抵抗性 脂肪酸合成酵素シグナル伝達 Western diet

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

哺乳類は生命活動に必要なエネルギー源である ATP を産生するために、摂食により栄養素を取り込み、それらを代謝している。ヒトにおいて代謝の対象となる栄養素のうち、ブドウ糖(グルコース)や果糖(フルクトース)などからなる炭水化物(糖質)は脂質やタンパク質に比べその摂取量が多い。ショ糖(スクロース)はグルコースとフルクトースから成る2糖類であり、グルコースよりも甘味が強く、フルクトースと共に果物、菓子、清涼飲料水に多く含まれている。近年、こうした食品の取り過ぎによるフルクトースの摂取過多(欧米型の食事: Western diet)が、肥満、2型糖尿病、メタボリックシンドロームの発症リスクを増大させること、これらの疾患の罹患者の増加と相関することが報告されている(Lusting HE et al. Nature 2012)。肝臓においてフルクトースは解糖系の律速段階を通らずに代謝されるため、過剰摂取されると脂肪酸の新規合成(de novo lipogenesis, DNL)により中性脂肪が合成されるため脂肪肝が、また蓄積したジアシルグリセロールなどの脂質によりインスリン抵抗性が惹起されるため、脂肪肝合併 2 型糖尿病が引き起こされる(Bettina GF et al, J Hepatol, 2021)。そのため、これらの代謝障害の抑制は本病態の治療・予防に有効であると考えられる。

脂肪酸合成酵素 (Fatty acid synthase: FAS)は、マロニル CoA とアセチル CoA からパルミチン酸を合成する DNL の中心的酵素であり、その肝臓における発現は、高ショ糖高脂肪食の給餌下や肥満・2 型糖尿病モデルマウス(図 1)ならびに NAFLD や 2 型糖尿病の患者で増加している。こうしたことから肝臓の FAS の機能を明らかにすることは肝臓インスリン抵抗性・脂肪肝に対する病因的役割の解明や治療法の確立に有効であると考えられている。

2005 年に Chakravarthy らは、脂肪を含まない食餌で飼育したマウスにおいて肝臓の FAS を欠損させると、脂肪肝は悪化し、血糖値が低下するとの報告している

(Chakravarthy MV et al, Cell Metab, 2005)。また、我々の先行研究では、レプチン欠損による糖質の過食モデルにおいて肝臓において FAS を欠損させると DNL の抑制により脂肪肝が、糖新生の抑制により糖尿病が改善することを発見している(Matsukawa T et al., JCI insight, 2023)。しかしながら、どちらのモデルもフルクトースの摂取過多のモデルではなく、近年、我が国で増加にある欧米型肥満の病態を反映しているとは言い難い。

これらのことから、脂肪肝や現代の日本人の食生活に即した Western diet (高ショ糖高脂肪食: HSHF)を用いて、フルクトースの過剰摂取による肥満に合併した脂肪肝と 2 型糖尿病において、肝細胞の FAS が果たす役割を明らかにする必要があると考えられた。

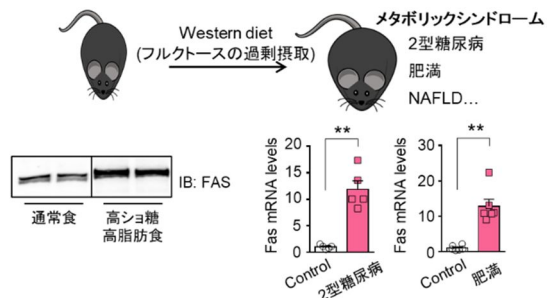


図1. FASの発現量は肥満や2型糖尿病、Western dietの給餌による脂肪肝や耐糖能が改善する

2. 研究の目的

本研究では、フルクトースの過剰摂取による肥満に合併した脂肪肝と 2 型糖尿病において、肝細胞の FAS が果たす病態生理学的役割を、肝細胞特異的 FAS 欠損マウスならびに初代培養 FAS 欠損肝細胞を用いた生化学的、分子生物学的解析から明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究の目的はフルクトースによる肝臓インスリン抵抗性・2 型糖尿病・脂肪肝の発症における FAS の役割を、その肝臓特異的欠損マウス及び、欠損初代培養肝細胞における生化学的、分子生物学的解析から明らかにすることである。本研究では以下の 2 点に着目し、解析を行った。

HSHF 食誘導性の代謝障害における肝細胞の FAS 欠損の影響とそのメカニズム解析

Albumin-Cre-loxP システムを用いて作製した慢性的な肝臓特異的 FAS 欠損マウスを HSHF 食にて飼育し、肝臓の FAS の欠損が生体にどのような代謝変化をもたらすのかを評価した。体重、血糖値、インスリン値、血中および肝臓中のコレステロール、中性脂肪、グリコーゲンレベルなどの代謝パラメーターの測定、各種代謝試験などにより耐糖能、インスリン抵抗性等への影響の評価を行なった。合わせて、過食、肥満、2 型糖尿病・NAFLD を呈する全身性にメラノコルチン 4 型受容体 (Mc4r)を欠損する Mc4R 欠損の遺伝的背景を導入したマウス(全身性 Mc4r 欠損肝臓特異的 FAS 欠損マウス)においても同様の解析を行った。肝臓中のメタボローム解析や DNL、脂肪酸酸化に関与する酵素やシグナル分子などの発現を Immunoblotting や Real-Time PCR にて評価することで詳細の作用機序の検討を行なった。

HSHF 食誘導性の代謝障害における肝細胞の FAS 欠損の治療効果の検討

HSHF 食飼育により肥満、インスリン抵抗性、2 型糖尿病、NAFLD の病態が完成したマウスにおいて肝細胞の FAS を欠損させ、その治療効果を検証した。具体的には、Albumin-Cre-ERT2-loxP システムにより作製したタモキシフェン誘導性肝臓特異的 FAS 欠損マウスを薬剤非投与下にて HSHF 食飼育し、上記病態が完成した時点でタモキシフェンを投与により FAS 欠損を誘導し、病態への影響を解析し、治療効果の検討を行なった。

4. 研究成果

HSHF 食誘導性の代謝障害における肝細胞の FAS 欠損の影響とそのメカニズム解析

Albumin-Cre-loxP システムを用いて作製した慢性的な肝臓特異的 FAS 欠損マウスを HSHF 食にて飼育し、肝臓の FAS の欠損が生体にどのような代謝変化をもたらすのかを評価した。体重や血糖値、血中の TG やコレステロール値には影響を与えなかった。一方で、脂肪肝の抑制、インスリン抵抗性や耐糖能異常の改善が認められた(図 2)。さらに、ピルビン酸を基質とした糖新生の抑制も認められ、この結果は肝臓特異的 FAS 欠損マウスより単離した初代培養肝細胞を用いた検討でも同様であった(図 3)。

詳細な作用機序を明らかにするために代謝に関わる遺伝子の発現量を Real-Time PCR で定量した。脂肪酸酸化や糖新生に関連した遺伝子の発現量には変化が認められなかったが、DNL に関わる SCD (Steroyl-CoA Desaturase), Elvol6 (Elongation of Very Long Chain Fatty Acids) などの発現量は増加していた。増加していた遺伝子の多くが転写因子 ChREBP (Carbohydrate Responsive Element-Binding Protein) の標的遺伝子であったことから、肝臓で FAS が欠損したことでフルクトースの代謝過程において何らかの代謝産物が増加あるいは減少し、ChREBP を介した遺伝子転写が亢進する可能性が想定された。そこで、肝臓中のメタボローム解析を実施したが顕著な変化は認められなかった。一方で、Western blotting などから肝臓特異的 FAS 欠損マウスでは肝臓のみならず骨格筋や白色脂肪組織におけるインスリンシグナルの亢進が認められた。2020 年に Lyu らはジアシルグリセロールの組成が変化することで、PKC ϵ が細胞膜に移行しインスリンシグナルが障害されることを報告しているが(Lyu K et al., Cell Metab, 2020)、肝臓特異的 FAS 欠損マウスでは細胞膜の PKC ϵ の量は変化しておらずジアシルグリセロールの組成の変化がインスリンシグナル亢進の原因ではないことが示された(図 4)。

また、過食、肥満、2 型糖尿病・NAFLD を呈する全身性にメラノコルチン 4 型受容体 (Mc4r) を欠損する Mc4R 欠損の遺伝的背景を導入したマウス(全身性 Mc4r 欠損肝臓特異的 FAS 欠損マウス)においても検討を行なったところ、慢性的な肝臓特異的 FAS 欠損マウスと同様に脂肪肝や耐糖能異常の改善が認められた。

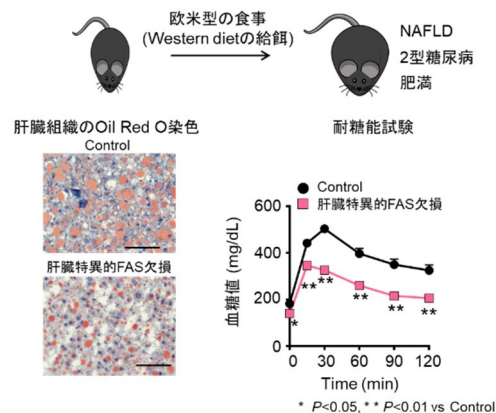


図2. 肝臓特異的FASの欠損により、Western dietの給餌による脂肪肝や耐糖能が改善する

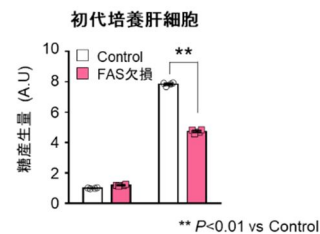


図3. 肝臓特異的FAS欠損マウス由来の初代培養肝細胞では糖産生が抑制される

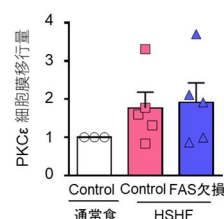


図4. HSHFの給餌によるPKC ϵ 細胞膜移行量は肝臓特異的FASの欠損で変化しない

HSHF 食誘導性の代謝障害における肝細胞の FAS 欠損の治療効果の検討

慢性的な肝臓特異的 FAS 欠損マウスを用いた検討から、肝臓の FAS の抑制は HSHF 誘導性の 2 型糖尿病・NAFLD の改善に対して有効である可能性が示された。そこで、Albumin-Cre-ERT2-loxP システムにより作製したタモキシフェン誘導性肝臓特異的 FAS 欠損マウスを薬剤非投与下にて HSHF 食飼育し、病態が完成した時点でタモキシフェンを投与することで FAS 欠損を誘導(亜急性 FAS 欠損)することで、急性な肝臓の FAS 欠損による治療効果を検証した。その結果、亜急性の FAS 欠損においても耐糖能やインスリン抵抗性の改善が認められた。一方で、糖新生や NAFLD の抑制は認められなかった。

本研究結果をまとめると、DNL の中心的な役割を担う酵素である FAS を肝臓特異的に欠損させると HSHF 誘導性の肥満に伴う糖尿病や NAFLD が改善することが認められた。その作用機序としてインスリンシグナルの亢進が関与することが明らかとなった。肝臓特異的 FAS 欠損によるインスリン抵抗性の改善効果については、これまでに報告はなく新しい発見である。2005 年の Chakravarthy らは、脂肪を含まない非肥満モデルで検討していること(Chakravarthy MV et al, Cell Metab, 2005)。また、我々の先行研究では、フルクトースではなく糖質(グルコース)の過食モ

デルにおいて検討しており(Matsukawa T et al., JCI insight, 2023)、いずれの実験系もエサによるフルクトースの寄与度が小さい。フルクトースはグルコースよりも DNL を亢進するため、HSHF 誘導性の実験モデルでは肥満形成時における FAS の貢献度が大きくなったことで、今回のインスリン抵抗性の改善という新しい結果が得られたと考えられる。しかし、肝臓特異的に FAS を欠損させた際に、なぜインスリンシグナルが亢進するのかは明らかにできなかった。少なくともメタボローム解析では著明な変化を認めていないので代謝産物の変化ではない。ヘパトカインやエキソソームのような液性因子が候補として考えられるので、本ポイントを明らかにすることは今後の課題である。また、Albumin-Cre-ERT2-loxP システムを用いた検討から、HSHF 誘導性の糖尿病や NAFLD に対する急性的な FAS 欠損の治療効果が示された。アデノウイルスベクターや阻害剤を用いた FAS 抑制の治療効果を検討する必要があるが、FAS 抑制は近年我が国で増加にある欧米型肥満に対する治療標的となる可能性を示している。

参考文献

- Lusting HE et al. Nature 2012
- Bettina GF et al, J Hepatol, 2021
- Chakravarthy MV et al, Cell Metab, 2005
- Matsukawa T et al., JCI insight, 2023
- Lyu K et al., Cell Metab, 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsukawa T et al.,	4. 巻 8
2. 論文標題 Hepatic FASN deficiency differentially affects nonalcoholic fatty liver disease and diabetes in mouse obesity models	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e161282
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.161282	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5件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松川 隼也、長沼 孝雄、満島 勝、松本 道宏
2. 発表標題 グルカゴン応答性メチル化酵素を介した肝糖新生制御機構
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 松川 隼也、長沼 孝雄、満島 勝、松本 道宏
2. 発表標題 グルカゴン応答性メチル化酵素の糖尿病肝における役割の解明
3. 学会等名 第31回日本医学会総会 6NCリトリートポスターセッション
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松川 隼也、長沼 孝雄、満島 勝、松本 道宏
2. 発表標題 肝臓特異的な脂肪酸合成酵素の抑制は肥満の成因依存的にNAFLDと糖尿病を改善する
3. 学会等名 第44回日本肥満学会第41回日本肥満症治療学会学術集会
4. 発表年 2023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
---------	---------