

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659360

研究課題名(和文)肝エネルギー代謝に関する新規転写抑制因子の機能解析と代謝関連肝疾患治療への応用

研究課題名(英文) Analysis of a novel transcriptional repressor involved in energy metabolism and application for metabolic liver diseases

研究代表者

根本 朋幸 (Nemoto, Tomoyuki)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：20397277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子の機能抑制因子であるId2は分化調節能と増殖促進作用を有し、Id2ノックアウトマウスは痩せの表現型を示す。Id2の機能喪失は、マウスモデルで肥満および脂肪肝抵抗性を示し、耐糖能が高く、インスリン感受性の亢進をもたらした。Id2はインスリンにより発現が誘導され、ホスファチジルイノシトール-3 キナーゼ経路を介して制御された。脂肪細胞分化にはインスリンによるId2発現増加が重要である可能性が示唆された。Id2の機能制御は脂肪肝、メタボリック症候群、さらには生活習慣病に対する新規の治療薬開発につながるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：A dominant-negative transcriptional repressor, Id2 has been shown to regulate cell differentiation and proliferation. Id2 knockout mice have lean phenotype. Id2 deficiency conferred resistance to obesity and fatty liver development in a mouse model. Id2 knockout mice showed increased glucose tolerance and insulin sensitivity. Id2 was induced by insulin and mediated by phosphatidylinositol-3 kinase pathway. An increase of Id2 expression by insulin may be indispensable for adipocyte differentiation. Modulation of Id2 expression is thought to be a potential therapeutic target for fatty liver, metabolic syndrome, and furthermore, lifestyle-related diseases.

研究分野：消化器内科

キーワード：糖代謝 インスリンシグナル

### 1. 研究開始当初の背景

メタボリック症候群の表現型の1つである非アルコール性脂肪性肝疾患(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)は、肥満人口の増加に伴い罹患率は上昇している。近年、メタボリック症候群の場としての肝臓の重要性が再認識され、肝でのエネルギー代謝調節における転写因子の病態への関与が解明されつつある。

NAFLDは、その9割を占める予後良好な単純性脂肪肝と、残り1割の肝硬変、肝癌への進展がある非アルコール性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)からなる。近年、インスリン抵抗性は糖尿病の前段階であるだけでなく、NAFLDおよびNASH発症の重要因子の1つとも考えられており、生活習慣病へ至る重要な病態と位置付けられている(Hepatology 43:S99, 2006)。このようなつながりは、NAFLDからその重症型であるNASHへの進展がメタボリック症候群から生活習慣病への進展のアナロジーになると考えられる。

塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス型転写因子の機能抑制因子であるId2 (inhibitor of DNA binding 2)は、分化調節能と増殖促進作用を併せ持つ(Yokota, et al. Nature 397: 702, 1999, Nature 407: 592, 2000)。我々は血清刺激による転写因子RFX1を介したId2遺伝子の早期発現誘導機構(Wang, Nemoto, et al. J Biol Chem, 282:26167, 2007)の発現過程で、Id2遺伝子の発現がインスリンによって誘導されることを見出した。

また、Id2は大腸癌、膵癌、前立腺癌などで過剰発現が認められ、表現型として過増殖、腫瘍進展を示し、予後不良と関連することが報告されている。

これらのことよりId2が糖代謝制御機構、肝脂肪蓄積、さらにNASHの発症、肝癌がんに関連していることが推察される。

### 2. 研究の目的

増殖分化に関与する転写抑制因子Id2に新たな糖代謝制御機能を見出したことより、Id2ノックアウト(KO)マウスを用いてNAFLDの病態に対する関与を明らかにし、そのことを土台にメタボリック症候群から生活習慣病における転写因子ネットワークの新たな領域を解明することが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

(1) Id2 KOマウスにグルコースおよびインスリンを腹腔内投与し、血糖値を経時的に測定する。

(2) KKAY肥満マウスでId2をKOしたマウス(KKAY-Id2 KOマウス)を作製し、体重、血糖、インスリン値を測定し、肝臓、褐色脂肪組織のHE染色を行い、KKAYマウスと比較する。

(3) マウス線維芽細胞株、NIH-3T3細胞お

よびヒト肝癌細胞株、HepG2細胞をインスリン刺激しId2の発現を検討する。

(4) 野生型マウスにインスリンを投与しId2の組織での発現を検討する。

(5) マウス前駆脂肪細胞株、3T3-L1細胞を分化誘導させ、インスリンとId2の関与を検討する。

### 4. 研究成果

(1) Id2 KOマウスの耐糖能とインスリン感受性

Id2 KOマウスの4週および8週の体重は野生型に比べ有意に低値で、痩せの表現型を示した(図1)。

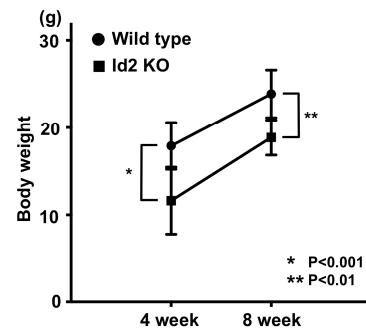


図1 Id2 KOマウスの体重の推移

Id2 KOマウスが肥満に抵抗性があるか検討するため、耐糖能およびインスリン感受性を評価した。グルコース負荷試験ではId2 KOマウスは野生型に比べ血糖の上昇が有意に抑制された(図2A)。インスリン感受性試験ではインスリン投与により血糖はId2 KOマウスで有意に低下した(図2B)。

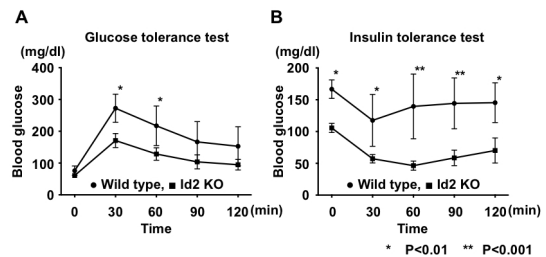


図2 Id2 KOマウスにおけるブドウ糖負荷試験とインスリン感受性試験

(2) KKAY-Id2 KOマウスの抗肥満の表現型

肥満マウスのKKAYの背景でId2を欠失させたKKAY-Id2 KOマウスではKKAYと比較し有意に体重増加が少なく(図3A)、血糖の上昇も認めなかった(図3B)。

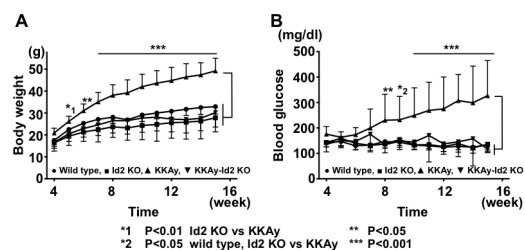


図3 KKAY-Id2 KOマウスの抗肥満の表現型

(3) KKAY-Id2 KO マウスのインスリン値  
 KKAY-Id2 KO マウスのインスリン値は 0.56 ng/ml で KKAY マウスの 3.0 ng/ml に比べ有意に低値だった(図 4)。

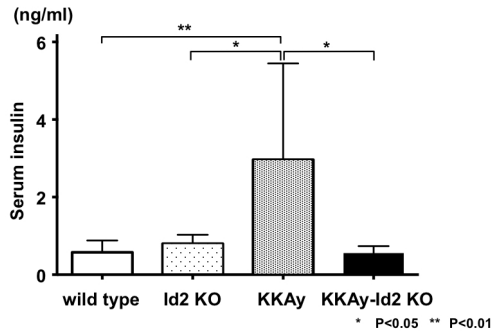


図4 KKAY-Id2 KOマウスのインスリン値

(4) KKAY-Id2 KO マウスの脂肪化に対する抵抗性

KKAY-Id2 KO マウスは KKAY マウスに比べ肝細胞の脂肪沈着が少なく(図 5A, B)、褐色脂肪組織の白色脂肪化を認めなかった(図 5C, D)。

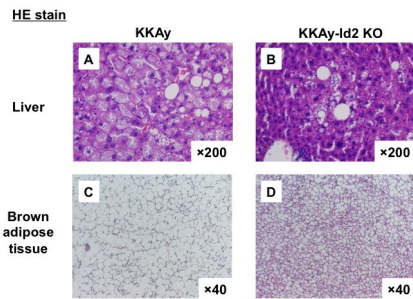


図5 KKAY-Id2 KOマウスの脂肪化に対する抵抗性

(5) 培養細胞におけるインスリンによる Id2 の発現誘導

インスリンが Id2 遺伝子発現に影響を及ぼすか検討するため、NIH-3T3 細胞および HepG2 細胞にインスリンを投与した。mRNA レベルで Id2 の発現量は 1 時間後に増加し(図 6A)、タンパクレベルでは 2 時間後に増加した(図 6B)。HepG2 細胞でも同様に増加し(図 6C)、インスリン濃度依存的に Id2 発現量の増加を認めた(図 6D)。

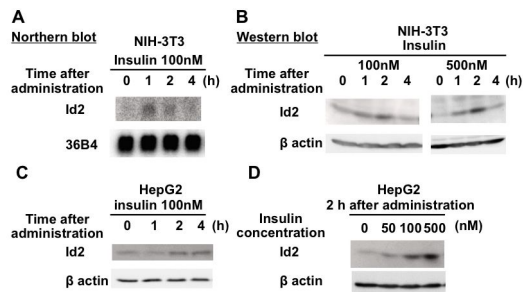


図6 培養細胞におけるインスリンによるId2の発現誘導

(6) *in vivo* におけるインスリンによる Id2 の発現誘導とインスリンシグナル経路の関与

*in vivo* においてもインスリンにより Id2 の発現誘導を認めるか野生型マウスにインスリンを投与した。白色脂肪組織で Id2 発現量の増加を認めた(図 7A)。

また、Id2 の発現誘導が主要なインスリンシグナル系であるホスホイノシチド 3-キナーゼ(P13 キナーゼ)シグナル系の下流であるか検討するためPI3 キナーゼ阻害剤のLY294002 を NIH-3T3 に添加しました。インスリンによる Id2 発現量は低下した(図 7B)。

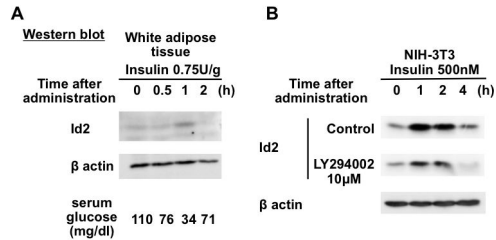


図7 *in vivo*におけるインスリンによるId2の発現誘導とインスリンシグナル経路の関与

(7) 脂肪分化におけるインスリンと Id2 の関連

インスリンによる Id2 の発現誘導が Id2 KO マウスの痩せの表現型にどのように関与するか明らかにするため、マウス前駆脂肪細胞株、3T3-L1 細胞を分化誘導させて検討した。3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)、dexamethasone (Dex)および insulin からなる分化誘導カクテルで分化誘導すると脂肪細胞分化を認めるが、インスリンを除くと脂肪細胞分化を認めなかった(図 8A)。脂肪細胞への分化をもたらすインスリンを含む分化誘導カクテルにより Id2 の発現量は早期にかつ高度に誘導された(図 8B)。

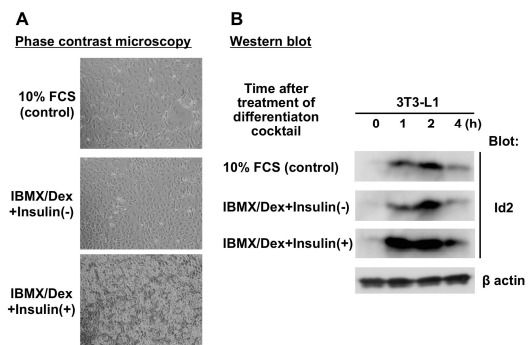


図8 脂肪分化におけるインスリンとId2の関連

(8) 総括

Id2 KO マウスは耐糖能に優れ、インスリン感受性が亢進していた。肥満マウス KKAY の背景で Id2 を欠失させた KKAY-Id2 KO マウスでは肥満に抵抗性で、KKAY 肥満マウスで見られた高インスリン血症が改善し、脂肪肝が軽減した。培養細胞および白色脂肪組織においてインスリンによる Id2 発現量の増加を認め、PI3 キナーゼ阻害剤で低下した。さらに、前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化にはインスリン必要で、Id2 の発現誘導を伴っていた。

Id2 の発現増加が脂肪細胞分化に関与し、

Id2 の機能喪失がインスリン感受性を高め、NAFLD の改善をもたらすことは、NAFLD の背景にあるメタボリック症候群、さらには生活習慣病に対する新規の治療薬開発につながるものと考えられた。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- 1) Nemoto T, Matsuda H, Nosaka T, Saito Y, Ozaki Y, Hayama R, Naito T, Takahashi K, Ofuji K, Ohtani M, Hiramatsu K, Suto H, Nakamoto Y. Comparison of hepatic arterial infusion chemotherapy and sorafenib in elderly patients with advanced hepatocellular carcinoma: A case series. *Mol Clin Oncol*. 2014; 2(6): 1028-1034. , 査読有 ,doi: 10.3892/mco.2014.371

〔学会発表〕(計 1 件)

- 1) Nemoto T, Matsuda H, Nosaka T, Saito Y, Ozaki Y, Naito T, Takahashi K, Ofuji K, Ohtani M, Hiramatsu K, Suto H, Nakamoto Y. Comparison of interferon-alpha combined with hepatic arterial infusion chemotherapy and sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. Feb. 10th 2015 Keynote Symposia, Banff (Canada)

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

根本 朋幸 (NEMOTO, TOMOYUKI)  
福井大学・医学部・助教  
研究者番号 : 20397277

##### (2)連携研究者

横田 義史 (YOKOTA, YOSHIFUMI)  
福井大学・医学部・教授  
研究者番号 : 50222386