

The cutting-edge of medicine; clinical and molecular pathology of type 2 diabetic liver

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-03 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/29347

2型糖尿病肝におけるインスリン抵抗性の病態と分子機構

篁 俊成 御簾 博文 金子 周一

要 旨

肝臓の脂肪化は肥満と独立してインスリン抵抗性と関連する。このことは日本人の糖尿病発症が肥満だけでは説明できず、軽度な肥満域から動脈硬化につながる代謝異常が増大することと関連する可能性がある。2型糖尿病に肥満症を伴った患者の肝臓では、解糖系、糖新生系、それらから派生するPentose phosphate cycle、中性脂肪合成系、脂肪酸合成・酸化系を構成する遺伝子群が協調的に発現亢進する。これらのプロファイルは糖・脂質由来の基質がミトコンドリアに流入することを示唆し、事実、ミトコンドリア酸化的リン酸化（OXPHOS）を構成する遺伝子群が活性酸素関連遺伝子群の発現とともに2型糖尿病患者、とりわけ肥満症を合併する患者の肝臓で、協調的に発現亢進する。2型糖尿病患者肝臓の包括的発現遺伝子解析から同定した新規ヘパトカイン「セレノプロテインP」は、抗酸化作用を有するにもかかわらず、一部にAMPキナーゼ活性の抑制を介して、全身のインスリン抵抗性を増大する。

〔日内会誌 100:1670~1676, 2011〕

Key words 2型糖尿病, 肥満症, インスリン抵抗性, 脂肪肝, ミトコンドリア

はじめに

過栄養時代に入り、2型糖尿病患者は世界中で爆発的に増加している。米国では肥満の重症度に伴い糖尿病発症率は直線的に増加するが、日本人では両者の関係はJ字型であり、やせ形でインスリン分泌不全を有する一群で糖尿病発症のリスクが増大する¹⁾。加えて、標準体重とされるBMI 22を境に、動脈硬化の危険因子保有数が有意にステップアップすることから、日本人では軽度の過体重から代謝異常が増大する可能性が

ある²⁻⁵⁾。このことは、肥満に先行して過栄養状態を関知して代謝異常をもたらす径路の存在を示唆する⁶⁾。

近年、2型糖尿病・肥満症は、生体ストレス・炎症、過栄養、臓器由来液性因子など多因子が体内において複雑なネットワークを形成して発症することが認識されてきた。なかでも肝臓は、糖・蛋白・脂質代謝の司令塔として、これらの因子を感じとり、遺伝子発現をダイナミックに変化させることで生体の恒常性を維持している⁷⁾。肥満症、糖尿病、およびそれらの合併症である動脈硬化、癌などの、過栄養が関与する症候群

金沢大学医薬保健研究域医学系恒常性制御学

The Cutting-edge of Medicine; Clinical and molecular pathology of type 2 diabetic liver.

Toshinari Takamura, Hirofumi Misu and Shuichi Kaneko: Department of Disease Control and Homeostasis, Kanazawa University Graduate School of Medical Science, Japan.

に肝臓の機能破綻とそれに伴うインスリン抵抗性が大きく関与している可能性がある⁶⁾。本稿では過栄養状態の肝臓恒常性の破綻が2型糖尿病の病態を形成する可能性を考察したい。

1. 肝脂肪化に関連したインスリン抵抗性

2007年のOECD Health Data (<http://www.swivel.com/graphs/show/28649976>)によれば、BMI 30 kg/m²以上の人の割合は、米国人の32.2%に対し、日本人は3.2%にすぎない。にもかかわらず、日本人では、比較的軽度な肥満域から動脈硬化につながる代謝異常が増大する^{2,3)}。日本人の代謝異常には肥満以外の要素も関わっていると考えた著者らは、メタボリックシンドロームの肝表現型である非アルコール性脂肪肝 (NAFLD) 患者の肝病理像と臨床像の関連を解析した。年齢、性、BMIで補正しても、肝の脂肪化、炎症、線維化はインスリン抵抗性指標と有意に関連しており、さらに互いの病理像を補正すると、肝脂肪化のみが独立してインスリン抵抗性を予知した⁸⁾。したがって、日本人のような肥満の軽度な民族では、肝臓の脂肪化が、腹部肥満と同等かあるいはそれ以上に、2型糖尿病、生活習慣病の基盤病態であるインスリン抵抗性を底上げしている可能性がある。

2. 過栄養とヒト肝臓遺伝子発現プロファイル

過栄養によって生じた肝の脂肪化がインスリン抵抗性をはじめとする2型糖尿病の病態を形成する分子機構を解析するため、著者らは、Serial analysis of gene expression (SAGE) およびDNA chip、Realtime PCR、独自に作成したin-house cDNA microarray、Metabolic Chip⁹⁾等の手法を駆使して、ヒト肝臓の包括的発現遺伝子情報を整備した¹⁰⁾。これらのプロファイルから、

軽度の脂肪肝を有する2型糖尿病患者の肝臓では、糖・脂質代謝、蛋白代謝が大きく変動するとともに、個々の遺伝子に着目すると、TGF- β やBMPなどのTGFスーパーファミリーとその下流で活性化されるVEGFやPDGFなどの血管新生因子、そしてplasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) やコラーゲンなどの全身の動脈硬化症と肝臓の線維化に促進的に作用する生理活性物質やそれらの受容体の遺伝子発現が亢進していることがわかった⁷⁾。動脈硬化関連分子と線維化関連分子はクロストークしており、血管新生因子は線維産生星細胞を活性化し、PAI-1は線溶化を阻害することで線維分解を阻害する。さらに、肥満が加わった患者の肝臓では、正常体重患者の肝臓に比し、インスリン抵抗性を惹起する炎症性サイトカインであるTNF- α 、動脈硬化・線維化関連PAI-1の各遺伝子¹¹⁾、および肝線維化の準備状態を作るレニン・アンギオテンシン系に関わる遺伝子¹²⁾が高発現していた。肝臓におけるPAI-1遺伝子発現量が血漿PAI-1レベルと有意に関連する事実¹²⁾は、血漿PAI-1レベルに肝臓が寄与する可能性を示唆する。ヒト正常肝細胞由来培養THLE-5b細胞を用いた検討により、TNF- α とアンギオテン系の経路は一部クロストークしてPAI-1発現を誘導すること¹²⁾、ピオグリタゾンとスタチンがこのTNF- α 誘導性PAI-1発現を抑制することがわかった¹¹⁾。これらの知見は、糖尿病および肥満状態の肝臓では、すでにインスリン抵抗性、動脈硬化症、肝線維化の病態形成に向けた準備状態にあることを示唆する。事実、肥満と糖尿病の存在は輸血後C型慢性肝炎患者の肝線維化進展¹³⁾あるいは術後肝癌再発¹⁴⁾の独立した予知因子であった。また、日本人NAFLD患者の臨床病理学的自然歴を追跡した著者らの検討では、厳格な血糖コントロールが、減量にも増して、NAFLD患者の肝線維化改善を予知していた¹⁵⁾。

脂肪組織と肝臓のネットワークは代謝異常に

つながる臓器間ネットワークの中でもその中心的存在と考えられる。肥満患者における内臓脂肪組織由来の脂肪酸や生理活性分子は門脈を介して肝臓に注ぎ込む。肝臓は、インスリン感受性亢進作用、抗線維化作用を有する脂肪細胞由来アディポネクチンの重要な標的臓器である。インスリン抵抗性と脂肪肝を有する患者では、血清アディポネクチンレベルが低値であることに加えて、肝臓におけるアディポネクチン受容体の中でも、AdipoR2が選択的に発現低下していた¹⁶⁾。

3. 2型糖尿病患者の肝臓で変動する代謝パスウェイ

上述の既知キー分子に加え、未知の肝臓由来生理活性分子が2型糖尿病・肥満症の病態を形成している可能性がある。さらに、2型糖尿病や肥満症は多因子疾患であるため、個々の分子の発現変動のみで全病態を説明できる可能性はむしろ低く、細胞局在や機能などのontologyを考慮した代謝パスウェイの変動をも解析することでみえてくる病態がある。まず、2型糖尿病患者5名と健常人5名の肝発現遺伝子をSerial analysis of gene expression (SAGE)法を用いて包括的に解析し、コードタンパクの細胞内局在別に分類したところ、2型糖尿病患者の肝臓では分泌タンパクにもまして、ミトコンドリアタンパクをコードする遺伝子群の発現が有意に亢進していた¹⁷⁾(図1)。さらにDNA chip法を用いてより多数の糖尿病患者の肝発現遺伝子プロファイルを解析した結果、2型糖尿病患者の肝臓ではミトコンドリア遺伝子のなかでもATP産生を司る酸化的リン酸化(OXPHOS)関連遺伝子群が協調的に発現亢進していた¹⁷⁾。OXPHOS関連114遺伝子の発現シグナルを標準化して求めたOXPHOS mean centroidは、各症例のFPGと有意に正相関し、さらに骨格筋レベルでのインスリン

感受性指標であるグルコースクランプ法にて算出したMetabolic Clearance Rateと負に相関した¹⁷⁾。さらに、OXPHOS遺伝子群は、肝糖新生酵素遺伝子、エネルギー代謝関連転写因子遺伝子、および活性酸素関連遺伝子群と関連して協調的に発現変動した¹⁸⁾。以上の結果より、2型糖尿病患者の肝臓におけるミトコンドリアOXPHOS遺伝子群の発現亢進は、ATPを過剰に産生し肝糖新生酵素に供給することで、さらに、活性酸素産生を介してインスリン抵抗性を生じて、肝糖新生の亢進を招く可能性がある。一方、2型糖尿病患者の骨格筋¹⁹⁾、脂肪組織²⁰⁾や末梢血単核球²¹⁾では、肝臓と逆に、OXPHOS遺伝子群は協調的に発現低下していることが報告された。OXPHOSの発現亢進と減弱のいずれがインスリン抵抗性の原因でいずれが結果かの議論が続いている。肝特異的および骨格筋特異的AIF遺伝子ノックアウトマウスではOXPHOS遺伝子発現が協調的に減弱し、これらのマウスの肝臓、骨格筋におけるインスリン感受性はむしろ亢進することが報告された²²⁾。このことは、2型糖尿病患者の骨格筋で観察されたOXPHOS遺伝子発現の低下はむしろ代償機構であることが示唆され、肝臓で観察されたOXPHOS遺伝子の発現亢進がインスリン抵抗性の原因となる可能性が支持されつつある。また、このような代謝パスウェイの臓器特異的な発現変動を制御する上流の因子が、糖尿病の治療標的となるかもしれない。

4. 肥満症患者の肝臓で変動する代謝パスウェイ

OXPHOS遺伝子群の協調的発現亢進は肥満が加わることでさらに顕著になることがわかった¹⁸⁾。そこで、2型糖尿病患者に肥満が加わることで肝臓において差別的協調的に発現変動するエネルギー代謝パスウェイをコードする発現遺伝子群を解析した¹⁸⁾(表)。2型糖尿病患者に肥満

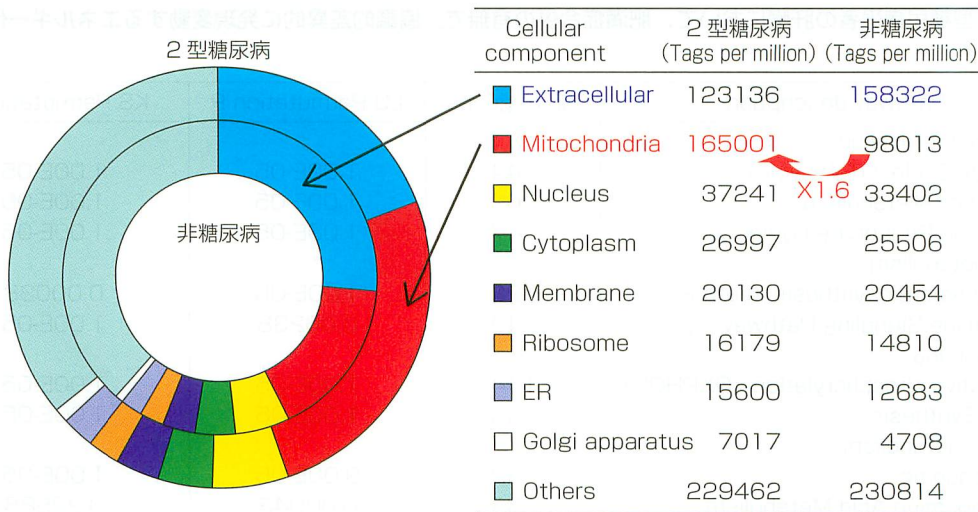


図 1. 2 型糖尿病および健常人の肝臓に発現する遺伝子の細胞局在比較

2 型糖尿病患者 5 名と健常人 5 名の肝発現遺伝子プロファイルを Serial analysis of gene expression (SAGE) 法を用いて包括的に解析し、発現遺伝子をコードタンパクの細胞内局在別に分類した。2 型糖尿病患者の肝臓ではミトコンドリアタンパクをコードする遺伝子群の発現が有意に亢進していた。

文献 17 より改変掲載

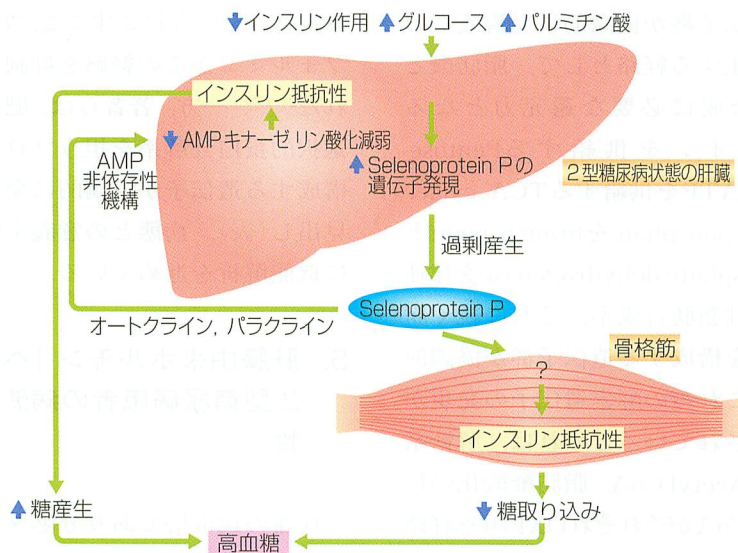


図 2. 2 型糖尿病状態における selenoprotein P の過剰産生による肝臓および骨格筋でのインスリン抵抗性の発症

過栄養状態の肝臓から過剰に産生される selenoprotein P はオートクライン・パラクライン様式で肝臓自身に、また血流を介して骨格筋に、それぞれ作用し、インスリン抵抗性を形成し、肝糖産生と骨格筋糖取り込み低下による高血糖を招来する悪循環を形成する。Selenoprotein P は一部に AMP キナーゼ活性の減弱を介して、肝臓におけるインスリン抵抗性を形成する。

文献 26 より改変掲載

表. 2型糖尿病患者の肝臓において、肥満症合併の有無で、協調的差別的に発現変動するエネルギー代謝パスウェイ

Pathway description	No of genes	LS Permutation P	KS Permutation P
Glucose metabolism			
Citrate Cycle (TCA Cycle)	44	1.00E-05	1.00E-05
Pyruvate Metabolism	69	1.00E-05	1.00E-05
Pentose Phosphate Cycle	47	1.00E-05	1.00E-05
Lipid metabolism			
Fatty Acid Biosynthesis (path 2)	23	1.00E-05	0.00038
Ceramide Signaling Pathway	49	0.00238	1.00E-05
Mitochondria			
Oxidative phosphorylation (OXPHOS)	144	1.00E-05	1.00E-05
ATP Synthesis	66	1.00E-05	1.00E-05
Protein metabolism			
Proteasome	30	9.00E-05	1.00E-05
Selenoamino Acid Metabolism	33	0.00043	0.22588

肥満合併及び非合併2型糖尿病患者、各々10名、11名の肝発現遺伝子プロファイルAffymetrix社のHuman Genome U133 Plus 2.0 Arrayを用いて包括的に解析し、差別的協調的に発現変動する代謝パスウェイを示す。2型糖尿病患者に肥満が加わると、上記のエネルギー代謝パスウェイが肝臓で協調的に発現亢進した。(文献18より改変掲載)

が加わると、肝臓において、解糖系および糖新生系を構成する遺伝子群が協調的に発現亢進した。解糖系から派生する経路として、脂肪酸とコレステロール合成に必要な還元力となるNADPHと水素イオンを供給するPentose-phosphate cycle, ATPを供給するTCA cycle, Dihydroxyacetone phosphateをbranch pointとしてglycerol-3-phosphate dehydrogenaseを律速段階酵素とする中性脂肪合成系、それに続く脂肪酸合成・分解系を構成する遺伝子群が協調的に発現亢進した。これらの酵素遺伝子の発現が基質依存性に誘導されているとすれば、解糖系の代謝産物としてAcetyl CoA, 脂肪酸酸化の代謝産物としてAcyl CoAがそれぞれOXPHOS経路の基質としてミトコンドリアに流入する。表に示すように、おそらくこのような基質の過剰流入を受けて、OXPHOSを構成する遺伝子群が協調的に発現誘導された可能性を考える。

近年、蛋白代謝がインスリン抵抗性やエイジングと関連する可能性を示す基礎研究が報告されている。蛋白合成系を制御するmTOR-S6

Kinase経路の活性化が長寿の阻害²³⁾やインスリン抵抗性²⁴⁾を引き起こすこと、カロリー制限やメトフォルミンがこの経路を抑制しうることが示された^{24, 25)}。一方、著者らは、肥満症患者の肝臓で選択的蛋白分解系を担うプロテアソーム経路を構成する遺伝子が協調的に発現亢進することを見出し(表)、病態との意義を明らかにするために機能解析を進めている。

5. 肝臓由来ホルモン「ヘパトカイン」が2型糖尿病患者の病態を形成する可能性

代謝の司令塔であり分泌タンパクの主要な産生源である肝臓には臓器間ネットワークを制御する未知のホルモン、すなわちヘパトカインが存在することが推定されてきたが、それらの同定と解析は未だ不十分である。実際、肝臓に発現する遺伝子の細胞局在比較の結果も、2型糖尿病および健常人ともに、分泌蛋白をコードする遺伝子(extracellular)が豊富であることを示し

た(図1)。そこで、SAGE、DNA chip解析から得た遺伝子情報から、シグナルペプチドの構造を有すると推測される遺伝子、あるいはGene ontology cellular compartmentでextracellularに分類される遺伝子に絞り、発現量と臨床マーカーの関連を照合した。このようなアプローチで、インスリン抵抗性、肥満、あるいは血糖コントロールと関連する肝臓由来分泌蛋白コード遺伝子を絞り込んだ。

これらの中で、ヒト肝臓での発現がインスリン抵抗性および高血糖と関連する機能性ヘパトカインとしてセレノプロテインP(selenoprotein P: SeP)を同定した²⁶⁾。2型糖尿病患者の肝臓で、SePの合成に必要な過程であるセレノアミノ酸代謝関連遺伝子群が肥満に関連して協調的に発現亢進し(表)、SeP遺伝子がOXPHOS遺伝子群と協調的に正相関して発現亢進する知見もこの蛋白の役割を暗示していた¹⁸⁾。SePは主に肝臓で産生される分子量約50キロダルトンの分泌タンパクで、必須微量元素であるセレンの輸送タンパク、あるいはグルタチオンの酸化を介した抗酸化タンパクとして機能することが知られていたが、糖代謝に与える影響は不明であった。*in vitro*および*in vivo*の検討から、SePは、少なくとも一部にAMPキナーゼの活性抑制を介して全身のインスリン抵抗性を引き起こし、糖代謝を障害することがわかった²⁶⁾。SeP発現は、細胞レベルではグルコース、脂肪酸で誘導され、インスリンで抑制される。また個体レベルでは絶食時には発現誘導され、摂食により抑制される。したがって、絶食時にインスリン作用を落とし、摂食時にインスリン作用を高める生理的要求と適応する。一方、酸化ストレスがインスリン抵抗性の原因になるにもかかわらず、抗酸化作用を有するSePがどのような機構でインスリン抵抗性を形成するのであろうか？ 生体は活性酸素をシグナル分子として使っていること、あるいは生物に対して通常有害な作用を示すものが、微

量であれば逆に良い作用を示す生理的刺激作用となるホルミシス(hormesis)効果等の観点から、この問題に挑戦している。

以上の結果は、ヒトの臨床サンプルを用いて臨床情報との関連をもとに絞り込む候補遺伝子アプローチが、新規機能性分泌タンパクのスクリーニングに有用であることを示唆するとともに、過栄養状態の肝臓が糖尿病の治療標的になる仮説を支持する。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：金子周一：報酬(大塚製薬、キュービクス)、講演料(大日本住友製薬)、研究費・助成金(アボット・ジャパン、大塚製薬、興和、第一三共、大鵬薬品工業、中外製薬、バイエル薬品、プリストル・マイヤーズ、ヤンセンファーマ)、寄付金(旭化成クラレメディカル、アステラス製薬、アストラゼネカ、エーザイ、MSD、大塚製薬、小野薬品工業、杏林製薬、協和発酵キリン、サノフィ・アベンティス、三和化学研究所、塩野義製薬、第一三共、大日本住友製薬、武田薬品工業、田辺三菱製薬、中外製薬、日本イーライリリー、ノバルティスファーマ、ノボノルディスクファーマ、バイエル薬品、ファイザー、プリストル・マイヤーズ)

文 献

- 1) Sakurai M, et al: J-shaped relationship between waist circumference and subsequent risk for Type 2 diabetes: an 8-year follow-up of relatively lean Japanese individuals. *Diabet Med* 26: 753-759, 2009.
- 2) Ota T, et al: Preobesity in world health organization classification involves the metabolic syndrome in Japanese. *Diabetes Care* 25: 1252-1253, 2002.
- 3) 太田嗣人, 他: 日本人で代謝異常が増大するBMI. 肥満研究(日本肥満学会誌) 11: 317-322, 2005.
- 4) Sakurai M, et al: BMI may be better than waist circumference for defining metabolic syndrome in Japanese women. *Diabetes Care* 31: e12, 2008.
- 5) Sakurai M, et al: Middle-aged Japanese women are resistant to obesity-related metabolic abnormalities. *Metabolism* 58: 456-459, 2009.
- 6) Sakurai M, et al: Abnormal liver function tests and metabolic syndrome—is fatty liver related to risks for atherosclerosis beyond obesity? *Intern Med* 48: 1573-1574, 2009.
- 7) Takamura T, et al: Genes for systemic vascular complications are differentially expressed in the livers of type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 47: 638-647, 2004.
- 8) Sakurai M, et al: Liver steatosis, but not fibrosis, is associ-

- ated with insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 42 : 312-317, 2007.
- 9) Ando H, et al : The hepatic circadian clock is preserved in a lipid-induced mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 380 : 684-688, 2009.
 - 10) Takamura T, et al : SAGE application in the study of diabetes. *Curr Pharm Biotechnol* 9 : 392-399, 2008.
 - 11) Takeshita Y, et al : Tumor necrosis factor-alpha-induced production of plasminogen activator inhibitor 1 and its regulation by pioglitazone and cerivastatin in a nonmalignant human hepatocyte cell line. *Metabolism* 55 : 1464-1472, 2006.
 - 12) Takeshita Y, et al : Transformation of p53-positive papillary thyroid carcinoma to anaplastic carcinoma of the liver following postoperative radioactive iodine-131 therapy. *Intern Med* 47 : 1709-1712, 2008.
 - 13) Kita Y, et al : Impact of diabetes mellitus on prognosis of patients infected with hepatitis C virus. *Metabolism* 56 : 1682-1688, 2007.
 - 14) Komura T, et al : Impact of diabetes on recurrence of hepatocellular carcinoma after surgical treatment in patients with viral hepatitis. *Am J Gastroenterol* 102 : 1939-1946, 2007.
 - 15) Hamaguchi E, et al : Histological course of nonalcoholic fatty liver disease in Japanese patients : tight glycemic control, rather than weight reduction, ameliorates liver fibrosis. *Diabetes Care* 33 : 284-286.
 - 16) Shimizu A, et al : Regulation of adiponectin receptor expression in human liver and a hepatocyte cell line. *Metabolism* 56 : 1478-1485, 2007.
 - 17) Misu H, et al : Genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately upregulated with fasting hyperglycaemia in livers of patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* 50 : 268-277, 2007.
 - 18) Takamura T, et al : Obesity upregulates genes involved in oxidative phosphorylation in livers of diabetic patients. *Obesity (Silver Spring)* 16 : 2601-2609, 2008.
 - 19) Mootha VK, et al : PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34 : 267-273, 2003.
 - 20) Dahlman I, et al : Downregulation of Electron Transport Chain Genes in Visceral Adipose Tissue in Type 2 Diabetes Independent of Obesity and Possibly Involving Tumor Necrosis Factor- α . *Diabetes* 55 : 1792-1799, 2006.
 - 21) Takamura T, et al : Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells reflect the pathophysiology of type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 361 : 379-384, 2007.
 - 22) Pospisilik JA, et al : Targeted deletion of AIF decreases mitochondrial oxidative phosphorylation and protects from obesity and diabetes. *Cell* 131 : 476-491, 2007.
 - 23) Selman C, et al : Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span. *Science* 326 : 140-144, 2009.
 - 24) Kalender A, et al : Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell Metab* 11 : 390-401.
 - 25) Kapahi P, Vijg J : Aging—lost in translation? *N Engl J Med* 361 : 2669-2670, 2009.
 - 26) Misu H, et al : A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. *Cell Metab* 12 : 483-495, 2010.