

学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

肝 LKB1 の糖尿病における役割

研究代表者 小野 啓 (大学病院 内分泌内科・糖尿病内科)

研究分担者 住田 崇*, 鈴木 徳子*

背景

LKB1はPeutz-Jeghers症候群の原因遺伝子であり、エネルギー欠乏状態で活性化されるAMPK (AMP活性化プロテインキナーゼ) をリン酸化して活性化する酵素としても知られている¹⁾。2005年にReuben Shawらは成熟マウスの肝臓のLKB1をCre-LoxPシステムを用いて急性に減少させると空腹時血糖が上昇し糖尿病を発症すること、および糖尿病治療薬メトフォルミンがLKB1-AMPK経路を介して血糖低下作用を発揮していることをScience誌に発表した²⁾。筆者らはAMPKの競合阻害型変異体を肝臓に急性に発現させると空腹時血糖が上昇することを発表している³⁾。これらのことから、肝臓においてLKB1-AMPK経路を遮断すると糖尿病を発症することが示されたということが言える。しかし逆に、糖尿病においてLKB1-AMPK経路がその病態生理に関与しているかどうかは不明である。

目的

糖尿病モデルにおいて肝臓のLKB1がその病態に関与しているかどうかを調査する。

方法の概要

マウスの糖尿病モデルにおいて肝臓のLKB1がどのように変化しているかを検索する。そして、肝臓のLKB1を増加させたときに糖尿病が改善するかどうかを調査する。

方法と結果

重症の糖尿病モデルであるdb/dbマウスの肝臓におけるLKB1の定量を蛋白レベル、mRNAレベルの両方で行い、非糖尿病マウスのモデルとして汎用されているC57Bl/6マウスのそれと比較を行ったところ、

db/dbマウスの肝臓ではLKB1の量が著明に減少していた(タンパク質量; C57Bl6/J: 1.0 ± 0.2 vs. db/db: 0.1 ± 0.0 , mRNA量; 1.0 ± 0.1 vs. 0.4 ± 0.0 ; 図1)。これに対し、インスリン抵抗性モデルである1日あるいは2週間の高脂肪食を摂取したC57Bl/6マウスの肝臓においては、LKB1の量は通常食の同種マウスと有意差を認めなかった。糖尿病の治療によって肝LKB1の量が変化するかどうかを調べるため、db/dbマウスを19日間にわたりinsulin glargineの1日1回投与により高血糖を是正した後に肝LKB1を定量したところ、LKB1の増加が認められた(図1)。

次に、db/dbマウスの肝LKB1を強制発現させ、糖尿病にどのような影響を及ぼすのかを調べた。db/dbマウスの尾静脈よりLKB1もしくはLacZのベクターを投与して、肝臓でこれらのタンパク質を強制発現させることで、糖代謝、インスリン伝達経路、遺伝子発現を解析した。

ベクター投与により、肝臓のLKB1は内因性に比して著明に増加した(図2)。

ベクター投与5日後のマウスを5時間絶食させた時の空腹時血糖はLKB1を強制発現させた群が有意に低下していた(LacZ: 521 ± 59 mg/dL 対 LKB1: 304 ± 21) が、インスリン負荷後の血糖値には有意差を認めなかった(図3)。グルコース負荷試験はLKB1群でグルコース負荷後30分、60分、90分の血糖値が有意に低かった(負荷後15分 LacZ: 427 ± 19 mg/dL vs. LKB1: 324 ± 35 , 60分 LacZ: 488 ± 23 vs. LKB1: 373 ± 45 , 90分 LacZ: 455 ± 31 vs. LKB1: 343 ± 49 ; 図4)。肝臓のシグナル伝達を調べたところ、AMPKのリン酸化には有意な変化は認められなかったが、インスリン刺激時のS6キナーゼのリン酸化が亢進していた(図5)。ベクター投与11日後の体重は両群間に差はなかったが(LacZ: 39.3 ± 0.7 g vs. LKB1: 39.7 ± 0.6)、体重当たりに占める肝臓の割合を調べたところ、LKB1群の方が有意に大きかった(LacZ: $5.3 \pm 0.2\%$ vs. LKB1: 8.9 ± 0.6)。脂肪

*大学病院 内分泌内科・糖尿病内科

は変化を認めなかった (LacZ: $5.1 \pm 0.1\%$ vs. LKB1: 5.1 ± 0.1) (図6). また, 糖新生の律速酵素である PEPCK, G6Pase, PGC1 α の mRNA 量が LKB1 群で有意に減少しており (それぞれ 0.5 倍, 0.8 倍, 0.5 倍; 図7), これと対照的に, 解糖系の律速酵素である GCK, PFK

は LKB1 群で有意に増加していた (それぞれ 1.7 倍, 1.2 倍; 図8). PK は LKB1 群で増加傾向であった (1.3 倍). LKB1 群の肝臓の外観が白色を呈しており, また肝臓重量が大きかったため, FAS の mRNA 量を調べたところ LKB1 群で有意に増加していた (2.0 倍; 図9).

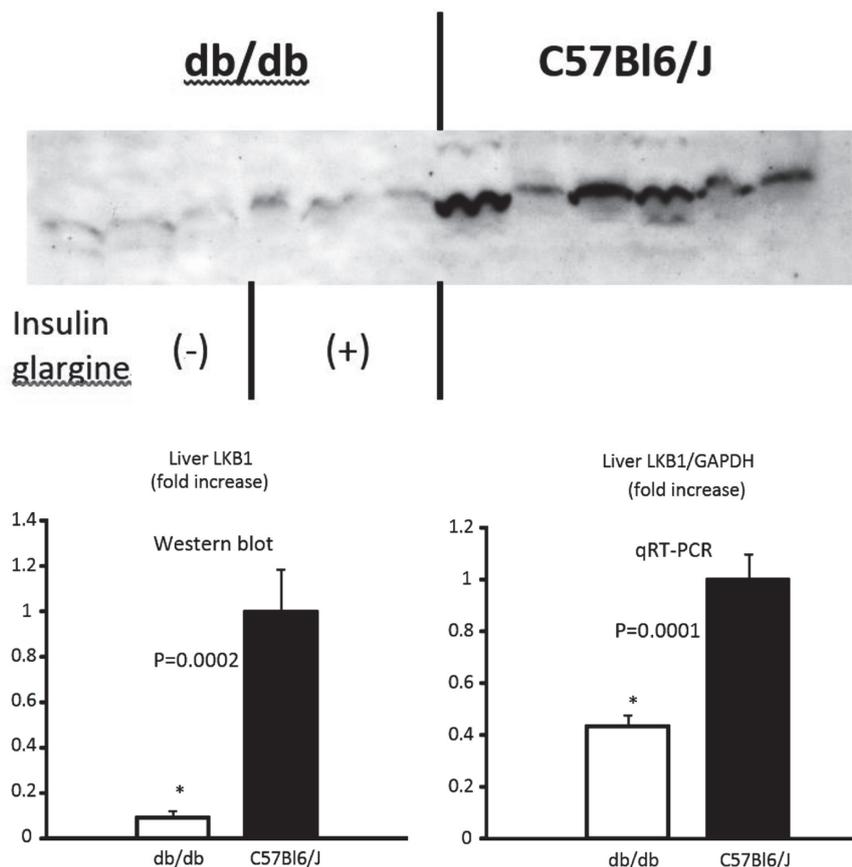


図 1. マウス肝臓のLKB1はdb/dbマウスにおいて減少しており, インスリンによる治療により部分的に改善した.

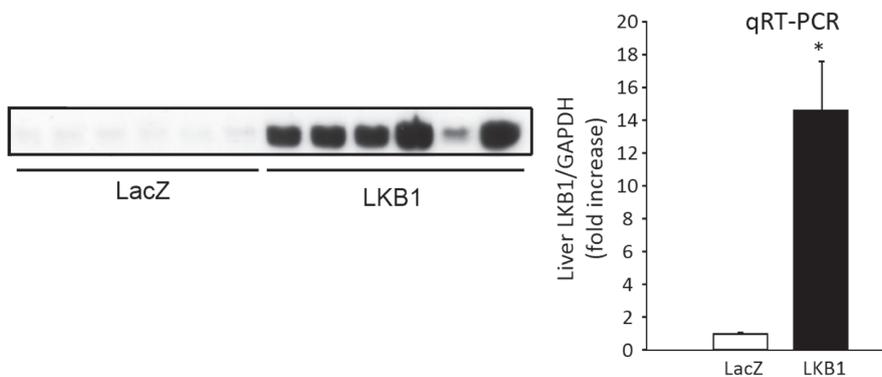


図 2. ベクターの静脈注射により肝臓にLKB1が効果的に強制発現された.

次に、軽症のインスリン抵抗性モデルである、1日の高脂肪食を摂餌したC57Bl6マウスにおいて、肝臓のLKB1の強制過剰発現が糖代謝にどのように影響するかを、無麻酔非拘束条件下での高インスリン血症正常血糖クランプ法を用いて解析した。クランプは60%脂質からなる高脂肪食を1日摂餌したマウスを3時間絶食させ、その後に2時間のbasal periodにて空腹時の基礎糖産生量を測定し、次いで2.5 mU/kg/minの生理的高インスリン血症条件下で正常血糖を保つためのグルコース注入量(GIR)、末梢組織への糖取り込み量(Rd)、内因性糖産生量(EGP)および糖産生量の基礎糖産生量に比較した抑制率(SupGP)を測定した。

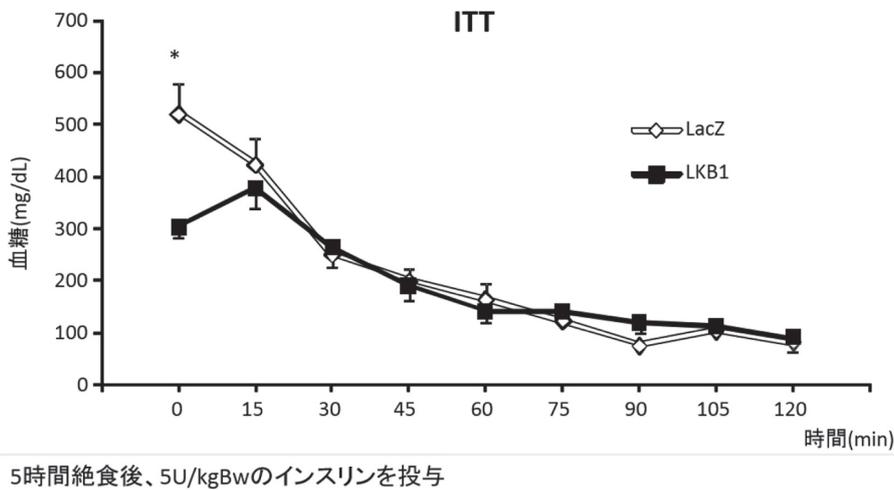
このモデルにおいては、空腹時血糖(FPG)は両群で有意差を認めなかった(図11)。予想に反して、内

因性の基礎糖産生量はLKB1群で有意に増加しており(図11, basal EGP)、インスリン持続注入時の糖産生量もコントロールと比較して有意に高値であった。グルコース注入量および糖取り込み量には群間に有意差は認められなかった(図11)。

考 察

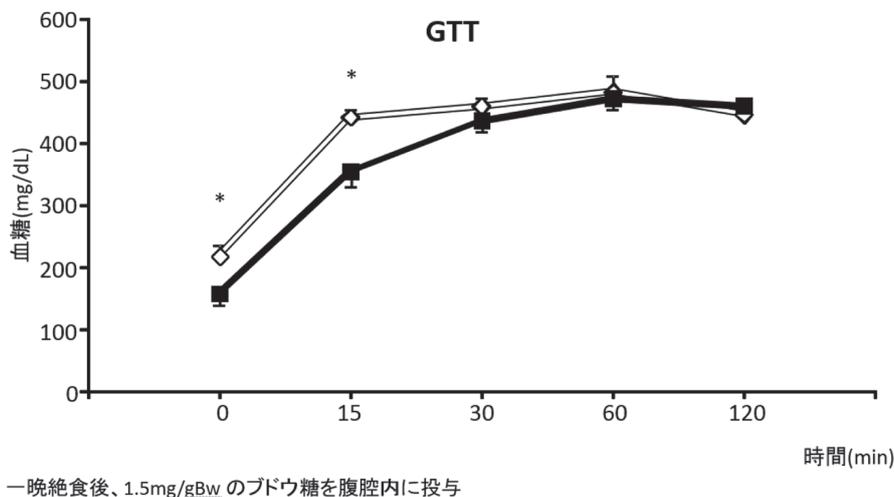
重症の糖尿病モデルであるdb/dbマウスの肝臓においてはLKB1のダウンレギュレーションがインスリン抵抗性に関与している可能性が示唆された。

このdb/dbマウスにおいて、減少しているマウスの肝LKB1を急性に補充すると、空腹時血糖、耐糖能が改善したが、これは2005年のShawらの報告と合致する。db/dbマウスで減少している肝LKB1を強制的



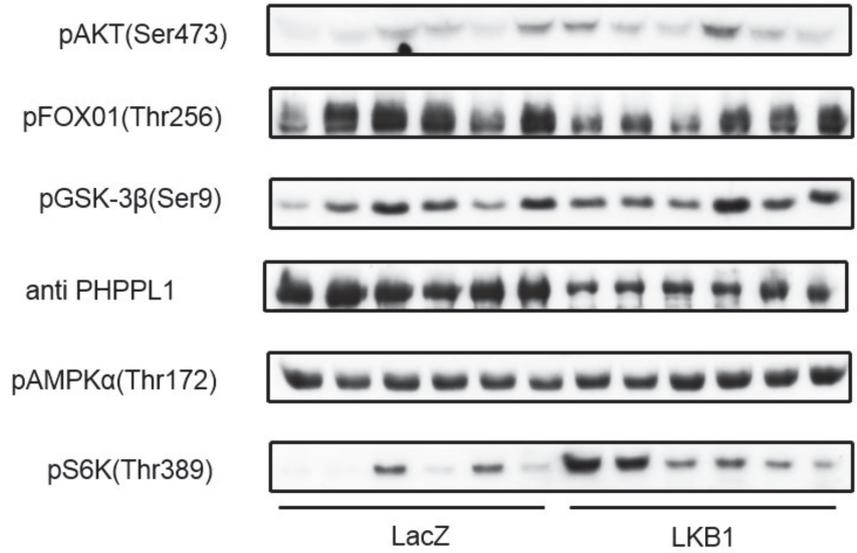
5時間絶食後、5U/kgBwのインスリンを投与

図3. インスリン負荷試験では、5時間空腹後の血糖値の有意な低下を認めたが、インスリン負荷後の血糖値には有意差が無かった。



一晩絶食後、1.5mg/gBwのブドウ糖を腹腔内に投与

図4. 糖負荷試験において、LKB1群では空腹時、負荷15分後の血糖値は有意に低値であったが、その後はコントロール群と有意差が認められなかった。



5時間絶食後の全てのマウスに1U/kgBwのインスリンを腹腔内投与し、投与1分後に肝臓を摘出した

図 5. 肝臓のシグナル伝達.

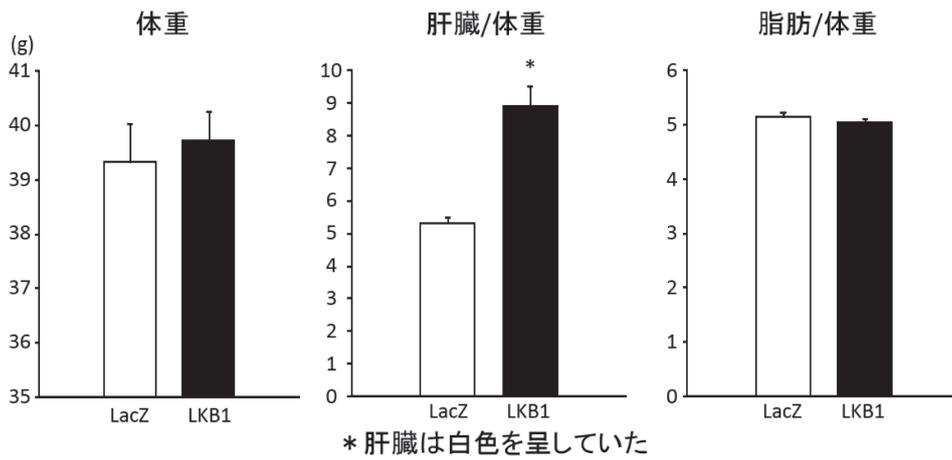


図 6. LKB1の強制発現は肝腫大と白色肝を呈した.

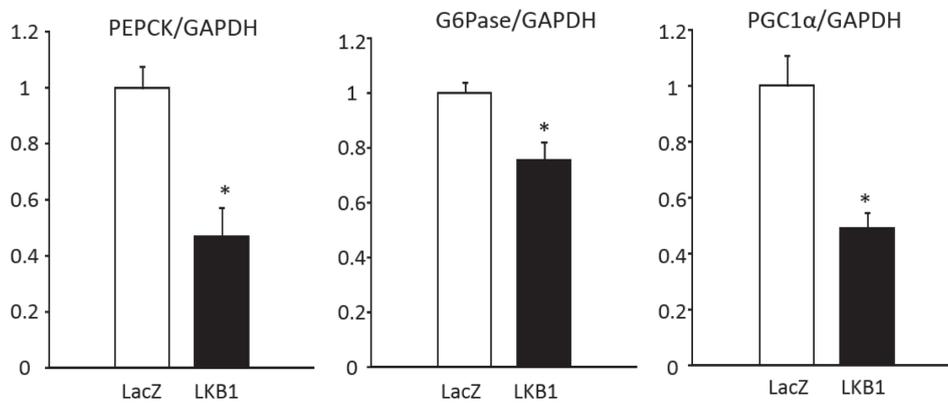


図 7. 肝臓の糖新生律速酵素と関連因子への影響.

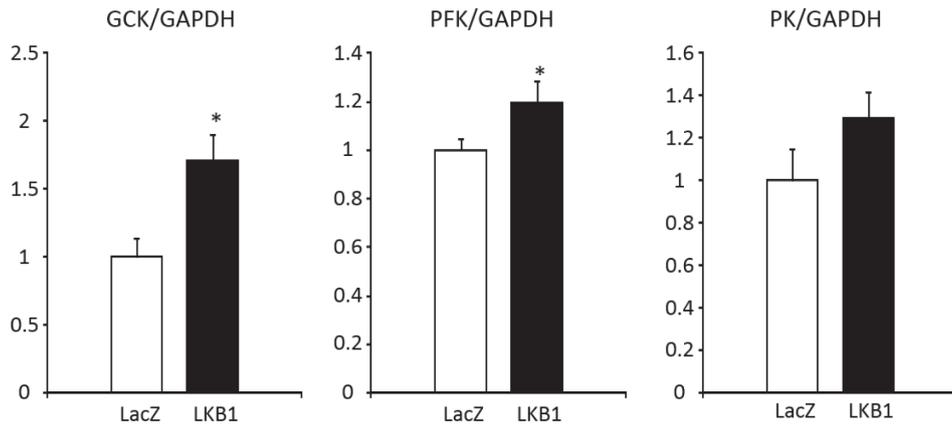


図 8. 解糖系律速酵素への影響.

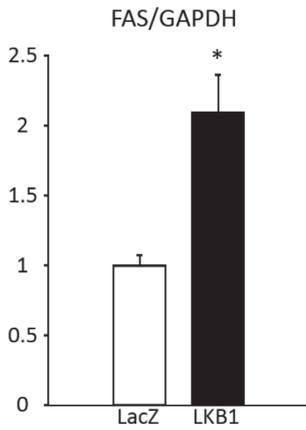


図 9. 肝臓の脂肪酸合成酵素 (FAS) は LKB1 群で増加していた.

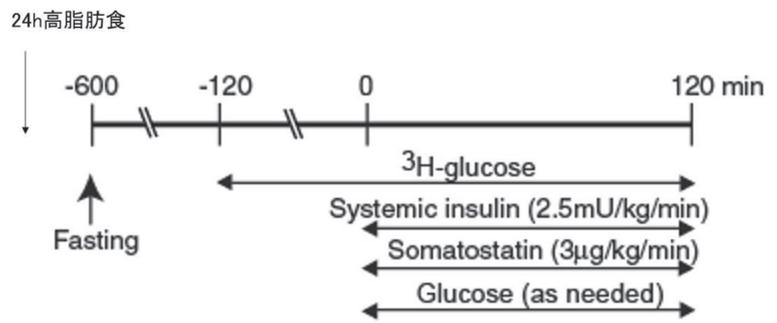


図 10. 1日高脂肪食負荷マウスにおけるインスリンクランプのプロトコール.

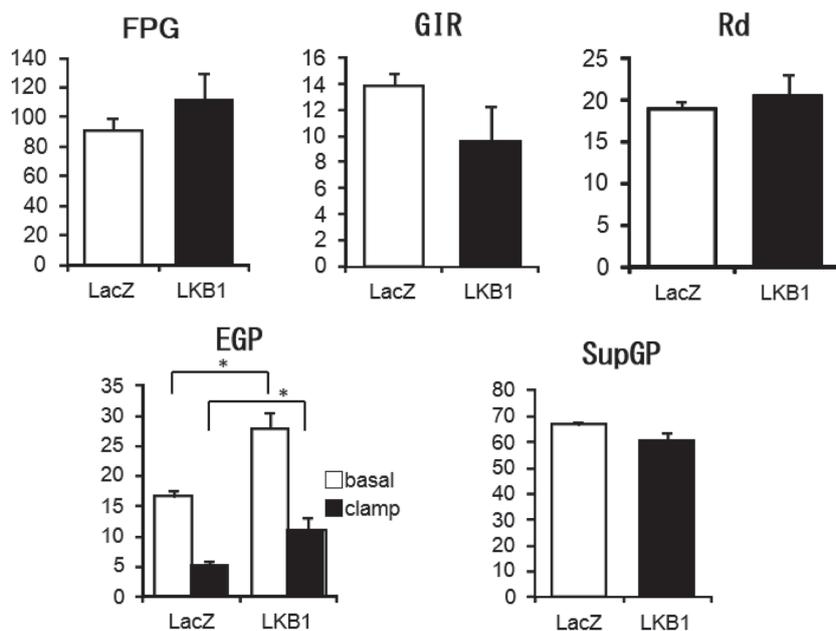


図 11. 1日高脂肪食負荷マウスにおけるインスリンクランプの結果.

に増加させると、糖新生の律速酵素であるPEPCK, G6Pase, PGC1 α が抑制され、さらに解糖系を調節しているGCK, PFK, PKが活性化されることで、糖新生抑制と解糖系亢進が起こり、血糖の低下作用を来すことが示唆された。

AMPKのリン酸化はLKB1の強制発現で有意な変化を認めなかったため、減少している肝LKB1を補充することで現れた血糖値が低下にはLKB1-AMPKを介さない別の経路が関与していることが示唆された。

肝LKB1を補充すると白色の肝腫大を認め、肝脂肪合成の律速酵素であるFASが増加しており、肝臓の脂肪合成にもLKB1が関与している可能性が考えられた。

肝臓のLKB1の低下が見られないインスリン抵抗性モデルである短期高脂肪食マウスにおいては、肝臓へのLKB1の過剰発現はインスリン抵抗性を改善しなかった。

結 語

重症糖尿病モデルであるdb/dbマウスにおいて肝臓のLKB1の減少が高血糖に関与しており、これをレスキューすることによって糖尿病を改善できる可能性が示された。

参考文献

- 1) Imai K, Inukai K, Ikegami Y, Awata T & Katayama S. LKB1, an upstream AMPK kinase, regulates glucose and lipid metabolism in cultured liver and muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;351:595-601.

- 2) Shaw R J, et al. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 2005;310:1642-6.
- 3) Viana AY, et al. Role of hepatic AMPK activation in glucose metabolism and dexamethasone-induced regulation of AMPK expression. *Diabetes Res Clin Pract* 2006;73:135-42.

研究成果リスト

学会発表

- 1) Sumita T, Ono H, et al. Role of Hepatic LKB1 in the pathophysiology of diabetes in obese diabetic mouse, FASEB summer research conference, AMPK: Central Regulatory System in Metabolism & Growth, 2010年10月4日, 滋賀県 大津プリンスホテル
- 2) 住田崇, 小野啓, 他. 肥満糖尿病マウスにおける肝LKB1の役割, 第27回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会, 2013年2月23日, 東京 JA共済ビル
- 3) 住田崇, 小野啓, 他. 肥満糖尿病マウスにおける肝LKB1の役割, 第56回日本糖尿病学会年次学術集会, 2013年5月18日, 熊本 メルパルク熊本

論文

- 1) Sumita T, Ono H, et. al. Mediobasal hypothalamic PTEN modulates hepatic insulin resistance independently of food intake in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014;307(1):E47-60.