

主論文の要旨

Basigin deficiency prevents anaplerosis and ameliorates insulin resistance and hepatosteatosis

〔 Basigin の欠損は TCA 回路への補充反応を抑制し
インスリン抵抗性と脂肪肝を改善させる 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 腎臓内科学分野

(指導：丸山 彰一 教授)

龍華 章裕

【緒言】

糖尿病は全世界で 4 億 1500 万人もの患者がおり、脂肪肝もアジアで約 30%もの有病率があり、両疾患に対する新規治療開発は喫緊の課題である。糖尿病はインスリン抵抗性により糖新生が亢進しており、糖新生の基質として乳酸が一番多いことは知られているが、この乳酸の輸送を抑制することが糖尿病の治療手段となるかについては検証されていない。

乳酸輸送を担う Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) が細胞膜に発現するには、細胞膜蛋白である CD147/Basigin (BSG) が必要である。我々は BSG 欠損が MCT1 の細胞膜発現を抑制し乳酸・ピルビン酸輸送を抑制することで糖尿病の治療標的となるかを検証した。

【方法】

野生型マウス ($Bsg^{+/+}$) と BSG 欠損マウス ($Bsg^{-/-}$) を用いて、①BSG が乳酸・ピルビン酸代謝に関連するか、②BSG が糖・アミノ酸・脂質代謝に影響するか、③糖尿病・脂肪肝モデルである高脂肪食負荷による $Bsg^{+/+}$ と $Bsg^{-/-}$ の表現系、を検証した。

【結果】

BSG は肝臓と腎尿細管の細胞膜およびミトコンドリアに発現を認めたが、 $Bsg^{-/-}$ では肝細胞および腎尿細管細胞の細胞膜における MCT1 の発現が低下したものの、ミトコンドリアでは変化を認めなかった (Fig 1 A-F)。in vivo の乳酸負荷試験およびピルビン酸負荷試験では $Bsg^{-/-}$ において血中乳酸・ピルビン酸値が上昇したことから、 $Bsg^{-/-}$ では既報同様 MCT1 の細胞膜への translocation が低下することにより細胞内への乳酸・ピルビン酸輸送が抑制されることが示唆された (Fig 1 G-J)。

乳酸・ピルビン酸は肝臓および腎臓の TCA 回路に流入することから、各々のマウスの肝臓・腎臓の metabolomics 解析を行ったところ $Bsg^{-/-}$ の乳酸・ピルビン酸、および TCA 回路の中間代謝産物の臓器含有量が少ないことがわかった (Fig 2 A-C)。そこで各々のマウスから抽出した primary hepatocyte に $^{13}C_3$ 標識乳酸・ピルビン酸を負荷したところ、 $Bsg^{-/-}$ で $^{13}C_3$ 標識された TCA 回路の中間代謝産物の含有量が少なく、medium 中の $^{13}C_3$ 標識乳酸・ピルビン酸の含有量が多いことがわかり (Fig 2 D-E)、このことから、BSG 欠損により乳酸・ピルビン酸の TCA 回路への補充反応が低下することが示された。

糖新生は TCA 回路のオキサロ酢酸から glucose が産生される経路であることから、BSG の糖新生への関連を評価した (Fig 3A)。絶食下では $Bsg^{-/-}$ の血糖値が低く、非絶食下および絶食下における乳酸値とピルビン酸値の差を評価したところ、 $Bsg^{+/+}$ では $Bsg^{-/-}$ に比して乳酸値とピルビン酸値の低下が顕著であることがわかった (Fig 3 B-D)。hepatocyte に対して $^{13}C_3$ 標識乳酸・ピルビン酸を投与すると、 $^{13}C_3$ 標識された糖新生の中間代謝産物であるグルコース 6 リン酸およびフルクトース 6 リン酸の含有量は $Bsg^{-/-}$ の hepatocyte で有意に低下し、in vivo で乳酸・ピルビン酸を負荷した際の血糖値

の上昇も $Bsg^{-/-}$ で有意に抑制された (Fig 3 E-G)。 $Bsg^{+/+}$ および $Bsg^{-/-}$ の hepatocyte に乳酸・ピルビン酸を負荷すると、 $Bsg^{-/-}$ の hepatocyte から産生されたグルコースは野生型の 6 割程度にまで減少し、MCT1 阻害薬である AZD3965 を負荷したところ $Bsg^{+/+}$ の hepatocyte では $Bsg^{-/-}$ の hepatocyte とほぼ同レベルにまでグルコース産生量が低下するのに対し、 $Bsg^{-/-}$ の hepatocyte では影響がなかった (Fig 3 H)。これらのことから、BSG 欠損により MCT1 の乳酸・ピルビン酸輸送低下を介した糖新生が抑制されることが示された。

次に、BSG 欠損による糖新生低下が、アミノ酸からの糖新生で代償されているかを確認するために、各々の hepatocyte に対してピルビン酸からアラニンへの変換酵素である ALT を阻害する β -Cl-Alanine を投与すると、 $Bsg^{-/-}$ の hepatocyte で極端にグルコース産生量が低下し、この状態で L-グルタミンを投与すると $Bsg^{-/-}$ の hepatocyte でその低下がキャンセルされ、そこにグルタミン酸デヒドロゲナーゼである Epigallocatechin Gallate (EGCG) を投与すると、 $Bsg^{-/-}$ の hepatocyte でグルコース産生が顕著に低下した (Fig 4 B, C)。さらに、肝臓の糖原性アミノ酸の含有量が $Bsg^{-/-}$ で顕著に低下しており、アミノ酸の産生源である筋肉のアミノ酸含有量も $Bsg^{-/-}$ で低下していた (Fig 4 D, E) ことから、 $Bsg^{-/-}$ の hepatocyte ではアミノ酸による糖新生が大きく寄与していることがわかった。 *in vivo* のアラニンやグルタミンからのグルコース産生能は、乳酸・ピルビン酸と異なり、両群で変わりがなかった (Fig 4 F, G)。アミノ酸は尿素回路で代謝されアンモニアを産生するため、両群の肝臓における主要な尿素回路に関連する酵素の mRNA を確認したところ $Bsg^{-/-}$ で高い傾向にあり、アンモニアも $Bsg^{-/-}$ で低いことがわかった (Fig 4 H, I)。これらのことから、BSG 欠損による乳酸・ピルビン酸からの糖新生を、アミノ酸からの糖新生で代償しようとしていることが示唆された。

次に、BSG 欠損の脂質代謝における影響を確認した。 $Bsg^{-/-}$ の肝臓において脂肪酸酸化の主要酵素の mRNA が増加し、その下流の代謝産物であるアセチル CoA やケトン体である 3-ヒドロキシ酪酸の含有量も $Bsg^{-/-}$ で有意に増えていることがわかった (Fig 5 A-D)。両群の hepatocyte に対して L-グルタミンを投与し TCA 回路を補充した状態で 3-ヒドロキシ酪酸産生量を評価したところ、 $Bsg^{-/-}$ では有意に低下した (Fig 5 E) ことから、 $Bsg^{-/-}$ のケトン体産生増加の上流が MCT1 の乳酸・ピルビン酸輸送低下による TCA 回路への補充反応低下によるものであることがわかった。これらのことから、 $Bsg^{-/-}$ では脂肪酸酸化が亢進しケトン体産生が増加することがわかった。

以上から、BSG は肝細胞において糖・アミノ酸・脂質代謝に大きく寄与することがわかった。特に BSG を欠損させることで、糖新生が低下すること、さらに脂肪酸酸化亢進やケトン体産生が増加することは、2 型糖尿病および脂肪肝の抑制に繋がる可能性があることから、これらのマウスに、2 型糖尿病および脂肪肝のマウスモデルである高脂肪食投与を 16 週間行った。 $Bsg^{-/-}$ で耐糖能異常の低下を認め (Fig 6 B-H)、脂肪肝が抑制される (Fig 6 I-L) ことが判明した。

【考察】

今回の研究で、BSG が肝細胞の代謝に重要な役割を果たしていることが明らかになった。BSG が欠損すると、乳酸やピルビン酸の細胞内への流入が減少し TCA 回路が抑制され、その結果、①糖新生の抑制、②糖原性アミノ酸による糖新生の代償機構亢進、③脂肪酸酸化およびケトン体の産生亢進につながるということが明らかとなった。

近年、肝臓のミトコンドリア内にピルビン酸を輸送する MPC (mitochondrial pyruvate carrier) を欠損させることで糖新生を抑制させた報告や、MCT1 ヘテロノックアウトマウスで乳酸の臓器輸送低下による AMPK の活性化によって脂肪肝が抑制されたことが報告されており、乳酸・ピルビン酸といったモノカルボン酸の輸送に注目が集まっている。我々も *Bsg*^{-/-} で糖新生や脂肪肝が抑制されたが、その機序は MCT1 発現低下による TCA 回路の補充反応抑制であった。以上から、糖尿病・脂肪肝の治療標的として TCA 回路への補充反応抑制が重要な機序である可能性がある。

本研究では、BSG 欠損はミトコンドリアにおける MCT1 の発現に影響を与えておらず、MCT1 の局在に及ぼす影響は細胞膜選択的なものと結論づけたが、BSG の欠損によりミトコンドリアの MCT1 のモノカルボン酸の輸送を機能的に低下させている可能性までは否定できておらず、今後の検討課題となった。ただ、BSG の欠損による MCT1 の影響が細胞膜選択的であれば、MCT1 の欠損または阻害よりも優れている可能性がある。細胞膜およびミトコンドリアの MCT1 の阻害は、乳酸・ピルビン酸のミトコンドリア内への輸送をより強く低下させ、より強い表現型を生じる可能性があるからである。実際、MCT1 の完全ノックアウトマウスは胎生致死であることが知られている。以上から、BSG 欠損による乳酸・ピルビン酸の輸送を抑制することは、今後糖尿病や脂肪肝の治療標的となり得る可能性がある。

【結語】

BSG 欠損は TCA 回路への補充反応を抑制することでインスリン抵抗性と脂肪肝を改善させる。今後、糖尿病と脂肪肝の治療への応用が期待される。