

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06800

研究課題名(和文)新規肥満・糖尿病モデルZFDMラットの病態発症機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of pathogenesis of diabetes in the novel obese diabetes model ZFDM rat

研究代表者

横井 伯英 (YOKOI, NORIHIDE)

神戸大学・医学研究科・特命准教授

研究者番号：70311610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、研究代表者らが新規に確立した肥満・糖尿病モデルZFDMラットの病態発症機構を明らかにすることを目的とし、メタボローム解析を中心とした詳細な表現型解析ならびに単離膵島を用いたインスリン分泌障害のメカニズムの検討を行った。その結果、糖尿病発症前に肥大した膵島が出現すること、肥大膵島はインスリン分泌障害を呈すること、肥大膵島では解糖系およびヘキソサミン生合成経路の亢進によりタンパク質の糖鎖修飾の一つであるO-GlcNAc化が亢進していることがわかった。本研究の成果は、糖尿病の病態の解明や新規のメカニズムに基づく治療薬の開発の基盤となる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to elucidate the pathogenesis of diabetes in the novel animal model of obese type 2 diabetes, the Zucker fatty diabetes mellitus (ZFDM) rat. By insulin secretion experiment, transcriptome analysis, metabolome analysis, and western blotting of isolated pancreatic islets, we found that the number of large islets increased with age and insulin secretion was impaired in the large islets. We also found that glycolysis and hexosamine biosynthesis pathways were enhanced and downstream O-GlcNAcylation of proteins was increased in the large islets. These findings may underlie the elucidation of pathogenesis of diabetes and development of drugs based on the novel mechanism.

研究分野：分子代謝学、実験動物学

キーワード：糖尿病 疾患モデル インスリン分泌障害 メタボローム解析 病態発症機構

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は多因子疾患の代表例であり、その発症には遺伝因子と環境因子が複雑に関与する。糖尿病は地球規模で増加し続けており、世界の糖尿病人口は 2030 年に 5 億人に達すると予想され、我が国では予備群を合せると 2,000 万人を越えるなど、その克服は医学的、社会的にも極めて重要な課題である。インスリン抵抗性とインスリン分泌不全が糖尿病発症の基盤にあるが、初期の代謝異常の発現、代謝異常の進展、重度の糖尿病への進行など、糖尿病の発症・進展機構については不明な点が多い。糖尿病は糖代謝異常が病態の中心であるにもかかわらず、病態の鍵となる代謝物や代謝経路、さらにはその標的や制御分子についてはほとんど明らかでない。従って、糖尿病の核心的な病態解明には包括的代謝物解析(メタボローム解析)を取り入れたアプローチが不可欠である。また、糖尿病のような多因子疾患の発症・進展機構を解明するには、遺伝的にも環境的にも統御可能な動物モデルを用いた解析が有力な手段である。

最近、研究代表者は肥満モデル Zucker fatty (ZF) ラットを起源とする新たな肥満・糖尿病モデルとして Zucker fatty diabetes mellitus (ZFDM) ラットを確立した (Yokoi et al., J. Diabetes Res., 2013)。ZFDM ラットは、ZF ラット由来のレプチン受容体遺伝子変異 (fatty, fa) を有する。ZFDM 系統の fa/fa オスは 10 週齢以降 20 週齢ごろまでに全例が糖尿病を発症するため、初期の代謝異常の発現から重度の糖尿病の進展まで経時的な観察が容易である。

これまで、研究代表者は 1 型糖尿病モデル KDP ラットや 2 型糖尿病モデル SDT ラットの病態発症機構の解明に関する研究に従事しており、糖尿病モデルラットを用いた遺伝学的、組織学的、病態生理学的解析に習熟している。また、研究代表者が所属する研究室にはキャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS) および液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いたメタボローム解析の基盤が整備されている。

そこで、新規の肥満・糖尿病モデル ZFDM ラットを対象とするメタボローム解析を中心とした検討によって、単に一つの動物モデルの病態発症機構の解明だけでなく、ヒトにおける類似の糖尿病の病態の解明や新規のメカニズムに基づく創薬の基盤確立に直結する成果が得られると考え、本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らが新規に確立した肥満・糖尿病モデル Zucker fatty diabetes mellitus (ZFDM) ラットを対象として、メタボローム解析を中心とした詳細な表現型解析ならびに単離膵島を用いたインスリン分泌障害のメカニズムの検討により、当該ラットの病態発症機構を明らかにする。本研究

は、糖尿病の病態の解明や新規のメカニズムに基づく治療薬の開発の基盤となるだけでなく、他の類似研究における疾患モデルの有用性を実証するものである。

3. 研究の方法

(1) 病態発症・進展過程の経時的な表現型の解明:

新規の肥満・糖尿病モデル ZFDM ラットについて経時的に耐糖能、インスリン抵抗性、膵臓の組織構築などを検討し、病態発症・進展過程の表現型を明らかにする。

(2) 病態発症・進展過程の経時的な代謝プロファイルの解明:

経時的に採取した血漿および各種臓器(肝臓、膵臓、骨格筋、脂肪)を用いたメタボローム解析により、病態発症・進展過程の代謝プロファイルを明らかにするとともに病態発症・進展に関する代謝物・代謝経路を同定する。

(3) 単離膵島を用いたインスリン分泌障害のメカニズムの解明:

単離膵島を用いて、各種刺激によるインスリン分泌障害について検討するとともにメタボローム解析によりインスリン分泌障害に関する代謝物・代謝経路を同定する。

(4) 病態発症・進展に関する代謝物・代謝経路についての細胞レベルおよび個体レベルの解析:

上記(2)および(3)の解析から特定された代謝物・代謝経路について、細胞レベルおよび個体レベルの解析により病態生理学的な意義を明らかにする。

4. 研究成果

(1) ZFDM 系統の fa/fa 個体(肥満・糖尿病発症)と対照の fa/+ 個体(正常体重、糖尿病発症なし)のオスについて、6 週齢から糖尿病発症後の 24 週齢まで経時的に経口糖負荷試験による耐糖能の評価、インスリン負荷試験によるインスリン抵抗性評価、膵臓の組織学的解析を行った。その結果、経時的に耐糖能が悪化すること、重度のインスリン抵抗性が継続すること、12 週齢頃を境として膵島構築が破壊され β 細胞が減少することがわかった。

(2) および(3) ZFDM 系統の fa/fa 個体と対照の fa/+ 個体のオスについて、6 週齢から糖尿病発症後の 24 週齢まで経時的に採血するとともに、別個体を用いて経時的に各種臓器(肝臓、膵臓、骨格筋、脂肪)を採取し、血漿および臓器サンプルを用いてメタボローム解析を行った。また、8 週齢および 12 週齢時に単離した膵島を用いて、インスリン分泌実験、メタボローム解析およびトランスクリプトーム解析を行った。その結果、12 週齢の

fa/fa 個体において肥大した膵島が認められること、肥大膵島ではインクレチン応答性インスリン分泌が障害されていること、肥大膵島ではインクレチン受容体の発現低下、解糖系の亢進、乳酸産生の亢進、TCA 回路の減弱、グルコースからのグルタミン酸産生の減弱などの異常が認められた。これらが肥大膵島におけるインクレチン応答性インスリン分泌障害に関与することが示唆された。

(4) 上記の単離膵島を用いた解析により解糖系から分岐するヘキソサミン生合成経路の亢進が示唆され、実際にこの経路の最終産物である UDP-GlcNAc が結合した O-GlcNAc 化タンパク質の増加が認められた。O-GlcNAc 修飾はタンパク質のセリンおよびスレオニンを標的としており、プロテインキナーゼ A (PKA) のリン酸化と競合することが想定される。従って、肥大膵島におけるインクレチン応答性インスリン分泌障害の機序として O-GlcNAc 化の亢進によるインクレチン/cAMP/PKA シグナルの阻害が考えられた。

今後、プロテオーム解析により肥大膵島における O-GlcNAc 化タンパク質を同定し、インスリン分泌障害の鍵となる分子メカニズムを解明する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

Takahashi H, Hidaka S, Seki C, Yokoi N, Seino S. Characteristics of repaglinide effects on insulin secretion. **Eur. J. Pharmacol.** (査読有) 828:52-59, 2018 [doi: 10.1016/j.ejphar.2018.03.025]

Murao N, Yokoi N, Honda K, Han G, Hayami T, Gheni G, Takahashi H, Minami K, Seino S. Essential roles of aspartate aminotransferase 1 and vesicular glutamate transporters in β -cell glutamate signaling for incretin-induced insulin secretion. **PLoS One** (査読有) 12:e0187213, 2017 [doi: 10.1371/journal.pone.0187213]

Seino S, Sugawara K, Yokoi N, Takahashi H. β -cell signaling and insulin secretagogues: a path for improved diabetes therapy. **Diabetes Obes. Metab.** (査読有) 19 (Suppl 1):22-29, 2017 (Review) [doi: 10.1111/dom.12995]

Nakanishi S, Kuramoto T, Kashiwazaki N, Yokoi N. Genetic profiling of two phenotypically distinct outbred rats derived from a colony of the Zucker fatty rats maintained at the Tokyo Medical University. **Exp.**

Anim. (査読有) 66:91-98, 2017 [doi: 10.1538/expanim.16-0068]

横井 伯英、清野 進. メタボロミクスを用いた糖尿病研究 - インクレチン作用メカニズムの解明と糖尿病バイオマーカーの探索を例に. **実験医学** (査読有) 35:346-351, 2017

Sugawara K, Honda K, Reien Y, Yokoi N, Seki C, Takahashi H, Minami K, Mori I, Matsumoto A, Nakaya H, Seino S. A novel diphenylthiosemicarbazide is a potential insulin secretagogue for anti-diabetic agent. **PLoS One** (査読有) 11:e0164785, 2016 [doi: 10.1371/journal.pone.0164785]

横井 伯英. 動物モデルをもとにした糖尿病遺伝素因の解明. **糖尿病** (査読有) 59:16-17, 2016

横井 伯英、清野 進. インクレチンの膵作用: ホルモン分泌と細胞量の調節. **最新医学** (査読有) 71:17-22, 2016

Yokoi N, Gheni G, Takahashi H, Seino S. β -cell glutamate signaling: Its role in incretin-induced insulin secretion. **J. Diabetes Investig.** (査読有) 7:38-43, 2016 (Review) [doi: 10.1111/jdi.12468]

Yokoi N. Elucidation of genetic factors in diabetes based on studies of animal models. **Diabetol. Int.** (査読有) 6:255-260, 2015 (Review) [doi: 10.1007/s13340-015-0228-9]

グブルジャン ゲニ、横井 伯英、清野 進. グルタミン酸シグナリングによるインスリン分泌制御. **実験医学** (査読有) 33:1641-1647, 2015

[学会発表](計 20 件)

速水 智英、横井 伯英、日高 志保美、川畑 綾子、グブルジャン ゲニ、マヒラ アシム、高橋 晴美、神谷 英紀、清野 裕、中村 二郎、清野 進. 肥満糖尿病の膵島におけるインクレチン応答性障害オミクス解析による検討. 第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会、東京国際フォーラム (東京都) 2018 年 5 月 24 日

横井 伯英、速水 智英、波多野 直哉、日高 志保美、川畑 綾子、星野 貴一、星野 雅行、清野 進. 肥満糖尿病モデル ZFDM ラットの膵島におけるタンパク質糖鎖修飾の病態生理学的意義. 第 65 回日本実験動物会総会、富山県民会館

(富山県) 2018年5月18日

Yokoi N, Hayami T, Hidaka S, Takahashi H, Seino S. Omics-based characterization of impaired incretin responsiveness in the pancreatic islets of the ZFDM rat, an animal model of obese type 2 diabetes. The 19th Servier-International Group on Insulin Secretion Symposium, Nice (France) March 23, 2018

速水 智英、横井 伯英、本田 洸平、マヒラ アシム、高橋 晴美、清野 進. ZFDM ラットにおけるインクレチン応答性インスリン分泌障害機序 オミクス解析による検討. 第32回日本糖尿病・肥満動物学会, ウィンクあいち(愛知県) 2018年2月23日

Yokoi N, Hashim M, Gheni G, Takahashi H, Seino S. Formation of Pseudoislets Induces Incretin Responsiveness in Incretin-unresponsive Clonal Beta Cells: Possible Role of an Amino Acid Transporter. The 53rd EASD Annual Meeting, Lisbon (Portugal) September 14, 2017

横井 伯英、速水 智英、本田 洸平、山口 拓郎、グブルジャン ゲニ、マヒラ アシム、日高 志保美、川畑 綾子、星野 貴一、星野 雅行、清野 進. 肥満・2型糖尿病モデル ZFDM ラットにおけるインクレチン応答性インスリン分泌障害の発症機序. 第64回日本実験動物学会総会, ビッグパレットふくしま(福島県) 2017年5月25日

横井 伯英、村尾 直哉、高橋 晴美、清野 進. Incretin and beta-cell metabolic signaling. シンポジウム「Explore the possibility of incretins: インクレチンの可能性について探る」第60回日本糖尿病学会年次学術集会, 名古屋国際会議場(愛知県) 2017年5月19日

速水 智英、横井 伯英、本田 洸平、山口 拓郎、グブルジャン ゲニ、マヒラ アシム、星川 律子、清野 進. 肥満糖尿病におけるインクレチン応答性インスリン分泌障害機序の解明 - ZFDM ラット膵島を用いた検討 -. 第60回日本糖尿病学会年次学術集会, 名古屋国際会議場(愛知県) 2017年5月19日

村尾 直哉、横井 伯英、韓 桂栄、グブルジャン ゲニ、清野 進. 膵β細胞グルタミン酸シグナルのインスリン分泌における役割の解明 -CRISPR/Cas9 によ

る遺伝子改変膵β細胞株を用いた検討. 第60回日本糖尿病学会年次学術集会, 名古屋国際会議場(愛知県) 2017年5月19日

本田 洸平、横井 伯英、山口 拓郎、グブルジャン ゲニ、速水 智英、星川 律子、清野 進. メタボローム解析を用いたインクレチン応答性インスリン分泌障害の原因探索 - ZFDM ラット膵島を用いた検討 -. 第31回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会, はまぎんホール(神奈川県) 2017年2月11日

Yokoi N, Hoshikawa R, Matsubara T, Seino S. Simultaneous quantification of tryptophan-related metabolites as biomarkers for prediabetes. The 64th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, San Antonio (USA) June 5-9, 2016

Yokoi N, Hoshikawa R, Matsubara T, Hirano I, Seino S. Selective and sensitive quantification of glucagon and glucagon-related peptide hormones in human plasma using conventional LC/MS/MS. The 64th American Society for Mass Spectrometry (ASMS) Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, San Antonio (USA) June 5-9, 2016

横井 伯英、清野 進. メタボロミクスによる糖尿病の病態解析. シンポジウム「Omics approaches for understanding the mechanism of type 2 diabetes」第59回日本糖尿病学会年次学術集会, 国立京都国際会館(京都府) 2016年5月20日

本田 洸平、横井 伯英、山口 拓郎、田村 香楠子、グブルジャン ゲニ、清野 進. 肥満糖尿病におけるインクレチン応答性インスリン分泌障害の原因探索 -ZFDM ラットを用いた検討-. 第59回日本糖尿病学会年次学術集会, 国立京都国際会館(京都府) 2016年5月19日

村尾 直哉、横井 伯英、韓 桂栄、グブルジャン ゲニ、清野 進. CRISPR-Cas9 システムを用いたグルタミン酸シグナル関連遺伝子欠損膵β細胞株の樹立とその解析. 第59回日本糖尿病学会年次学術集会, 国立京都国際会館(京都府) 2016年5月19日

本田 洸平、横井 伯英、山口 拓郎、田村 香楠子、グブルジャン ゲニ、清野 進. 新規肥満・糖尿病モデル ZFDM ラットにおける耐糖能障害の原因探索. 第30

回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会, 大宮ソニックシティビル(埼玉県)
2016年3月12日

Yokoi N, Hashim M, Gheni G, Hoshikawa R, Seino S. Mechanism of Induction of Incretin Responsiveness by Formation of Pseudoislets. The 7th AASD Scientific Meeting and Annual Scientific Meeting of the Hong Kong Society of Endocrinology, Metabolism and Reproduction, Hong Kong (China) November 21, 2015

横井 伯英, 山口 拓郎, グブルジャン ゲニ, 別府 正悠, 日高 志保美, 川畑 綾子, 星野 貴一, 星野 雅行, 清野 進. 新規肥満・2型糖尿病モデル ZFDM ラットにおける糖尿病発症前の表現型解析. 第 62 回日本実験動物学会総会, 京都テルサ(京都府) 2015年5月30日

山口 拓郎, 横井 伯英, グブルジャン ゲニ, 別府 正悠, 日高 志保美, 星川 律子, 清野 進. 新規 2 型糖尿病モデル Zucker fatty diabetes mellitus(ZFDM) ラットにおける糖代謝関連表現型の経時的解析. 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会, 海峡メッセ下関(山口県) 2015年5月23日

横井 伯英, グブルジャン ゲニ, 小倉 雅仁, 岩崎 真宏, 清野 進. グルタミン酸シグナリングとβ細胞不全. シンポジウム「膵β細胞不全のメカニズム - 機能障害から細胞死まで - 」第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会, 海峡メッセ下関(山口県) 2015年5月22日

[その他]

ホームページ等

神戸大学医学研究科分子代謝医学ホームページ

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/phys1/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

横井 伯英 (YOKOI, Norihide)

神戸大学・大学院医学研究科・特命准教授

研究者番号：70311610