

令和元年6月20日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09789

研究課題名(和文) コレステロール合成阻害による糖尿病発症機構解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Diabetes mellitus induced by inhibition of cholesterol synthesis: clarification of the pathogenesis and development of its therapy

研究代表者

石橋 俊 (Ishibashi, Shun)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：90212919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：スタチンは糖尿病の新規発症を増加させることが知られているが、その機序は不明である。そこで、FloxedHMG-CoA還元酵素(HMGCR)マウスとrat insulin 2 promoter Cre過剰発現マウスとの交配によって、膵細胞特異的なHMGCR欠損マウスを得た。生後早期よりインスリン分泌不全に起因する糖尿病を発症した。膵細胞数が選択的に減少した。一部グルコゴンとインスリン共陽性細胞が認められ、細胞から細胞へのtransdifferentiationが推測された。細胞分化にかかわるPDX1等の転写因子の発現が低下した。メパロン酸投与では高血糖の改善を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵細胞特異的なHMGCRの欠損は、膵細胞の減少を来し、インスリン分泌低下及び高血糖を来すことが明らかとなっている。マウスの遺伝子改変モデルによっても、膵細胞の形態維持や分化・増殖能におけるHMGCRの関与が確認された。今後、このモデルを用いて、膵細胞障害の発症機序の詳細の解明が期待出来る。そこを標的にし、スタチン投与または機能低下型HMGCR変異に起因する2型糖尿病の発症予防や治療法の開発が期待される。該当する患者数は少ないため、世界的に増加し続ける糖尿病患者数の低減に貢献できる可能性が大きい。

研究成果の概要(英文)：Inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMGCR), statins, which are used to prevent cardiovascular diseases, are associated with a modest increase in the risk of new-onset diabetes mellitus. To investigate the role of HMGCR in the development of  $\beta$  cells and glucose homeostasis, we deleted Hmgcr in a  $\beta$  cell-specific manner by using Cre-loxP technique in vivo. Mice lacking Hmgcr in  $\beta$  cells ( $\beta$ -KO) exhibited hypoinsulinemic hyperglycemia due to decreases in both  $\beta$  cell mass and insulin secretion. mRNA expression of Ngn3 was maintained despite the striking reduction of the expression of genes which characterize  $\beta$  cell identity such as insulin, Pdx1 and MafA in the islets from  $\beta$ -KO mice. Numbers of  $\beta$  cells were markedly reduced, some of which were also positive for glucagon. In conclusion, HMGCR plays critical roles not only in insulin secretion but also in the development of  $\beta$  cells in mice.

研究分野：代謝

キーワード：コレステロール 糖尿病 マウス 膵細胞 インスリン スタチン HMG-CoA還元酵素 グルカゴン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

HMG-CoA 還元酵素(HMGCR)はメバロン酸経路において HMG-CoA をメバロン酸へ変換する律速酵素である [1]。HMGCR の阻害薬であるスタチンは強力な血中リポ蛋白代謝改善作用を有し、これまで動脈硬化症の治療に広く使用されている。

一方で、スタチンによる臓器障害すなわち、筋障害や肝障害も稀ではあるが出現し、さらに近年糖尿病の新規発症リスクが約 9%増加すると報告された[2]。また *HMGCR* の遺伝子多型でも糖尿病の新規発症が増えることが報告されている。スタチンが糖尿病を引き起こす機序として主に *In vitro* の研究報告であるが、HMGCR の下流でコレステロール合成とは別の経路で合成される非ステロール産物であるイソプレノイド類の減少により、低分子 G 蛋白が阻害されインスリン分泌を阻害する機序、膵細胞の L 型 Ca チャネルを阻害しインスリン分泌を阻害する機序、脂溶性スタチンの細胞毒性によりインスリン分泌を阻害する機序、脂質ラフトに存在するインスリン顆粒の分泌に必要な SNARE(soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment receptor)蛋白が減少することによるインスリン分泌障害の機序等が報告されている。一方で、イソプレノイド類の減少により脂肪細胞における glucose transporter 4 (GLUT4)の発現が低下してインスリン抵抗性を惹起する機序、蓄積した脂肪酸が筋細胞のインスリン受容体基質のチロシンリン酸化を阻害してインスリン抵抗性を惹起する機序も報告されているが、原因は明らかにはなっていない。またこれらの研究はスタチンを用いた薬理的な実験である。一方でスタチンにはメバロン酸経路外に作用する非特異的効果(off-target effects)が報告されている。遺伝学的に HMGCR を阻害できれば、スタチンの off-target effects の可能性を排除して実験結果の解釈が可能となる。しかし以前我々が作製した全身での *Hmgcr* を欠損させたマウスは胎生致死となった[3]。

## 2. 研究の目的

膵細胞におけるコレステロール合成を遺伝学的に阻害し、膵島の発生・分化、インスリン分泌能・耐糖能を調べる、具体的には、Cre-loxP システムを用いて作成した膵細胞特異的な *Hmgcr* 欠損マウスを用いて解析する。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 実験動物

すべての動物実験は自治医科大学動物実験規定に従い施行した。

*Hmgcr* 遺伝子の開始コドンの位置するエクソン 2 を含むエクソン 2、3、4 の上流及び下流に loxP 配列を挿入した floxed *Hmgcr* マウス[4]に、膵細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する rat insulin 2 promoter Cre トランスジェニックマウス(以下 Cre)を交配することにより膵細胞特異的 *Hmgcr* 欠損(以下 -KO)マウスを作製した。マウスは全て C57BL/6J マウスをバックグラウンドとした。

### 3-2. Reverse transcription-PCR(RT-PCR)

*Hmgcr* 遺伝子が欠損した disrupted allele を検出した。

### 3-3. 血中代謝パラメーターの測定

後眼窩採血を行い、空腹時採血は 16 時間絶食後に採血を行った。血糖値はグルコース C テストワコー(和光純薬工業株式会社)、インスリン値はマウスインスリン測定キット(森永生科学研究所)、グルカゴン値はグルカゴン ELISA キット(Merckdia)、総コレステロール値はデタミナー L TC (協和メデックス株式会社)、トリグリセライド値は L タイプワコー TG・M(和光純薬工業株式会社)、遊離脂肪酸値は NEFA C テストワコー(和光純薬工業株式会社)を用いて測定

した。

#### 3-4. 経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT)とインスリン感受性試験 (ITT)

OGTTは16時間の絶食後に2 mg/gのブドウ糖溶液を経口ゾンデを用いて経口投与し、尾静脈から採血を行った。ITTは4時間の絶食後に0.75 U/kgのインスリンを腹腔内投与し、尾静脈から採血を行った。

#### 3-5. 膵島の単離

膵島の単離はコラゲナーゼ (Sigma-Aldrich C7657) を用いて行った。

#### 3-6. 単離膵島の解析

大きさをそろえた10個の膵島を37℃で10分間インキュベートした後、2.8mMあるいは20mMグルコース溶液を入れ37℃で1時間インキュベートした。その後上清を回収してインスリン濃度を測定してインスリン分泌能を評価した[18]。

#### 3-7. 組織学的評価

パラフィン切片は polyclonal guinea pig anti-insulin 抗体(Dako)及び、polyclonal rabbit anti-glucagon 抗体 (Progen Biotechnik) monoclonal rabbit anti-Ki67 抗体(abcam)の1次抗体で処理して室温で一晩インキュベートした。ビオチン標識2次抗体(Vector Laboratories)で処理して、Vectastain ABC systems (Vector) で処理し、diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)で反応させ光学顕微鏡 AX-80 にて画像を撮影した。TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl transferase deoxyuracil triphosphate nick end labeling)染色は In situ Apoptosis Detection キット(タカラ)を用いて行った。インスリン、グルカゴンを蛍光染色した。共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV-1000 を用いて撮影した。

#### 3-8. RNA 抽出及び real-time PCR (RT-qPCR)

TRIzol 試薬 (Invitrogen) を用いて RNA 抽出を行い、High-capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit (Applied Biosystems)を用いて cDNA を合成した。StepOnePlus(Thermo Fisher)を用いて real-time PCR を施行した。actin を内部標準として使用した。

#### 3-9. 統計解析

データはすべて平均値 ± 標準偏差で示した。2群間では Student's t 検定を行った。多群間の多重比較は two-way ANOVA の後、Bonferroni 法により検定を行った。

### 4. 研究成果

#### 4-1. -K0 マウスの表現型の解析

##### 4-1-1. -K0 マウスにおける *Hmgcr* 欠損の確認

膵島特異的に *Hmgcr* が欠損していることを確認した。また -K0マウスの膵島における *Hmgcr* 遺伝子発現は、コントロールと比較して78%抑制されていた。肝臓と小腸での *Hmgcr* 遺伝子の発現もそれぞれ57%、59%低下が認められた。

##### 4-1-2. -K0 マウスの体重

-K0 マウスはコントロールと比較して全身像に明らかな違いは認められなかった。コントロールと比較して -K0 マウスでは14週齢以降で体重減少を認めたが、-K0 マウスでは摂食量の低下はなく、直腸温度もコントロールで  $36.63 \pm 0.19$  に対して -K0 マウスで  $36.63 \pm 0.28$  と有意差は認められなかった。精巣上体脂肪組織重量がコントロール  $0.26 \pm 0.05$  g に対して -K0 マウスで  $0.14 \pm 0.07$  g と低下が認められた。

#### 4-2. 血糖値、インスリン値、グルカゴン値の解析

##### 4-2-1. 空腹時及び摂食時血糖値、インスリン値

出生直後においても  $\beta$ -KO マウスは見た目に変化は認められなかったが、5 週齢で  $\beta$ -KO マウスの空腹時血糖値はと顕著な上昇を認め、10 週齢でも顕著な上昇を認めた(図 1A)。空腹時の  $\beta$ -KO マウスの血漿インスリン値は低下が認められた(図 1B)。  $\beta$ -KO マウスは摂食時血糖値の顕著な上昇を認めた(図 1C)。摂食時の血漿インスリン値も低下が認められた(図 1D)。

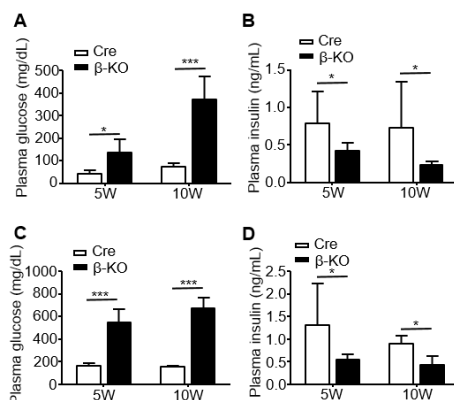


図 1. 空腹時及び摂食時血糖値、インスリン値

Cre は白い棒グラフ、  $\beta$ -KO は黒い棒グラフで示した。\* $P$ <0.05、\*\* $P$ <0.01、\*\*\* $P$ <0.001。

#### 4-2-2. 摂食時グルカゴン値

5 週齢のマウスの摂食時グルカゴン値はコントロール  $2.93 \pm 1.97$  pmol/L に対し  $\beta$ -KO マウス  $8.42 \pm 4.09$  pmol/L と上昇が認められた。

#### 3-2-3. 出生後の血糖値の推移

マウスの離乳前から血糖値の上昇が認められるか確認するため、出生直後の生後 9 日目から生後 21 日目までのマウスの 6 時間絶食後の空腹時血糖値を調べた。空腹時血糖値は  $\beta$ -KO マウスでは生後 9 日目で既に上昇していた。

#### 4-2-4. OGTT 及び ITT

OGTT ではコントロールと比較して  $\beta$ -KO マウスで血糖値の上昇を認めたが、ITT では 2 群で差は認められず、  $\beta$ -KO マウスでインスリン分泌障害により高血糖を来していると考えられた。

#### 4-2-5. 血漿脂質の評価

血漿総コレステロールは 2 群で変化は認められなかった。

#### 4-3. 組織学的評価

##### 4-3-1. 膵臓の免疫染色

インスリン分泌が障害されている原因を調べるために組織学的解析を行った。膵臓の免疫染色では  $\beta$ -KO マウスで、膵島の数の減少及び面積の減少が認められた(図 2A)。マウス 1 匹あたり 4 切片の免疫染色で評価したところ、  $\beta$ -KO マウスで全膵臓面積に対する膵島の数は 46%減少し(図 2B)、全膵臓面積に対する膵島面積は 65%減少を認めた(図 2C)。細胞及び細胞の面積は、全膵臓面積に対するグルカゴン陽性及びインスリン陽性面積として評価したところ、  $\beta$ -KO マウスで細胞の面積は 83%減少を認めたが(図 2D)、細胞の面積に変化は認められなかった(図 2E)。

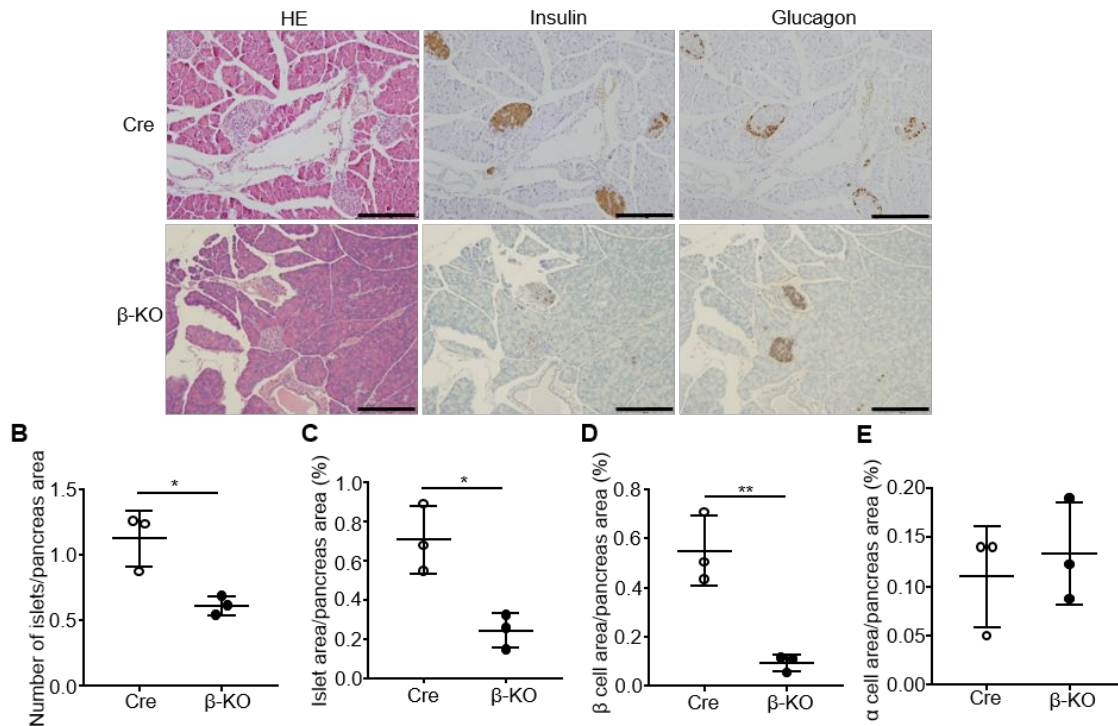


図 2. 膵臓の組織所見

Cre は白丸、 $\beta$ -KO は黒丸で示した。\*P<0.05、\*\*P<0.01、\*\*\*P<0.001。

#### 4-3-2. 膵島の蛍光染色

蛍光染色では  $\beta$ -KO マウスの膵島は典型的な円形の形ではなく崩れており、細胞の減少も認められた。また中心に細胞が存在しその周囲を細胞が取り囲むマントル・コア構造も破壊されており、中心に細胞が認められた。

#### 4-3-3. TUNEL 染色及び Ki67 染色

膵細胞数の減少が細胞死によるものか、細胞増殖の低下によるものかを評価するため、5週齢のマウスの膵臓で TUNEL 染色や Ki67 に対する免疫染色も行ったが、TUNEL 染色陽性細胞や Ki67 陽性細胞の増加は認められなかった。

#### 4-4. 単離膵島の評価

##### 3-4-1. インスリン分泌能及びインスリン含量

*Hmgcr* 欠損によるインスリン分泌への影響を評価するため、単離膵島のインスリン分泌能を測定した。低濃度(2.8mM グルコース溶液)のグルコース刺激によるインスリン分泌能は保たれていたが、高濃度(20mM)のグルコース刺激によるインスリン分泌能は  $\beta$ -KO マウスで低下が認められた。インスリン含量も  $\beta$ -KO マウスで低下が認められた。

##### 4-4-2. 膵島の遺伝子発現

5 週齢のマウスから単離した膵島の遺伝子発現を調べたところ、細胞の機能に重要な *insulin 1 (Ins1)* の発現低下を認めた。また細胞の分化や成熟に重要な転写因子である pancreatic and duodenal homeobox 1 (*Pdx1*)、neurogenic differentiation 1 (*Neurod1*)、musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family A (*MafA*) の遺伝子発現の低下も認められたが、胎生期の膵内分泌前駆細胞に一過性に発現する neurogenin 3 (*Ngn3*) の遺伝子発現の低下は認められなかった。

##### 4-4-3. 膵島の脂質評価

単離膵島の総コレステロール含量を測定したところ、 $\beta$ -KO マウスの膵島で低下が認められた。これは *Hmgcr* 欠損による影響と考えられた。またコレステロール代謝に関わる遺伝子発現を単

離腺島で調べたところ、コレステロール代謝を制御する転写因子である *Srebp-2* や SREBP-2 の標的遺伝子である *LDLR* が -KO マウスで低下を認めた。コレステロール合成に関わる *HMGCS* や *SQS* は 2 群で変化は認められなかった。

<結語>

腺 細胞特異的な *Hmgcr* の欠損は、腺 細胞の減少を来し、また腺島のインスリン分泌低下も来すため、糖尿病を引き起こすことが明らかとなった。出生前後の 細胞の増殖障害や、細胞から 細胞への transdifferentiation が 細胞の減少に関わっている可能性が考えられ、発生段階における 細胞の維持にメバロン酸経路が重要であることが示唆された。

<引用文献>

Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 343:425-30,1990.

Satter N, et al. Statins and risk of incident diabetes: a collaborative meta-analysis of randomised statin trials. *Lancet*. 375:735-42,2010.

Ohash K, et al. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase gene. *J Biol Chem*. 278: 42936-41,2003.

Nagashima S, et al. Liver-specific deletion of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase causes hepatic steatosis and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 32:1824-1831,2012.

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Sakai K, et al. Myeloid HMG-CoA (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A) reductase determines atherosclerosis by modulating migration of macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 査読有、2018 Nov;38(11):2590-2600. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311664.

〔学会発表〕(計 2 件)

武井祥子 他. 腺 細胞特異的 HMG-CoA 還元酵素欠損マウスにおける糖尿病発症機序の解析 日本糖尿病学会年次学術集会 2017.5 月

永島秀一 他. 脂質治療の展望-量から質へのパラダイムシフト コレステロール合成系と糖代謝の cross talk 組織特異的遺伝子改変マウスを用いた検討 日本糖尿病学会年次学術集会 2018.5 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

## 6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名： 武井祥子、 武井暁一、 永島秀一

ローマ字氏名： (TAKEI, shoko), (TAKEI, akihito), (NAGASHIMA, shuichi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。