

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19529

研究課題名(和文)臓器別インスリン受容体欠損が全身糖利用に及ぼす影響

研究課題名(英文)Effect of tissue specific insulin receptor knockout on whole body glucose oxidization

研究代表者

高橋 圭 (Takahashi, Kei)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00644808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：安定同位体 $^{13}\text{C}$ で標識されたグルコースを投与後に呼気へと排出される $^{13}\text{C}\text{O}_2$ を測定する試験を $^{13}\text{C}$ -GBTと呼ぶが、我々これまでに $^{13}\text{C}$ -GBTを用いた動物実験に成功している。そこで、種々の臓器におけるインスリン作用の低下が個体レベルの糖利用に及ぼす影響を解明することを目的に本研究を行った。後天的に臓器特異的にインスリン作用を低下させたマウスで $^{13}\text{C}$ -GBTを行ったところ、これらのマウスでは個体レベルのグルコース酸化を増加することが判明した。これらの結果から、多量のグルコースの酸化と $\text{CO}_2$ 産生が行われている組織が存在することが示唆された。

研究成果の概要(英文)： $^{13}\text{C}$ -glucose breath test ( $^{13}\text{C}$ -GBT) evaluates abundance of  $^{13}\text{C}\text{O}_2$  in exhaled air after oral administration of  $^{13}\text{C}$ -glucose, a glucose molecule labeled with stable isotope  $^{13}\text{C}$ . Through previous experiments, we found out that  $^{13}\text{C}$ -GBT can be used to determine whole body glucose oxidation in mice. The aim of the present study was to elucidate whether and how alteration of insulin actions in individual tissues affect whole body glucose oxidation. We generated inducible tissue specific insulin receptor knockout mice and administered them with  $^{13}\text{C}$ -glucose. We found that whole body glucose oxidation increases in these mice. These results suggest the existence of unspecified tissue that oxidizes great amount of glucose and thus produces large amount of  $\text{CO}_2$ .

研究分野：糖尿病

キーワード： $^{13}\text{C}$ -グルコース負荷試験 肝臓 骨格筋 インスリン抵抗性 糖代謝異常

### 1. 研究開始当初の背景

世界には推計2億8,500万人の糖尿病罹患患者が存在する。この数は2030年までに現在の2倍に達すると予想されており、重大な社会問題となっている。ヒトを含む哺乳類の糖代謝は、膵β細胞からのインスリン分泌と、インスリン感受性組織におけるインスリン作用(例えば肝臓、骨格筋や脂肪組織などにおける糖利用の促進や糖新生の抑制)によって制御されており、これら2つの機構の異常が糖尿病の発症、ひいては心血管疾患リスク上昇に強く関連することが知られている。2つの機構のうち、従来我が国の糖尿病の多くで主たる病態を占めていたのはインスリン分泌低下であった。ところが、近年は生活習慣の欧米化に伴いエネルギーや脂肪摂取の増加と運動不足が進み、肥満を伴う糖尿病が急増した。このため、元来欧米の糖尿病の多くで主たる病態を占めていたインスリン抵抗性が、我が国においても糖尿病の主たる病態を占める例が増えてきた。このような背景から、インスリン抵抗性の病態の全容を明らかにし、インスリン抵抗性を評価できる適切な尺度を確立することは我が国においても、また世界全体においても、極めて重要かつ急務と考えられている。

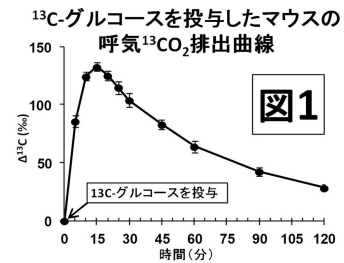
現在、日常臨床において糖尿病患者のインスリン抵抗性を評価するには、血糖値や血漿インスリン濃度から算出する指数(HOMA-R; homeostasis model assessment insulin resistance)や、インスリン持続注射下でのブドウ糖必要量を計測する検査(グルコースクランプ法)などがあるが、(1)採血検査は侵襲を伴う(2)測定結果判明までに時間を要する(3)食事摂取の有無・その内容・ストレス有無などにより測定結果が容易に変動する、などの問題があり、より迅速かつ非侵襲的な検査の確立が求められている。そこで、研究代表者らは炭素原子の安定同位体である<sup>13</sup>Cを用いた呼気<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>試験に着目した。

呼気<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>試験は既に一部の領域で臨床応用されており、その代表例としてヘリコバクター・ピロリ菌の感染の有無を診断する尿素呼気試験が挙げられる。近年、グルコースの6個すべての炭素原子に<sup>13</sup>Cを配置したグルコース(<sup>13</sup>C-グルコース)を用いた呼気試験(<sup>13</sup>C-glucose breath test (<sup>13</sup>C-GBT))が開発された。これは、<sup>13</sup>C-グルコースを経口投与後に呼気へと排出される<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>を測定する試験であり、測定結果は全身におけるグルコース酸化の総和を反映する。<sup>13</sup>C-GBTは、ヒトの耐糖能やインスリン抵抗性を反映する指標として利用されつつあるが、個体を形成する個々の臓器におけるインスリン作用の低下が呼気<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>排出量に及ぼす影響など基礎的な検討はこれまで行われていない。

### 2. 研究の目的

研究代表者らは<sup>13</sup>C-GBTを用いた動物実

験に成功している(図1)。そこで、全身性に、あるいは後天的に臓器特異的にインスリン作用を低下させた動物に<sup>13</sup>C-GBTを実施し、インスリン標的組織における後天的なインスリン作用の低下が、個体レベルでの糖利用に及ぼす影響の解明、さらには糖尿病の新規検査や治療開発へと展開するための基盤となる知見を得ることを本研究の目的とした。



### 3. 研究の方法

全身性にインスリン作用を低下させた動物としてレプチン受容体の点突然変異を有する肥満・糖尿病モデル動物であるZDF fatty ratを用いた。また、後天的に臓器特異的にインスリン作用を低下させた動物としてtamoxifen誘導型Cre-loxPシステムによる後天的臓器特異的インスリン受容体ノックアウトマウスを用いた。先天的に臓器特異的にインスリン受容体をノックアウトさせた遺伝子改変マウスを用いた研究自体はこれまでに数多く行われており、インスリン標的組織におけるインスリン作用の異常が個体レベルの糖代謝に及ぼす影響の一端が解明されてきた。しかし、これらの遺伝子改変マウスではインスリン受容体が先天的にノックアウトされているため、発生過程あるいは生後早期に何らかの代償機転が生じている可能性があり、インスリン受容体を欠損させた組織でのインスリン作用低下の効果のみを直接評価しているかは疑問が残る。加えて、ヒトでは多くの場合インスリン抵抗性は後天的に生じたものであり、先天的ノックアウトマウスから得られる知見をそのままヒトで見られるインスリン抵抗性の病態の理解に当てはめることは必ずしも適切ではないとも考えられる。そこで、後天的に生じたインスリン抵抗性が代謝性疾患の病態におよぼす影響を詳細に解明するため、肝臓単独、骨格筋単独、あるいはその両方において、随時後天的にインスリン受容体をノックアウトすることができるマウスを作製することとした。

具体的な研究方法は以下の通りである。

(1) ZDF fatty rat と対照動物のZDF lean ratの血糖と血中インスリン濃度を測定した。

(2) ZDF fatty rat とZDF lean ratに<sup>13</sup>C-GBTを行い、門脈と肝静脈における<sup>13</sup>C-glucose濃度を測定した。このデータをもとに肝でのグルコースクリアランスを算出した。

(3) ZDF fatty rat とZDF lean ratに<sup>13</sup>C-GBTを行い、血中<sup>13</sup>C-glucose濃度を測定した。

(4) ZDF fatty rat と ZDF lean rat に  $^{13}\text{C}$ -GBT を行い、呼気  $^{13}\text{CO}_2$  を測定した。

(5) tamoxifen 誘導型 Cre-loxP システムを用いてインスリン受容体を後天的に肝臓、骨格筋、あるいは骨格筋と肝臓で同時にノックアウトさせたマウスを作製した。

(6) これらの後天的臓器特異的インスリン受容体ノックアウトマウスに  $^{13}\text{C}$ -GBT を行い、血中  $^{13}\text{C}$ -glucose 濃度を測定した。

(7) 後天的臓器特異的インスリン受容体ノックアウトマウスに  $^{13}\text{C}$ -GBT を行い、呼気  $^{13}\text{CO}_2$  を測定した。

#### 4. 研究成果

まず肥満・糖尿病モデル動物である ZDF fatty rat と対照動物の ZDF lean rat に  $^{13}\text{C}$ -GBT を行った。ZDF fatty rat は高インスリン血症を呈し、 $^{13}\text{C}$ -glucose の肝臓におけるクリアランスが低下し、血中  $^{13}\text{C}$ -glucose 濃度も上昇していたが、興味深いことに、呼気への  $^{13}\text{CO}_2$  排出は増加していた。この結果は、インスリン抵抗性による肝臓の糖取り込み低下が、全身におけるグルコース酸化増加の要因となりうることを示唆する。そこで、個体レベルのグルコース酸化には、どの臓器におけるインスリン作用が重要なのかを検証するために、マウスにおいて後天的に臓器特異的にインスリン作用を低下させ、 $^{13}\text{C}$ -GBT を行うことにした。まずは後天的に肝臓選択的にインスリン受容体をノックアウトさせた iLIRKO マウスを作製した。iLIRKO マウスに  $^{13}\text{C}$ -GBT を行ったところ、血中  $^{13}\text{C}$ -glucose 濃度の上昇と、呼気  $^{13}\text{CO}_2$  排出の増加が観察された。加えて、後天的に骨格筋選択的にインスリン受容体をノックアウトさせた iMIRKO マウスを作製したところ、ここでも  $^{13}\text{C}$ -GBT により血中  $^{13}\text{C}$ -glucose 濃度が上昇し、呼気  $^{13}\text{CO}_2$  排出が増加していた。そこで、呼気  $^{13}\text{CO}_2$  排出増加の責任臓器が、iLIRKO マウスでは骨格筋、iMIRKO マウスでは肝臓である可能性を考え、肝臓と骨格筋の両方で同時にインスリン受容体をノックアウトさせた iLMIRKO マウスを作成し  $^{13}\text{C}$ -GBT を施行した。意外なことに、iLMIRKO マウスでも、iLIRKO マウスおよび iMIRKO マウスで認められた呼気  $^{13}\text{CO}_2$  排出増加は全く減弱せず、むしろ相加的に増加していた。以上より、肝臓、骨格筋それぞれ、あるいは同時にインスリン作用を後天的に低下させても、個体レベルのグルコース酸化はむしろ増加することが明らかとなった。これらの結果は、肝臓、骨格筋以外に、多量のグルコースを酸化し  $\text{CO}_2$  を産生する第三の組織が存在することを示唆し、ヒトにおける  $^{13}\text{C}$ -GBT 結果の解釈においても考慮すべき要因と考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計6件)

(1)

Serum cystatin C level is associated with carotid arterial wall elasticity in subjects with type 2 diabetes mellitus: A potential marker of early-stage atherosclerosis.

Kaneko R, Sawada S, Tokita A, Honkura R, Tamura N, Kodama S, Izumi T, Takahashi K, Uno K, Imai J, Yamada T, Miyachi Y, Hasegawa H, Kanai H, Ishigaki Y, Katagiri H. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018 Feb 15;139:43-51. doi: 10.1016/j.diabres.2018.02.003.

査読あり

(2)

Olfactory receptors are expressed in pancreatic  $\beta$ -cells and promote glucose-stimulated insulin secretion.

Munakata Y, Yamada T, Imai J, Takahashi K, Tsukita S, Shirai Y, Kodama S, Asai Y, Sugisawa T, Chiba Y, Kaneko K, Uno K, Sawada S, Hatakeyama H, Kanzaki M, Miyazaki JI, Oka Y, Katagiri H. *Sci Rep.* 2018 Jan 24;8(1):1499. doi: 10.1038/s41598-018-19765-5.

査読あり

(3)

Neuronal signals regulate obesity induced  $\beta$ -cell proliferation by FoxM1 dependent mechanism.

Yamamoto J, Imai J, Izumi T, Takahashi H, Kawana Y, Takahashi K, Kodama S, Kaneko K, Gao J, Uno K, Sawada S, Asano T, Kalinichenko VV, Susaki EA, Kanzaki M, Ueda HR, Ishigaki Y, Yamada T, Katagiri H.

*Nat Commun.* 2017 Dec 5;8(1):1930. doi: 10.1038/s41467-017-01869-7.

査読あり

(4)

ER Stress Protein CHOP Mediates Insulin Resistance by Modulating Adipose Tissue Macrophage Polarity.

Suzuki T, Gao J, Ishigaki Y, Kondo K, Sawada S, Izumi T, Uno K, Kaneko K, Tsukita S, Takahashi K, Asao A, Ishii N, Imai J, Yamada T, Oyadomari S, Katagiri H.

*Cell Rep.* 2017 Feb 21;18(8):2045-2057. doi: 10.1016/j.celrep.2017.01.076.

査読あり

(5)

Activation of the Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$  Subunit Pathway in Steatotic Liver Contributes to Formation of Cholesterol Gallstones.

Asai Y, Yamada T, Tsukita S, Takahashi K, Maekawa M, Honma M, Ikeda M, Murakami K, Munakata Y, Shirai Y, Kodama S, Sugisawa T, Chiba Y, Kondo Y, Kaneko K, Uno K, Sawada S, Imai J, Nakamura Y, Yamaguchi H, Tanaka K, Sasano H, Mano N, Ueno Y, Shimosegawa T, Katagiri H.

*Gastroenterology.* 2017 May;152(6):1521-1535.

doi: 10.1053/j.gastro.2017.01.001.

査読あり

( 6 )

MicroRNAs 106b and 222 Improve Hyperglycemia in a Mouse Model of Insulin-Deficient Diabetes via Pancreatic  $\beta$ -Cell Proliferation.

Tsukita S, Yamada T, **Takahashi K**, Munakata Y, Hosaka S, Takahashi H, Gao J, Shirai Y, Kodama S, Asai Y, Sugisawa T, Chiba Y, Kaneko K, Uno K, Sawada S, Imai J, Katagiri H.

EBioMedicine. 2017 Feb;15:163-172. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.12.002.

査読あり

〔学会発表〕(計1件)

( 1 )

肝臓と骨格筋のいずれでインスリン受容体を欠損させても全身におけるグルコース酸化はむしろ増加する

**高橋圭**、山田哲也、梶澤貴志、川田恵子、稲田睦、片桐秀樹

第29回分子糖尿病学シンポジウム

2017年

〔図書〕(計2件)

( 1 )

慢性炎症の病的意義 臓器連関と慢性炎症

**高橋圭**、片桐秀樹

最新醫學. 2016 71;917:2263-2268

( 2 )

特集：老化制御と疾患－エイジング研究の進歩－ .老化制御と疾患 老化制御と代謝性疾患

**高橋圭**、片桐秀樹

日本臨牀. 2016 74;9:1513-1517

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：肝の糖取込み能評価方法

発明者：片桐秀樹、山田哲也、**高橋圭**

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2016-220510

出願年月日：2016年11月11日

国内外の別：国内

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 圭 (TAKAHASHI, Kei)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00644808

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

梶澤 貴志 (SUGISAWA, Takahashi)

東北大学・大学院医学系研究科・大学院生