

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2019

課題番号：17KK0184

研究課題名（和文）インスリン分泌能規定因子としての脂肪酸動態：ヒト膵島を用いた検証

研究課題名（英文）Fatty acid dynamics as insulin secretion capacity regulating factor: analysis in human islets

研究代表者

浅井 明 (Asai, Akira)

東北大学・農学研究科・特任准教授

研究者番号：30500011

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 6,800,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：インスリン分泌能の異なるProne系（糖尿病易発性）とResistant系（糖尿病発症抵抗性）の2系統のマウスの膵島で認められる脂肪酸や脂質の代謝や輸送に関わる分子群の発現量の差異について、ヒトの膵島においても同様の現象を認めるのか検討した。Prone系マウスで発現の高いCD36（fatty acid translocase）は肥満者集団において2型糖尿病患者で正常耐糖能者より発現量が高い傾向を認めた。また、CD36はヒトにおいてもマウスと同様に膵細胞の細胞膜上に発現していることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Prone系とResistant系の両系統マウスは、多遺伝子性の遺伝的要因と環境的要因との相互作用というヒトにおける2型糖尿病発症基盤を反映して作出されたモデル動物である。両系統マウス間で遺伝的なインスリン分泌能の差異を規定する可能性のある候補因子について、マウスとヒトとの類似性を示した本研究の成果は、両系統マウスの「2型糖尿病発症における膵島病理基盤モデル」としての有用性を確かなものとし、新たな糖尿病予防・治療法開発に繋がる基礎的知見となるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Based on the differences in the expression levels of molecules involved in metabolism and transport of fatty acids and lipids in pancreatic islets of diabetes-prone (Prone) and diabetes-resistant (Resistant) mice, we examined whether similar findings were observed in human islets. The expression level of CD36 (also known as fatty acid translocase), which is higher in Prone mouse than in Resistant mice, was found to be higher in obese individuals with type 2 diabetes than those with normal glucose tolerance. In addition, as well as in mice, CD36 was expressed on the cell surface of pancreatic beta cells in humans.

研究分野：代謝学

キーワード：インスリン分泌 ヒト膵島 細胞 脂肪毒性 糖尿病 モデル動物

1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病患者数の増加は全世界規模の問題となっており、特に東アジア地域での患者数の増加が顕著である。東アジア地域での患者数の増加は、低インスリン分泌能という遺伝的要因に、食環境や身体活動量の変化（環境的要因）が加わったことが原因と考えられている。特に食環境に注目すると、日本を含む東アジア地域ではこの半世紀で脂肪摂取量が約 3 倍に増加しており、この脂肪摂取量の増加が 2 型糖尿病発症リスク増大の起因となることが示唆されている[1]。高脂肪食が肥満・インスリン抵抗性の出現を誘導して糖尿病状態を引き起こすことは、これまでの多くの研究で明らかとされてきた。しかし一方で、「高脂肪食環境下においてなぜ 2 型糖尿病発症に個人差が存在するのか」についての明確な機序は未だ明らかでない。

我々はこれまでに、耐糖能に明らかな差異を認める 2 系統 [耐糖能異常易発生 (Prone 系) および抵抗性 (Resistant 系)] のマウスを確立し[2,3]、本国際共同研究の基課題では、この Prone/Resistant 両系統マウスの膵ランゲルハンス島 (膵島) における脂肪酸・脂質代謝の違いがインスリン分泌能に及ぼす影響の検討を進めてきた。Prone/Resistant 両系統はヒトにおける耐糖能異常・2 型糖尿病の病理基盤を非常によく反映したモデルマウスであるが、そのモデル動物としての価値をより確かなものとするためには、ヒトとの相同性の検証が必要不可欠であり、インスリン分泌能を規定するに至る細胞内作用機序の解析においても、その解析対象を選抜するうえでヒト膵島との整合性を確認する必要性があった。

2. 研究の目的

我々が確立した Prone/Resistant 両系統マウスは、耐糖能異常・2 型糖尿病の病理基盤を非常によく反映したモデル動物であるが、その糖尿病研究における有用性の確立には、ヒトとの相同性の検証が必要不可欠である。基課題では、両系統マウス膵島での脂肪酸・脂質代謝の違いがインスリン分泌能に及ぼす影響に注目して研究を進めているが、両系統マウスの膵島間で認められるこれらの差異が、2 型糖尿病患者と非糖尿病患者の膵島間においても確認されれば、「2 型糖尿病発症における膵島病理基盤モデル」として、両系統マウスの有用性はより高いものとなる。

本国際共同研究の渡航先研究機関である Lund University Diabetes Centre (スウェーデン、マルメ市) は、糖尿病における基礎・臨床のトランスレーショナルリサーチを推進している世界有数の総合的糖尿病研究機関であり、北欧地域における移植用膵島供給機関である Nordic Network for Islet Transplantation (スウェーデン、ウプサラ市) との連携によって、2 型糖尿病患者を含むヒト由来膵島が研究用に供給されている。このような研究用ヒト膵島の安定供給体制は国内では確立されておらず、本研究計画を国内で完遂することは不可能である。

海外共同研究者の L. Eliasson 教授は、膵細胞におけるインスリン分泌動態研究の専門家であり、近年では、トランスクリプトームの網羅的発現解析と生化学的、電気生理学的手法を融合した膵細胞機能調節の分子基盤研究において世界的に先駆的な研究を行っている。これらの手法は本国際共同研究においても重要な技術的背景となる。一方、申請者が基課題で行っている脂質分析やフローサイトメトリーの手法については、その技術を本国際共同研究にてヒト膵島に応用することができる。このように本国際共同研究では、両者がこれまでに培ってきた互いの技術的背景が融合し、研究の発展に繋がるものと考えられる。

3. 研究の方法

(1) ヒト膵島を用いた検証試験

上述の Nordic Network for Islet Transplantation より供与される研究用ヒト膵島を用いる。基課題において Prone/Resistant 両系統マウスの膵島間で差異を認めている脂肪酸輸送、脂質代謝関連分子群について、2 型糖尿病患者と非糖尿病患者 (耐糖能正常者) の膵島におけるそれらの mRNA、タンパク質レベルでの発現量解析を行った。また、基課題において特に着目している CD36 (細胞膜上で脂肪酸の取り込みを促進し、fatty acid translocase としても知られるクラス B スカベンジャー受容体ファミリー分子) については、膵島構成細胞における細胞膜上での発現レベルを解析し、マウスなどの齧歯類とヒトとの相同性を検証した。

(2) ヒト膵細胞由来樹立細胞株 EndoC-βH1 を用いた検討

ヒト膵細胞由来の新規樹立細胞株である EndoC-βH1 細胞を用いた[4]。EndoC-βH1 細胞を高グルコースや脂肪酸添加条件下で培養した後、グルコースや KCl 応答性のインスリン分泌能を測定した。

4. 研究成果

(1) ヒト膵島での検証

スウェーデンにおいてデータの蓄積が進行しているヒト膵島の遺伝子発現データベースを用いた解析から、膵島における CD36 の遺伝子発現レベルが肥満者においては耐糖能異常者や糖尿病患者で正常耐糖能の肥満者より高い傾向にあることを認めた (図 1A)。そこでウェスタンブロッティング法で CD36 のタンパク質発現量を解析した結果、遺伝子発現と同様の傾向を認めた (図 1B)。また、上述のデータベースから脂肪酸輸送や脂質代謝に関わる他の分子群の遺伝子発現レベルについても解析を加え、いくつかの分子の発現レベルに耐糖能異常者や糖尿病患者と正常耐糖能者との間に差異を認めた。CD36 分子については、さらにヒト膵島細胞を用いたフローサイトメトリー解析を行い、CD36 がヒト膵島においても細胞の細胞膜上に発現していることを確認した (図 2)。一方で、マウスやラットの膵島と人の膵島では、膵島を構成する各細胞集団間での CD36 の発現パターンにいくつかの相違があることを新たに認めた。

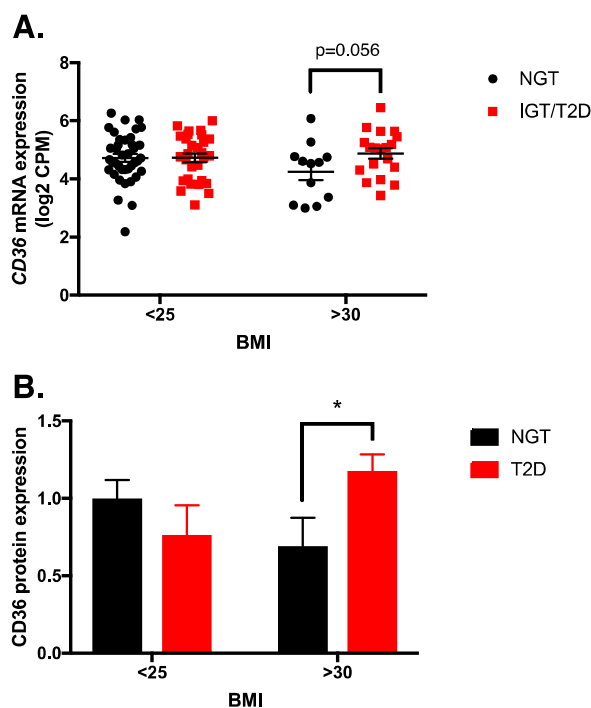


図1 ヒト膵島における CD36 の mRNA(A)とタンパク質(B)レベルでの発現比較 (NGT, normal glucose tolerance; IGT, impaired glucose tolerance; T2D, type 2 diabetes)

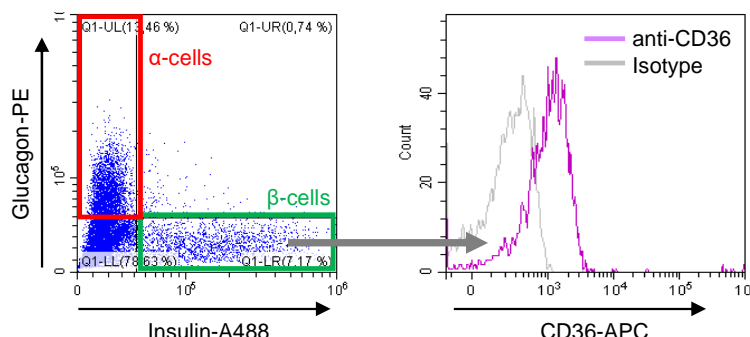


図2 ヒト膵島細胞の細胞膜上における CD36 の発現解析

(2) EndoC-βH1 細胞を用いた検討

高グルコース条件下での培養による糖毒性 (glucotoxicity) によって EndoC-βH1 細胞のインスリン分泌能は明らかに低下したが、脂肪酸添加条件下での培養が EndoC-βH1 細胞のインスリン分泌能に及ぼす影響については明確な結論には至らなかった。一般に培養細胞系における脂肪酸添加試験は、その添加方法や培養時間等の条件によって結果が大きく異なることから、細胞の脂肪毒性 (lipotoxicity) や糖脂肪毒性 (glucolipotoxicity) のモデルとして EndoC-βH1 細胞を利用するためには、さらなる実験条件の検討が必要と考えられた。

< 引用文献 >

- [1] Nagao M, Asai A, Sugihara H, Oikawa S. Fat intake and the development of type 2 diabetes. *Endocr J.* 2015;62:561-572.
- [2] Nagao M, Asai A, Kawahara M, et al. Selective breeding of mice for different susceptibilities to high fat diet-induced glucose intolerance: Development of two novel mouse lines, Selectively bred Diet-induced Glucose intolerance-Prone and -Resistant. *J Diabetes Investig.* 2012;3:245-251.
- [3] Nagao M, Asai A, Sugihara H, Oikawa S. Transgenerational changes of metabolic phenotypes in two selectively bred mouse colonies for different susceptibilities to diet-induced glucose intolerance. *Endocr J.* 2015;62:371-378.
- [4] Ravassard P, Hazhouz Y, Pechberty S, et al. A genetically engineered human pancreatic β cell line exhibiting glucose-inducible insulin secretion. *J Clin Invest.* 2011;121:3589-3597.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Nagao Mototsugu, Esguerra Jonathan L.S., Asai Akira, Ofori Jones K., Edlund Anna, Wendt Anna, Sugihara Hitoshi, Wollheim Claes B., Oikawa Shinichi, Eliasson Lena | 4. 巻 69 |
| 2. 論文標題 Potential Protection Against Type 2 Diabetes in Obesity Through Lower CD36 Expression and Improved Exocytosis in β -Cells | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Diabetes | 6. 最初と最後の頁 1193 ~ 1205 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2337/db19-0944 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Nagao Mototsugu, Esguerra Jonathan Lou S., Wendt Anna, Asai Akira, Sugihara Hitoshi, Oikawa Shinichi, Eliasson Lena | 4. 巻 2128 |
| 2. 論文標題 Selectively Bred Diabetes Models: GK Rats, NSY Mice, and ON Mice | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology | 6. 最初と最後の頁 25 ~ 54 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-0385-7_3 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 長尾元嗣、浅井明、杉原 仁、及川真一 |
| 2. 発表標題 CD36による 細胞機能障害と糖尿病発症：Oikawa-Nagao(ON)マウスを端緒とした研究成果 |
| 3. 学会等名 第34回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------------------|----------------------------------|-------------------------------------|----|
| 主たる渡航先の主たる海外共同研究者 | エリアッソン レナ (Eliasson Lena) | ルンド大学・Faculty of Medicine・Professor | |