

平成 21年 5月 22日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591050

研究課題名（和文）2型糖尿病寛解療法への新展開：脂肪肝合併糖尿病モデル動物を用いた検討

研究課題名（英文）Novel perspective for remission therapy of type 2 diabetes mellitus: study with animal model with fatty liver

研究代表者

藤澤 智巳 (FUJISAWA TOMOMI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10324766

## 研究成果の概要：

2型糖尿病の寛解療法にむけてはラ氏島過形成の分子機構の解明が重要である。本研究では、脂肪肝モデルFLSマウスは6ヶ月齢から12ヶ月齢にかけて糖尿病の自然寛解がみられるが、その改善に膵β細胞増加による代償性インスリン分泌亢進を基盤とすること、膵β細胞数増加に関与が知られるIrs2ならびにGck遺伝子の膵ラ氏島発現は亢進していないことを見出し、これらとは独立した機序が関与することを明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：糖尿病、脂肪肝、膵β細胞、自然寛解、インスリン

## 1. 研究開始当初の背景

近年、生活の欧米化・栄養の摂取と消費バランスの乱れを基盤に2型糖尿病の世界的な増加が指摘されている。中でも日本人をはじめとするアジア人種では特にその増加が著しいことが指摘されているが、この基盤としてアジア人種はインスリン分泌の予備能が低く、環境因子によるインスリン抵抗性の増大に対応しきれず耐糖能が障害されると考えられている。

これまで、2型糖尿病の病態解明とその発症予防に向けて様々な基礎・臨床研究が行われ、

インスリン抵抗性の分子メカニズムなど将来的に有望な新知見が集積されつつある。しかしながら、本邦の2型糖尿病ではインスリン分泌低下をその主たる障害とするため、その克服に向けての根本的な治療戦略として、インスリン分泌能の改善そのものを主眼にした新たな予防・治療法の確立が期待される。しかし、これまで2型糖尿病のインスリン分泌能の根本的な改善を目指した治療の可能性については疑問とされることが多かった。

われわれは近交系の脂肪肝モデルマウス

Fatty Liver Shionogi (FLS) マウスに注目し、本モデルの耐糖能に注目して、この動物が耐糖能異常を示すこと、しかしながらプレリミナリーな検討では 12 カ月齢の時点ではその耐糖能は改善がみられること、を明らかにしてきた。

## 2. 研究の目的

そこで本研究ではインスリン代償的過分泌・膵ラ氏島の過形成を基盤に 2 型糖尿病の寛解をきたすモデル動物 (FLS マウス) の膵ラ氏島発現遺伝子の網羅的検討により膵ラ氏島の過形成に関与する遺伝子群を明らかとすることを目的とし、最終的には膵ラ氏島過形成の鍵分子の臨床応用により、新たな 2 型糖尿病の寛解療法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

糖尿病合併脂肪肝のモデル動物 FLS とそのコントロール系統 C57/BL6 雄マウスを対象として以下の実験を行った。

### (1)

48 週齢において体重、(Body Mass Index: BMI)、臓器重量、肝逸脱酵素、血中脂質の測定を行った。

### (2)

8 週より 48 週齢まで 8 週毎に腹腔内糖負荷試験を施行し、耐糖能を経時的に評価した。

### (3)

①インスリン分泌能を評価するために 24 週齢と 48 週齢でインスリン分泌能試験を行った。

②さらに、インスリン抵抗性について空腹時血中インスリンと血糖値を用いて、HOMA-R による評価を行った。

### (4)

24 週 (6 ヶ月) 齢、および 48 週 (12 カ月) 齢のマウスの膵ラ氏島の組織学的評価を行った。

### (5)

32 週 (8 ヶ月) 齢のマウスよりコラゲナーゼ法により膵ラ氏島を単離し、単離ラ氏島より mRNA を調整し、未知の遺伝子 (6,000) を含む 12,000 の遺伝子の遺伝子発現プロファイル解析量的発現が可能な Gene Chip (Affymetrix 社製 Gene Chip Murine GenomeU74A Array) によりその発現遺伝子の網羅的検討を行った。

さらに、膵ラ氏島の代償的過形成に関与することが報告されている Insulin receptor substrate 2 (Irs2) と Glucokinase (Gck) 遺伝子の発現を半定量 RT-PCR にて評価した。

## 4. 研究成果

### (1)

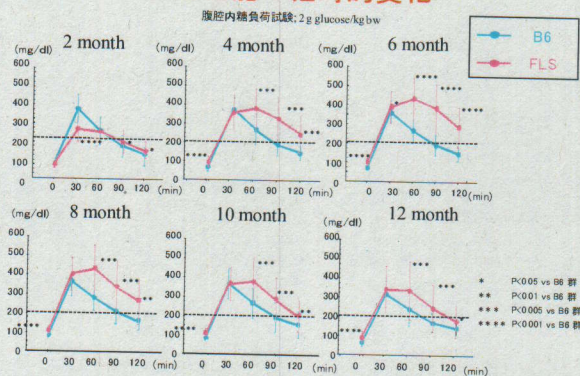
体重については FLS が B6 に比し高値であったが BMI には差を認めなかった。肝重量、血

中 T-cholesterol 値、Triglyceride 値、AST 値、ALT 値は FLS で有意に高く、脂肪肝を反映する結果と考えられた。

### (2)

FLS では B6 に比し 8 週齢から 24 週齢にかけて耐糖能障害の経時的な悪化がみられ、24 週齢では負荷後 2 時間値  $290 \pm 104$  mg/dl (vs. B6  $157 \pm 40$ ,  $p < 0.05$ ) と明らかな糖尿病型を示した。しかし、24 週齢以降 FLS の耐糖能障害は経時的に改善を示し、48 週齢では負荷後 2 時間値は 200 mg/dl 以下となり糖尿病の改善がみられた。

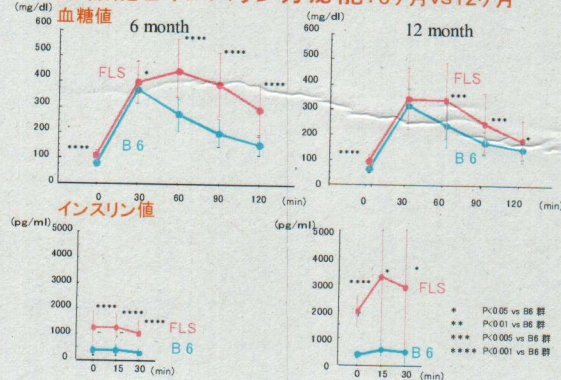
## 耐糖能の経時的変化



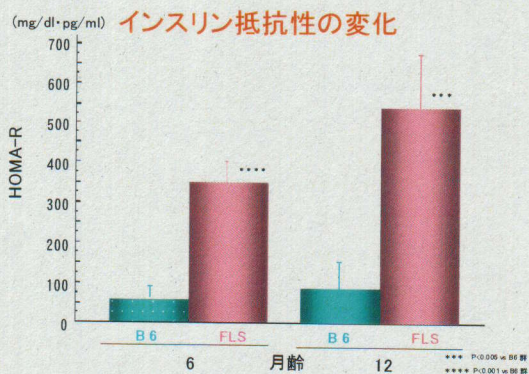
### (3)

①インスリン分泌能に関して、24 週齢と 48 週齢でインスリン分泌能試験を行ったところ、24 週齢では基礎値 ( $p < 0.001$ )、15 分値 ( $p < 0.001$ )、30 分値 ( $p < 0.001$ ) とも FLS では B6 に比しインスリン値は著明に高く、インスリンの過分泌が見られた。48 週齢でも FLS ではインスリン値は高値で、24 週齢の FLS に比べてもインスリン分泌の有意な増加が見られた ( $p < 0.001$ )。

## 耐糖能とインスリン分泌能: 6ヶ月vs12ヶ月



②インスリン抵抗性に関して HOMA-R で評価したところ、24 週齢、48 週齢ともに FLS では B6 に比し有意に高く、さらに 48 週齢 FLS では 24 週齢時より高値であり加齢とともにインスリン抵抗性が増悪することが観察された。

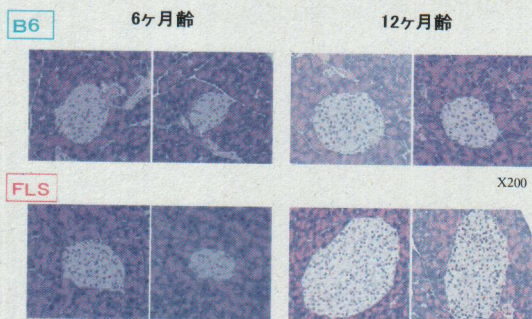


以上より、FLS では経時的にインスリン抵抗性が悪化するが、24 週齢以降にみられる耐糖能の改善はインスリン分泌能の改善に基づくものと考えられた。

(4)

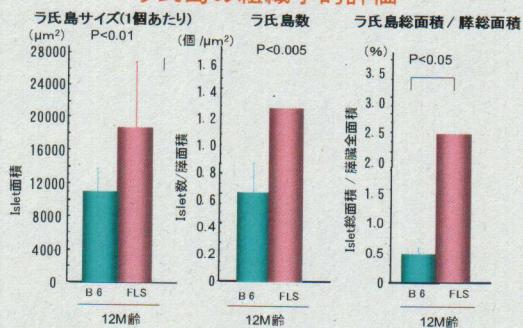
膵ラ氏島の組織学的評価を行ったところ、FLS では 24 週齢から 48 週齢にかけて膵ラ氏島の著明な増大傾向が見られた。

**膵ラ氏島の組織学的所見**



48 週齢では膵ラ氏島の大きさ、個数、膵臓総面積に対するラ氏島面積の割合も B6 と比し有意に高値であった。また、β細胞の大きさ

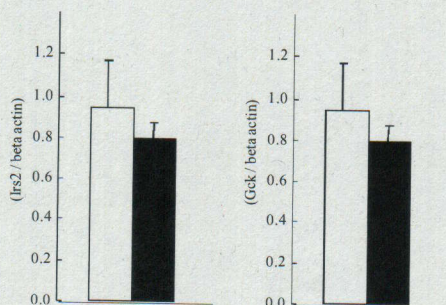
**ラ氏島の組織学的評価**



面積に対するラ氏島面積の割合も B6 と比し有意に高値であった。また、β細胞の大きさ

Irs2

Gck



を評価したところ、FLS と B6 で差を認めなかったため、FLS にみられる膵ラ氏島の増大はβ細胞数の増加 (増殖) によるものであることが示唆された。

(5)

単離ラ氏島を用いて膵ラ氏島の増殖関連遺伝子として報告されている Gck 及び Irs-2 の発現について、32 週齢のマウスより膵ラ氏島を単離して Real-Time PCR 法を用いて評価を行った。その結果、Gck 及び Irs-2 遺伝子とも FLS と B6 の間で発現の差は認めなかった。

本研究により脂肪肝自然発症 FLS マウスが経時的に悪化するインスリン抵抗性を基盤に耐糖能異常を示すが、6 か月齢以降β細胞数・量の代償的増加・増大を基盤にインスリンの著明な代償的過分泌によって糖尿病の自然寛解を示すことが明らかとなった。β細胞増殖に関与が報告されている既知の遺伝子については、本モデルの膵ラ氏島での発現亢進がみられず、未知のメカニズムを介していることが示唆された。本モデルで 2 型糖尿病の寛解を可能とする膵β細胞の増殖能に関わる新たな分子経路を明らかにすることにより、2 型糖尿病発症メカニズムの解明、ならびにそれに基づいた発症予防法の開発にも有用であると考えられる。

**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 13 件)

- ① Oze-Fukai A, Fujisawa T, Sugimoto K, Nojima K, Shindo N, Shimoyoshi S, Yoshikawa Y, Sato Y, Shimomura I, Ikegami H, Rakugi H. A novel mouse model for type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease: spontaneous amelioration of diabetes by augmented beta-cell mass. *Endocrine J* (in press) 査読有
- ② Fujisawa T, Ikegami H, Kasayama S, Matsuhisa M, Yamasaki Y, Miyagawa J, Funahashi T, Shimomura I. Age-dependent difference in factors affecting choice of system for self monitoring of blood glucose. *Diabet Res Clin Pract* 79: 103-107, 2008 査読有
- ③ Sugimoto K, Akasaka H, Katsuya T, Node K, Fujisawa T, Shimaoka I, Yasuda O, Ohishi M, Ogihara T, Shimamoto K, Rakugi H. A polymorphism regulates CYP4A11 transcriptional activity and is

- associated with hypertension in a Japanese population. *Hypertension* 52: 1142-1148, 2008 査読有
- ④ Hiromine Y, Fujisawa T, Noso S, Babaya N, Kawabata Y, Ikegami H. Congenic mapping of the MHC-linked susceptibility to type 1 diabetes in the NOD mouse: at least two genes contribute to the Idd16 effect. *Ann N. Y. Acad. Sci* 1150: 90-92, 2008 査読有
- ⑤ Ikegami H, Ono M, Fujisawa T, Hiromine Y, Kawabata Y, Yamato E. Molecular scanning of the gene for thioredoxin, an antioxidative and antiapoptotic protein, and genetic susceptibility to type 1 diabetes. *Ann N. Y. Acad. Sci* 1150: 90-92, 2008 査読有
- ⑥ Fujisawa T, Ikegami H, Noso S, Hiromine Y, Kawabata Y, Nishino M, Asano K, Ogihara T. Renoprotective effect of N-type Ca-channel blockade in diabetic nephropathy. *J Diabetes Complic* 21: 252-257, 2007 査読有
- ⑦ Fujisawa T, Ikegami H, Nojima K, Kawabata Y, Noso S, Asano K, Hiromine Y, Fukai A, Shindo N, Ogihara T. Present state of diabetes management in the elderly, Japan. *Diabet Res Clin Pract* 77S: S82-S86, 2007 査読有
- ⑧ Kobayashi M, Ikegami H, Fujisawa T, Nojima K, Kawabata Y, Noso S, Babaya N, Itoi-Babaya M, Yamaji K, Hiromine Y, Shibata N, Ogihara T. Prevention and treatment of obesity, insulin resistance and diabetes by bile acid binding resin. *Diabetes* 56: 239-247, 2007 査読有
- ⑨ Noso S, Fujisawa T, Kawabata Y, Asano K, Hiromine Y, Fukai A, Ogihara T, Ikegami H. Association of small ubiquitin-like modifier 4 (SUMO4) variant, located in IDDM5 locus, with type 2 diabetes in the Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 2358-62, 2007 査読有
- ⑩ Itoi-Babaya M, Ikegami H, Fujisawa T, Ueda H, Nojima K, Babaya N, Kobayashi M, Noso S, Kawaguchi Y, Yamaji K, Shibata M, Ogihara T. Fatty liver and obesity: phenotypically correlated but genetically distinct traits in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetologia* 50: 1641-1648, 2007 査読有
- ⑪ Hiromine Y, Ikegami H, Fujisawa T, Nojima K, Kawabata Y, Noso S, Asano K, Fukai A, Ogihara T. Trinucleotide repeats of programmed cell death-1 gene (PDCD1) are associated with susceptibility to type 1 diabetes. *Metabolism* 56: 905-909, 2007 査読有
- ⑫ Asano K, Ikegami H, Fujisawa T, Nishino M, Nojima K, Kawabata Y, Noso S, Hiromine Y, Fukai A, Ogihara T. Molecular scanning of IL-21 gene and genetic susceptibility to type 1 diabetes. *Hum Immunol* 68: 384-391, 2007 査読有
- ⑬ Ikegami H, Kawabata Y, Noso S, Fujisawa T, Ogihara T. Genetics of type 1 diabetes in Asian and Caucasian populations. *Diabetes Res Clin Pract* 77S: S116-S121, 2007 査読有

〔学会発表〕 (計 2 件)

- ① 小瀬綾、藤澤智巳、野嶋孝次、池上博司、楽木宏実 加齢に伴う 2 型糖尿病の寛解：脂肪肝モデル動物の検討 第 81 回日本内分泌学会学術総会 2008 年 5 月 18 日青森
- ② 藤澤智巳ら 非アルコール性脂肪肝炎-糖尿病合併モデル動物：ビッグアニドによる治療効果 第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会 2007 年 5 月 24 日 仙台

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤澤 智巳 (FUJISAWA TOMOMI)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：10324766

### (2) 研究分担者

倭 英司 (YAMATO EIJI)  
大阪大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：20273667

### (3) 連携研究者