

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05453

研究課題名(和文) 2型糖尿病発症における膵細胞の脂肪適応と脂肪毒性についての栄養生理学的検証

研究課題名(英文) Nutritional physiology of lipoadaptation/lipotoxicity in pancreatic beta cells in the development of type 2 diabetes mellitus

研究代表者

浅井 明 (Asai, Akira)

日本医科大学・大学院医学研究科・研究生

研究者番号：30500011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膵ランゲルハンス島細胞の「脂肪適応 lipoadaptation」における脂肪酸の役割(インスリン分泌応答調節機構)や、その「脂肪毒性 lipotoxicity」との差異を明らかにすることを究極的な目標として、本研究期間においては、主に培養細胞での実験系として新たにヒト由来膵細胞株である EndoC- H1細胞を導入し、脂肪酸がインスリン分泌機構に及ぼす影響をより生理的な条件で評価しうる実験系の再構築、評価系の確立を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界規模で増加している2型糖尿病の発症基盤はインスリン分泌不足とインスリン抵抗性である。現代の我が国のような飽食環境においては、肥満が慢性的な高脂肪酸状態を介してインスリン抵抗性を誘発することが明らかとなってきた一方で、インスリン分泌に及ぼす脂肪酸の膵細胞への直接的な影響は未だ明確でない。本研究の成果は、特に膵細胞機能に及ぼす脂肪酸の影響を評価しうる実験系の確立という観点において非常に重要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the role of fatty acids in "lipoadaptation" of pancreatic islet cells (e.g., effects on insulin secretion machinery) and how they differ from "lipotoxicity", we attempted to reconstruct and establish new experimental tools by introducing EndoC- H1 cells, a new human-derived pancreatic cell line, in which we evaluate the effects of fatty acids on the insulin secretion mechanism under more physiological conditions.

研究分野：内分泌代謝

キーワード：インスリン分泌 膵細胞 EndoC- H1 脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

今日、2型糖尿病患者数の増加は全世界規模の問題となっている。特に東アジア地域では、人種特有の低インスリン分泌能という遺伝的要因に、食の欧米化や身体活動量の低下といった環境的要因が近年新たに加わったことにより、患者数の増加が顕著となっている。特に食習慣に注目すると、日本を含む東アジア地域では脂肪摂取量がこの半世紀で約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[1,2]。これまでの数多くの疫学的、実験的研究から、高脂肪食が肥満を介して「インスリン抵抗性」を誘発し、2型糖尿病発症リスクを増大させることが明らかにされてきたが、2型糖尿病のもう一方の発症基盤である「インスリン分泌不足」に及ぼす外因性(食事性)脂肪や生体内における高脂肪酸状態の影響は未だ明確でない。

これまでに、慢性的な高脂肪酸状態がインスリン分泌能を低下させることが、膵ランゲルハンス島(膵島)の単離培養や膵β細胞株を用いた研究で支持されており、高度肥満糖尿病モデル動物であるZDFラットや*db/db*マウスにおいても、インスリン分泌障害への膵島内脂肪含量増加の関与が示唆されている。これらの事実は「脂肪毒性 lipotoxicity」として知られるようになり、過剰な脂肪酸流入が種々の細胞内ストレスを誘導して膵β細胞の機能低下や細胞死をもたらすものと説明されている。しかし、これらの現象は顕性の糖尿病状態における膵β細胞の疲弊や細胞量減少を反映したものであり、本研究課題で標的としている2型糖尿病の前段階や発症初期においても「脂肪毒性」が同様に関与しているのかは定かでない。実際に、単離膵島や膵β細胞株を用いた培養試験において、低濃度の脂肪酸はグルコース応答性インスリン分泌に明らかな障害を与えず、むしろグルコース非刺激時のインスリン分泌(基礎分泌)の増加がしばしば認められることから、生理的低濃度の脂肪酸によるインスリン分泌応答の変化は、上述のような細胞死を伴う「脂肪毒性」とは明らかに異なる「脂肪適応 lipoadaptation」とも呼ぶべき現象と考えられるが、その発現機序や病態生理学的意義はほとんど解明されていない[図1]。

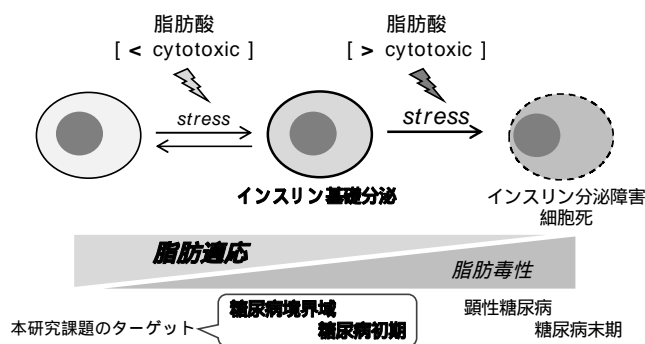


図1 膵β細胞における脂肪適応と脂肪毒性の概念

2. 研究の目的

上述の「脂肪適応」における脂肪酸の役割(インスリン分泌応答調節機構)や、その「脂肪毒性」との差異を明らかにすることを究極的な目標として、本研究期間においては、主に培養細胞から組織(膵島)レベルにおいて、脂肪酸がインスリン分泌機構に及ぼす影響をより生理的な条件下で評価しうる実験系の再構築、評価系の確立を試みた。

3. 研究の方法

(1) ヒト膵島由来β細胞株 EndoC-βH1 細胞の導入

本研究では、膵細胞機能を培養細胞レベルで評価しうる新たなツールとして、EndoC-βH1細胞を新たに導入した。EndoC-βH1細胞は、グルコース応答性インスリン分泌を維持した「ヒト由来」の膵細胞株であり[3]。これまで膵細胞研究に用いられてきたINS-1細胞(ラット由来)やMIN-6細胞(マウス由来)に替わって、よりヒト膵細胞の基礎研究に有用な研究ツールとなることが期待される。またEndoC-βH1細胞は、我々がこれまでマウスを用いた動物レベルや[4]ヒト膵島レベル[5]での解析で注目してきた脂肪酸輸送タンパク質CD36の発現を細胞表面に認めるため、本研究の目的である膵β細胞機能(インスリン分泌能)と脂肪毒性・脂肪適応との関係を解析するうえで理想的な実験ツールとなるものと考えられた。

(2) EndoC-βH1細胞培養条件の検討

EndoC-βH1細胞は標準的な培養プロトコールでは無血清かつ脂肪酸除去アルブミン添加の条件下で培養・継代がなされるが、この培養条件は細胞への必須脂肪酸供給の観点から、生理的条件とは大きくかけ離れた状態と考えられた。そこで、培養に用いるアルブミンとして脂肪酸高含有タイプのアルブミンを用いる培養系や、少量のFCS(牛胎児血清)を培地に添加する培養系を検

討した。またより生理的条件に近いと考えられる培養形態として膵島様の細胞塊 (pseudo-islet) を作出し、pseudo-islet を浮遊状態で培養する方法を新たに検討した。

4. 研究成果

(1) EndoC-βH1 細胞培養条件と脂肪酸応答

培養用培地に添加するアルブミンとして脂肪酸高含有タイプのアルブミンを用いる培養系や、FCS を培地に添加する培養系を検討した結果、これらの条件のいくつかでは、標準培養条件下よりもインスリン合成 / 分泌能が向上することを認めた [図 2]。EndoC-βH1 細胞は、その樹立過程において、血清添加条件では細胞株としての維持が不可であったと報告されており、実際に FCS 添加量が一定レベルを超えると細胞毒性が強く継代維持できないことを認めた。しかし今回の結果から、ごく少量の血清添加や脂肪酸含有タイプのアルブミンの使用は、脂肪酸供給の観点からより生理的条件に近い EndoC-βH1 細胞実験系として有用となる可能性を見出した。

(2) EndoC-βH1 を用いた pseudo-islet 浮遊培養系の確立

EndoC-βH1 細胞の培養条件について様々な検討を行い、膵島様の細胞塊 (pseudo-islet) を作り出し、pseudo-islet を浮遊状態で培養する方法を新たに確立した [図 3]。この EndoC-βH1 細胞由来 pseudo-islet の作成法は、既報の pseudo-islet 作成法より簡便であり、比較的サイズの揃った細胞塊を長期間にわたって安定的に浮遊培養することが可能であった。また、グルコース応答性インスリン分泌能も通常の単層接着条件下での培養時よりも優れていることから、より生体の膵島に近いモデルとして有用と考えられ、この pseudo-islet においても添加する脂肪酸の種類によってグルコース応答性インスリン分泌等の細胞応答に大きな差異があることを認めた。

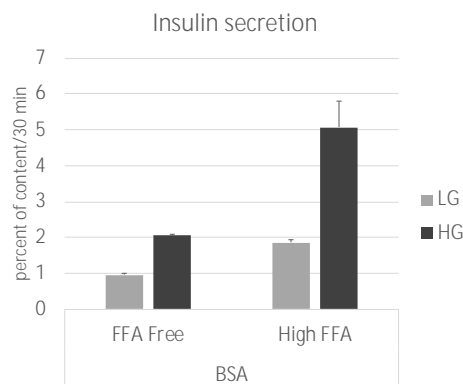


図 2 培地添加アルブミン (BSA) の違いが EndoC-βH1 細胞のグルコース応答性インスリン分泌に及ぼす影響。

FFA Free: 脂肪酸除去 BSA

High FFA: 脂肪酸高含有 BSA

LG: 1 mM Glucose

HG: 20 mM Glucose

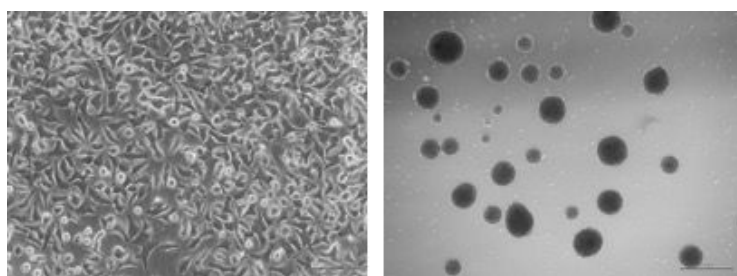


図 3 EndoC-βH1 細胞の標準的単層接着培養像 (左) と pseudo-islet 浮遊培養像 (右)

注: 倍率は異なる

これらの成果は、本研究の究極的な目的である「膵細胞機能 (インスリン分泌能) と脂肪毒性・脂肪適応との関係の解明」に寄与する「in vitro 培養細胞系実験ツールの確立」という観点から非常に有用な知見であった。

< 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] Scharfmann R, Pechberty S, Hazhouz Y, et al. Development of a conditionally immortalized human pancreatic β cell line. *J Clin Invest* 2014;124:2087-98.
- [4] Nagao M, Asai A, Inaba W, et al. Characterization of pancreatic islets in two selectively bred mouse lines with different susceptibilities to high-fat diet-induced glucose intolerance. *PLoS One.* 2014;9:e84725.
- [5] Nagao M, Esguerra JLS, Asai A, et al. Potential Protection Against Type 2 Diabetes in Obesity Through Lower CD36 Expression and Improved Exocytosis in β-Cells. *Diabetes* 2020;69:1193-205.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Nagao Mototsugu, Asai Akira, Eliasson Lena, Oikawa Shinichi	4. 巻 70
2. 論文標題 Selectively bred rodent models for studying the etiology of type 2 diabetes: Goto-Kakizaki rats and Oikawa-Nagao mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 19~30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endojrj.EJ22-0253	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nagao Mototsugu, Asai Akira, Mikiko Okazaki-Hada, Hitoshi Sugihara, Eliasson Lena, Oikawa Shinichi
2. 発表標題 CD36 subcellular localisation in beta cells between diabetes-prone and -resistant mice: possible involvement of CD36 in beta cell dysfunction
3. 学会等名 58th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長尾元嗣
2. 発表標題 新規糖尿病モデルOikawa-Nagaoマウスの開発と2型糖尿病の病態生理研究
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長尾元嗣、浅井明、杉原仁、Claes B. Wollheim、及川眞一、Lena Eliasson
2. 発表標題 Pathogenic role of beta-cell CD36 in the development of type 2 diabetes with obesity
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021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
研究 分担 者	長尾 元嗣 (Nagao Mototsugu) (10468762)	日本医科大学・医学部・准教授 (32666)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
スウェーデン	Lund University			