

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700900

研究課題名(和文)高脂肪食誘導性の非肥満糖尿病発症メカニズム

研究課題名(英文)Mechanism of high fat diet-induced hyperglycemia in obesity-resistant mice

研究代表者

李 恩瑛 (LEE, Eun Young)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60583424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：食物からの脂肪の過剰摂取は糖尿病を惹起するが、そのメカニズムは多くが不明である。我々はインスリン抵抗性だが耐糖能は正常であるインスリン受容体変異マウスに、高脂肪食を負荷すると顕性の糖尿病を発症することを見だし、そのメカニズムを解析した。解析の結果、このマウスでは脂肪組織での脂肪分解が亢進し、産生されたグリセロールが肝臓で糖新生に利用され、高血糖が誘発されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：High fat diet (HFD) triggers the onset of diabetes mellitus. However, its mechanism remains mostly unknown. We found that insulin receptor mutant mice develop overt hyperglycemia under HFD condition and examined its molecular mechanism. Our analyses revealed that lipolysis in white adipose tissues is increased in the mice, leading to the increased glycerol release and that the upregulation of gluconeogenesis in liver results in the occurrence of hyperglycemia.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：インスリン 高脂肪食 糖尿病 脂肪分解 糖新生

1. 研究開始当初の背景

高脂肪食による糖尿病発症の機序としては、これまで欧米での解析に基づき、「高脂肪食による肥満がインスリン需要を増加させ、これが膵細胞の疲弊をきたし最終的に糖尿病を引き起こされる」と考えられてきた。一方アジア人では、多くは血中インスリン値は発症前から低値を示し、その後さらに低下し糖尿病を発症することが知られている。しかも近年、アジア諸国では生活習慣の欧米化に伴い高脂肪食の摂取量が増加し、それと共に2型糖尿病患者数は激増している。従って、このアジア型糖尿病の発症機序は欧米型とは異なっていると予想されており、我が国の糖尿病の治療を確立するために、その病態の解明は非常に重要であると考えられた。

2. 研究の目的

我々が本研究で解析に用いた変異インスリン受容体ノックインマウス(mIR マウス)は、インスリン受容体に機能喪失型の1アミノ酸変異を導入したノックインマウスである。我々は、mIR マウスが、通常飼育下では耐糖能が正常であるが、高脂肪食を負荷すると肥満が軽度にししか誘発されないにもかかわらず顕性の糖尿病を発症することを見いだした(本研究の結果と合わせ論文投稿中)。

本研究では、mIR マウスをアジア型2型糖尿病の動物モデルととらえ、mIR マウスを用いて高脂肪食による糖尿病発症の分子メカニズムを解明することを目指した。

3. 研究の方法

我々はまず、高脂肪食を負荷した mIR マウス (mIR/HFD マウス) の表現型を解析した。具体的には随時血糖や体重の変化、経口ぶどう糖負荷試験による耐糖能、インスリン負荷試験によるインスリン感受性を評価した。

さらに、肝臓、脂肪組織などのインスリン標的臓器で、種々の遺伝子の発現変化を定量 RT-PCR 法により解析した。脂肪組織での脂肪分解活性は、ホルモン感受性リパーゼ (HSL) のリン酸化をウェスタンブロットで解析し、定量した。さらに脂肪分解活性は単離脂肪細胞から放出されたグリセロール量を測定することにより、イソプロテレノールによる脂肪分解とインスリンによる抑制を解析した。

脂肪組織の脂肪分解が亢進していることが疑われたため、生理学研究所の箕越教授との共同研究を実施し、酸素消費量や呼吸商を測定した。

4. 研究成果

我々は研究開始当初、高脂肪食による脂肪毒性が、糖尿病発症に大きく寄与していると予想していた。しかしながら、脂肪毒性の主要な標的と思われる膵細胞ではむしろ細胞傷害は軽度であり、糖尿病発症には、別の機

序が関与していることが疑われた。結果的には、mIR/HFD マウスの病態は個体レベルの表現型解析の結果に基づき、様々な可能性を一つずつ検証することで次第に解明された。その為、当初予想していた仮説とは随分異なった結論が証明された。

(1) mIR/HFD マウスの糖代謝の解析

我々はまず、耐糖能とインスリン感受性を、それぞれ経口ぶどう糖負荷試験とインスリン負荷試験により解析した。経口ぶどう糖負荷試験の結果では、通常食飼育下の mIR マウス (mIR/ND マウス) の耐糖能は通常食飼育下野生型(WT/ND)マウスと差がなかった。さらに、WT/HFD マウスは空腹時の血糖値は高いものの、糖負荷後の高血糖は見られず、耐糖能は保たれていた。しかし、mIR/HFD マウスの耐糖能は明らかに障害されていた。

さらにインスリン抵抗性を評価するために、インスリンを投与し、血糖値の低下を検討したところ、mIR/HFD マウスではインスリン投与後の血糖低下がほとんど見られず、高脂肪食の負荷により著明なインスリン抵抗性が誘導されていることが明らかになった。mIR/HFD マウスで見られた、これらの表現型(耐糖能障害とインスリン抵抗性)は、数多く作製された組織特異的インスリン受容体欠損マウスのうちの肝臓特異的インスリン受容体欠損マウス (LIRKO マウス) の表現型と類似するものであった。

また、mIR マウスでは高脂肪食負荷時の体重増加が WT マウスと比較して有意に減弱していた。解析の結果 mIR/HFD マウスでは、WT/HFD マウスと比較し、血清レプチン値が低く、CT 画像撮影でも脂肪量が減少しており、全身の脂肪量が減少していることが明らかになった。しかしながら、mIR/HFD マウスと WT/HFD マウスに摂餌量に有意差は見られなかったため、酸素消費量と呼吸商を測定し、エネルギー消費状況を解析した。解析の結果、通常食飼育下では mIR マウスと WT マウスの間で酸素消費量に差は見られなかった。しかし興味深いことに WT マウスの呼吸商は、暗期(マウスが活動し摂食する時間帯)に上昇し、明記に低下する日内変動が見られたが、mIR マウスではこの日内変動がほとんど見られず、インスリンによる消費エネルギー源の切り替えができなくなることが明らかになった。高脂肪食飼育下でも mIR マウスと WT マウスの間で酸素消費量に明らかな差は見られなかったものの、呼吸商の日内変動は mIR マウスで消失していた。これらの結果から、インスリンシグナルは摂食時/絶食時の熱エネルギー源の切り替えに重要な役割を果たしており、糖代謝恒常性が破綻していない比較的軽度なインスリン抵抗性状態でも、熱エネルギー源の切り替えは明らかに障害されていることが明らかになった。

(2) 肝臓での糖代謝の解析

LIRKO マウスでは糖新生が亢進し、それが耐糖能障害とインスリン抵抗性を引き起こすことが示されている。そこで、我々も mIR/HFD マウスの糖新生を、糖新生酵素である PEPCK と G6pase の絶食/摂食時の遺伝子発現変化を解析した。すると、PEPCK の発現は WT/HFD マウスと同様であったが、G6pase の発現が著明に増加していることが明らかになった。PEPCK と G6pase はいずれも転写レベルで糖新生を制御する分子であるが、PEPCK はピルビン酸やアミノ酸からの糖新生を担う酵素であるのに対し、G6pase はピルビン酸やアミノ酸に加え脂肪分解で産生されるグリセロールからの糖新生も担っている。そこで、PEPCK と G6pase の生体での活性を検討する目的で、それぞれの基質である、ピルビン酸とグリセロールをマウスに投与し、血糖値の上昇から糖新生を検討した。すると、mIR/HFD マウスではグリセロール投与後のみで、血糖の上昇がみられ、グリセロールからの糖新生が亢進していることが明らかになった。

(3) 脂肪組織での脂肪分解の解析

グリセロールは脂肪組織での脂肪分解により産生され血中に放出される。脂肪分解はインスリンにより抑制されることから、インスリン受容体変異マウスでは脂肪分解が亢進している可能性が考えられる。インスリンは脂肪分解酵素である HSL のリン酸化を抑制し脂肪分解を抑制するため、脂肪組織の HSL のリン酸化を指標に脂肪分解活性を解析した。すると、WT/HFD マウスでは高脂肪食負荷により脂肪分解は著明に抑制されたが、mIR/HFD マウスではその抑制が有意に減弱しており、脂肪分解が亢進していることが明らかになった。

脂肪分解活性は単離脂肪細胞からのグリセロール放出により直接的に測定した。その結果、mIR/ND マウスではむしろ脂肪分解が WT/ND マウスよりも抑制されていたものの、mIR/HFD マウスではイソプロテレノールによる脂肪分解が亢進し、インスリンによる抑制も減弱していた。このことから、mIR マウスでは、高脂肪食負荷条件のみで脂肪分解が亢進していることが示された。

(4) 脂肪組織と肝臓の臓器間連携の解析

以上の結果から、mIR/HFD では脂肪組織での脂肪分解の亢進によるグリセロール放出が増加し、グリセロールの肝臓への過剰供給が糖新生の亢進を引き起こし、高血糖が惹起される可能性が示唆された。この可能性を検証するために以下の実験を行った。

脂肪分解促進による高血糖誘発

我々はまず、mIR/HFD マウスで脂肪分解を亢進させると高血糖が誘発されるか検討した。この目的で、3 アドレナリン受容体作動薬を投与し血糖の変化を観察したところ、mIR/HFD マウスでは血糖上昇が有意に増大

しており、脂肪組織での脂肪分解から肝臓での糖新生の亢進までが mIR/HFD マウスでは亢進していることが明らかになった。

グリセロールによる肝での糖新生亢進
グリセロールの肝への取り込みから糖新生の亢進までの機序を明らかにする目的で、野生型マウスにグリセロールを投与し肝臓での糖新生酵素の遺伝子発現変化を検討したところ、グリセロール投与後に G6pase 発現が誘導されることが明らかになった。一方、PEPCK の発現はグリセロール投与により増加せず、糖新生基質の量の変化が肝細胞で感知され関連する酵素の発現誘導が惹起されることが示された。このことから、mIR/HFD マウスの肝臓における糖新生の亢進は、脂肪分解の亢進によりグリセロール供給が増加したことに伴う二次的変化である可能性が考えられた。

そこで次に、脂肪組織での脂肪分解の亢進が高血糖誘発の原因となっていることを証明する目的で、mIR/HFD マウスに野生型マウスの皮下脂肪を移植し、その後高脂肪食を負荷し血糖値を測定した。興味深いことに、脂肪移植を受けた mIR マウスでは高脂肪食負荷後の血糖値が、脂肪移植しない mIR/HFD マウスと比較し有意に低値であった。これらの結果から、mIR/HFD マウスの糖尿病は、脂肪組織でのインスリン作用不全による脂肪分解亢進と、肝臓でのグリセロールからの糖新生亢進を介して発症することが明らかになった。

(5) 本研究のまとめと臨床的意義

mIR マウスはインスリン受容体に機能喪失変異が導入されており、全身のインスリン作用が低下している。しかしながら、インスリン作用の障害が全員に同じ強さのインスリン機能不全を招来させるのではなく、組織によって、さらにはシグナル経路によって障害の程度が異なることが明らかになった。

ヒトの2型糖尿病でも、同様の病態が存在することが近年提唱されているが、それぞれの病態生理学的な意義は殆ど解明されていない。我々の解析では高脂肪食負荷時の脂肪分解の抑制は mIR マウスで著明に低下しており、糖尿病発症に寄与していた。

ヒトの2型糖尿病の臨床像は多様であるが、我々アジア人では、肥満の程度が白人より軽度であるにもかかわらず、軽度の肥満で糖尿病が誘発されやすいことが知られている。この病態は mIR/HFD マウスと類似する点が多く、アジア人型2型糖尿病でも脂肪分解亢進によるグリセロールからの糖新生が高血糖の原因となっている可能性が示唆された。さらに、この様な2型糖尿病患者では、過剰な脂肪分解を抑制することが新たな糖尿病治療法となる可能性も示唆された。

以上の研究成果は現在、学術論文に投稿中であり、全て未発表データである。

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 3 件)

- Seino, Y., Miki, M., Fujimoto, W., Lee, E.Y., Takahashi, Y., Minami, K., Oiso, Y., Seino, S. (2013) Cephalic phase insulin secretion is K_{ATP} channel-independent. *J Endocrinol* 218(1):25-33. 査読あり
- Sakurai, K., Lee, E.Y., Morita, A., Kimura, S., Kawamura, H., Kasamatsu, A., Shiiba, M., Yabe, D., Yokote, K., Miki, T. (2012) Glucagon-like peptide-1 secretion by direct stimulation of L cells with luminal sugar versus non-nutritive sweetener. *J Diabetes Invest* 3:156-63. 査読あり
- Lee, E.Y., Inoue, S., Senoo, A., Shimizu, H., Suzuki Y., Ishizuka, N., Imazeki, N., Sasaki, K., Kako, M., Osaka, T., Miki, T. (2011) Beneficial effects of ventromedial hypothalamus (VMH) lesioning on function and morphology of the liver after hepatectomy in rats. *Brain Res* 1421:82-9. 査読あり

〔学会発表〕(計 10 件)

国際学会

- Lee, E.Y., Sakurai, K., Toda, C., Minokoshi, Y., Miki, T. (2013) Unsuppressed Lipolysis in Adipose Tissue by Insulin Is Critical for Glucose Homeostasis under High Fat Diet 49th EASD Annual Meeting, Barcelona, Spain, 2013/9/23-27, 24
- Mukai, E., Ohta, T., Kawamura, H., Lee, E.Y., Morita, A., Inagaki, N., Iwanaga, T., Miki, T. (2012) Enhanced VEGF signaling in islets contributes to β -cell injury and consequential diabetes in SDT rats. 9th IDF-WPR Congress & 4th AASD Scientific Meeting (Nov 24 - 27, Kyoto, Japan)
- Lee, E.Y., Sakurai, K., Toda, C., Yokote, K., Minokoshi, Y., Miki, T. (2012) Increased gluconeogenesis from glycerol plays a critical role in developing diabetes under high fat diet. the 9th IDF-WPR Congress & 4th AASD Scientific Meeting (Nov 24 - 27, Kyoto, Japan)
- Sakurai, K., Lee, E.Y., Morita, A., Yabe, D., Yokote, K., Miki, T. (2011) Effect of an alpha-glucosidase inhibitor acarbose on glucagon-like peptide-1 secretion and postprandial lipid profile. AASD2011 3rd Annual Meeting (Jul 22-24, Beijing, China)

国内学会

- 櫻井健一、李恩瑛、橘香穂里、石川耕、三木隆司 高脂肪餌により糖尿病を発症する変異インスリン受容体ノックインマウスの肝臓における遺伝子発現 日本糖尿病学会年次学術集会, 熊本, 2013/5/16-18, 18
- 李恩瑛 櫻井健一 戸田知得 箕越靖彦 三木隆司 インスリン受容体変異マウスの高脂肪食感受性糖尿病発症のメカニズム 第56回日本糖尿病学会年次学術集会, 熊本, 2013/5/16-18, 18
- 向英里、太田毅、河村治清、李恩瑛、森田亜州華、笹瀬智彦、稲垣暢也、岩永敏彦、三木隆司 (2013) VEGF シグナル阻害は SDT ラットにおける細胞傷害と糖尿病発症を抑制する 第56回日本糖尿病学会年次学術集会, 熊本, 2013/5/16-18, 17.
- 向英里、太田毅、河村治清、笹瀬智彦、李恩瑛、森田亜州華、稲垣暢也、岩永敏彦、三木隆司 (2013) VEGF シグナル阻害は SDT ラットにおける膵島細胞障害と糖尿病発症を抑制する 第90回日本生理学会大会 (2013, 3, 27-29 東京)
- 向英里、太田毅、河村治清、笹瀬智彦、李恩瑛、森田亜州華、稲垣暢也、岩永敏彦、三木隆司 (2012) SDT ラットでは膵島内の VEGF シグナル亢進が細胞を障害し糖尿病を引き起こす 第27回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会, (2/22-23, 東京)
- 櫻井健一、李恩瑛、横尾英孝、河村治清、横手幸太郎、三木隆司 (2011) 健常日本人における GLP-1 分泌動態の検討. 第54回日本糖尿病学会年次学術集会 (5/19 札幌)

〔図書〕(計 1 件)

- 李恩瑛, 三木隆司 (2011) 転写因子 Dmbx1 欠損マウスのやせの病態解析. *Adipose science* 7, 225-231 (全頁 288 ページ). 査読あり

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/physiol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

李 恩瑛 (LEE Eun Young, リ ウンヨン)
千葉大学・医学研究院・助教
研究者番号: 60583424