

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293051

研究課題名(和文) 脂肪とインスリンシグナルのクロストーク -脂肪食感受性糖尿病マウスを用いた解析-

研究課題名(英文) Crosstalk between fat metabolism and insulin signaling in glucose homeostasis: Analysis in fat-sensitive diabetes mice

研究代表者

三木 隆司 (Miki, Takashi)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50302568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年の2型糖尿病の激増に、脂肪過剰摂取が寄与している可能性が考えられている。しかしながら、脂肪過剰摂取により糖尿病を発症する動物モデルはこれまでほとんど報告がなく、病態解明の支障となっていた。私達はインスリン受容体変異(mIR)マウスは高脂肪食(HFD)負荷時にのみ著明な高血糖を示すことを見いだした。このマウス(mIR/HFDマウス)では脂肪組織での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により高血糖が誘発されることと、胆汁酸代謝が大きく変化していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The rapid increase in the number of patients with type 2 diabetes mellitus is considered to be due, at least in part, to excessive fat intake. However, the lack of animal model of high fat diet (HFD)-induced diabetes has hampered the elucidation of its underlying mechanism. We found that the insulin receptor mutant mice (mIR mice) develop overt hyperglycemia only under HFD feeding. Our pathophysiological analyses of mIR mice under HFD (mIR/HFD mice) revealed that unsuppressed lipolysis plus increased gluconeogenesis from glycerol evokes hyperglycemia and that bile acid physiology is markedly altered in mIR/HFD mice.

研究分野：代謝生理学

キーワード：糖尿病 栄養学 胆汁酸

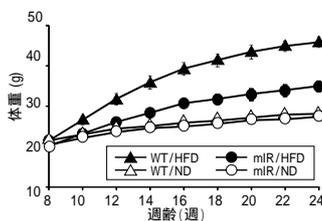
1. 研究開始当初の背景

近年の糖尿病患者急増の主因として脂肪過剰摂取の関与が考えられている。すなわち、「インスリン抵抗性など負の遺伝的素因の保因者に高脂肪食などの環境負荷が加わり糖尿病が発症する」という機序が広く受け入れられている。実際に研究の場でも、様々なインスリン抵抗性マウスに対し糖代謝破綻を誘発する目的で高脂肪食負荷が広く応用されている。しかし意外なことに、これまで高脂肪食負荷により顕性の糖尿病が誘発される動物モデルは世界で報告がなく、高脂肪食が惹起する催糖尿病作用の解析は困難であった。しかも、他の栄養素である炭水化物による生体応答 (ChREBP シグナルなど) や蛋白質による生体応答 (AMPK/mTOR シグナルなど) は分子レベルで制御機構が明らかにされつつあるのに対し、高脂肪食への生体応答とそのシグナルの分子実体は、当研究開始当時には十分には解明されていなかった。

2. 研究の目的

興味深いことに申請者らは mIR マウスでは通常食下では耐糖能は正常だが、高脂肪食負荷により顕性の糖尿病が誘発されることを

A. 体重



B. 血糖値

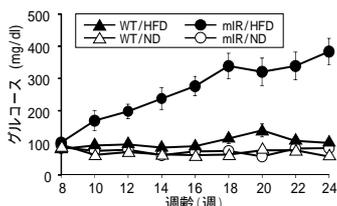


図1 高脂肪食負荷による体重と血糖値の変化

A: 体重の変化。B: 血糖値の変化。

見いだした (図 1)。すなわち mIR マウスは高脂肪食の催糖尿病作用分子メカニズムを解明する有用な解析ツールと考えられた。本研究ではこの「高脂肪食感受性糖尿病マウス」を用いて、脂肪とインスリンシグナルのクロストークの分子基盤を解析した。

3. 研究の方法

上述の通り、mIR マウスは「脂肪過剰摂取による糖代謝破綻メカニズム」を解析する上で有用なマウスモデルであると考えられた。そこで、8 週齢の雄性 mIR マウスおよび野生型マウス (WT マウス) に高脂肪食を投与し、(1)mIR/HFD マウスの個体レベルの糖・エネルギー代謝の詳細な解析

ギー代謝の詳細な解析

(2) 肝臓および脂肪組織におけるインスリンシグナル分子群の転写と蛋白活性の解析
(3) 肝臓および脂肪組織の代謝産物・遺伝子発現・蛋白活性化の網羅的定量解析
を行い脂肪過剰摂取による糖尿病発症の機序を解析した。さらに、これらの解析の結果に基づき、mIR/HFD マウスの糖尿病を改善させる薬物治療の探索とその効果を解析した。

4. 研究成果

(1) mIR/HFD マウスの個体レベルの糖・エネルギー代謝解析

私達はまず、mIR マウスと WT マウスに高脂肪食あるいは通常食を投与し、血糖値と体重を測定した。WT マウスでは HFD 負荷により有意な体重増加が誘導されたが、随時血糖の上昇は見られなかった。一方、mIR マウスでは HFD 負荷 2 週後以降で有意な血糖上昇を認めた (図 1) が、HFD による体重増加は WT マウスと比較して明らかに軽度であった。このことから、mIR マウスは HFD 負荷感受性の糖尿病が見られるものの、肥満抵抗性であることが明らかになった。また、経口ブドウ糖負荷試験およびインスリン負荷試験を行ったところ、mIR/HFD マウスでは明らかな耐糖能障害とインスリン抵抗性が認められた。

インスリン受容体は生体のほとんどすべての組織に発現し、様々な生命現象に参与している。インスリン受容体の全身性の遺伝子破壊マウスは新生児致死であることから、各組織における役割は、組織特異的な遺伝子破壊マウスを用いて解析されてきた。mIR マウスでは全身の組織でインスリンシグナルが高度に障害されているが、mIR/HFD マウスの高血糖と著明なインスリン抵抗性は、肝臓特異的なインスリン受容体欠損マウス (LIRKO) マウスの表現型とよく似ていた。さらに LIRKO マウスでは糖新生亢進により高血糖が惹起されることが報告されていることから、mIR/HFD マウスの糖新生の律速酵素である PEPCK と G6Pase の発現を解析した。すると再摂食時の肝臓での PEPCK の遺伝子発現には大きな変化がないものの、G6Pase は著明に増加していた。PEPCK はアミノ酸やピルビン酸からの糖新生を担うのに対し、G6Pase はこれらに加えグリセロールからの糖新生も担っている。そこで、ピルビン酸あるいはグリセロールを投与しその後の血糖上昇を解析したところ、mIR/HFD マウスではグリセロール投与後に血糖が大きく上昇し、グリセロールからの糖新生が選択的に亢進していることが明らかになった。

(2) mIR/HFD マウスの脂肪代謝の変化

生体ではグリセロールは中性脂肪の脂肪分解により産生される。また、インスリンはホルモン感受性リパーゼ (HSL) リン酸化の抑制を介して脂肪分解を低下させる。そこで、

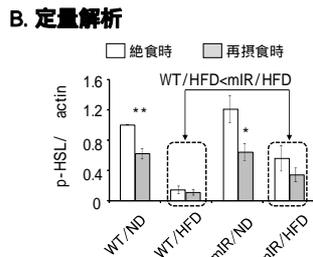
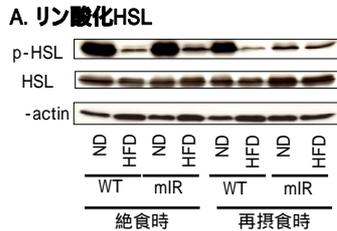


図2 mIR/HFDマウスの脂肪組織での脂肪分解亢進 A: リン酸化HSLのウェスタンブロット解析, B: 定量解析

mIR/HFDマウスの脂肪組織でのHSLリン酸化

をウェスタンブロットにより解析したところ、脂肪分解の抑制が有意に障害されていた(図2)。また、mIR/HFDマウスから単離した脂肪細胞でも脂肪分解が有意に亢進していた。このことから、mIR/HFDマウスでは脂肪組織での脂肪分解亢進によりグリセロールが放出され、これが肝臓での糖新生を亢進させ高血糖が誘発されることが明らかになった。

(3) 脂肪分解産物であるグリセロールによる肝臓の胆汁酸代謝の変化

mIR/HFDマウスの肝臓でどのような代謝変化が生じているかを明らかにする目的で、肝臓のマイクロアレイ解析を行ったところ、mIR/HFDマウスでは、Cyp7a1、Cyp8b1、Slco1a1

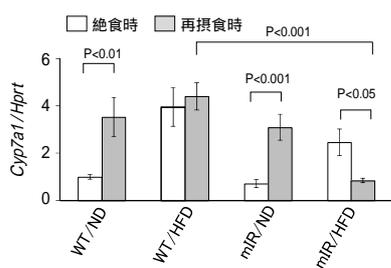


図3 mIR/HFD肝臓でのCyp7a1の発現亢進

など胆汁酸代謝に関わる遺伝子群の発現が大きく変化していることが明らかになった。特に、胆汁酸合成の律速酵素であるCyp7a1の遺伝子発現はmIR/HFDマウスで著明に減少していた(図3)。さらに、野生型マウスにグリセロールを投与するとCyp7a1の遺伝子発現は有意に抑制された。これらの結果から脂肪組織での脂肪分解がグリセロールを介して

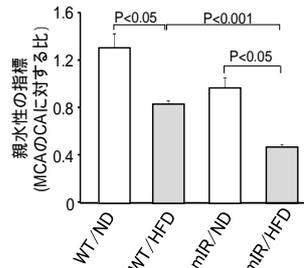


図4 肝臓における胆汁酸の親水性指標

て肝臓の胆汁酸代謝に寄与していることが明らかになった。また実際にmIR/HFDマウスの肝臓では胆汁酸の親水性が低下していた(図4)。近年、胆汁酸代謝が様々な経路を介して糖代謝を制御していることが報告されており、mIR/HFDマウスの高血糖にも胆汁酸代謝の異常が寄与している可能性が示唆

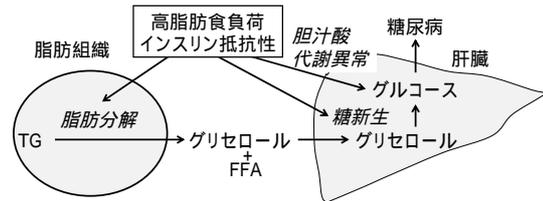


図5 脂肪過剰摂取による糖尿病発症機序のモデル

(4) 脂肪過剰摂取による糖尿病発症機序

以上の研究結果から、mIR/HFDマウスではインスリン抵抗性状態に高脂肪食負荷が加わることにより、脂肪組織での脂肪分解の亢進とそれによるグリセロール放出の増加が起こり、このグリセロールが肝臓での糖新生に利用されて高血糖が誘発されることが明らかになった(図5)。

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14件)
 Morita, A., Mukai, E., Hiratsuka, A., Takatani, T., Iwanaga, T., Lee, EY., Miki, T. (2016) Distinct effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibitor and glucagon-like peptide-1 receptor agonist on islet morphology and function. *Endocrine* 査読有、51(3):429-39. doi:10.1007/s12020-015-0733-4.
 Hirono, S., Lee, EY., Kuribayashi, S., Fukuda, T., Saeki, N., Minokoshi, Y., Iwanaga, T., Miki, T. (2016) Importance of adult Dmbx1 in long-lasting orexigenic effect of agouti-related peptide. *Endocrinology* 査読有、157(1):245-57. doi:10.1210/en.2015-1560.
Lee, EY., Sakurai, K., Zhang, X., Toda, C., Tanaka, T., Jiang, M., Shirasawa, T., Tachibana, K., Yokote, K., Vidal-Puig, A., Minokoshi, Y., Miki, T. (2015) Unsuppressed lipolysis in adipocytes is linked with enhanced gluconeogenesis and altered bile acid physiology in *Insr^{P1195L/+}* mice fed high-fat-diet. *Scientific Reports* 査

読有、5:17565. doi:10.1038/srep17565

Nakagomi, A., Okada, S., Yokoyama, M., Yoshida, Y., Shimizu, I., Miki, T., Kobayashi, Y., Minamino, T. (2015) Role of the central nervous system and adipose tissue BDNF/TrkB axes in metabolic regulation. *npj Aging and Mechanisms of Disease* 査読有、1, 15009. doi:10.1038/npjamd.2015.9

Seino, Y., Ogata, H., Maekawa, R., Iida, A., Harada, N., Miki, T., Inagaki, N., Tsunekawa, S., Seino, S., Oiso, Y., Hamada, Y. (2015) Fructose induces K_{ATP} channel-independent GIP and GLP-1 secretion and K_{ATP} channel-dependent insulin secretion. *J Diabetes Investig* 査読有、6(5):522-526. doi:10.1111/jdi.12356.

Oarada, M., Takahashi-Nakaguchi, A., Abe, T., Nikawa, T., Miki, T., Gono, T. (2015) Refeeding with glucose rather than fructose elicits greater hepatic inflammatory gene expression in mice. *Nutrition* 査読有、31, 757-765. DOI:10.1016/j.nut.2014.11.014.

Matsushita, K., Kitamura, K., Rahmutulla, B., Tanaka, N., Ishige, T., Satoh, M., Hoshino, T., Miyagi, S., Mori, T., Itoga, S., Shimada, H., Tomonaga, T., Kito, M., Nakajima-Takagi, Y., Kubo, S., Nakaseko, C., Hatano, M., Miki, T., Matsuo, M., Fukuyo, M., Kaneda, A., Iwama, A., Nomura, F. (2015) Haploinsufficiency of the c-myc transcriptional repressor FIR, as a dominant negative-alternative splicing model, promoted p53-dependent T-cell acute lymphoblastic leukemia progression by activating Notch1. *Oncotarget* 査読有、6, 5102-5117. DOI:10.18632/oncotarget.3244

Lee, EY., Kaneko, S., Jutabha, P., Zhang, X., Seino, S., Jomori, T., Anzai, N., Miki, T. (2015) Distinct action of the α -glucosidase inhibitor miglitol on SGLT3, enteroendocrine cells, and GLP1 secretion. *J Endocrinol* 査読有、224(3): 205-14. doi: 10.1530/JOE-14-0555.

Mukai, E., Ohta, T., Kawamura, H., Lee, EY., Morita, A., Sasase, T., Miyajima,

K., Inagaki, N., Iwanaga, T., Miki, T. (2014) Enhanced vascular endothelial growth factor signaling in islets contributes to cell injury and consequential diabetes in Spontaneously Diabetic Torii rats. *Diabetes Res Clin Pract* 査読有、2014 106:303-11, 2014. doi:10.1016/j.diabres.2014.08.023.

Kawamoto, K., Yabe, S., Konno, M., Ishii, H., Nishida, N., Koseki, J., Fukuda, S., Tomimaru, Y., Hama, N., Wada, H., Kobayashi, S., Eguchi, H., Tanemura, M., Ito, T., Lee, E-Y., Mukai, E., Miki, T., Doki, Y., Mori, M., Hamazaki, T., Nagano, H., Okochi, H. (2014) Murine insulinoma cell-conditioned medium with BETA2/Neurod1 transduction efficiently induces the differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into β -like cells both in vitro and in vivo. *J Stem Cell Res Ther* 査読有、4:221, 2014. DOI:http://dx.doi.org/10.4172/2157-7933.1000221

Ogata, H., Seino, Y., Harada, N., Iida, A., Suzuki, K., Izumoto, T., Ishikawa, K., Uenishi, E., Ozaki, N., Hayashi, Y., Miki, T., Inagaki, N., Tsunekawa, S., Hamada, Y., Seino, S., Oiso, Y. (2014) K_{ATP} channel as well as SGLT1 participates in GIP secretion in the diabetic state. *J Endocrinol* 査読有、222(2):191-200. doi:10.1530/JOE-14-0161.

Kitamoto, T., Sakurai, K., Tachibana K., Yokoh H., Ishikawa, K., Miki, T., Yokote K. (2013) A case of Type 1 diabetes with nocturnal hypoglycemia after desensitization therapy for insulin allergy. *Diabetes Care* 査読有、36(7):e89. doi: 10.2337/dc12-2591

Seino, Y., Miki, T., Fujimoto, W., Lee, EY., Takahashi, Y., Minami, K., Oiso, Y., Seino, S. (2013) Cephalic phase insulin secretion is K_{ATP} channel-independent. *J Endocrinol* 査読有、218(1):25-33. doi:10.1530/JOE-12-0579.

Oarada, M., Miki, T., Kohno, S., Sakai, K., Nikawa, T., Yoneyama, M., Gono, T. (2013) Refeeding with a standard diet after a 48-h fast elicits an inflammatory response in the mouse

liver. *J Nutr Biochem* 査読有、
24(7):1314-23.doi:10.1016/j.jnutbio.
2012.10.006.

〔学会発表〕(計 18 件)

三木隆司 (2016) 糖恒常性の維持機構(教育講演). 第 93 回日本生理学会, 札幌コンベンションセンター(北海道、札幌), 2016/3/23.

Miki, T., Lee, E.Y., Minokoshi, Y. (2016) 胆汁酸代謝制御による糖尿病治療. 第 93 回日本生理学会, 札幌コンベンションセンター(北海道、札幌), 2016/3/24.

Lee, E.Y., Sakurai K, Zhang, X., Minokoshi Y, Miki, T. (2015) Fat transplantation ameliorates high-fat diet induced hyperglycemia in *Insr^{P1195L/+}* mice. 75th Annual Meeting of the American Diabetes Association. Boston (USA), 2015/7/8.

森本真有, 李恩瑛, 張錫麟, 櫻井健一, 三木隆司 (2015) 高脂肪食感受性糖尿病マウスにおける EPA の高血糖改善メカニズム. 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会, 海峡メッセ下関(山口県、下関市), 2015/5/24.

李恩瑛, 櫻井健一, 張錫麟, 戸田知得, 箕越靖彦, 三木隆司 (2015) 皮下脂肪移植による高脂肪食感受性糖尿病マウスの高血糖改善メカニズム. 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会, 海峡メッセ下関(山口県、下関市), 2015/5/24.

鈴木佐和子, 中山哲俊, 李恩瑛, 三木隆司, 田中知明, 横手幸太郎 (2015) 癌抑制遺伝子 p53 によるグルタミン代謝調節作用の生活習慣病と癌における役割. 第 88 回日本内分泌学会学術総会, ホテルニューオータニ東京(東京都、千代田区), 2015/4/25.

Miki, T., Lee, E.Y., Minokoshi, Y. (2015) 肝臓における代謝産物感知と糖代謝制御. 第 92 回日本生理学会, 神戸国際会議場(兵庫県、神戸市), 2015/3/21.

Lee, E.Y., Zhang, X., Miki, T. (2014) Mechanism and physiological roles of glucose sensing in enteroendocrine cells. 50th EASD Annual Meeting, Vienna (Austria), 2014/9/16.

Mukai, E., Morita, A., Hiratsuka, A., Takatani, T., Lee, E.Y., Miki, T. (2014) Dual roles of a DPP-4 inhibitor on cytoprotection and proliferation of pancreatic β -cells in a mouse model of β -cell injury/regeneration. 50th EASD Annual Meeting, Vienna (Austria), 2014/9/19.

李恩瑛, 張錫麟, 三木隆司 (2014) 腸内分泌 L 細胞のグルコース感知と脳への情

報伝達. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会, 大阪国際会議場(大阪府、大阪市), 2014/5/24.

尾方秀忠, 清野祐介, 原田範雄, 飯田淳史, 鈴木和代, 泉本貴子, 石川孝太, 上西栄太, 尾崎信暁, 林良敬, 三木隆司, 稲垣暢也, 清野進, 濱田洋司, 恒川新, 大磯ユタカ(2014) 単糖類は K_{ATP} チャネル依存性の経路と非依存性の経路により GIP 分泌を惹起する. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会, 大阪国際会議場(大阪府、大阪市), 2014/5/24.

森田亜州華, 向英里, 平塚文乃, 高谷具純, 李恩瑛, 三木隆司 (2014) DPP- 阻害薬による膵 細胞死抑制と増殖促進-膵 細胞傷害/再生マウスを用いた検討-第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会, 大阪国際会議場(大阪府、大阪市), 2014/5/22.

Miki, T. (2014) インスリンによる脂肪組織-肝臓間の代謝産物の動態制御. 第 91 回日本生理学会, 鹿児島大学(鹿児島県、鹿児島市), 2014/3/16.

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), 2013/9/24.

櫻井健一, 李恩瑛, 橘香穂里, 石川耕, 三木隆司 (2013) 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. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会, ホテル日航熊本(熊本県、熊本市), 2013/5/18.

清野祐介, 尾崎信暁, 深見亜也子, 尾方秀忠, 飯田淳史, 藤谷淳, 大川哲司, 石川孝太, 泉本貴子, 上西栄太, 三木隆司, 清野進, 恒川新, 林良敬, 大磯ユタカ, 濱田洋司 (2013) プログルカゴン遺伝子 GFP ノックインマウスにおける膵 細胞由来 GIP の分泌機構の解明. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会, ホテル日航熊本(熊本県、熊本市), 2013/5/16.

李恩瑛, 櫻井健一, 戸田知得, 箕越靖彦, 三木隆司 (2013) 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, ホテル日航熊本(熊本県、熊本市), 2013/5/18.

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, ホテル日航熊本(熊本県、熊本市), 2013/5/17.

〔図書〕(計8件)

三木隆司、日本臨床社、日本臨床増刊号：
新時代の臨床糖尿病学。「栄養素、インク
レチン、神経系によるインスリン分泌制
御」、2015、671。

三木隆司、科学評論社、内分泌糖尿病代
謝内科：中枢神経系によるエネルギー代
謝調節機構。「中枢 K_{ATP} チャンネルによる糖
代謝調節機構」、2015、88。

三木隆司、羊土社、実験医学：グルカゴ
ン革命 糖尿病の真の分子病態を追え！
「グルカゴン抑制作用を有する抗糖尿病
薬」、2015、234。

三木隆司、科学評論社、内分泌糖尿病代
謝内科：グルカゴンの分泌調節と作用。
「GLP-1 の膵 細胞における作用とその
機序」、2014、91。

三木隆司、医学の世界社、ホルモンと臨
床：ラ氏島細胞研究 Update。「膵 細胞
と膵 細胞におけるインスリンとグルカ
ゴンの分泌調節機構」、2014、83。

三木隆司、科学評論社、内分泌糖尿病代
謝内科：グルカゴンの分泌調節と作用。
「GLP-1 の膵 細胞における作用とその
機序」、2014、91。

三木隆司、医歯薬出版株式会社、医学の
あゆみ：イオンチャンネル病の全て。「ATP
感受性 K^+ チャンネルと疾患」、2013、100。

三木隆司、丸善出版株式会社、ギャノン
グ生理学 原書 24 版。「肝臓の輸送機能
と代謝機能」、2013、860。

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

千葉大学大学院医学研究院代謝生理学研
究室ホームページ：

[http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/physio
l/index.html](http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/physiol/index.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

三木 隆司 (MIKI, Takashi)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：50302568

(2)研究分担者

向 英里 (MUKAI, Eri)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：60362539

李 恩瑛 (LEE, Eun Young)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：60583424