

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850090

研究課題名(和文) 蛋白質による膵 細胞量調節機構の解明

研究課題名(英文) The research on mechanism for regulating pancreatic beta cell mass through proteins

研究代表者

松田 友和 (MATSUDA, TOMOKAZU)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：20570344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病発症において糖尿病発症初期からの膵 細胞量の減少が注目されている。一方、H CDP(Histidine-Containing dipeptides)であるL-carnosineの膵 細胞量に対する影響は明らかではない。そこで、膵 細胞量の減少した前糖尿病モデルマウスとして作成した膵 細胞特異的C/EBP トランスジェニックマウスにL-carnosineを投与し、膵 細胞に対するL-carnosineの効果を解析したところ、随時血糖値の低下と耐糖能の改善、膵 細胞量の増加が認められた。L-carnosineはC/EBP の発現を抑制することで膵 細胞量を増加させていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：L-Carnosine (carnosine), a histidine-containing dipeptide (HCDP), is present in the brain and muscle in large amounts. Several studies have shown that carnosine plays a role in glucose metabolism and suppresses diabetic nephropathy and that carnosine increases pancreatic β -cell mass without influencing insulin resistance and insulin secretion capacity in leptin receptor knock-out (db/db) mice (Diabetes 56: 2425-2432, 2007). However, the mechanism by which carnosine increases pancreatic β -cell mass is unknown. We generated pancreatic β -cell-specific CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) transgenic (TG) mice and showed that pancreatic β -cell mass is inversely proportional to the C/EBP expression level. Pancreatic β -cell mass was decreased markedly in TG mice compared with WT mice but increased significantly after carnosine administration. It was considered that this increase in pancreatic β -cell mass might lead to improved blood glucose levels in TG mice.

研究分野：膵 細胞量の調節機構

キーワード：膵 細胞量 カルノシン C/EBP

1. 研究開始当初の背景

日本人 2 型糖尿病の発症において膵β細胞分泌不全が注目されており、その要因として、糖尿病発症初期からの膵β細胞量の減少が考えられている。

我々が作成した膵β細胞特異的 C/EBPβ(CCAAT/Enhancer Binding Proteinβ)トランスジェニックマウスは、その C/EBPβの発現量に反比例するように膵β細胞量が減少し、高血糖を呈する。発現量の多いラインは、血糖値が 400mg/dl を超える overt diabetes となるが、発現量の少ないラインは、膵β細胞量が著明に減少するものの、血糖値は 200mg/dl(随時)を超えずに推移する。また、このマウスは野生型と比較して体重減少は認めない。つまり、膵β細胞量の少ない前糖尿病モデルマウスと言える(J Clin Invest 120: 115-126, 2010)。

2. 研究の目的

HCDP(Histidine-Containing dipeptides)である L-carnosine(carnosine)は、脳や筋肉に多く含まれていることが知られている。carnosine が糖代謝に作用し糖尿病腎症を抑制することや(Diabetes 54: 2320-2327, 2005)、レプチン受容体欠損マウスに投与することで、インスリン抵抗性やインスリン分泌能には影響を及ぼさないが、膵β細胞量を増加させることが報告されている(Diabetes 56: 2425-2432, 2007)。しかし、carnosine がどのような機序で膵β細胞量を増加させるのかは明らかではない。

そこで我々はこの C/EBPβの発現量が少ないラインのマウスに carnosine を投与し、膵β細胞量や耐糖能に対する効果を評価することで、インスリン抵抗性に依存しない膵β細胞に対する carnosine の効果を解析した。

3. 研究の方法

マウスに対する carnosine の投与:

carnosine 投与群(car+)および carnosine 非投与群(car-)をつくり、それぞれの群に野生型マウス(WT)、膵β細胞特異的 C/EBPβトランスジェニックマウス(TG)を用意し、carnosine を水に 4mmol/l で溶解し、4 週齢より飲水投与した。

インスリンアッセイ: 酵素免疫測定法

(Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay; ELISA 法)によるインスリン測定キットであるレピインスリン - マウス U (株)シバヤギ)を用いて血清インスリン値を測定した。

経口ブドウ糖負荷試験 (Oral glucose tolerance test; OGTT):

16 週齢のマウスを 16 時間絶食(carnosine も中止)した後、1.5g/kg のグルコースを経口投与し、グルコース負荷前、負荷後 15・30・60 分の血糖値とインスリン値及び、負荷後 45・90・120 分の血糖値を測定した。

免疫染色: 16 週齢のマウスから膵臓を摘出しホルマリンで固定した後、パラフィンで包埋し切片を作製した。その切片を CY3 標識抗インスリン・モルモット抗体 (DAKO) 及び FITC 標識抗グルカゴン・ウサギ抗体 (DAKO) を用いて免疫二重染色を行い、膵ラ氏島の形態学的観察及び膵β細胞量の測定を行った。

細胞培養と処理: マウス膵β細胞の腫瘍化細胞株 MIN6 細胞を 15% 牛胎児血清添加 Eagle ' s Medium(SIGMA)を用いて 5% CO₂、37 °C の条件下で培養した。C/EBPβの発現ベクター (p-BABE-C/EBPβ)を用いて、Lipofectamine2000(Invitrogen)により MIN6 細胞に C/EBPβを強発現させた。

蛋白質発現解析: MIN6 細胞から蛋白質を抽出し、protein assay および蛋白質濃度調整の後に Western Blotting を行った。

1 次抗体に抗 C/EBP β 抗体、抗 CHOP 抗体 (SANTA CRUZ)、抗 β -actin 抗体 (SIGMA) を用いた。

統計学的検討：

Unpaired-Student ' s-t-test による検定を行い、* : P<0.05、** : P<0.01 とした。

4 . 研究成果

4 週齢から 14 週齢までの体重の推移は、carnosine 投与群と非投与群で有意な差は見られなかった (図 1 A)。同期間計測した血糖値の推移では、野生型マウスの carnosine 投与群と非投与群で有意な差は見られなかった。一方で、12 週齢および 14 週齢において TG 群の随時血糖値は、carnosine 投与群は非投与群に比べ、有意に低下していた (図 1 B)。インスリン値は、TG 群は野生型に比べて低値の傾向であったが、carnosine による効果は明らかではなかった (図 1 C)。

図 1 A

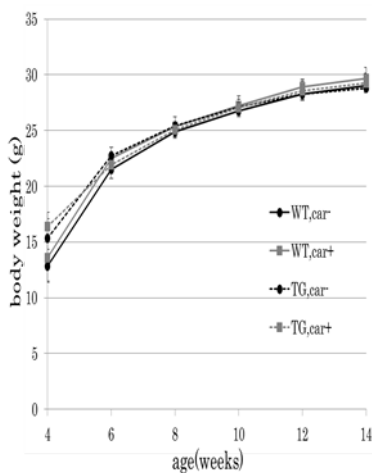


図 1 B

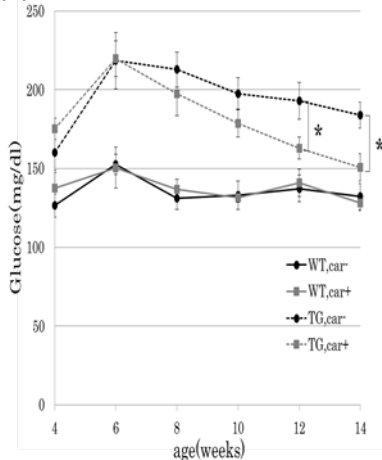
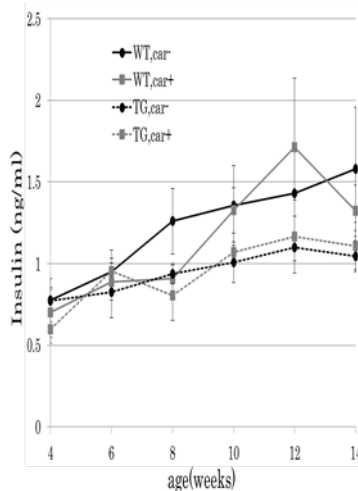


図 1 C



さらに carnosine 投与群と非投与群の耐糖能を比較するために、16 週齢のマウスを用いて経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT) を行った。トランスジェニックマウスの carnosine 投与群は、非投与群と比較して、空腹時の血糖値に有意差はなかったが、グルコース負荷後 45 分値から血糖値が有意に低下していた。また、野生型マウスの carnosine 投与群は、非投与群と比較して、空腹時の血糖値に有意差はなかったが、グルコース負荷後 30 分値のみ血糖値が有意に低下していた (図 2 A)。インスリン分泌は、TG 群は野生型に比べて低値の傾向であった。野生型、TG 群ともに carnosine 投与によってインスリン分泌能が改善する傾向ではあったが、有意な差は認めなかった (図 2 B)。

図 2 A

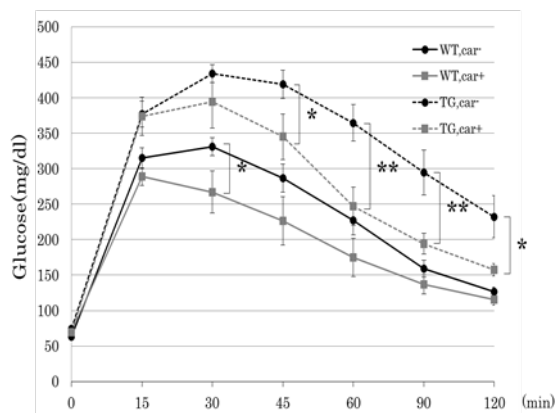
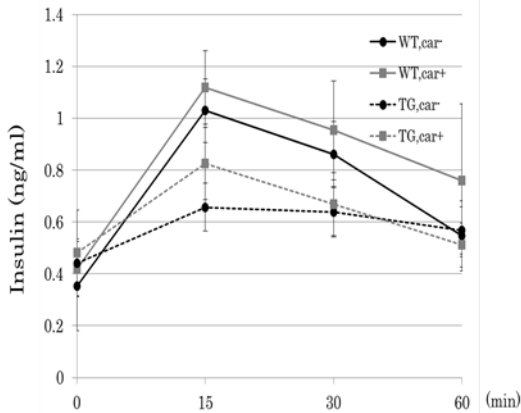
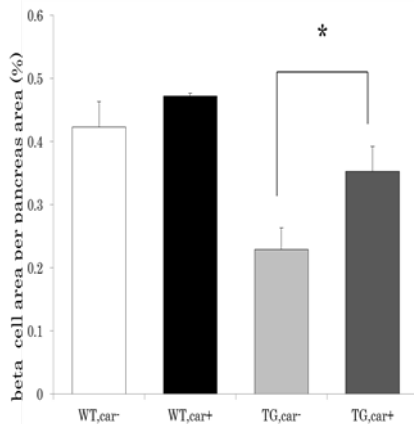


図 2 B



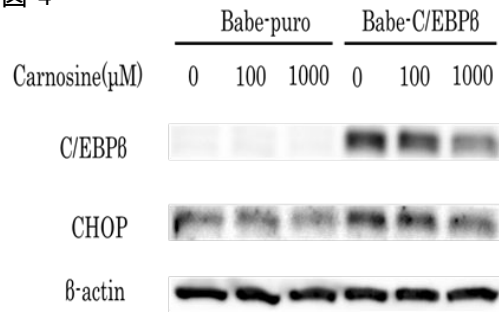
次に、各群のマウスの膵β細胞量を免疫染色にて評価した。野生型マウスは carnosine 投与群と非投与群で有意な差はなかった。一方で、トランスジェニックマウスの carnosine 投与群は非投与群に比較して、膵β細胞量が有意に増加していた(図 3)。

図 3



さらに、トランスジェニックマウスの carnosine 投与群において膵β細胞量が増加していた機序を検討するために、MIN6細胞を用いて蛋白質レベルで解析を行った。C/EBPβを強発現させることで、アポトーシス関連マーカーである CHOP の発現が亢進したが、carnosine を負荷することで、C/EBPβの発現抑制を伴い CHOP の発現は抑制された(図 4)。

図 4



膵β細胞特異的 C/EBPβトランスジェニックマウス(TG 群)は膵β細胞量が減少しているが、血糖値の上昇は軽度にとどまる。また、体重低下を来さないことより、膵β細胞量の減少した前糖尿病モデルマウスであると考えている。そのマウスに carnosine を投与したところ、12 週齢(投与後 8 週齢)より随時血糖の低下を認めた。また、TG 群は carnosine 投与により経口ブドウ糖負荷試験にて耐糖能の改善を認めた。さらに、TG 群では carnosine 投与により膵β細胞量の増加を認めた。以上より、carnosine は TG 群の膵β細胞量を増加させることで耐糖能を改善させたと考えられた。in vitro では強発現させた C/EBPβの発現が carnosine 投与により減少した。我々は、レプチン受容体欠損マウスや Akita マウスの膵β細胞において蓄積している C/EBPβを膵β細胞特異的に欠損させることで、膵β細胞量を増加させることを報告している。つまり、carnosine は C/EBPβの発現を抑制することで、膵β細胞量を増加させるのではないかと考えられた。しかし、今回の検討では随時、あるいはブドウ糖負荷時のインスリン値には carnosine 投与による影響は明らかではなかった。また野生型では、膵β細胞量に carnosine は影響を及ぼさないにも関わらず、ブドウ糖負荷試験の 30 分値で血糖値の有意な低下を認めた。これらより、carnosine には膵β細胞量に対する効果以外に、インスリン分泌能に

も影響を及ぼしている可能性が示唆された。また、インスリン抵抗性に関する筋肉や肝臓への影響も検討していく必要があると考えている。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 友和 (MATSUDA Tomokazu)

神戸大学大学院・医学研究科・医学研究員

研究者番号：20570344