

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860300

研究課題名(和文)新規モデルマウスを用いた高脂肪食誘導性耐糖能異常における疾患感受性規定因子の解明

研究課題名(英文) Identification of the determinants of susceptibility to high-fat diet-induced glucose intolerance using a new mouse model

研究代表者

長尾 元嗣 (NAGAO, Mototsugu)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：10468762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は近年、高脂肪食投与後の耐糖能を指標としたマウスの連続的選抜交配を行い、高脂肪食誘導性耐糖能異常を易発するSDG-P系と、抵抗性を示すSDG-R系の2系統を確立した。本研究では、両系統マウス間でのインスリン分泌能や摂食行動の差異に関する解析を行い、SDG-P系では生体および単離膵島レベルでのグルコース応答性インスリン分泌能が遺伝的に低値を示すこと、高脂肪食投与初期に過食となるSDG-P系は血中レプチン濃度が低値を示すこと、を見出した。以上の結果より、高脂肪食誘導性耐糖能異常における疾患感受性規定因子として、遺伝的なインスリン分泌能や低レプチン状態が重要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We have performed repetitive selective breeding of mice exhibiting different glucose tolerance after high-fat diet (HFD) feeding, and recently established 2 mouse lines with distinctively different susceptibilities (prone and resistant) to HFD-induced glucose intolerance (SDG-P and SDG-R, respectively). In the present study, we analyzed the differences in insulin secretory capacity and in feeding behavior between the 2 lines of mice to explore the hereditary predisposition to HFD-induced glucose intolerance. As compared to SDG-R mice, SDG-P mice showed lower glucose-induced insulin secretory capacity in vivo and in vitro (isolated islets) even before HFD feeding. In addition, SDG-P mice showed hyperphagia preceding the development of obesity under HFD feeding, and had lower plasma leptin levels as compared to SDG-R mice. In conclusion, hereditary insulin and leptin secretion may determine the susceptibility to HFD-induced glucose intolerance.

研究分野：実験病理学

キーワード：選抜交配 モデルマウス 高脂肪食 耐糖能異常 摂食行動 インスリン分泌能 レプチン分泌能

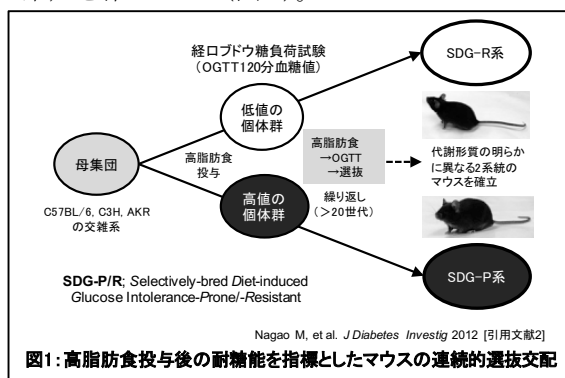
1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者数の増加は世界的な問題となっており、特にアジア太平洋地域での2型糖尿病患者数の増加は顕著である。アジア人特有の低インスリン分泌能という遺伝的背景に加えて、食習慣の欧米化や身体活動量の低下といった生活環境の変化がその要因と考えられている。特に食習慣の要因に注目すると、本邦を含む東アジア諸国では脂肪摂取量がこの半世紀で約3倍に増加しているが、脂肪摂取量の増加が2型糖尿病の発症を増加させるか否かについては、現在も一定した見解は得られていない。しかし、遺伝的にインスリン分泌能が低いアジア人の断面調査、耐糖能異常者を対象としたいくつかのコホート研究、糖・脂質代謝に関連する遺伝子型別の解析において、脂肪摂取量の増加に伴う2型糖尿病発症リスクの増加が示されている¹。

基礎研究においては、動物に高脂肪食と低脂肪食(普通食)を投与して、その後の代謝形質を比較した研究が多数行われているが、「高脂肪食環境下においてなぜ2型糖尿病の発症に個人差(個体差)が存在するのか」という疑問については、その詳細なメカニズムはほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

申請者らは2001年より、高脂肪食環境下における2型糖尿病の発症基盤の解明を目的として、高脂肪食投与後の耐糖能(経口ブドウ糖負荷試験[OGTT]における負荷後120分血糖値[BG120min])を指標としたマウスの連続的選抜交配を10余年にわたって行ない、高脂肪食投与後の耐糖能に明らかな差異を認める2系統のモデルマウス(SDG-P系とSDG-R系)を確立した(図1)。



SDG-P系マウスは高脂肪食投与前から軽度の耐糖能異常を示し(前糖尿病状態)、高脂肪食投与によって空腹時血糖値の上昇を伴った顕性の糖尿病状態に進展するが、SDG-R系マウスは高脂肪食投与後においても正常耐糖能を維持することがわかっている²。

そこで本研究では、SDG-P/R両系統マウスの選抜交配過程における代謝形質(耐糖能、摂食行動、体重)の変化を世代横断的に分析することによって両系統マウス間での代謝表現型の差異を明確化し、その差異の発生機

序を器官レベルで解析することで、高脂肪食誘導性耐糖能異常における疾患感受性規定因子の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) SDG-P/R系マウスの選抜交配過程における形質変化

SDG-P/R両系統マウスの選抜交配過程(5~20世代)において、各世代全個体の高脂肪食(脂質 32en%, 5~10週齢にかけて5週間)投与後のBG120min(選抜指標)・空腹血糖値(FBG)・体重、高脂肪食の摂餌量を測定してきた。本研究ではそれらの記録を元に、両系統マウスにおける世代横断的な代謝形質の変化を分析した。

(2) インスリン分泌能の解析

高脂肪食投与前(5週齢)のSDG-P/R系マウス(雄性)に対してOGTTを行い、耐糖能とインスリン分泌能を評価した。さらにインスリン負荷試験(ITT)を行って、インスリン感受性を評価した。

次に両系統マウスを剖検し、膵臓の連続切片を作成して、免疫組織学的に膵β細胞量を測定した。また、コラゲナーゼ法を用いて両系統マウスの膵ランゲルハンス島(膵島)を単離し、*in vitro*でのグルコース応答性インスリン分泌能(GSIS)を評価すると共に、インスリン分泌関連因子の遺伝子発現をリアルタイムPCR法で測定した。

(3) 摂食行動に関する解析

① ペアフェッド試験

SDG-P/R系マウス(雄性)の自由摂食群に加えて、SDG-R系マウスの自由摂食群と同量に制限給餌したSDG-P系マウスのペアフェッド群を設け、高脂肪食(脂質 32en%, 5~10週齢にかけて5週間)投与時の体重の推移と、高脂肪食投与後の耐糖能を評価した。

② レプチン動態の解析

体重を一致させた5~6週齢のSDG-P/R系マウス(雄性)に高脂肪食(脂質 32en%)を3日間投与し、3日目(自由摂食下期初期)の血中レプチン濃度を測定し、剖検を行なって精巢周囲脂肪組織(eWAT)のレプチン遺伝子発現をリアルタイムPCR法で測定した。また、高脂肪食投与開始と同時にレプチン(50 μg)もしくは等量の生理食塩水を1日2回(明期初期と終期)皮下投与して、3日間の摂餌量と体重の変化を測定した。

4. 研究成果

(1) SDG-P/R系マウスの選抜交配過程における形質変化

BG120min(選抜指標)やFBGといった糖代謝に関する形質は、雄性・雌性ともに、選抜交配の世代が進むにつれて両系統間の差が拡大しており、それと同時に高脂肪食の摂餌

量や体重の差も拡大していた。両系統間での形質差が拡大した原因として、糖代謝や体重に関しては、選抜交配の進行に伴った SDG-P 系マウスでの糖代謝の悪化および体重増加が、また高脂肪食の摂餌量に関しては、世代の進行に伴った SDG-R 系マウスで摂餌量の減少が寄与していることがわかった。

(2) インスリン分泌能の解析

高脂肪食投与前 (5 週齢) の SDG-P 系マウスは、SDG-R 系と比較して、体重に差はなく、ITT におけるインスリン感受性にも差異を認めなかったが、OGTT ではすでに軽度の耐糖能異常を示していた (図 2)。そこで、両系統マウスのインスリン分泌能に関する解析を行なった。

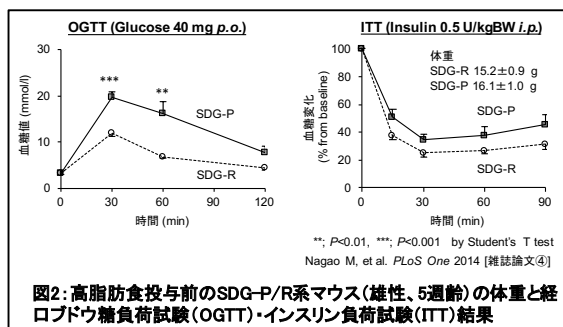


図2: 高脂肪食投与前のSDG-P/R系マウス(雄性、5週齢)の体重と経口ブドウ糖負荷試験(OGTT)・インスリン負荷試験(ITT)結果

まず、OGTT における血中インスリン値の変化を測定したところ、SDG-P 系マウスでは負荷後 15 分での血中インスリン値の上昇が SDG-R 系と比較して乏しく、膵β細胞機能を反映するインスリン分泌指数が低値であった (図 3)。また SDG-P 系マウスから単離した膵島では、SDG-R 系と比較して明らかな GSIS の低値を示した (図 3)。一方で、SDG-P 系マウス一個体あたりの膵β細胞量は、SDG-R 系と比較して差は認めなかった。従って、遺伝的な低インスリン分泌能は、高脂肪食誘導性耐糖能異常の発症基盤として重要であると考えられた。

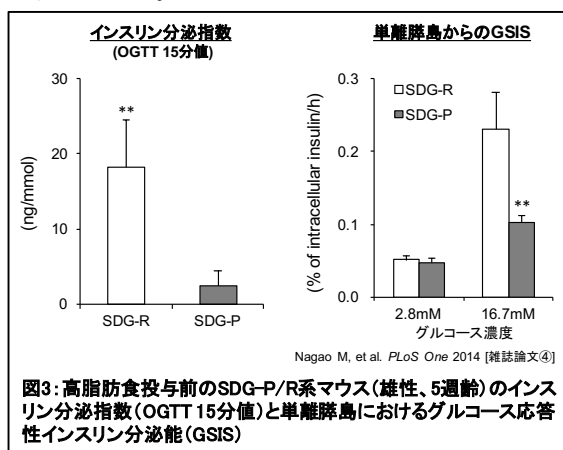


図3: 高脂肪食投与前のSDG-P/R系マウス(雄性、5週齢)のインスリン分泌指数(OGTT 15分値)と単離膵島におけるグルコース応答性インスリン分泌能(GSIS)

膵島における遺伝子発現解析の結果、SDG-P 系マウスの膵島では、インスリン分泌に関与する GLUT2, PDX1 および SNARE タンパク質群 (STX1a, SNAP25) の mRNA 発現量が、SDG-R 系と比較して遺伝的に低値を示すことから、複合的な遺伝子発現の差異が両系統マウス間でのインスリン分泌能の差異を規

定するものと考えられた。

(3) 摂食行動に関する解析

① ペアフェッド試験

SDG-P/R 系マウスの選抜交配過程における形質変化の分析 [4. 研究成果 (1) 参照] から、SDG-P 系マウスは、SDG-R 系と比較して、高脂肪食投与時に過食となることがわかってい。そこで、高脂肪食投与時の摂食行動が両系統マウス間での代謝形質の差に与える影響を明らかにするため、SDG-P 系マウスの高脂肪食摂餌量を SDG-R 系と同量に制限給餌したペアフェッド試験を行なった。

SDG-P 系自由摂食群の摂餌量は、両系統マウス間での体重差がほとんどない高脂肪食投与初期から、SDG-R 系自由摂食群と比較して明らかに多く、その差は経時的に拡大することがわかった。高脂肪食 5 週間投与後の体重は、SDG-P 系自由摂食群では、SDG-R 系自由摂食群と比較して約 10 g 程度多かったが、SDG-P 系ペアフェッド群では、SDG-R 系自由摂食群とほぼ同等の体重増加に留まっていた。また、高脂肪食投与後に実施した OGTT では SDG-P 系自由摂食群でのみ空腹時血糖値の上昇を伴う耐糖能の悪化を認めたが、SDG-P 系ペアフェッド群の耐糖能は高脂肪食投与前とほぼ同等の水準を維持しており、高脂肪食投与による悪化を認めなかった。

従って、SDG-P 系マウスにおける高脂肪食投与時の耐糖能悪化には、高脂肪食投与下における過食と体重増加が密接に関与することが明らかとなった。

② レプチン動態の解析

次に高脂肪食投与時の摂食行動の差異を規定する要因を明らかにするため、両系統マウス間での体重差がほとんどない高脂肪食投与 3 日目において、両系統マウスの血中レプチン濃度を測定した。その結果、高脂肪食投与時に過食を示す SDG-P 系マウスは、SDG-R 系と比較して、血中レプチン濃度が低値を示した。剖検時に測定した eWAT 重量は両系統マウス間で差異を認めなかったが、SDG-P 系マウスでは eWAT におけるレプチンの mRNA 発現量が、SDG-R 系と比較して低値を示した。

次に、高脂肪食投与開始後の 3 日間において、両系統マウスにレプチン (100 μg/日) を連続皮下投与した。その結果、SDG-R 系マウスと同様に、SDG-P 系マウスでもレプチン投与によって摂餌量が減少し、体重増加も抑制された。つまり、高脂肪食投与初期の時点では、両系統マウス間でのレプチン感受性に明らかな差異はないものと考えられた。

以上の結果より、SDG-P 系マウスにおける高脂肪食投与初期の過食には、レプチン感受性よりも、白色脂肪組織でのレプチン合成低下に起因する低レプチン状態が寄与するものと考えられた。

(4) 結論

以上の研究から、SDG-P系マウスで観察される高脂肪食誘導性耐糖能異常の出現には、遺伝的な低インスリン分泌能という発症基盤に加えて、低レプチン状態に起因する高脂肪食の過食が重要であることがわかった(図4)。これらの形質は、多世代に及ぶ選抜交配によって次第に濃縮されていることから、複数の遺伝子多型の集積が関与するものと想定される。これらの特徴は、疫学研究において、脂肪摂取量の増加に伴う2型糖尿病発症リスクの増加が示された集団の特徴¹とも類似していた。

最近の研究から、高脂肪食投与後のSDG-P系マウスが脂質異常症²や血圧上昇¹を呈することや、動脈硬化惹起食の投与により動脈硬化巣形成が亢進することもわかっており³、SDG-P/R系マウスは高脂肪食環境下における代謝異常症の出現機序を包括的に解明する極めて有益なモデル動物と考えられた。

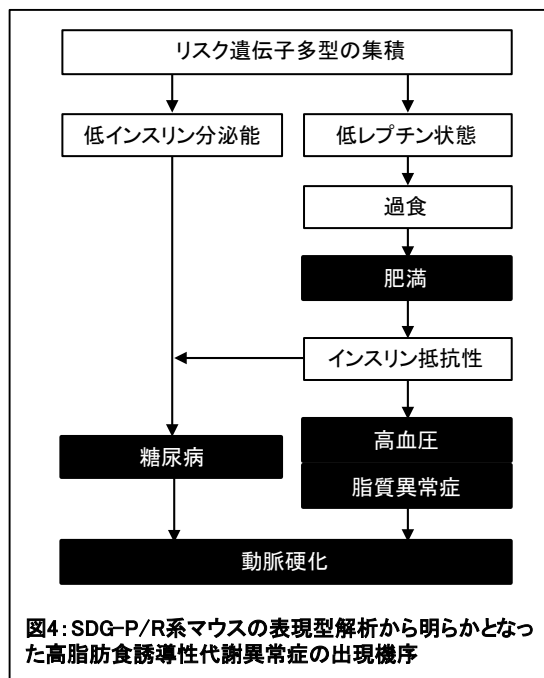


図4: SDG-P/R系マウスの表現型解析から明らかとなった高脂肪食誘導性代謝異常症の出現機序

我々は現在、SDG-P/R系マウスの表現型解析から得られた知見をもとに、その差異を決定する分子メカニズムの解明に着手しており、将来的にはその成果を2型糖尿病に対する新たな予防・治療法の開発につなげていきたいと考えている。

<引用文献>

1. Nagao M, Asai A, Sugihara H, Oikawa S. Fat intake and the development of type 2 diabetes. *Endocr J*: In press.
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 3 (3): 245-251, 2012.

3. Asai A, Nagao M, Kawahara M, et al. Effect of impaired glucose tolerance on atherosclerotic lesion formation: An evaluation in selectively bred mice with different susceptibilities to glucose intolerance. *Atherosclerosis* 231 (2): 421-426, 2013.

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5件)

- ① Nagao M, Asai A, Sugihara H, Oikawa S. Fat intake and the development of type 2 diabetes. *Endocr J*: In press. 査読有 DOI:10.1507/endocrj.EJ15-0055
- ② Nagao M, Asai A, Sugihara H, Oikawa S. Transgenerational changes of metabolic phenotypes in two selectively bred mouse colonies for different susceptibilities to diet-induced glucose intolerance. *Endocr J* 64 (4): 371-378, 2015. 査読有 DOI:10.1507/endocrj.EJ14-0241
- ③ 長尾元嗣, 浅井明, 杉原仁, 及川眞一. 脂肪摂取と2型糖尿病. *オレオサイエンス* 15 (2): 69-78, 2015. 査読無 <http://www.jocs-office.or.jp/mokuji/oleo15-2.html>
- ④ Nagao M, Asai A, Inaba W, Kawahara M, Shuto Y, Kobayashi S, Sanoyama D, Sugihara H, Yagihashi S, Oikawa S. Characterization of pancreatic islets in two selectively bred mouse lines with different susceptibilities to high-fat diet-induced glucose intolerance. *PLoS One* 9 (1): e84725, 2014. 査読有 DOI:10.1371/journal.pone.0084725
- ⑤ 長尾元嗣, 浅井明, 及川眞一. 高血糖と動脈硬化 実験動物からのアプローチ. *糖尿病合併症* 28 (1): 66-69, 2014. 査読無

[学会発表] (計10件)

- ① 長尾元嗣、高脂肪食誘導性耐糖能異常への感受性が異なる2系統のマウスにおけるレプチン分泌と視床下部レプチン受容体に関する解析、第41回日本神経内分泌学会学術集会、2014年10月31日~11月2日、東京
- ② 長尾元嗣、高脂肪食誘導性肥満耐糖能異常マウスと同抵抗性マウスのレプチン分泌動態に関する解析、第35回日本肥満学会、2014年10月24日~25日、宮崎
- ③ Nagao M, Transgenerational changes in selectively bred mice for different susceptibilities to diet-induced glucose intolerance, 50th EASD (Annual

Meeting of the European Association for the Study of Diabetes), 2014年9月15日～19日, Vienna (Austria)

- ④ 長尾元嗣, Gene-Environment Interaction に基づいた新しい糖尿病モデルマウスの開発とその解析、第82回日本医科大学医学学会総会（招待講演）、2014年9月6日、東京
- ⑤ 長尾元嗣, 高脂肪食誘導性耐糖能異常への感受性が異なる SDG-P/R マウスのインスリン分泌能と膵臓遺伝子発現に関する解析、第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2014年7月10日～11日、東京
- ⑥ 長尾元嗣, 遺伝的な膵島機能のよって規定される高脂肪食誘導性耐糖能異常の出現：新規選抜交配モデルマウスでの解析、第57回日本糖尿病学会年次学術集会、2014年5月22日～24日、大阪
- ⑦ 長尾元嗣, 高脂肪食誘導性耐糖能異常への感受性が異なる新規選抜交配モデルマウスのインスリン分泌能に関する解析、第28回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、2014年2月14日～15日、宮崎
- ⑧ 長尾元嗣, 高脂肪食誘発性耐糖能異常への感受性が異なる2系統のマウスにおける摂食行動の検討、第40回日本神経内分泌学会学術集会、2013年10月25日～26日、宮崎
- ⑨ Nagao M, Feeding behavior in mice with hereditary predisposition to high fat diet induced glucose intolerance, Asia-Pacific Diabetes and Obesity Study Group Symposium 2013, 2013年10月12日～13日、東京
- ⑩ 長尾元嗣, 高血糖と動脈硬化-実験動物からのアプローチ-, 第28回日本糖尿病合併症学会（招待講演）、2013年9月13日～14日、旭川

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長尾 元嗣 (NAGAO, Mototsugu)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：10468762

(2) 研究協力者

八木橋 操六 (YAGIHASHI, Souroku)

稲葉 渉 (INABA, Wataru)