

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10152

研究課題名（和文）炎症誘導性膵細胞Xaf1の役割解明～歯周病 膵 細胞機能の連関

研究課題名（英文）The role of inflammatory induced Xaf1 in pancreatic beta cells~correlation with periodontitis

研究代表者

岩下 未咲 (Iwashita, Misaki)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：80611326

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）：本研究結果から、高脂肪を含む食事を摂取すると、活性化したマクロファージのインターフェロン産生が亢進することにより、細胞のアポトーシスを促進する因子X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor 1 (XAF1) の発現が膵臓の細胞で増大することが示された。また、細胞でのXAF1発現の増大に比例して、細胞のアポトーシスが誘導され、結果的にインスリン分泌が低下し糖尿病の病態が増悪することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満状態では、脂肪組織等でマクロファージが活性化し糖尿病を増悪させる炎症が持続していることが以前から知られていた。本研究ではそれに加えて、活性化マクロファージ誘導性のXAF1発現の増大が膵細胞のアポトーシスを亢進を引き起こすことで糖尿病の増悪に関与することが示された。本研究結果は、糖尿病の根本的治療の鍵である膵細胞量減少のメカニズムの解明と、インスリン分泌能の低下しやすい日本人糖尿病患者に対する新たな治療戦略の基盤となりうる。

研究成果の概要（英文）：We explored the effects of X-linked inhibitor of apoptosis associated factor 1 (XAF1) on  $\beta$ -cell function and progression of diabetes in vivo. Pancreatic  $\beta$ -cell-specific XAF1 overexpressing (Xaf1 Tg) mice and their wild-type (WT) littermates were fed either a normal diet or a high-fat diet (HFD).

HFD-fed Xaf1 Tg mice demonstrated increased  $\beta$ -cell apoptosis, lowered insulin expression, and impaired glucose tolerance compared with WT mice fed the same diet. Pancreatic  $\beta$ -cell XAF1 expression was enhanced via HFD-induced, macrophage-derived interferon  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ), which promoted  $\beta$ -cell apoptosis and led to a reduction in insulin secretion and progression of diabetes. Since bacterial endotoxin also stimulates IFN  $\gamma$  production from macrophages, it may indicate an association between low-grade inflammation-induced pancreatic  $\beta$ -cell XAF1 expression and exacerbation of diabetes, thus providing insight into the mechanism of  $\beta$ -cell mass reduction in diabetes.

研究分野：歯周病学

キーワード：膵細胞 XAF1 アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病の主な病態は、インスリンの作用が不十分なインスリン抵抗性と膵細胞機能障害である。日本人はインスリン分泌の代償能が低いことから糖尿病を発症しやすく、2型糖尿病の発症・進展には膵細胞の機能障害が重要な因子であることが明らかになっている。膵細胞機能障害に対する治療戦略として、膵細胞のインスリン分泌能増大および膵細胞量増大の両面へのアプローチが有用と考えられる。近年では2型糖尿病患者の膵島ではマクロファージ等の炎症性細胞浸潤が観察されているものの、炎症性細胞による膵島機能や膵細胞減少への影響は明らかではない。

申請者らの先行研究 (Tsuruta M et al., Horm Metab Res, 2018) において、低濃度 lipopolysaccharide (LPS) 存在下で RAW264.7 マクロファージと共培養した膵細胞における遺伝子発現変動をマイクロアレイ法にて網羅的に解析した結果、LPS 刺激によってアポトーシスに關与する X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor 1 (Xaf1) 遺伝子の発現が有意に亢進することが明らかになった。さらに、活性化マクロファージからのインターフェロン (IFN) の分泌が増大し、IFN 刺激を受けた膵細胞では、有意な Xaf1 発現および活性型 Caspase3 発現の亢進、アポトーシスの誘導がみられたことから、マクロファージ由来 IFN は膵細胞のアポトーシスを誘導することが示唆された。この結果をふまえると、高脂肪食による腸内細菌叢の変化や歯周炎症によって活性化したマクロファージは膵細胞における Xaf1 発現の亢進を介して細胞のアポトーシスを誘導し、糖尿病の病態増悪に關与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

## 2. 研究の目的

膵細胞におけるアポトーシス誘導因子 XAF1 の発現が膵島機能および糖尿病の病態に及ぼす影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

野生型 (WT) マウスおよび膵細胞選択的に Xaf1 を高発現させた (Xaf1 Tg) マウスにそれぞれ通常食 (ND)、カロリー比 40% または 60% 高脂肪食 (40% HFD、60% HFD) を負荷した。膵細胞 XAF1 が細胞のアポトーシスおよび糖尿病の進行に及ぼす影響について、組織学的解析および生理学的機能解析から検証した。

## 4. 研究成果

### (1) 高脂肪負荷によるマクロファージ IFN 産生の亢進

パルミチン酸刺激マクロファージにおける IFN 産生の亢進

RAW264.7 マクロファージを遊離脂肪酸 (パルミチン酸) で刺激すると、無刺激群と比較して IFN 遺伝子発現、IFN 産生が有意に増大した (図 1a、1b)。

高脂肪食負荷マウスにおける血中 IFN 濃度の増大

60% HFD を 10 週間負荷した野生型マウスでは、ND 負荷野生型マウスに比べ、末梢血中の IFN 濃度が有意に増大した (図 1c、1d)。

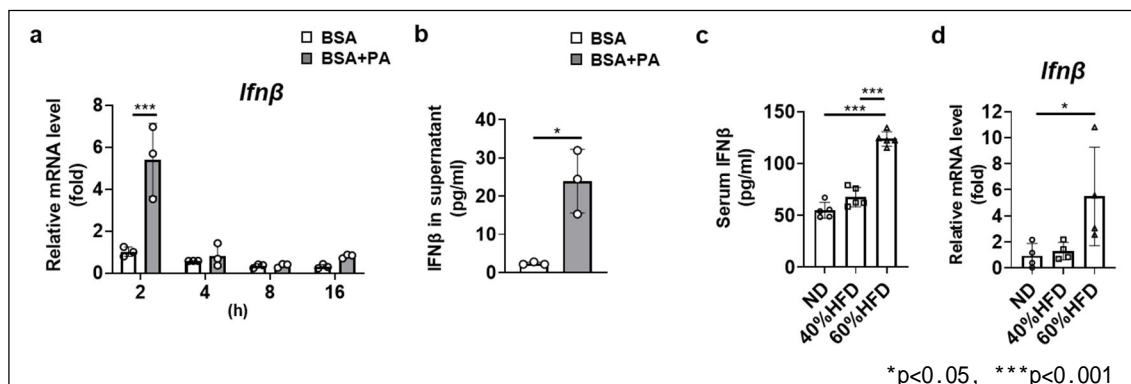


図1 高脂肪負荷によりマクロファージ IFN 産生が亢進した

### (2) 高脂肪食負荷マウス膵島における XAF1 発現の亢進

WT マウスに比べ Tg マウス膵島では、XAF1 発現が亢進し、高脂肪食負荷によりさらに XAF1 発現の増大が観察された (図 2a、2b)。60%HFD 負荷 Xaf1 Tg マウスではインスリン発現が減弱し、XAF1 陽性インスリン陰性細胞数が増大した (図 2a)。WT マウス膵島では、通常食負荷では XAF1 陽性細胞はほとんど観察されなかったが、高脂肪食負荷により、XAF1 陽性領域の増大がみられた (図 2b)。また、高脂肪食負荷において、WT、Xaf1 Tg マウスいずれも膵島内におけるマクロファージマーカー (CD68、Ly6C) の発現が増加した。

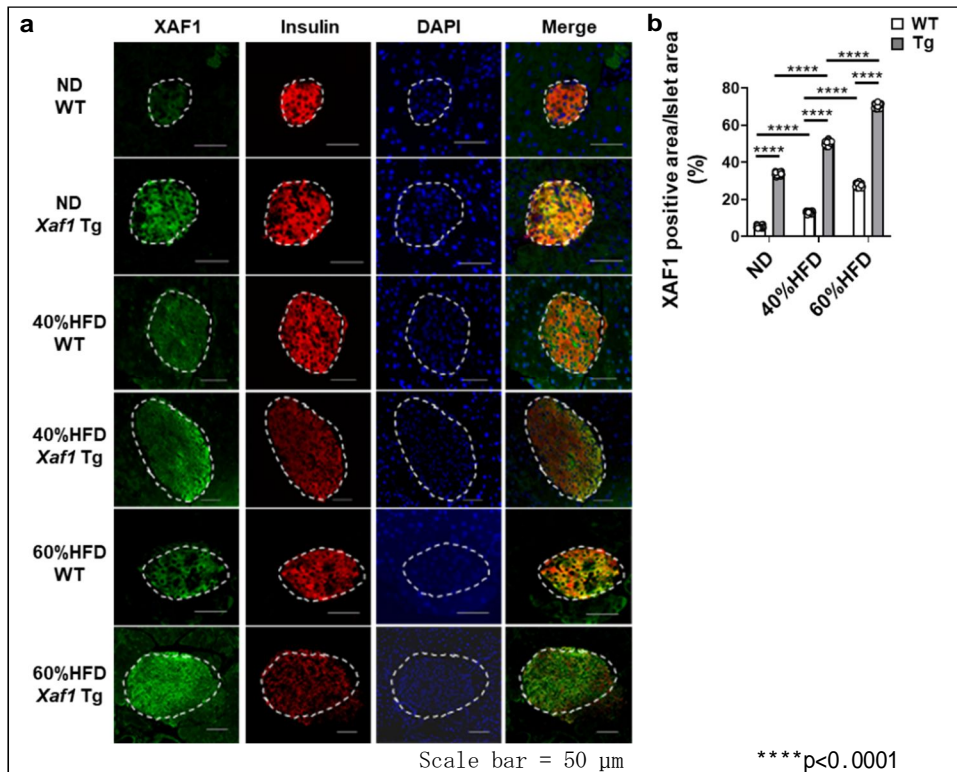


図2 高脂肪食負荷マウス膵島では XAF1 発現が亢進した

(3) HFD 負荷 Xaf1 Tg マウスにおけるインスリン発現の減弱と耐糖能の低下

40%HFD 負荷群および、60%HFD 負荷群では、WT マウスに比べ Xaf1 Tg マウスにおいて空腹時血糖値の有意な増大、糖負荷後の血糖値低下の減弱をみとめた (図 3d、3g)。特に 60%HFD 負荷 Xaf1

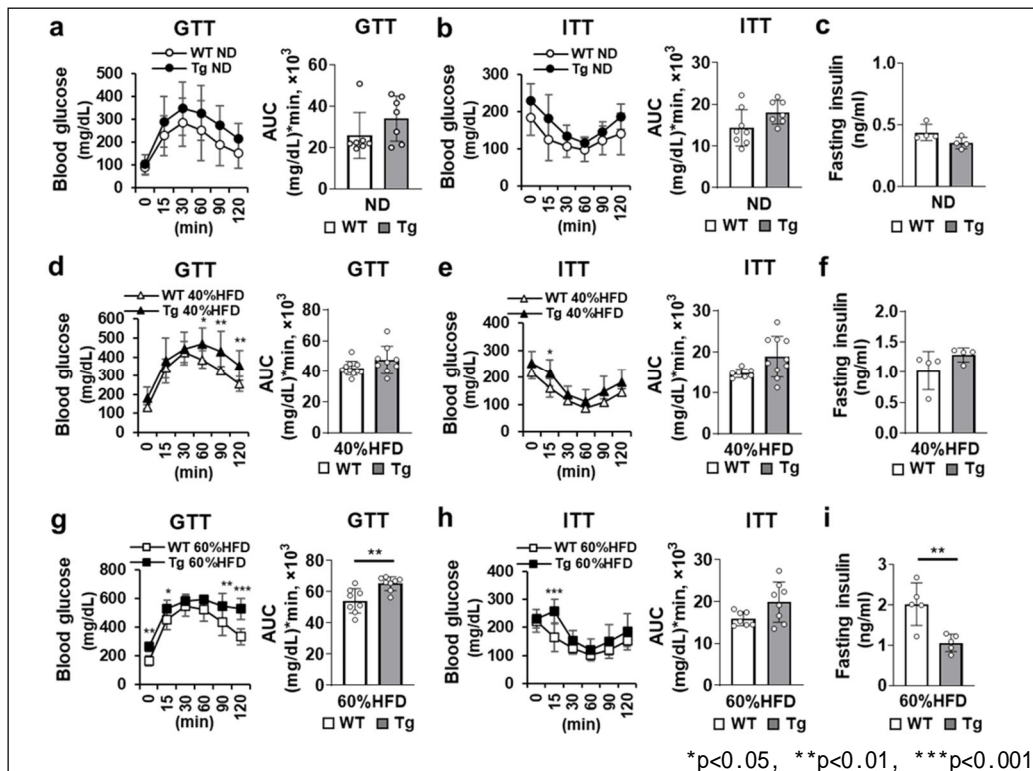


図3 HFD 負荷 Xaf1 Tg マウスでは WT マウスに比べ耐糖能が低下した

Tg マウスでは WT マウスに比べ顕著な耐糖能異常を示した。インスリン負荷試験では、40%HFD 負荷および 60%HFD 負荷 Xaf1 Tg マウスはそれぞれ同じ食餌負荷 WT マウスに比べインスリン投与

後 15 分時点での血糖値低下の抑制がみられた (図 3e、3h)。60%HFD 負荷 Xaf1 Tg マウスでは WT に比べ空腹時インスリン値 (図 3i) インスリン分泌能の指標である HOMA- $\beta$  が有意に低下した。膵島組織の免疫蛍光染色による解析では、60%HFD 負荷 Xaf1 Tg マウスにおいて、他の群に比べ顕著なインスリン陽性面積の減少、グルカゴン陽性面積の増大をみとめた。40%HFD 負荷 Xaf1 Tg マウス膵島では、40%HFD 負荷 WT マウスおよび ND 負荷 Xaf1 Tg マウスに比べ、有意なインスリン陽性面積の減少をみとめた (図 4a、4b)。

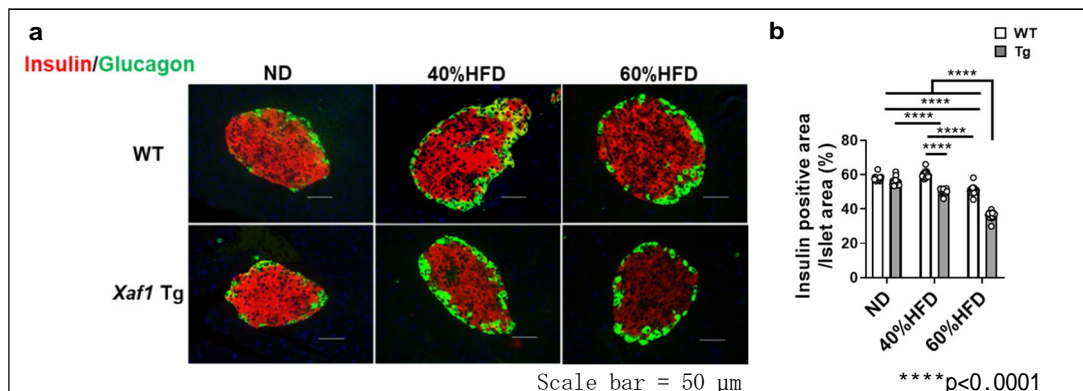


図 4 HFD 負荷 Xaf1 Tg マウス膵島では WT マウスに比べインスリン発現が減弱した

#### (4)HFD 負荷 Xaf1 Tg マウスにおける膵 細胞アポトーシスの亢進

XAF1 発現の増大がアポトーシスに及ぼす影響について解析するため、膵島組織の Cleaved Caspase3 免疫蛍光染色および TUNEL 染色を行った。Xaf1 Tg マウス膵島では、いずれの食餌負荷群でも WT マウスに比べ Cleaved caspase3 陽性 細胞が有意に増大し、その増大は食餌脂肪量に比例していた (図 5a)。60%HFD 負荷 WT マウス膵島では、他の食餌を負荷した WT マウスに比べ有意な Cleaved caspase3 陽性面積の増大が観察された。60%HFD 負荷 Xaf1 Tg マウス膵島では、60%HFD 負荷 WT マウスおよび他の食餌負荷群に比べ TUNEL 陽性 細胞数が顕著に増大した (図 5b)。このように、膵島細胞のアポトーシスの亢進は、XAF1 発現レベルが増大した群で顕著に観察された。

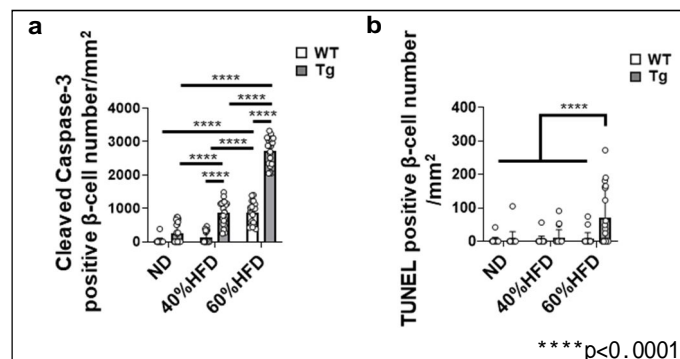


図 5 HFD 負荷 Xaf1 Tg マウスでは膵 細胞アポトーシスが亢進した

#### (5)60%HFD 負荷 Xaf1 Tg マウスにおけるグルコース応答性のインスリン分泌の減弱

60%HFD 負荷 Xaf1 Tg マウスでは、60%HFD 負荷 WT マウスに比べ、糖負荷後の血清中インスリン濃度の顕著な減少を示した (図 6a)。60%HFD 負荷マウス膵臓から単離した膵島においても同様に、WT マウスに比べ高濃度グルコース刺激後のインスリン分泌が著しく減弱した (図 6b)。

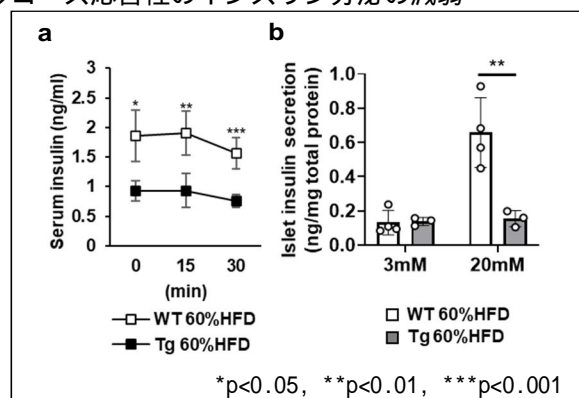


図 6 60%HFD 負荷 Xaf1 Tg マウスではグルコース 応答性のインスリン分泌が減弱した

本研究結果から、高脂肪食誘導性にマクロファージの IFN 産生が亢進することで膵 細胞における XAF1 発現が増大し、膵 細胞のアポトーシスが誘導され、結果的にインスリン分泌の減弱を引き起こすことが明らかになった。すなわち、肥満状態でのマクロファージの活性化を引き起こす軽微な炎症は、脂肪組織炎症を介したインスリン感受性の低下に加え、XAF1 発現を介した

膵 細胞のアポトーシス亢進による 細胞機能障害をもたらすことで糖尿病の病態の増悪に  
関与することが示された。本研究結果は、糖尿病の根本的治療の鍵である膵 細胞量減少のメカニ  
ズムの解明と新たな治療戦略に有用な知見をもたらすものである。さらに、歯周病に代表される  
軽微な炎症は、短期的には脂肪組織炎症の増悪を介してインスリン感受性の低下をもたらすが、  
長期的視点で考えると、膵 細胞機能そのものにも影響を与える可能性が見出されたといえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Iwashita Misaki, Hayashi Masato, Nishimura Yuki, Yamashita Akiko	4. 巻 8
2. 論文標題 The Link Between Periodontal Inflammation and Obesity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Oral Health Reports	6. 最初と最後の頁 76 ~ 83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s40496-021-00296-4	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西村優輝、岩下未咲、林大翔、新城尊徳、佐野朋美、山下明子、西村英紀
2. 発表標題 膵 細胞Xaf1が膵島機能および糖尿病発症に及ぼす影響
3. 学会等名 第152回日本歯科保存学会春季学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村優輝、岩下未咲、林大翔、新城尊徳、瀬々起朗、佐野朋美、山下明子、西村英紀
2. 発表標題 膵 細胞Xaf1が膵島機能および糖尿病発症に及ぼす影響
3. 学会等名 第154回日本歯科保存学会春季学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Nishimura, Misaki Iwashita, Masato Hayashi, Takanori Shinjo, Tatsuro Zeze, Akiko Yamashita, Takao Fukuda, Terukazu Sanui, Tomomi Sano, Fusanori Nishimura
2. 発表標題 High-fat diet-induced XAF1 exacerbates diabetes by promoting pancreatic $\beta$ -cell apoptosis
3. 学会等名 The 69th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村優輝、岩下未咲、林大翔、新城尊徳、瀬々起朗、佐野朋美、山下明子、西村英紀
2. 発表標題 高脂肪食により誘導されるXAF1は膵 細胞のアポトーシスを促進させることで糖尿病を悪化させる
3. 学会等名 2021年度JSP九州五大学・JACP九州支部合同研修会
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	西村 英紀  (Nishimura Fusanori)  (80208222)	九州大学・歯学研究院・教授   (17102)	
研究分担者	浅野 知一郎  (Asano Tomoichiro)  (70242063)	広島大学・医系科学研究科(医)・教授   (15401)	

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
---------	---------