

令和元年6月19日現在

機関番号：23102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K00825

研究課題名(和文) 膵細胞と視床下部を標的としたビオチンのエピゲノム制御による2型糖尿病の発症予防

研究課題名(英文) Preventive effect of biotin in the hypothalamus and pancreatic islets on the development of type 2 diabetes

研究代表者

曽根 英行 (Sone, Hideyuki)

新潟県立大学・人間生活学部・教授

研究者番号：90398511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ビオチンは、高脂肪食負荷の早期の段階から摂食抑制と顕著な体重増加抑制を示し、高脂肪食負荷による肥満と高血糖状態への進展を抑制した。その機序としてビオチンはglucokinaseの遺伝子発現量を増加し、膵島ではIRS-2経路を介した膵島細胞増殖、視床下部ではグルコース応答性ニューロンを介した摂食抑制が示唆された。加えて、ビオチンは、高脂肪食誘導性肥満マウスにおいても脂質代謝を亢進し、顕著な体重増加抑制を示した。以上の結果から、ビオチンは、膵島及び視床下部に作用して膵島機能維持、摂食抑制及び脂質代謝亢進を介して肥満を予防・改善し、2型糖尿病への進展を予防することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ビオチンが高血糖にตอบสนองする共通分子としてグルコキナーゼを介し膵島細胞と視床下部を調節することにより、日本人2型糖尿病(非肥満型)を予防するといった新たな発想に基づいている。ビオチンは過剰症の心配のない水溶性のビタミンであり、生体にとってより安全な使用が可能である。また、過食と膵細胞の量的不足は多くの2型糖尿病に共通する発症要因であり、疾病予防・改善の両面で応用範囲が広く有効性も高いと考えられる。本研究の中核的な課題の1つであるビオチンによるエピゲノム制御は、栄養素による2型糖尿病の新たな予防・治療法の先行研究として多くの注目を集め、今後の研究・教育面において幅広く活用できる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the preventive effect of biotin on the development of type 2 diabetes. We showed that biotin suppressed food intake and body weight gain and increased pancreatic islet cell division. Additionally, biotin elevated the expression of glucokinase gene in both the hypothalamus and pancreatic islets. Glucokinase leads to excitation of the glucose-responsive neuron in hypothalamus which resulted in satiety, and to activation of the IRS-2 pathway which further resulted in the promotion of pancreatic islet cell division to preserve normal function. Moreover, biotin strongly suppressed body weight gain in high-fat diet induced obesity mice via the acceleration of fat catabolism. These findings suggest that biotin prevents obesity and hyperglycemia via the suppression of food intake by inducing satiety, elevation of fat metabolism, and the maintenance of normal pancreatic islet function, leading to the prevention of the development of type 2 diabetes.

研究分野：栄養生理学

キーワード：ビオチン 摂食抑制 肥満

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病の発症原因は、インスリン抵抗性とインスリン分泌不全（膵細胞の機能不全と量的不足）にある。血糖の恒常性は、インスリン抵抗性に対抗した膵細胞の機能亢進と細胞増殖による代償性インスリン分泌によって維持されるが、この状態が継続すると膵細胞は疲弊・老化し、2型糖尿病を発症する。日本人は欧米人と比較して膵細胞の増殖能力の低いことが示唆されている。そのため、軽度の肥満・インスリン抵抗性に対しても膵細胞は十分な代償を行うことができず、糖尿病を発症する。こうした観点から、日本人2型糖尿病の発症予防には、過食による肥満や膵細胞の機能不全の予防に加え、膵細胞増殖による細胞量の維持が重要となる。

ピオチンによる糖尿病改善作用では、ピオチンは肝臓及び膵細胞でグルコキナーゼ（GK）活性を上昇し、肝臓でのグルコース取込みと膵細胞のインスリン分泌を亢進する。加えて、肝臓での糖新生の抑制と骨格筋でのインスリン抵抗性の改善を報告している。さらに、明確な作用機序は明らかではないが、視床下部に作用し、摂食行動を抑制する。こうしたピオチンの複合的作用により糖尿病は改善されるが、現在に至るまでピオチンと膵細胞増殖に関する報告はなく、日本人2型糖尿病においても極僅かしかない。

GKは、ピオチンによる糖尿病改善作用において中心的な役割を担う有力な標的分子であり、膵細胞と視床下部腹内側核（VMH:満腹中枢）では高血糖に应答するグルコースセンサーとして機能する。膵細胞では、細胞増殖を促進することでインスリン抵抗性に対抗し、VMHでは、グルコース受容性ニューロン（GRN）を活性化することで摂食行動を抑制する。つまり、ピオチンの新たな作用機序として、ピオチンが、膵細胞とGRNにおいて高血糖に应答するGK反応系を促進し、膵細胞量の維持と摂食抑制によって日本人2型糖尿病の発症を予防するといった仮説が想定される。

ピオチンによるGK反応系の促進は、GK遺伝子の発現量の増加に起因する。ピオチンはグアニル酸シクラーゼを活性化し、cGMP/PKG系を亢進する。cGMP/PKG系の亢進は転写関連タンパク質をリン酸化し、遺伝子発現を調節する。GK遺伝子はこの経路による発現調節が示唆されている。しかし、cGMP/PKG系を介した遺伝子発現の調節には、生理的濃度の1,000倍以上のピオチンが必要とされ、以前から別経路の存在が指摘されている。近年では、ピオチンがヒストンを修飾し遺伝子発現を調節するといったピオチンによるエピゲノム制御が注目されている。ピオチンは、ヒストンアミノ末端におけるアセチル化（H4K8, H4K12）・メチル化（H3K4, H3K9）部位に競合的に結合することでクロマチンの微小環境を変化させ、転写活性を調節する。そのため、ピオチンが膵細胞とVMH（GRN）においてヒストンをピオチニル化することにより、GKを含めた関連タンパク質の遺伝子発現を調節し、膵細胞増殖と摂食抑制を誘起するといった機序が推測される。

2. 研究の目的

本研究では、膵島細胞及び視床下部の2つの視点からピオチンの効果と作用機序を検討し、ピオチンによる2型糖尿病予防への応用を目指す。高脂肪食を給餌したマウスを実験動物として、ピオチン添加飼料で飼育することにより、ピオチンの肥満・糖尿病予防効果を検討する。さらに、膵島細胞では、組織免疫染色法により、ピオチンによる細胞増殖促進を介した膵島機能維持効果を検討する。視床下部では、ピオチンによるGRN活性化を介した摂食抑制について検討する。共通する有力な標的分子としてGKが挙げられ、これを含めた標的臓器での関連遺伝子の発現量を測定することでピオチンの作用機序を検討する。

3. 研究の方法

(1) 実験動物、体重及び摂食量の測定、試料採取及び調製

実験動物にはC57BL/6Jマウス、雄、3週齢を用いた。8日間の予備飼育後、対照群とピオチン群に群分けし、正常食及び高脂肪食（HFD32、日本クレア社）で実験飼育した。ピオチン群には1.0%ピオチン添加食を給餌した。体重と摂食量は2日毎に測定した。

実験飼育最終日に採血し、膵臓、膵島及び視床下部を摘出した。血漿及びそれぞれの臓器は、血糖値、摂食調節ペプチドホルモン等の血漿濃度及び臓器中の摂食関連タンパク質の遺伝子発現量の測定まで-80℃で保存した。

(2) 糖負荷試験、インスリン負荷試験

糖負荷試験とインスリン負荷試験は常法に従い実施した。血糖値は血糖値測定器（アボットジャパン株式会社）で測定した。インスリン濃度は酵素免疫測定法による市販キットを用いて測定した。

(3) 膵島ピオチン含量と組織免疫学染色法による膵島細胞増殖効果の測定

ピオチン含量は、膵臓から膵島と膵外分泌腺細胞を単離後、常法に従い微生物学的定量法に

より測定した。組織免疫学染色法では、上記マウスに 5%ホルムアルデヒド溶液で灌流固定を施し、膵臓を摘出後、常法に従いパラフィン切片を作成した。組織切片上のインスリンと核を蛍光免疫抗体で染色し、インスリン陽性細胞を可視化した。さらに、陽性細胞に占める細胞分裂マーカー (Ki-67 と MCM7:Mini Chromosome Maintenance7) 陽性細胞を検出し、細胞分裂活性を測定した。

(4) 血漿ホルモン測定

コルチゾール、甲状腺ホルモン (T3、T4) 及び甲状腺刺激ホルモン (TSH) の血漿濃度は、酵素免疫測定法による市販キットを用いて測定した。

(5) 遺伝子発現量の測定

膵島及び視床下部から TRIzol Reagent (Invitrogen 社) を用いて Total RNA を抽出し、逆転写反応により相補的 DNA (cDNA) を合成した。逆転写反応には SuperScript™ First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen 社) を使用した。この cDNA を鋳型として目的タンパク質の mRNA 量をリアルタイム PCR 法で測定した (real time rt-PCR)。膵島では GK、IRS-2、GLUT2、Pdx-1、視床下部では GK、プロオピオメラノコルチン (POMC)、ニューロペプチド Y (NPY)、AKPK-2、甲状腺及び下垂体では、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH)、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、甲状腺刺激ホルモン受容体 (TSH-R)、甲状腺ペルオキシダーゼ (TPO) を測定し、加えて、それぞれの試料における対照遺伝子として β -actin を測定した。

(6) 統計学的解析

全ての測定値は、平均値 \pm 標準誤差 (SE) で示した。測定値の集計及び解析には、Stat View J-4.5 を用いた。対応のない t 検定あるいは分散分析 (Post-hoc test として Bonferroni 法) により検定した。

4. 研究成果

(1) 体重及び摂食量

通常飼料で飼育した場合、各群における体重変化 (体重曲線) には有意な差は認められず (反復測定分散分析) 各日における体重についても同様の結果が示された。摂食量は、実験飼育開始 4 日目で対照群に対しピオチン群で有意な低下を示し ($p < 0.05$)、この低下は、引き続き 6 日目、8 日目にも認められた (共に $p < 0.001$)。

しかし、高脂肪食を給餌した場合、実験飼育期間における平均体重は、実験飼育 4 日後からピオチン群で有意な低下が認められ、実験終了時の平均体重では、高脂肪食群に対しピオチン群で顕著な低下を示した (35.19 ± 0.944 g vs 23.95 ± 0.262 g, $p < 0.001$)、1 日当たりの体重増加量についても高脂肪食群に対しピオチン群で有意な低値を示した (0.33 ± 0.021 g vs 0.14 ± 0.012 g, $p < 0.001$)、この結果から、高脂肪食摂食時、ピオチンは体重の増加抑制効果を有することが明らかとなった。実験期間中の平均摂食量 (g/日) は、実験飼育 16 日後から有意差が見られた。摂食量は高脂肪食群 (2.85 ± 0.043 g)、ピオチン群 (2.55 ± 0.035 g) で、高脂肪食群に対しピオチン群で有意な低下を示した。このことから、ピオチンによる体重増加抑制作用の一端がピオチンによる摂食抑制に起因することが示唆された。これは、本研究室で現在までに得られた知見と一致する。加えて、ピオチンによる体重抑制効果は高脂肪食飼育下でより顕著に現れることが確認された。しかし、体重 1g 当たりに換算した摂食量を見てみると、高脂肪食群に対しピオチン群で有意な高値を示した (0.10 ± 0.007 g vs 0.12 ± 0.009 g, $p < 0.01$)。体重変化量の結果を考慮すると、ピオチン群では摂取エネルギー量に見合った体重増加ができていないことが示された。ピオチンには本研究室が報告してきた機序を上回る体重増加抑制機序の存在が推察される。

また、このピオチンによる体重増加抑制効果は、高脂肪食で 5 週間飼育した肥満マウスにおいても認められ、ピオチン添加飼育 4 週後の体重は、高脂肪食群に対しピオチン群で有意な低値を示し (33.0 ± 0.5 g vs 26.0 ± 0.4 g, $p < 0.001$)、ピオチンが肥満改善に有効であることが示唆された。

(2) 糖負荷試験及びインスリン負荷試験

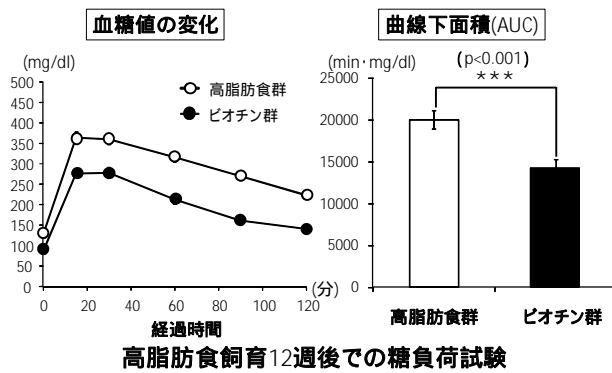
高脂肪食飼育 12 週後の糖負荷試験の結果、高脂肪食群では空腹時血糖が 129mg/dL

あるのに対し、ピオチン群では 88mg/dL

と正常範囲を維持していた。また、120 分値と比較しても高脂肪食群が 224mg/dL に対し、ピオチン群は 142mg/dL と糖尿病の指標である 200mg/dL を大幅に下回る結果となった。曲線下面積 (AUC) で比較しても、ピオチン群が有意な低値を示しており (20.0 ± 0.1 g/dL min vs 14.2 ± 0.1 g/dL min, $p < 0.001$)、ピオチンによる血糖調節機能の維持が明らかとなった。

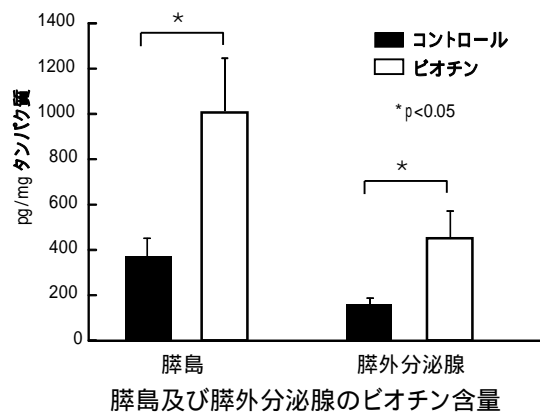
インスリン負荷試験の結果、血糖値の変化は全ての測定点において高脂肪食群が高値を示すものの、曲線パターンでは両群に大きな差は認められず、曲線上面積に有意差は認められなかったことから、インスリン応答に差がないことが明らかとなった。

以上の結果、末梢組織におけるインスリン感受性に差はないが、ビオチン群では血糖の恒常性が維持されており、ビオチンによる高血糖状態への進展抑制が明らかとなった。ビオチンによるインスリン分泌を含む膵島機能の維持が推察される。



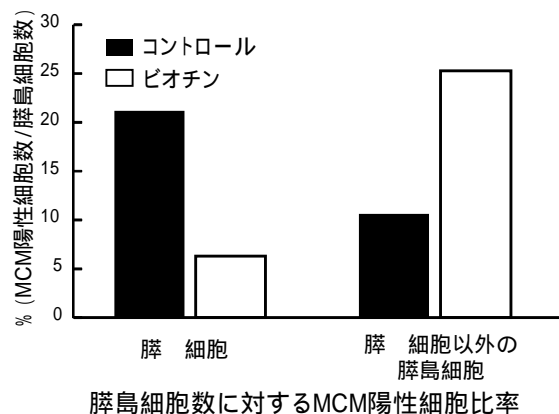
(3) 膵島ビオチン含量と組織免疫学染色法による膵島細胞増殖効果

膵島のビオチン含量は、対照群 369.38 ± 80.55 pg/mg protein、ビオチン群 1004.68 ± 230.32 pg/mg protein で、ビオチン群が有意に増加 ($p < 0.05$) しており、増加率は2.7倍であった。膵外分泌腺のビオチン含量は対照群 158.08 ± 29.35 pg/mg protein、ビオチン群が 448.63 ± 122.19 pg/mg protein で、増加率は2.8倍であった。膵島と膵外分泌腺のビオチン含量の比較では、ビオチン増加率は同程度であったが、ビオチン含量は膵島が膵外分泌腺の2.2倍を示しており、膵島におけるビオチンの重要性が示唆された。



膵島細胞増殖の検討では、膵細胞におけるMCM陽性細胞比率は、対照群に対しビオチン群で約3分の1と低値を示した。一方、膵細胞以外の膵島細胞におけるMCM陽性細胞比率は、ビオチン群で約2.4倍であった。MCM陽性を示した細胞の多くが膵島周辺部に存在していたことから、これらの細胞は膵細胞であることが強く示唆された。一方、膵細胞でのki-67陽性細胞比率は対照群に対しビオチン群で1.2倍を示した。膵細胞以外の膵島細胞におけるki-67陽性細胞比率では対照群に対しビオチン群で3倍を示した。

MCMは細胞周期G1期初期からS期にかけて発現がみられるが、分裂期であるM期にはみられない。そのため、MCM陽性を示した細胞は制御点で止まっているものも含まれ、必ずしも分裂期に至っているわけではない。一方、ki-67は細胞周期G1期後期から発現量に変化が現れ、S期で増加が起こり、M期で最大となるため、分裂期であるM期に至っている細胞において陽性を示す。そのため、ビオチンは細胞を含め、膵島細胞において分裂増殖を亢進することが示唆された。本検討では、健常マウスを使用したため、膵細胞増殖の必要性が低かったと推察される。今後は、膵細胞の代償性増殖が亢進するインスリン抵抗性マウスで検討することでビオチンによる膵細胞増殖効果を明確にすることができると考える。

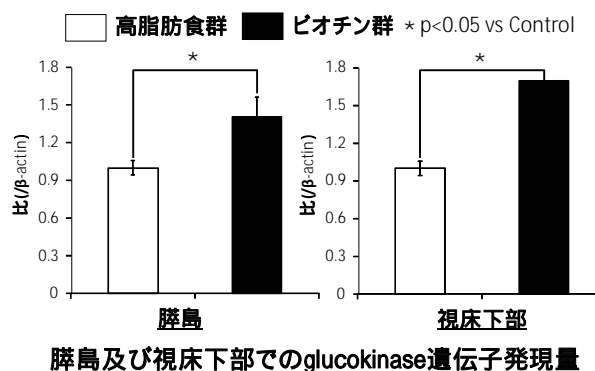


(4) 血漿ホルモン濃度及び遺伝子発現量

高脂肪食マウスによる検討では、血漿コレステロール濃度は高脂肪食群とビオチン群で同程度であったが、血漿T4濃度は高脂肪食群に対しビオチン群で約4倍の高値を示した (1.5 ± 0.2 ng/mL vs 5.7 ± 2.0 ng/mL, $p < 0.05$)。また、血漿T3濃度及び血漿TSH濃度においても、ビオチン群は高脂肪食群により増加傾向にあった。

遺伝子発現量では、膵島及び視床下部において、グルコキナーゼ遺伝子の発現量が高脂肪食

群に対しピオチン群で1.8倍に上昇していた。しかし、ピオチンは、GLUT2、Pdx-1、POMC、NPY、AKPK-2の遺伝子発現量には影響を及ぼさなかった。以上の結果から、ピオチンは膵島及び視床下部に作用してグルコキナーゼ遺伝子の発現量を増加し、膵島ではIRS-2経路を介した膵島細胞増殖、視床下部ではグルコース応答性ニューロンを介した摂食抑制が示唆された。一方、甲状腺及び下垂体では、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン（TRH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、甲状腺刺激ホルモン受容体（TSH-R）、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）の遺伝子発現量は、高脂肪食群とピオチン群で同程度であった。以上の結果から、ピオチンは、甲状腺ホルモン関連タンパク質の遺伝子発現には影響せず、直接、甲状腺ホルモン分泌を亢進させることが示唆された。



本研究では、過剰量のピオチンが高脂肪食負荷の早期の段階から摂食抑制と顕著な体重増加抑制を示し、高脂肪食負荷による肥満と高血糖状態への進展を抑制することを明らかにした。その機序として、膵島及び視床下部で共通する標的分子であるグルコキナーゼ遺伝子の発現量の増加が示された。加えて、高脂肪食誘導性肥満マウスにおいても脂質代謝を亢進し、顕著な体重増加抑制を示した。以上の結果から、ピオチンは、膵島及び視床下部に作用して膵島機能維持、摂食抑制及び脂質代謝亢進を介して肥満を予防・改善し、2型糖尿病への進展を予防することが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び研究協力者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

Sone H, Kamiyama S, Higuchi M, Fujino K, Kubo S, Miyazawa M, Saya Shirato, Shiozawa K: Biotin augments acetyl CoA carboxylase 2 gene expression in the hypothalamus, leading to the suppression of food intake in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 476 (2016) 134-139

Kamiyama S, Ohnuki R, Moriki A, Abe M, Ishiguro M, Sone H: The effects of light and temperature on biotin synthesis in pea sprouts. *J Nutr Sci Vitaminol* 62 (2016) 19-25

曾根英行、神山伸: ピオチンの微生物学的定量法と発光共鳴エネルギー転移を利用した化学発光法による超高感度測定法 *ビタミン* 89 (2015) 453-455

[学会発表](計 2件)

曾根英行: リポタンパク質を介したピオチンの新規体内輸送経路について 日本微量栄養素学会(京都市)2018年5月

曾根英行: ピオチンによる摂食抑制作用と視床下部ACC- の遺伝子発現調節について 日本ビタミン学会(富山市)2016年6月

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 神山 伸

ローマ字氏名: (KAMIYAMA, Shin)

所属研究機関名: 新潟県立大学

部局名: 人間生活学部

職位: 准教授

研究者番号: 70525401