

平成30年6月20日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09383

研究課題名(和文) 膵細胞における食事誘導性O-結合型糖修飾調節異常と、膵細胞機能不全との関係

研究課題名(英文) Abnormality of O-GlcNAcylation and pathogenesis of beta cell dysfunction

研究代表者

関根 理 (SEKINE, OSAMU)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：00402719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内蛋白へのO-GlcNAc修飾における転移酵素O-GlcNAc transferase(OGT)の役割を明らかにするために、タモキシフェン(TM)誘導性の膵島特異的OGT遺伝子ノックアウトマウスを作成した。これらのマウスは一過性に低血糖や高インスリン血症、脂肪量の増加を呈していたが、その後高血糖やインスリン分泌能の低下へと変化しており、膵細胞におけるアポトーシスが認められた。また、TM誘導性の全身OGTノックアウトマウスはTM投与4週後までに8割のマウスが致死性表現系を示した。これらのことから、O-GlcNAc修飾は膵細胞機能や生存に対して重要な役割を持つものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：O-GlcNAcylation is characterized by the addition of N-acetylglucosamine to various proteins by O-GlcNAc transferase (OGT) as the post-translational modification and serves in sensing intracellular nutrients by modulating various cellular process. Abnormality of O-GlcNAcylation may be associated with the pathogenesis of metabolic disease such as diabetes mellitus. We investigated insulin secretion and pancreatic beta cell function using tamoxifen-inducible pancreatic beta cell-specific Ogt-KO mice. These mice displayed transient hypoglycemia associated with higher insulin secretion and accelerated adiposity (early phase), followed by subsequent hyperglycemia with insulin depletion accompanied by beta cell apoptosis (late phase). In addition, tamoxifen-inducible global Ogt-KO mice exhibited a lethal phenotype from 4 weeks post injection. These findings suggest that O-GlcNAcylation plays a crucial role in pancreatic beta cell function and survival under physiological conditions.

研究分野：代謝学

キーワード：O-GlcNAc修飾 膵細胞 インスリン分泌 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

膵細胞機能不全にともなうインスリン分泌不全が2型糖尿病の病態の一つとされているが、近年、糖毒性や脂肪毒性などといった、過栄養や食事バランスの失調などがもたらす高血糖や過剰な飽和脂肪酸刺激による膵細胞への悪影響が問題とされている。

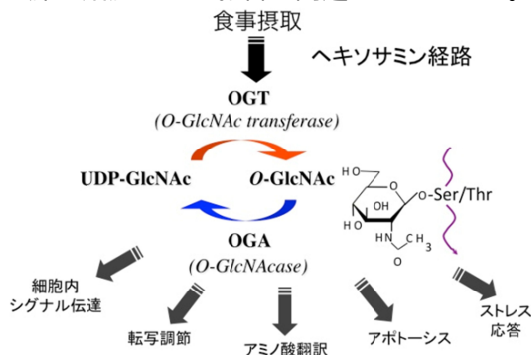


図1 食事摂取によるヘキサミン経路を介した細胞内蛋白のO-GlcNAc修飾

我々はこれまでに、食事誘導性の細胞内核内蛋白の翻訳後修飾の重要性を明らかにしつつある。食事摂取により様々な栄養素がヘキサミン経路を介して代謝され、その最終産物UDP-N-アセチルグルコサミン(UDP-GlcNAc)が単糖として蛋白とO-結合する(O-結合型糖修飾: O-GlcNAc)。O-GlcNAc修飾には、転移酵素O-GlcNAc transferase(OGT)および解離酵素O-GlcNAcase(OGA)の2つの修飾酵素により調節されており(図1)。これらの酵素の調節異常が糖尿病や代謝異常と関連性が高いことが話題となっている。我々はショウジョウバエの脳に存在するインスリン分泌細胞におけるこれらO-GlcNAc修飾酵素の遺伝子をノックダウンさせたところ、インスリンの産生量や末梢組織でのインスリンの感受性が変化していると報告している(文献8)。

そこで我々は、本研究に向けてCre-loxPシステムを用いて膵細胞に特異的に作用するタモキシフェン誘導性Pdx1-CreマウスとOGT遺伝子floxedマウスとを交配させ、出生した児にタモキシフェンを投与し、膵細胞特異的OGT遺伝子ノックアウトマウスを作成することに成功した。

2. 研究の目的

食事バランスの不均衡がもたらす膵細胞の機能不全による糖尿病進展に、細胞内蛋白へのO-結合型糖修飾(O-GlcNAc)の調節異常が関与しているかを、転移酵素O-GlcNAc transferase(OGT)の膵島特異的ノックアウトマウスを用いて明らかにさせる。

3. 研究の方法

本研究を行うに際し、滋賀医科大学遺伝子組換え安全委員会での遺伝子組換え実験計画および、滋賀医科大学動物生命科学研究セ

ンターでの動物実験計画に対する承認を得ており、同動物生命科学研究センターで定められた法律や指針に基づいて実験を行っている。

1) 膵細胞特異的OGT遺伝子ノックアウト

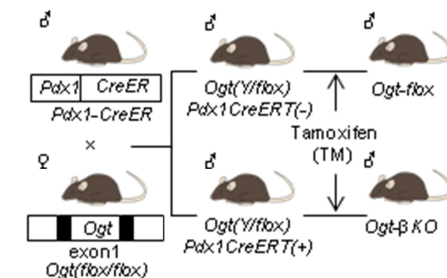


図2 膵β細胞特異的ノックアウトマウスの作成

トモデルマウスにおける、膵島の形態やインスリン分泌能の経時的な変化を検討した。

OGT遺伝子floxedマウス(129S1/SvJ background)をJackson Laboratory社より入手している。OGT遺伝子floxedマウスにはOGT遺伝子のExon1を含む領域がCre recombinase認識配列であるloxP領域により挟まれており、Cre recombinaseの作用にてExon1を含む領域を欠損させることにより、臓器特異的ノックアウトモデルを作成することができる。一方、タモキシフェン投与により膵細胞にてCre遺伝子が誘導されるPdx1-Creマウス(Pdx1-CreERTMマウス)をVanderbilt UniversityのMaureen Gannon氏より入手している(図2)。

A) 雌OGT遺伝子floxedマウスと雄Pdx1-CreERTMマウスとを交配させ、出生した児を10週齢においてタモキシフェンを5日間腹腔内投与(0.15g/体重kg/day)し、膵細胞特異的OGTノックアウトマウスを作成した。一方でタモキシフェン非誘導性野生型マウスとOGT遺伝子floxedマウスとを交配させたマウスを対照とし、同様にタモキシフェンの5日間腹腔内投与を行った。

B) それぞれのマウスの体重や血糖値、血中インスリンの変化を評価した。

C) それぞれの膵臓を摘出し組織標本を作製し、膵島の形態的变化およびO-GlcNAc修飾蛋白発現やプロインスリンやインスリンの含量等を、HE染色、免疫組織染色を用いて評価した。

D) 膵細胞の機能低下の機構として、細胞内アポトーシスや小胞体ストレス、酸化ストレス等の関与を仮説としている。膵細胞特異的OGT遺伝子ノックアウトモデルマウスおよび対照マウスの膵臓組織標本や単離した膵島を用いて、TUNEL法による細胞内アポトーシスの評価や、小胞体ストレスや酸化ストレスに関連した遺伝子や蛋白の発現や活性化の変化などを評価した。

2) 単離した膵島細胞における、グルコース応答性のインスリン分泌能の変化を検討し

た。

- A) 膵 細胞特異的 OGT 遺伝子ノックアウトモデルマウスおよび対照マウスよりコラゲナーゼ法にて膵臓を還流し、膵島の単離を行った。単離された膵島から蛋白抽出や RNA 抽出を行い、Western blot 法や半定量 PCR 法を用いて膵島における細胞内蛋白や遺伝子発現の変化を検討した。
- B) 低グルコース及び高グルコース刺激下での細胞内でのインスリン遺伝子発現量や培養上清へのインスリン分泌量を測定し、インスリン分泌能の経時的変化の評価を行った。

3) 2 型糖尿病モデル動物である OLETF ラットを用いて、膵 細胞でのインスリン発現や O-GlcNAc 修飾の変化を検討した。

4) 培養膵 細胞モデルへの OGT の si-RNA 導入を行い、細胞でのインスリン発現や O-GlcNAc 修飾の変化を評価した。

5) タモキシフェン誘導性に全身での OGT 遺伝子をノックアウトさせたマウスを作成した。

タモキシフェンにて全身で誘導される雄 Cre マウス (R26-Cre-ER^{T2}) と、雌 OGT 遺伝子 floxed マウスと交配させて出生したマウスにタモキシフェンを 5 日間腹腔内投与 (0.15g/体重 kg/day) し、全身 OGT ノックアウトマウスを作成し、生存可能かを評価した。これらのマウスで膵島を含めた全身の臓器での OGT 遺伝子や蛋白発現が欠失しているかについて、免疫組織染色等を用いて評価した。また、体重や血糖値、血中インスリン、脂肪量、体温、生存率などを測定した。

4. 研究成果

a) 膵 細胞特異的 OGT 遺伝子ノックアウトモデルマウスにおける、糖代謝やインスリン分泌能の変化

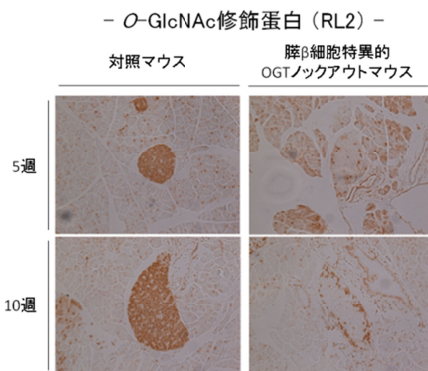


図3 膵β細胞特異的 OGT 遺伝子ノックアウトマウスは、膵島細胞内での O-GlcNAc 修飾蛋白の発現が減少していた

タモキシフェン投与後 4 週時に摘出した膵臓を用いて組織学的に検討したところ、対照マウスの膵島において OGT 蛋白や O-GlcNAc

修飾蛋白 (RL2) の発現が認めていたのに対し、膵 細胞特異的 OGT 遺伝子ノックアウトマウスの膵島における OGT 蛋白や O-GlcNAc 修飾蛋白の発現が減少していることを確認した (図3)。

膵 細胞特異的 OGT 遺伝子ノックアウトマウスは、タモキシフェン投与後 5 週より空腹時血中インスリン値の上昇および空腹時血糖値の低下を認め、タモキシフェン投与後 6 週より体重増加を認めていた。タモキシフェン投与後 7 週時の精巣上体脂肪含有量や肝内脂肪量が対照マウスと比較して増加していた。一方、タモキシフェン投与 10 週後では血中インスリン値は対象マウスと比較して有意に低下していた。それと同時に空腹時血糖値の上昇及び体重減少を認め糖尿病モデルを呈していた (図4)。タモキシフェン投与 5-8 週後に腹腔内ブドウ糖投与を行い耐糖能を評価したところ、対照マウスと比較して 5-6 週 (早期相) においてはインスリン濃度の上昇や血糖値の減少を認めたものの、7-8 週 (後期相) においては血糖値の上昇を認め、二相性の変化を呈していた。これらのことは、インスリン分泌能が早期相では亢進しているものの、後期相では逆に減少していることに関連していると考えられた。

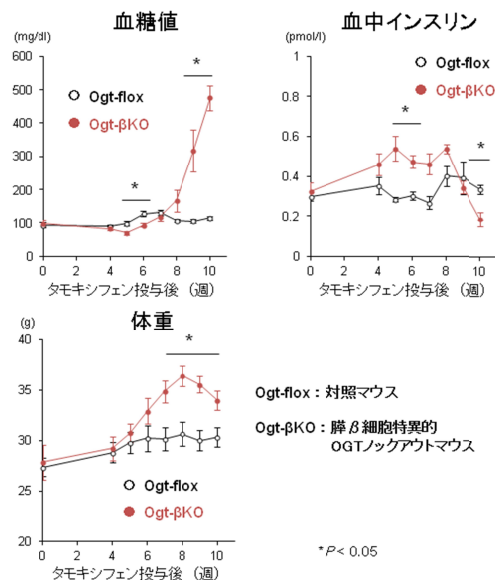


図4 膵β細胞特異的 OGT 遺伝子ノックアウトマウスは、体重や血糖値、血中インスリン値が二相性に变化した

b) 膵 細胞特異的 OGT 遺伝子ノックアウトモデルマウスの早期相における膵島細胞でのインスリン分泌能亢進の機構

膵 細胞特異的 OGT 遺伝子ノックアウトモデルマウスは早期相において、対照マウスと比較して低血糖やインスリン分泌の増加を認めていた。タモキシフェン投与後 5 週目に膵臓を摘出して組織学的に検討を行ったところ、膵 細胞特異的 OGT 遺伝子ノックアウトマウスは対照マウスと比較して、膵島面積の増加や Ki67 陽性細胞の増加を認め、膵島内プロインスリンやインスリン発現量の变

化は認めなかったものの、単離膵島あたりのインスリン濃度は増加していた（図5）。

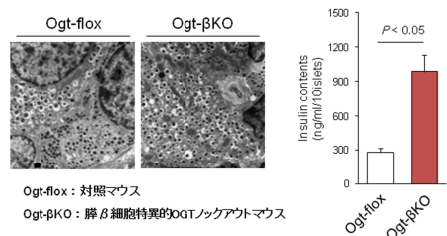


図5 膵β細胞特異的OGT遺伝子ノックアウトマウスは、早期相では膵島内のインスリン量が増加していた

単離膵島に対してグルコースを投与したところ、膵細胞特異的OGT遺伝子ノックアウトマウスは対照マウスと比較して、低濃度（2.8mmol/l）および高濃度（25mmol/l）のグルコース投与に対するインスリンの分泌量が増加していた。

単離膵島におけるインスリン分泌に関連する様々な遺伝子発現を検討したところ、膵細胞特異的OGT遺伝子ノックアウトマウスは対照マウスと比較して、Ins1やMafaの発現に差は認めなかったが、インスリン遺伝子Ins2や転写因子Pdx1、Vamp2の発現は有意に増加していた。

c) 膵細胞特異的OGT遺伝子ノックアウトモデルマウスの後期相における膵島細胞でのインスリン分泌不全の機構

膵細胞特異的OGT遺伝子ノックアウトモデルマウスは後期相において、対照マウスと比較して高血糖やインスリン分泌の低下を認めていた。タモキシフェン投与後10週目に膵臓を摘出して組織学的に検討を行ったところ、膵細胞特異的OGT遺伝子ノックアウトマウスは対照マウスと比較して、膵島面積の減少や細胞数の減少を認めていた。さらに、膵細胞特異的OGT遺伝子ノックアウトモデルマウスはプロインスリンの発現量の減少やインスリン陽性細胞数の減少を認めていた（図6）。

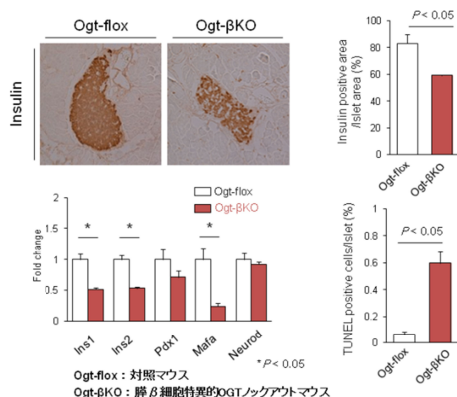


図6 膵β細胞特異的OGT遺伝子ノックアウトマウスは、後期相では膵島内のインスリン量が減少しており、細胞内アポトーシスの増加が認められた

また、膵細胞特異的OGT遺伝子ノックアウトモデルマウスは、透過型電子顕微鏡では

細胞においてインスリン顆粒の減少及び形態の乱れが認められた。単離膵島内の遺伝子発現を検討したところ、NeuroDの発現に差は認めなかったが、Ins1やIns2、Mafaの発現が有意に減少していた。さらにアポトーシスの評価のために行ったTUNEL染色ではTUNEL陽性細胞の増加を認めた。そしてND3-5、Mtco1、Cycなどミトコンドリア関連の遺伝子が増加しており、Ho1、Nqo1、Catalase、MnSODなどの酸化ストレス、抗酸化関連遺伝子も有意に増加していた。また、小胞体ストレスの増加が観察された。

d) 2型糖尿病モデル動物を用いた検討

2型糖尿病モデルであるOLETFラットの52週令で、膵島面積の減少やインスリン遺伝子発現の減少の他に、O-GlcNAc修飾蛋白の発現が低下していたことより、O-GlcNAc修飾の調節異常がインスリン分泌不全や糖尿病発症に関係していることが考えられた。

e) 膵島細胞へのOGT遺伝子ノックダウンによるインスリン分泌能などの検討

マウス膵臓より単離した膵島細胞へのsi-RNA導入効率が不安定のため、膵細胞由来細胞株MIN6に対してOGTのsi-RNA導入を行ったところ、OGT遺伝子発現の低下を認めた。

f) 全身でのOGT遺伝子ノックアウトモデルマウスを用いた検討

これまでの報告にて、先天的にOGT遺伝子を全身でノックアウトさせたマウスは胎生致死であり検討が困難であるため、後天的に全身で作用するタモキシフェン誘導性OGTノックアウトマウスを作成した。このマウスは肝臓や骨格筋、膵臓や脂肪組織でのO-GlcNAc修飾蛋白の蛋白発現が減少していた。また、対照マウスと比較して、体重や脂肪量の減少、血糖値の低下や血中インスリン濃度の減少、体温の低下を認めていたが、食事摂取量は増加していた。また、タモキシフェン投与4週後までに8割のマウスが致死性表現系を示した（図7）。

本研究結果からの見解

膵細胞特異的OGTノックアウトマウスは、一旦は血中インスリン濃度を上昇させたが、その後は低下させており、高血糖を来していた。2型糖尿病の経過において、代償性の高インスリン血症の後にインスリン分泌能の低下により高血糖を来し、食事バランスの不均衡による糖毒性や脂肪毒性などが膵細胞機能不全に影響するとされている。我々が作成した膵細胞特異的OGTノックアウトマウスが、同様な経過で糖尿病を発症しているとも考えられた。また、出生後に作成した全身OGTノックアウトマウスでは、血糖値の低下や血中インスリン濃度の減少および致死性表現系を示していた。

これらのことから、O-GlcNAc 修飾は膵細胞機能や生存に対して重要な役割を持つものと考えられた。

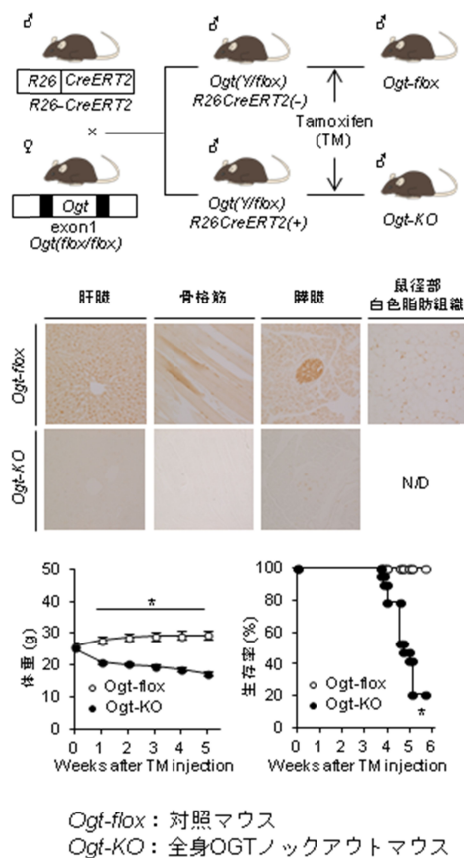


図7 全身OGTノックアウトマウスは体重が減少し、致死性表現系を示した

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)

1. Ida S, Morino K, Sekine O, Ohashi N, Kume S, Chano T, Iwasaki K, Harada N, Inagaki N, Ugi S, Maegawa H. Diverse metabolic effects of O-GlcNAcylation in the pancreas but limited effects in insulin-sensitive organs in mice. *Diabetologia*. 2017 Sep;60(9):1761-1769.
2. Murata K, Morino K, Ida S, Ohashi N, Lemecha M, Park SY, Ishikado A, Kume S, Choi CS, Sekine O, Ugi S, Maegawa H. Lack of O-GlcNAcylation enhances exercise-dependent glucose utilization potentially through AMP-activated protein kinase activation in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jan 8;495(2):2098-2104.
3. Ohashi N, Morino K, Ida S, Sekine O, Lemecha M, Kume S, Park SY, Choi CS, Ugi S, Maegawa H. Pivotal Role of O-GlcNAc Modification in Cold-Induced

Thermogenesis by Brown Adipose Tissue Through Mitochondrial Biogenesis. *Diabetes*. 2017 Sep;66(9):2351-2362.

4. Okada T, Morino K, Nakagawa F, Tawa M, Kondo K, Sekine O, Imamura T, Okamura T, Ugi S, Maegawa H. N-3 Polyunsaturated Fatty Acids Decrease the Protein Expression of Soluble Epoxide Hydrolase via Oxidative Stress-Induced P38 Kinase in Rat Endothelial Cells. *Nutrients*. 2017 Jun 24;9(7).

5. Sato D, Morino K, Nakagawa F, Murata K, Sekine O, Beppu F, Gotoh N, Ugi S, Maegawa H. Acute Effect of Metformin on Postprandial Hypertriglyceridemia through Delayed Gastric Emptying. *Int J Mol Sci*. 2017 Jun 16;18(6).

6. Ono S, Kume S, Yasuda-Yamahara M, Yamahara K, Takeda N, Chin-Kanasaki M, Araki H, Sekine O, Yokoi H, Mukoyama M, Uzu T, Araki SI, Maegawa H. O-linked β -N-acetylglucosamine modification of proteins is essential for foot process maturation and survival in podocytes. *Nephrol Dial Transplant*. 2017 Feb 27.

7. Nagayama K, Morino K, Sekine O, Nakagawa F, Ishikado A, Iwasaki H, Okada T, Tawa M, Sato D, Imamura T, Nishio Y, Ugi S, Kashiwagi A, Okamura T, Maegawa H. Duality of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Mcp-1 Expression in Vascular Smooth Muscle: A Potential Role of 4-Hydroxy Hexenal. *Nutrients*. 2015 Sep 21;7(9):8112-8126.

8. Sekine O, Love DC, Rubenstein DS, Hanover JA. Blocking O-linked GlcNAc cycling in *Drosophila* insulin-producing cells perturbs glucose-insulin homeostasis. *J Biol Chem*. 2010 Dec 3;285(49):38684-38691.

[学会発表](計 3件)

1. Ida S, Morino K, Sekine O, Ohashi N, Kume S, Iwasaki K, Harada N, Inagaki N, Ugi S, Maegawa H. Comprehensive Analysis to Reveal Physiological Role of O-GlcNAcylation in Glucose Metabolism by Using Tissue-Specific Ogt Knockout Mice. *American Diabetes Association 77th*.
2. Murata K, Morino K, Ida S, Ohashi N, Iwasaki H, Lemecha M, Sekine O, Kume S, Park SY, Choi CS, Ugi S, Maegawa H. Lack of O-GlcNAcylation Enhances Exercise-Dependent Glucose Utilization through Amp Kinase Activation in Skeletal Muscle. *American Diabetes Association 77th*.
3. Ohashi N, Morino K, Ida S, Sekine O, Lemecha M, Kume S, Park SY, Choi CS, Ugi S, Maegawa H. Metabolic Switch by

O-GlcNAcylation Is Essential for Cold-Induced Thermogenesis in Brown Adipose Tissue. American Diabetes Association 77th.

〔図書〕(計 3 件)

1. 関根理、前川聡：糖尿病新薬 新時代の臨床糖尿病学(上) 日本臨牀増刊号 日本臨牀社 2016 年
2. 関根理、前川聡：2 型糖尿病 糖尿病 最新の治療 2019-2021 南江堂
3. 関根理、前川聡：SGLT2 阻害薬に期待される臨床効果 月刊糖尿病 医学出版 2017 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関根 理 (Sekine Osamu)
滋賀医科大学 医学部 助教
研究者番号：00402719