

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08780

研究課題名(和文) インスリン分泌能規定因子としての脂肪酸動態：新規モデルマウスを用いた解析

研究課題名(英文) Fatty acid dynamics as insulin secretion capacity regulating factor: analysis in new model mice

研究代表者

浅井 明 (Asai, Akira)

東北大学・農学研究科・特任准教授

研究者番号：30500011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝的にインスリン分泌能の異なるProne系(糖尿病易発性)とResistant系(糖尿病発症抵抗性)の2系統のマウスより膵ランゲルハンス島を単離して各解析に用いた。Prone/Resistant両系統の膵島では、脂肪酸や脂質の代謝や輸送に関わる分子群の遺伝子発現に多くの差異を認めた。細胞膜上の脂肪酸輸送体として知られるCD36の膵細胞における発現量の差がインスリン分泌能を遺伝的に規定する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Prone系とResistant系の両系統マウスは、多遺伝子性の遺伝的要因と環境的要因との相互作用というヒトにおける2型糖尿病発症基盤を正しく反映して作出されたモデル動物である。両系統間での遺伝的なインスリン分泌能の差異について、その出現機序の解明を目的とした本研究の成果は、ヒトにおける2型糖尿病の発症基盤や発症における個人差の成因解明、さらには、それらに基づいた糖尿病予防・治療法開発に繋がる基礎的知見となるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic islets were isolated from diabetes-prone (Prone) and diabetes-resistant (Resistant) mice, and used for each analysis. There are heritable differences in insulin secretion capacity between the two lines of mice. Many differences were observed in gene expression of molecules involved in metabolism and transport of fatty acids and lipids. We found that different expression levels of CD36, known as a fatty acid transporter on plasma membrane, in pancreatic beta cells may determine the heritable differences in insulin secretion capacity.

研究分野：代謝学

キーワード：インスリン分泌 膵島 細胞 脂肪酸 CD36 糖尿病 モデルマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

今日、2型糖尿病患者数の増加は全世界規模の問題となっており、特に東アジア地域での2型糖尿病患者数の増加は顕著である。東アジア地域での患者数の増加は、人種特有の低インスリン分泌能という遺伝的要因に、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(環境的要因)が加わったことが原因と考えられているが、特に食習慣に注目すると、日本を含む東アジア諸国ではこの半世紀で脂肪摂取量が約3倍に増加しており、この脂肪摂取量の増加が2型糖尿病発症リスク増大の起因となることが示唆されている[1]。高脂肪食が肥満・インスリン抵抗性の出現を誘導して糖尿病状態を引き起こすことは、これまでの多くの動物実験で明らかとされてきた。しかし一方で、「高脂肪食環境下においてなぜ2型糖尿病発症に個人差が存在するのか」についての明確な機序は未だ明らかでない。

我々はこれまでに、高脂肪食投与後の耐糖能異常を指標としたマウスの連続選抜交配によって、高脂肪食誘発性の耐糖能異常悪化(糖尿病状態への進行)を示す Prone 系と耐糖能異常を示さない Resistant 系の2系統のマウスを確立した[2,3]。これらのマウスは糖尿病発症における遺伝的要因と環境的要因(高脂肪食)との相互作用の解明を目的として作出されたモデル動物であり、糖尿病発症における両系統マウス間での系統間差の出現機序解明は、上述の「なぜ2型糖尿病発症に個人差が存在するのか」の回答に繋がる知見をもたらすものと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、Prone/Resistant 両系統マウスの膵島においてインスリン分泌能の差異を規定する因子として脂肪酸動態に注目し、膵島β細胞において脂肪酸動態を決定する因子の同定と、それらがインスリン分泌能に及ぼす影響の評価を行う。具体的には、まず両系統マウス膵島における脂肪酸輸送・代謝関連分子群の発現パターンを mRNA およびタンパク質レベルで解析し、それらの発現量と脂肪酸取込能、脂肪蓄積量、インスリン分泌能との関係を比較検討する。次に脂肪酸動態やインスリン分泌能との関係が認められた分子群を候補分子として、単離膵島やβ細胞株を用いた発現量調節試験を行い、各候補分子が脂肪酸動態やインスリン分泌能に及ぼす実際の影響を検証する。これらの結果をもとに、脂肪酸動態の調節を介してインスリン分泌能に影響を及ぼす責任分子を同定し、「脂肪酸がインスリン分泌能を低下させるに至る分子基盤」を推定する。

3. 研究の方法

(1) 膵島における遺伝子発現レベルの網羅的解析

Prone/Resistant 両系統マウス(雄性、5週齢)の膵臓よりコラゲナーゼ法によりランゲルハンス島(膵島)を単離した。単離した膵島より RNA を抽出精製し、RNA シークエンス(RNA-Seq)法による遺伝子発現レベルの網羅的解析を行った。RNA-Seq 法において、Prone/Resistant 両系統マウスの膵島間で発現レベルに有意な差が認められた遺伝子群のうち、特にインスリン分泌や脂質代謝に関連すると考えられる遺伝子群については、定量的 PCR(qPCR)法によってそれらの発現レベルを確認した。

(2) 膵島のインスリン分泌能と ATP 産生

上記(1)と同様の方法で単離した Prone/Resistant 両系統マウスの膵島を用いた。既報[4]と同様に高グルコース、高カリウム刺激に対するインスリン分泌応答を測定するとともに、高グルコース刺激時における ATP 産生能に両系統の膵島間に差異があるのかについての検討を加えた。

(3) CD36 発現誘導β細胞株を用いた検討

Doxycycline(DOX)誘導性に CD36 を発現する INS-1 細胞(膵細胞株)[5]を用いた。DOX による CD36 の発現誘導がインスリン分泌能や細胞内インスリン分泌顆粒の局在に及ぼす影響を検討した。

(4) 膵島細胞における CD36 の分布と細胞内局在

上記(1)と同様の方法で単離した Prone/Resistant 両系統マウスの膵島を用いた。EGTA を用いて膵島構成細胞を分散し、CD36 を抗体ラベルした後、細胞の固定透過処理を行い、細胞内のインスリンとグルカゴンを抗体標識した。フローサイトメーターで細胞と細胞を分画し、各細胞集団の CD36 発現レベルを測定した。また、固定透過処理後の細胞を用いて CD36、インスリン、グルカゴンの抗体標識を行い、CD36 の細胞内分布についての検討も行った。

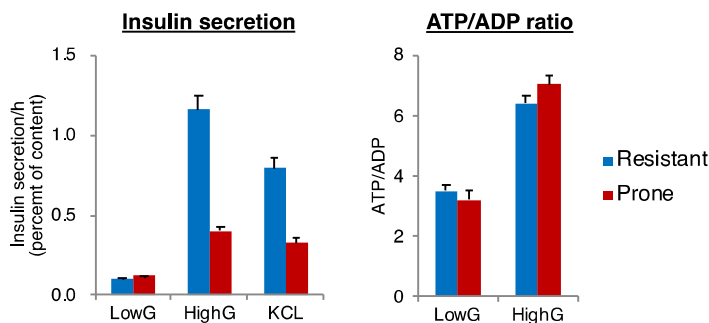
4. 研究成果

(1) 膵島における遺伝子発現

RNA-Seq の結果をもとに qPCR 法で遺伝子発現レベルの確認を行い、これまでに明らかとなっていた CD36 (細胞膜上で脂肪酸の取り込みを促進し、fatty acid translocase としても知られるクラス B スカベンジャー受容体ファミリー分子)に加えて、多数の脂質代謝関連遺伝子の発現レベルに両系統間で差異があることを認めた。これらの結果は膵島細胞内の脂肪含量とも相反しないものであった。また、PPARs や RXRs など、脂質代謝調節の主要制御因子群の発現レベルにも差のある傾向が認められたことから、両系統の膵島間では、脂肪酸や脂質の代謝制御系に包括的な差異があることが示唆された。

(2) 膵島のグルコース応答性 ATP 産生

Prone/Resistant 両系統マウスの膵島におけるグルコース応答性インスリン分泌能 (GSIS) の差異に関連して、グルコース応答性の ATP 産生能を解析した結果、GSIS に明らかな差異を認めるにもかかわらず ATP 産生には両系統マウスの膵島間で有意な差は認めなかった。したがって、両系統マウス膵島間での GSIS の差異は、グルコース代謝による ATP 産生の違いによるものではなく、その下流においてインスリン分泌顆粒放出に至るまでの制御機構に何らかの違いがあることによるものと推定された。この結果は両系統の膵島間で KCl 応答性インスリン分泌能にも明らかな差異を認めるという結果からも支持された(右図)。



Prone/Resistant 両系統マウス膵島のインスリン分泌能と ATP 産生能 (LowG, low glucose; HighG, high glucose; KCl, high KCl)

(3) CD36 発現誘導 INS-1 細胞を用いた解析

INS-1 細胞の GSIS や KCl 応答性インスリン分泌能は、DOX による CD36 の発現誘導によって低下した。また CD36 発現誘導 INS-1 細胞では、インスリン分泌顆粒の細胞膜近傍への局在が著しく低下していた。

(4) 膵島細胞における CD36 の分布と細胞内局在

CD36 分子がインスリン産生細胞である 細胞の細胞膜表面に発現していることを確認し、その発現レベルは Prone 系マウスで Resistant 系より高い傾向にあった。また、Prone/Resistant 両系統マウスの膵 細胞では細胞内における CD36 の局在や存在様式が大きく異なる可能性を見出した。

以上より、CD36 をはじめとする脂肪酸脂質輸送、代謝関連因子群の膵 細胞での発現レベルの差異が、Prone/Resistant 両系統マウスの膵島における遺伝的なインスリン分泌能の差異を決定する因子として重要と考えられた。

< 引用文献 >

- [1] Nagao M, Asai A, Sugihara H, Oikawa S. Fat intake and the development of type 2 diabetes. *Endocr J.* 2015;62:561-572.
- [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.* 2012;3:245-251.
- [3] 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.* 2015;62:371-378.
- [4] Nagao M, Asai A, Inaba W, et al. Characterization of pancreatic islets in two selectively bred mouse lines with different susceptibilities to high-fat diet-induced glucose intolerance. *PLoS One.* 2014;9:e84725.
- [5] Wallin T, Ma Z, Ogata H, et al. Facilitation of fatty acid uptake by CD36 in insulin-producing cells reduces fatty-acid-induced insulin secretion and glucose regulation of fatty acid oxidation. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1801:191-197.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nagao Mototsugu, Esguerra Jonathan L.S., Asai Akira, Ofori Jones K., Edlund Anna, Wendt Anna, Sugihara Hitoshi, Wollheim Claes B., Oikawa Shinichi, Eliasson Lena	4. 巻 69
2. 論文標題 Potential Protection Against Type 2 Diabetes in Obesity Through Lower CD36 Expression and Improved Exocytosis in β -Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 1193 ~ 1205
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2337/db19-0944	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Asai Akira, Nagao Mototsugu, Hayakawa Koji, Miyazawa Teruo, Sugihara Hitoshi, Oikawa Shinichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Leptin production capacity determines food intake and susceptibility to obesity-induced diabetes in Oikawa-Nagao Diabetes-Prone and Diabetes-Resistant mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diabetologia	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00125-020-05191-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagao Mototsugu, Esguerra Jonathan Lou S., Wendt Anna, Asai Akira, Sugihara Hitoshi, Oikawa Shinichi, Eliasson Lena	4. 巻 2128
2. 論文標題 Selectively Bred Diabetes Models: GK Rats, NSY Mice, and ON Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 25 ~ 54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-0385-7_3	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 長尾元嗣、浅井明、杉原 仁、及川真一
2. 発表標題 CD36による β 細胞機能障害と糖尿病発症：Oikawa-Nagao(ON)マウスを端緒とした研究成果
3. 学会等名 第34回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浅井明、長尾元嗣、宮澤陽夫、杉原仁、及川真一
2. 発表標題 選抜交配によって新たに確立した高脂肪食誘発性耐糖能異常モデルマウスにおける過食、体重増加とレプチンシグナルとの関係
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅井明、長尾元嗣、宮澤陽夫、杉原仁、及川真一
2. 発表標題 新規耐糖能異常モデルマウスにおける過食・体重増加の規定因子：若齢期における低レプチンとその要因の探索
3. 学会等名 第33回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asai A, Nagao M, Tsuduki T, Miyazawa T, Esguerra JLS, Eliasson L, Sugihra H, Oikawa S.
2. 発表標題 Reduced insulin secretion in a diet-induced glucose intolerance susceptible mouse model is coupled with increased CD36 and triglycerides in the cells.
3. 学会等名 European Association for the Study of Diabetes 53rd Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nagao M, Esguerra JLS, Ofori JK, Wendt A, Asai A, Sugihra H, Oikawa S, Wollheim CB, Eliasson L.
2. 発表標題 CD36 is increased in human islets from obese T2D donors, and affects beta cell function by the modulation of exocytotic proteins and insulin content.
3. 学会等名 European Association for the Study of Diabetes 53rd Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nagao M, Esguerra JLS, Ofori JK, Asai A, Sugihra H, Oikawa S. Wollheim CB, Eliasson L.
2. 発表標題 CD36 modulates exocytotic proteins and affects insulin secretion through miR-130a up-regulation in beta-cells
3. 学会等名 2nd Joint Meeting of the EASD Islet Study Group and Beta Cell Workshop (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 浅井明、長尾元嗣、都築毅、宮澤陽夫、杉原仁、及川眞一
2. 発表標題 臍島におけるCD36/FATの発現と脂肪酸動態、インスリン分泌能との関係：新規耐糖能異常モデルマウスを用いた解析
3. 学会等名 第60回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2017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	杉原 仁 (Sugihara Hitoshi) (60183414)	日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授 (32666)	
研究分担者	都築 毅 (Tsuduki Tsuyoshi) (00404848)	東北大学・農学研究科・准教授 (11301)	