

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790624  
 研究課題名（和文） 新規 2 型糖尿病動物モデル膵 細胞グルコシルトランスフェラーゼ欠損マウスの解析  
 研究課題名（英文） Analysis of new animal type 2 diabetic model, pancreatic beta cell specific deleted glucosyltransferase mouse.  
 研究代表者 水上 浩哉（MIZUKAMI HIROKI）  
 弘前大学・大学院医学研究科・助教  
 研究者番号：00374819

研究成果の概要：ラットインスリンプロモーター（RIP）Cre マウスとグルコシルトランスフェラーゼ（GT）loxP マウスを交配することにより作製された 細胞特異的 GT 欠損マウス（RGTKO）は耐糖能障害、生後約一年で 細胞の著明なアポトーシスを伴った膵島の過形成を示した。しかしながら、RIP-Cre マウスにインスリン分泌不全が報告されており、これら表現形が GT 欠損に起因するかどうか不明であった。そこで Pdx1 をプロモーターとする Cre マウスを用いて同様な実験を行った。作製された 細胞特異的 GT 欠損マウス（PGTKO）は膵島において DNA の組み換え、GT の発現低下、ガングリオシドの軽度産生低下が認められた。しかしながら、糖代謝には変化がみられず、さらに 細胞のアポトーシスも認められなかった。これには Pdx1 プロモーターの活性が RIP に比べ弱い可能性が考えられた。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目：内科臨床医学・代謝学

キーワード：グルコシルトランスフェラーゼ、セラミド、2 型糖尿病、ガングリオシド、細胞、ラットインスリンプロモーター

## 1. 研究開始当初の背景

近年の 2 型糖尿病の爆発的増加は大きな社会問題に加え、医療経済上の損失をも引き起こしている。2 型糖尿病の原因としては末梢のインスリン抵抗性ととも進行性膵 細胞脱落があげられる（Sakuraba, Mizukami et al. Diabetologia 45:85-96,2002）。その機序には高血糖による糖毒性や高脂肪状態に

よる脂肪毒性の関与が挙げられるが詳しい機序は未だ不明である。

申請者はスフィンゴ脂質と疾患の関係について関心をもち、主にその合成酵素のノックアウトマウスを用いて疾患モデルにおける病態解析を行ってきた（Mizukami et al, J Clin Invest 109:1215-21,2002 など）。その過程でスフィンゴ脂質が糖尿病の膵 細胞

インスリン分泌との強いつながりがある可能性を見出し(Mizukami et al. ADA 発表 2003、日本糖尿病学会発表 2005) また類似の報告も散見されるようになってきた(Laychock SG et al. Diabetes. 52:1986-93,2003)。

スフィンゴ脂質であるセラミドはアポトーシス誘導脂質でもあり、セカンドメッセンジャーとして、その蓄積により細胞死をもたらすことも知られている。また、TNF 刺激などによるアポトーシス誘導の際もセラミドが関与することが知られている。セラミドの生成にはパルミチン酸からの de novo に合成される系と、スフィンゴミエリンの分解から生じる2つの系が知られている。とくにZDFラット膵島では、高脂肪状態から de novo 合成が促進されることによりセラミド蓄積が起こり、最終的に細胞死、脱落が起こると考えられている。これに対し、細胞内でのセラミド蓄積の機序としてガングリオシド合成系の障害も考慮される必要がある。しかしながら、これまでガングリオシド合成系と膵細胞脱落に関連については、申請者が文献を渉猟する限り、その報告はみられていない。セラミドからガングリオシドの合成経路はグルコシルトランスフェラーゼ(GT)から起こる。GTはUDP-グルコースをセラミドに付加し、グルコシルセラミドへ変換させる。グルコースの付着によりセラミドは不活化し、アポトーシス誘導作用は失われる。セラミドの細胞内蓄積はGTを活性化させるが、糖尿病での膵細胞においてはGT活性化に障害が起こっている可能性も考えられる。このような背景から、膵細胞のアポトーシス制御、脱落防止を目的として、細胞におけるGTの役割を明らかにすることは2型糖尿病の治療への新しい局面を拓く可能性が大きい。実際に、GTを標的としてセラミド蓄積からのアポトーシス誘導を目的とした、癌治療の分子

標的治療も探索されている(Uchida Y et al. Cancer Res 64:6271-79,2004)。

## 2. 研究の目的

申請者は Cre-loxP システムを用いて細胞選択的にGTを欠損させたマウス(GTKO)を作成した。

予備的実験では、GTKOは数週齢までは変化を示さないが、9ヶ月齢の時点で対照マウスに比して随時血糖の有意な増加、2g/Kg腹腔内グルコース耐糖能試験(IPGTT)にて有意な耐糖能低下が認められ、2型糖尿病類似のパターンを示した。このGTKOマウスの高血糖状態の原因を解析し、GTによるセラミドからガングリオシドへの合成系の細胞における役割を明らかにし、2型糖尿病の治療につなぐ可能性を探ることである。

## 3. 研究の方法

細胞特異的GTノックアウトマウス(GTKO)を用いた解析

### (1) In vivoの解析

Cre-loxP systemを用いたGTKOマウスを用いる。市販されているラットインスリンプロモーターで制御されているCreマウスはインスリン分泌不全が報告されているため、今回はPdx1プロモーターで制御されているCreマウスを用いる。Pdx1 Creは共同研究者である米国NIHのRichard Proia博士から供与を受けている。

Genotype (PCR法による)の決定

経時的体重、膵臓重量、血糖(随時、空腹時)、血清インスリン量の測定

腹腔内および経口耐糖能試験の実施

インスリン耐性試験の実施

膵島の経時的形態観測

経時的に12ヶ月齢までのマウスにおける膵島病変を観察する。(H&Eおよびインス

リン、グルカゴン、ソマトスタチン、PPなどの免疫染色)

切片上の 細胞面積の計測

TUNEL法を用いた免疫染色によるアポトーシスの検索

#### (2) in vitroの解析

GTKOから経時的にコラゲナーゼ法にて膵島を単離、培養する。

膵島の脂質を抽出後、Thin-Layer Chromatography(TLC)法にてセラミドの蓄積、ガングリオシドのprofilingを検討する。

膵島DNAを抽出後、PCR法による膵島DNAの組み換えの確認をする。

RNA抽出後、Real-time PCR法を用いてGT発現を検討する。

#### GTKO脂肪負荷モデルにおける検討

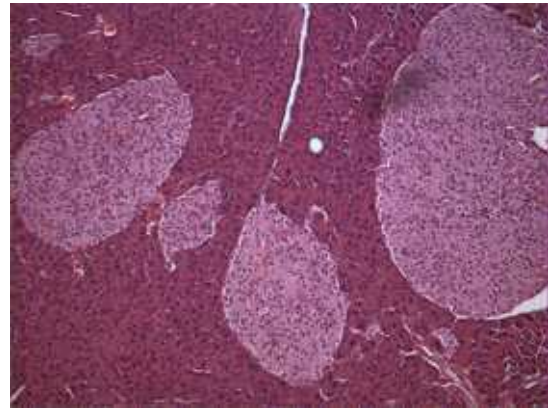
GTKOに高脂肪食を負荷させ(3ヶ月)、細胞にセラミドの合成を促進した状態では細胞にどのような影響が与えられるか検討する。実験内容はIと同様に行う。

さらに作成されたマウスを肥満型2型糖尿病モデルのOb/Obマウスと掛け合わせ、細胞脱落が阻止できるかどうか検討する。実験内容はIと同様に行う。

#### 4. 研究成果

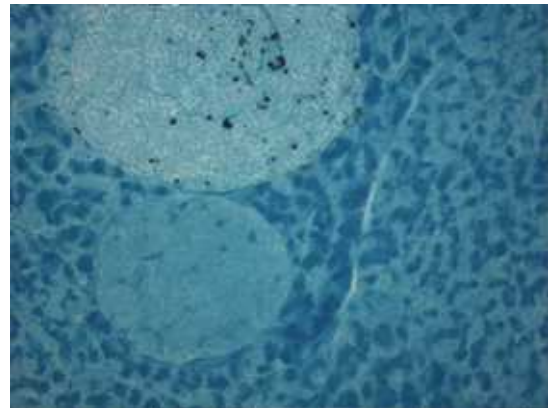
(1) ラットインスリンプロモーターCreを用いた GTKO の長期膵島病変の検討  
12ヶ月齢のラットインスリンプロモーターを用いたCreによる GTKOの膵島を組織的に検討した。コントロールに比べ膵島の過形成が目立っていた。TUNEL法にてapoptosisをin situにて検討すると GTKOは著明なアポトーシスを示していた。(下図)

#### 12ヶ月齢のRat insulin promoter Creを用いた GTKOにおける膵島



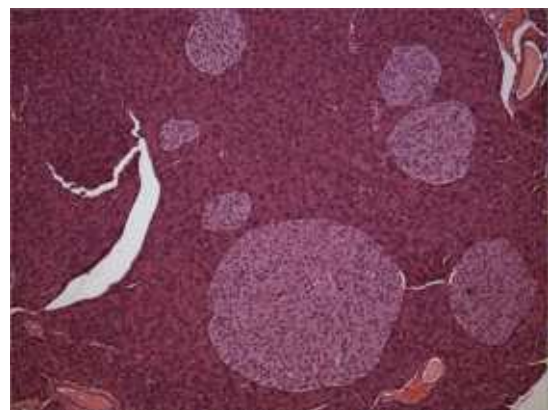
膵島は著明な過形成を示している。

#### TUNEL法を用いたin situでの GTKO膵島のアポトーシスの検出



過形成を示す膵島内に多数のTUNEL陽性細胞が認められる。

#### Controlの膵島のH&E像

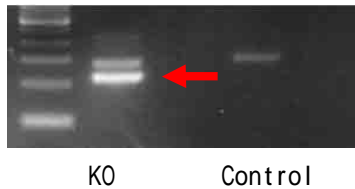


過形成を示す膵島が見られるも GTKOに比べ程度は低い。アポトーシスは見られていない。

い。

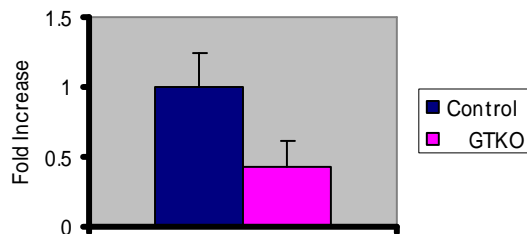
(2) Pdx1 cre を用いての GTKO 作成  
次にインスリン分泌不全がない Pdx1 Cre を用いて GTKO を作成した。マウスはメンデルの法則にしたがって生まれてきており、viable であることが確認された。

(3) 単離膵島での DNA の組み換えの検討  
PCR にて DNA の組み換えを検討したところ、組み換えバンドが GTKO 膵島特異的に認められた。



(4) 単離膵島 GT の発現の検討

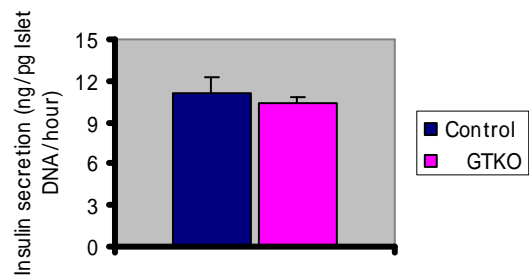
単離膵島での GT 発現を Realtime-PCR で検討した。GTKO では GT の発現が 40% まで減少していた ( $p < 0.05$  vs Control)。



(5) Thin-layer chromatography による検討  
膵島を用いた Thin-layer chromatography の結果では、コントロールに比べ GTKO ではガングリオシドの量が軽度減少していた。しかしながらセラミドの蓄積ははっきりしなかった。セラミドは他の分解酵素で分解された可能性が示された (data not shown)。

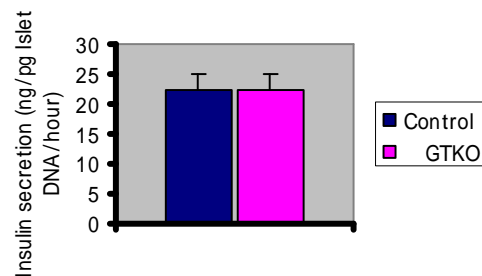
(6) 単離膵島を用いたインスリン分泌の検討  
単離膵島を用いてグルコースに対するインスリンの分泌を検討した。

## 5.6mM グルコースに対するインスリン分泌



明らかな差は見られなかった。

## 16.7mM グルコースに対するインスリン分泌

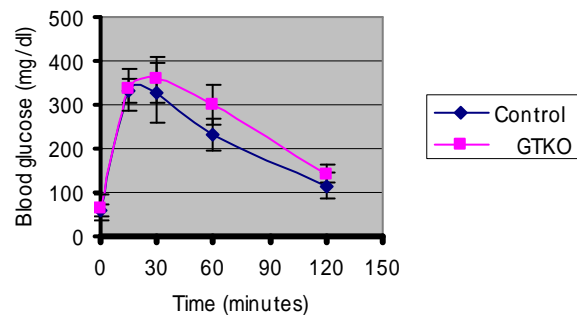


こちらも明らかな差は見られなかった。

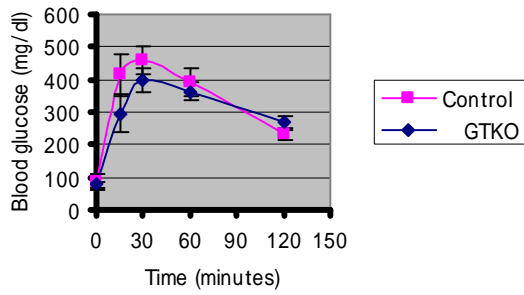
(7) 8ヶ月齢マウスでの血糖値など

これらマウス(8ヶ月齢)を用いて随時血糖、インスリン、空腹時血糖、インスリン、インスリン分泌の測定、2g/kg 経口糖負荷試験、インスリン耐性試験を行った。空腹時血糖、インスリン、随時血糖、インスリン共にコントロールと GTKO で差は見られなかった。

## 2g/kg 腹腔内注射糖負荷テスト

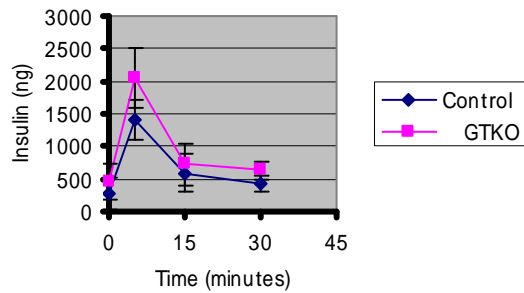


1ヶ月齢では耐糖能が軽度悪化傾向を示した。



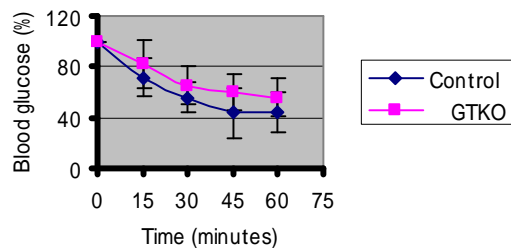
8ヶ月齢でも1ヶ月齢と同様に耐糖能が軽度悪化傾向が見られた。

### 3g/kg グルコースに対するインスリン分泌



In vivo でも in vitro と同様にグルコースに対して明らかなインスリン分泌に差が見出せなかった。

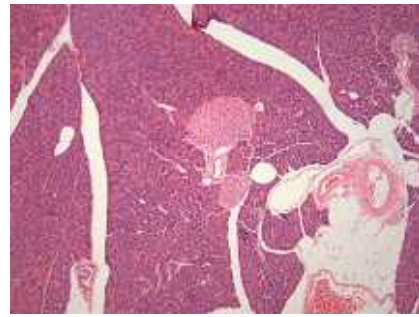
### 0.75U インスリン耐性テスト



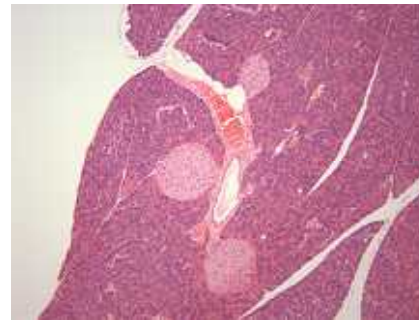
末梢のインスリン感受性も明らかな違いが認められなかった。

### (8) 8ヶ月齢マウス膵島組織所見

Control (x10)



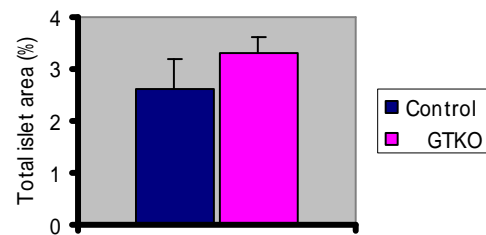
GTKO (x10)



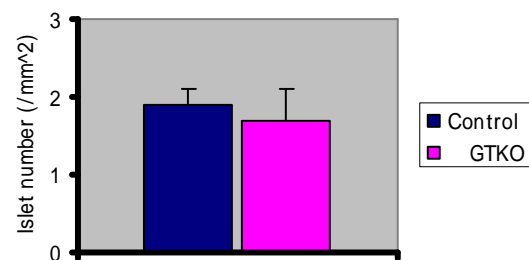
H&E 染色切片では大きな違いは見出せないようであった。

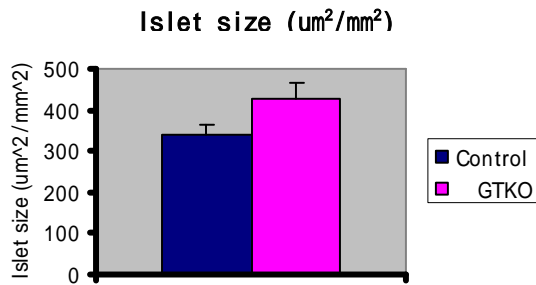
(9) マウス(8ヶ月齢)の膵島形態計測  
8ヶ月齢の膵島形態計測の結果を示す。

Total islet area (%)



Islet number (/mm<sup>2</sup>)





膵島容積に GTKO で軽度増加傾向を示すも有意差は認められなかった。

(10)膵島のアポトーシスを TUNEL 法にて検討した。明らかなアポトーシスの増加は GTKO にて認められなかった (data not shown)。

#### 考察

今回の検討では残念ながら、PDX1-Creを用いた GTKO のでは明らかな表現形が認められなかった。これには RIP に比べてプロモーター活性が弱い可能性がある。表現形を得るために現在2つのプロジェクトを進行させている。

1. 表現形を得るためには、セラミド代謝系に更なる負荷を示すことが必要と考えられる。そこで de novo のセラミド合成を高めるためリサーチダイエツト社の高脂肪食負荷及び肥満型2型糖尿病モデルマウスである ob/ob マウスと GTKO の交配を現在行っている。これにより、明らかな形質が発現するが期待される。

2. 今回の検討では Cre マウスのプロモーターを変えた結果、表現形が変化してしまった。表現形がラットインスリン Cre マウスのための可能性も捨てきれない。しかしながら、他の遺伝子の loxP マウスではラットインスリンプロモーター Cre を用いても 細胞のアポトーシス、過形成は観察されないことから、GT 特異的な形質であると考えられる。そこでインスリン分泌不全のないラットインスリンプロモーター Cre マウスを共同研究者である北海道大学・大学院先端生命科学研究院附属次世

代ポストゲノム研究センター山下 匡准教授に供与をうけて交配中である。これらマウスの解析をこれから進めていく予定である。これらのことより 細胞における GT のより明らかな役割が解明されると考えている。

#### 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0件)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

水上 浩哉 (MIZUKAMI HIROKI)  
弘前大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：00374819

##### (2) 研究分担者 なし

( )  
研究者番号：

##### (3) 連携研究者 なし

( )  
研究者番号：