

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09006

研究課題名(和文) DBPシグナルを介した時計遺伝子ネットワークによるインスリン分泌制御機構の解明

研究課題名(英文) Circadian regulation of insulin secretion through DBP signal

研究代表者

太田 康晴 (Ohta, Yasuharu)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：60448280

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)：全身型DBP欠損(KO)マウスの解析を中心に解析を行なった。OGTTおよび単離ラ氏島を用いたStatic incubation assayでは、DBP欠損マウスにおいてインスリン分泌低下が認められた。しかし同マウスはインスリン分泌不全を認める一方で耐糖能障害は軽度であった。インスリン負荷試験において低血糖からの回復が遅延していることから、このマウスでは骨格筋における糖取り込みが増大していることが推察された。インスリン負荷後の腓腹筋のAKTリン酸化がDBP KOマウスにおいて増大しており、骨格筋のインスリン感受性の増大が認められた。現在、このメカニズム解明を中心に解析を継続している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

代謝機構そのものにも概日リズムが存在すること、体内時計の異常によって糖尿病や肥満のリスクが上昇することから、体内時計/時計遺伝子と代謝疾患の間には密接な関連があることに疑いはない。しかし、そのメカニズムの解明は不十分である。我々は、時計遺伝子の一つであるDBPが筋肉の糖取り込みを調節していることを見出し、本研究は、この調節機構の解明によって、肥満・糖尿病治療の発展に大きく寄与する可能性が高い。さらには生活習慣の改善方法を含めた新たな糖尿病の治療法の開発につながる可能性が高いと考えている。

研究成果の概要(英文)：The analysis focused on systemic DBP-deficient (KO) mice, in which OGTT and static incubation assay using isolated islet La showed decreased insulin secretion in DBP-deficient mice. However, DBP-deficient mice had only mild glucose intolerance while showing deficient insulin secretion. Delayed recovery from hypoglycemia in the insulin tolerance test suggests increased glucose uptake in skeletal muscle in these mice. AKT phosphorylation in the gastrocnemius muscle after insulin loading was increased in DBP KO mice, indicating increased insulin sensitivity in skeletal muscle. We are currently continuing our analysis with a focus on elucidating this mechanism.

研究分野：糖尿病・代謝学

キーワード：糖脂質代謝

## 1. 研究開始当初の背景

DBP と E4BP4 は、それぞれ転写活性化、転写抑制因子として、D-box に対して reciprocal に作用する。我々は、自身の研究成果から、D-box に対する転写活性化シグナル(DBP シグナル)は、膵細胞のみならず、肝細胞、さらには骨格筋における糖代謝制御機構に極めて重要な役割を担っていることを示してきた。しかしながらこれまで我々は、臓器特異的に E4BP4 を過剰発現させることによって DBP の作用抑制が臓器特異的に引き起こされることを想定して解析を行ってきており、DBP そのものの機能解析はまだ不十分であると考えていた。

## 2. 研究の目的

DBP 自体が、膵細胞におけるインスリン分泌、肝と骨格筋のインスリン感受性、特に筋肉のインスリン感受性にどのような役割を持っているのかを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

全身型の *Dbp* 欠損(KO)マウスを樹立し、このマウスの糖代謝関連の負荷試験(経口ブドウ糖負荷試験、インスリン負荷試験、ピルビン酸負荷試験)を行なった。さらに同マウスを用いて、in vivo での 2-Deoxy Glucose (2-DG) の腓腹筋への取り込み、インスリン投与後の腓腹筋の AKT リン酸化を行なった。網羅的な解析として、同マウスの腓腹筋、末梢血単核細胞(PBMC)を用いたトランスクリプトーム解析(RNA シークエンス)も行なった。

## 4. 研究成果

*Dbp* KO マウスは、予想に反して 経口糖負荷試験では耐糖能障害はほとんど認められなかった。一方、糖負荷試験での負荷後 30 分のインスリン分泌は野生型(WT) vs KO=0.378 vs 0.11(ng/ml)であり、*Dbp* KO マウスで有意に低下していた。ピルビン酸負荷試験においては、*Dbp* KO マウスで有意な高血糖が認められたため、肝糖新生も *Dbp* KO マウスで増加していることがわかった。インスリン分泌不全、肝糖新生の増大があるにも関わらず、耐糖能障害がほとんどないと要因を明らかにするため、次にインスリン負荷試験を行なった。負荷後 90 分、120 分において *Dbp* KO マウスで明らかに血糖値が低くなることがわかった。この結果から、骨格筋での糖の取り込みが増大している可能性が示唆された。2-DG の in vivo での糖取り込みをインスリンと同時に投与して解析したところ、*Dbp* KO マウスの腓腹筋では、WT の約 4 倍の 2-DG の取り込みが認められた。さらにインスリン投与後の腓腹筋の AKT のリン酸化も *Dbp* KO マウスでは WT の約 3 倍と顕著に亢進していた。つまり、*Dbp* KO マウスでは、骨格筋のインスリン感受性が明らかに亢進し、筋での糖取り込みが増加しているため、インスリン分泌不全や肝糖産生の増大があるにも関わらず、明らかな耐糖能障害が一見認められなくなっていることがわかった。*Dbp* KO では、インスリン分泌不全が認められるものの、骨格筋で

のインスリン感受性の増大に比べるとその差が小さいことから、骨格筋におけるインスリン感受性増大のメカニズムの解明を優先して行うこととした。*Dbp* KO マウスの腓腹筋のトランスクリプトーム解析を行なったところ、意外なことに、血球の表面マーカー、サイトカイン、サイトカインレセプターなど、免疫や血球の分化に関わる分子の発現が、WT と大きく異なることがわかった。リアルタイム PCR で解析を続けて行なっているが、TNF そのものあるいはそのレセプターなどの発現が、*Dbp* KO マウスの腓腹筋で低下していることがわかった。末梢血における血球の分画の比率自体が、*Dbp* KO マウスでは変化しているのではないかと考え、末梢血単核細胞 (PBMC) のトランスクリプトーム解析も行なった。しかし、PBMC の遺伝子発現において、WT と

*Dbp* KO マウスでは、ほとんど差が認められなかった。筋肉活動に伴う筋肉の炎症と糖取り込み、そこにおける時計遺伝子 DBP の役割というところにまずは着目し、解析を継続する予定としている。血中遊離脂肪酸 (NEFA) も *Dbp* KO マウスで低下しており、この低下が筋肉のインスリン感受性増大の要因になっている可能性もある。このように様々な観点から、*Dbp* KO マウスの骨格筋のインスリン感受性増大のメカニズムを解明していきたい。筋の糖取り込みはこのマウスのデータからも分かるように全身の糖代謝に与える影響が非常に大きい。*Dbp* 欠損に伴う筋肉の糖取り込み増大の機序の解明により、糖尿病の新たな治療戦略が開拓できる可能性があると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Matsumura T, Ohta Y, Taguchi A, Hiroshige S, Kajimura Y, Fukuda N, Yamamoto K, Nakabayashi H, Fujimoto R, Yanai A, Shinoda K, Watanabe K, Mizukami Y, Kanki K, Shiota G, Tanizawa Y.	4. 巻 534
2. 論文標題 Liver-specific dysregulation of clock-controlled output signal impairs energy metabolism in liver and muscle.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 415-421
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.11.066	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 Kitada M, Koya D, Harada N, Shide K, Joo E, Ryo Suzuki, Bouchi R, Ohta Y, Kondo T	4. 巻 11
2. 論文標題 Medical nutrition therapy and dietary counseling for patients with diabetes-energy, carbohydrates, protein intake and dietary counseling.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diabetol Int.	6. 最初と最後の頁 224-239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13340-020-00437-7	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 -

1. 著者名 Suetomi R, Ohta Y, Akiyama M, Matsumura T, Taguchi A, Yamamoto K, Kamatani T, Tanizawa Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Adrenomedullin has a cytoprotective role against endoplasmic reticulum stress for pancreatic -cells in autocrine and paracrine manners.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig.	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） 10.1111/jdi.13218.	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9件（うち招待講演 3件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 太田康晴, 田口昭彦, 松村卓郎, 藤本留理子, 秋山優, 福田尚文, 山本薫, 神吉けい太, 汐田剛史, 水上洋一, 篠田晃, 柳井章江, 明石真, 谷澤幸生
2. 発表標題 体内時計による代謝制御と糖尿病
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松村卓郎, 太田康晴, 藤本留理子, 田口昭彦, 山本薫, 廣重俊典, 竹田孔明, 明石真, 谷澤幸生
2. 発表標題 ヒトにおける糖代謝の概日リズムと時計遺伝子との関連性の検討
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤本留理子, 太田康晴, 松村卓郎, 田口昭彦, 山本薫, 廣重俊典, 秋山優, 竹田孔明, 明石真, 谷澤幸生
2. 発表標題 非糖尿病患者における糖代謝の概日リズムとそのメカニズムの検討
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田康晴, 松村卓郎, 田口昭彦, 福田尚文, 山本薫, 柳井章江, 秋山優, 藤本留理子, 神吉けい太, 汐田剛史, 水上洋一, 篠田晃, 谷澤幸生
2. 発表標題 出力系時計遺伝E4BP4の肝特異的過剰発現は骨格筋でのインスリン感受性を低下させる
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤本 留理子、太田 康晴、松村 卓郎、田口 昭彦、山本 薫、廣重 俊典、秋山 優、竹田 孔明、明石 真、谷澤 幸生
2. 発表標題 健常者における糖代謝の概日リズムとそのメカニズムの検討
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤本 留理子, 太田 康晴, 松村 卓郎, 田口 昭彦, 山本 薫, 廣重 俊典, 秋山 優, 竹田 孔明, 明石 真, 谷澤 幸生
2. 発表標題 ヒトの糖代謝の概日リズムとそのメカニズムの解明
3. 学会等名 第117回日本内科学会講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田 康晴, 松村 卓郎, 田口 昭彦, 福田 尚文, 山本 薫, 柳井 章江, 秋山 優, 藤本 留理子, 神吉 けい太, 汐田 剛史, 水上 洋一, 篠田 晃, 谷澤 幸生
2. 発表標題 出力系時計遺伝子DBP、E4BP4を介した肝臓における脂質代謝制御機構
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田口 昭彦, 太田 康晴, 松村 卓郎, 梶邑 泰子, 山本 薫, 中林 容子, 藤本 留理子, 秋山 優, 柳井 章江, 篠田 晃, 谷澤 幸生
2. 発表標題 時計遺伝子E4BP4、DBPと膵 細胞機能との関連
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田 康晴, 松村 卓郎, 田口 昭彦, 福田 尚文, 山本 薫, 柳井 章江, 秋山 優, 藤本 留理子, 神吉 けい太, 汐田 剛史, 水上 洋一, 篠田 晃, 谷澤 幸生
2. 発表標題 体内時計と代謝制御機構
3. 学会等名 第69回日本体質医学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019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	秋山 優  (Akiyama Masaru)  (90717547)	山口大学・医学部附属病院・講師    (15501)	

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