

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32666

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K23872

研究課題名(和文) CD36によるインスリン分泌調節と糖尿病発症：新規モデルマウスを用いた解析

研究課題名(英文) Addressing the role of CD36 in insulin secretion and diabetes incidence using a new mouse model

研究代表者

長尾 元嗣 (NAGAO, Mototsugu)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：10468762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝的なインスリン分泌能は2型糖尿病の発症を規定する重要な要因であるが、その分子基盤は未だ解明されていない。我々は以前に、細胞株に脂肪酸輸送体CD36を過剰発現させると、エキソサイトーシスが障害されてインスリン分泌能が低下することを示している。本研究において、遺伝的な低インスリン分泌能を示す2型糖尿病モデル動物(ON-DPマウス)の膵島(細胞)でも『CD36高発現-インスリンシグナル減弱-エキソサイトーシス障害-インスリン分泌能低下』という一連の事象が確認されたことから、遺伝的なインスリン分泌能の低下にはCD36を起点とする細胞機能障害の惹起経路が関与するものと予想された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が行った肥満ドナー由来のヒト膵島を用いた検討において、非2型糖尿病患者(正常血糖者)と比較して、2型糖尿病患者ではエキソサイトーシス障害やインスリン分泌能の低下がみられるのと同様に、CD36発現が遺伝子およびタンパク質レベルで高いことを見出している。ON-DPマウスの膵島(細胞)において肥満2型糖尿病患者の膵島と類似した事象を確認し得た本研究の成果は、ON-DPマウスの「2型糖尿病発症における膵島病理基盤モデル」としての位置づけをより確かなものとすると共に、細胞のCD36を標的とする新たな糖尿病予防・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)：Hereditary insulin secretion capacity can be a crucial determinant for the susceptibility to type 2 diabetes. However, its molecular background has not been fully clarified. We previously demonstrated that overexpression of fatty acid translocase/CD36 impaired insulin secretion, associated with suppressed insulin signaling and exocytosis dysfunction (e.g., defects in insulin granule docking), in INS-1 clonal β -cells. In the present study, we aimed to study the implications of CD36 expression for hereditary low insulin secretion capacity observed in diabetes-prone ON-DP mice. We demonstrated here that the ON-DP mouse islets (and β -cells) had abnormally high CD36 protein expression and showed lipid accumulation, insulin signaling attenuation, and defects in insulin granule docking. These findings provide new insight into the pathophysiological role of CD36 for the development of T2D.

研究分野：実験病理学

キーワード：2型糖尿病 インスリン分泌能 細胞 CD36 エキソサイトーシス Oikawa-Nagaoマウス

1. 研究開始当初の背景

肥満は2型糖尿病発症における強力な危険因子である。しかしながら、全ての肥満者が2型糖尿病を発症するとは限らない。インスリン分泌能の個人差がその発症感受性を規定するものと考えられているが、その個人差を決定するメカニズムは明らかでない[1]。我々は以前に、肥満ドナー由来のヒト膵島を用いた検討において、非2型糖尿病患者(正常血糖者)と比較して、2型糖尿病患者ではエキソサイトーシス障害やインスリン分泌能の低下がみられるのと同時に、CD36発現が遺伝子およびタンパク質レベルで高いことを見出している[2]。CD36は細胞内への脂肪酸取込を促進するスカベンジャー受容体であり、β細胞株での過剰発現がインスリン分泌能を低下させることが示されているものの[3]、そのインスリン分泌調節機序や糖尿病発症との関係は解明されていない。

そこで我々は、先行研究において、ラット由来β細胞株であるINS-1細胞にCD36の過剰発現を試みた[2]。その結果、CD36過剰発現によってインスリン分泌顆粒の細胞膜への接着を制御するSNAREタンパク質群の発現量が低下し、細胞膜に接着するインスリン分泌顆粒数(接着顆粒数)が減少した結果、エキソサイトーシスが障害されてインスリン分泌能が低下することを見出した。またそれらと同時に、インスリンシグナルの抑制が認められ、その下流にあるFoxO1(SNAREタンパク質群の転写抑制因子)の核内停滞を認めた。これらの結果は、『CD36高発現-インスリンシグナル減弱-エキソサイトーシス障害-インスリン分泌能低下』というCD36を起点とするβ細胞機能障害の惹起経路(図1)の存在を強く示唆しており、膵島および生体レベルでの検証が必要と考えられた。

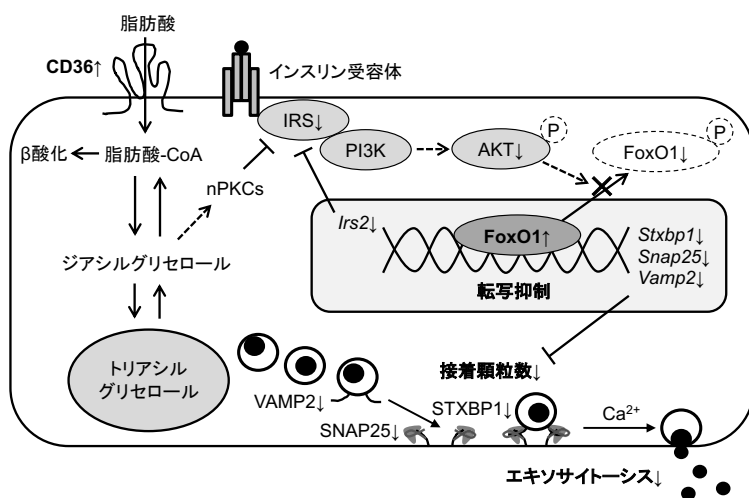


図1: CD36を起点とするβ細胞機能障害の惹起経路
[Nagao M, et al. *Diabetes* 69: 1193-1205, 2020より作図]

2. 研究の目的

我々は近年、高脂肪食投与時の耐糖能が遺伝的に異なるモデルマウス [Oikawa-Nagao (ON) マウス] 2系統を選抜交配によって確立した[4, 5]。高脂肪食誘導性に糖尿病を易発するDiabetes-Prone系(ON mouse-DP®; 以下、ON-DPマウス)と糖尿病発症耐性を示すDiabetes-Resistant系(ON mouse-DR®; 以下、ON-DRマウス)の代謝表現型の差異とその出現機序の解析は、「なぜ2型糖尿病の発症に個人差が存在するのか」という未解明の疑問に回答をもたらす。ON-DPマウスは遺伝的な「低インスリン分泌能」を基盤に、高脂肪食の過食と体重増加による「インスリン抵抗性」の獲得によって糖尿病を発症するという、ヒトの2型糖尿病の発症過程と類似した表現型を示すことがわかっている。このON-DPマウスの膵島では、ON-DRと比較して、グルコースおよびカリウム応答性インスリン分泌能(GSIS・KSIS)の低下がみられるが、CD36の遺伝子発現が高値を示す一方で、SNAREタンパク質群の遺伝子発現は低値を示すことがわかっている[6]。そのため、ON-DPマウスとその正常対照であるON-DRマウスは、β細胞におけるCD36発現の差異がインスリン分泌能に及ぼす影響の解析や、糖尿病発症との関係を解明する上で、極めて有用なマテリアルと考えられた。そこで本研究では、ON-DP/DRマウスを用いて、CD36発現の差異がβ細胞機能、特にインスリン分泌機序に及ぼす影響を膵島(β細胞)レベルで解析し、糖尿病発症におけるCD36の病態生理学的意義を明確化することを目的とした。

3. 研究の方法

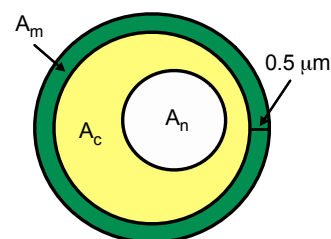
本研究ではON-DP/DRマウスにおけるインスリン分泌能の差異を規定する因子としてCD36の役割に注目し、以下の2点を中心に検証を行った。

- ① **CD36 がインスリン分泌能を低下させるメカニズム**: 膵島 (β 細胞) における CD36 発現の差異が、細胞内の代謝調節、インスリンシグナル、およびエキソサイトーシスを制御する SNARE タンパク質群の発現量やインスリン分泌顆粒動態にどのような影響を与えるのかを明らかにするために、ON-DP/DR マウスの膵島 (β 細胞) における CD36 の発現パターン、すなわち膵島でのタンパク質発現量 (ウェスタンブロット) や β 細胞内分布 (細胞免疫染色) と、脂質代謝関連酵素の遺伝子発現 (qPCR)、インスリンシグナル (AKT リン酸化解析)、β 細胞内のインスリン分泌顆粒分布 (走査電子顕微鏡) との関係を比較検討した。
- ② **β 細胞 CD36 を標的とした介入の有効性**: CD36 特異的 IgG 抗体 (FA6-152) を用いた CD36 の機能制御介入試験を膵島レベルで行い、インスリン分泌能 (GSIS・KSIS) への影響を解析した。

4. 研究成果

① CD36 がインスリン分泌能を低下させるメカニズム

ON-DP マウスの膵島では、ON-DR と比較して、CD36 のタンパク質発現量が約 2 倍高値であった。そこで膵島細胞における CD36 発現を確認したところ、ほぼ全てのインスリン陽性細胞 (β 細胞) で CD36 の発現をみとめた。CD36 の発現強度は ON-DP マウスの β 細胞で明らかな高値を示すとともに、その細胞内分布についても両系統間で明らかな差異がみられることがわかった。例えば ON-DP マウスの β 細胞では、核・細胞辺縁部を除く部位 (細胞質領域: A_c) に対する細胞辺縁部 (細胞膜領域: A_m) の CD36 発現強度比 $R_{m/c}$ (図 2) が、ON-DR と比較して明らかな高値を示した。



$$R_{m/c} = F(A_m) \text{ mean} / F(A_c) \text{ mean}$$

図2: CD36の細胞内局在解析

CD36 による脂肪酸流入の増加を反映してか、ON-DP マウスの膵島では一部の脂質代謝関連分子の遺伝子発現が高値を示すとともに、AKT のリン酸化が抑制されており、インスリンシグナルの減弱が示唆された。また ON-DP マウスの β 細胞では、接着顆粒数が ON-DR の 3 分の 1 程度に減少していることもわかった。

以上の結果より、ON-DP マウスの膵島 (β 細胞) においても、『CD36 高発現-インスリンシグナル減弱-エキソサイトーシス障害-インスリン分泌能低下』という CD36 を起点とする β 細胞機能障害の惹起経路 (図 1) が、インスリン分泌能の低下に関与している可能性を示した。

② β 細胞 CD36 を標的とした介入の有効性

ON-DP マウスから膵島を単離し、FA6-152 と 72 時間共培養して CD36 の機能を長時間阻害した後 GSIS・KSIS を評価したが、インスリン分泌能の明らかな改善はみられなかった。一方で、ヒト β 細胞株である EndoC-β H1 細胞[2]や野生型 C57BL/6 マウスの膵島[未発表]では、同様の介入手法によってインスリン分泌能の改善が確認されている。以上の結果より、脂肪蓄積前の状態にある β 細胞では CD36 の機能阻害によって脂肪酸の新規流入を防ぐことによりインスリン分泌能が改善する可能性もあると考えられるため、CD36 を標的とした介入の方法やタイミングについて更なる検討を行う必要があると思われる。

<引用文献>

- [1] Nagao M, Asai A, Sugihara H, Oikawa S (2015) Fat intake and the development of type 2 diabetes. *Endocr J* 62: 561-572
- [2] Nagao M, Esguerra JLS, Asai A, et al. (2020) Potential Protection Against Type 2 Diabetes in Obesity Through Lower CD36 Expression and Improved Exocytosis in beta-Cells. *Diabetes* 69: 1193-1205
- [3] Wallin T, Ma Z, Ogata H, et al. (2010) 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* 1801: 191-197

[4] Nagao M, Asai A, Kawahara M, et al. (2012) 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* 3: 245-251

[5] Nagao M, Esguerra JL, Wendt A, et al. (2020) Selectively bred diabetes models: GK rats, NSY mice and ON mice. In: King A (ed) *Animal Models of Diabetes: Methods and Protocols*. Springer, New York

[6] Nagao M, Asai A, Inaba W, et al. (2014) Characterization of pancreatic islets in two selectively bred mouse lines with different susceptibilities to high-fat diet-induced glucose intolerance. *PLoS One* 9: e84725

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 1件）

1. 著者名 Mototsugu Nagao, Jonathan L.S. Esguerra, Akira Asai, Jones K. Ofori, Anna Edlund, Anna Wendt, Hitoshi Sugihara, Claes B. Wollheim, Shinichi Oikawa, Lena Eliasson	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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Akira Asai, Mototsugu Nagao, Koji Hayakawa, Teruo Miyazawa, Hitoshi Sugihara, Shinichi Oikawa	4. 巻 63
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 1836-1846
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 Mototsugu Nagao, Jonathan Lou S. Esguerra, Anna Wendt, Akira Asai, Hitoshi Sugihara, Shinichi Oikawa, Lena Eliasson	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 Mol Biol	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4件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0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回日本肥満・糖尿病動物学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長尾 元嗣
2. 発表標題 新規糖尿病モデルOikawa-Nagaoマウスの開発と2型糖尿病の病態生理研究
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長尾 元嗣
2. 発表標題 新規糖尿病モデルOikawa-Nagaoマウスの開発と2型糖尿病・動脈硬化の病態生理研究
3. 学会等名 第36回日本糖尿病合併症学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長尾 元嗣、浅井 明、杉原 仁、Claes B. Wollheim、及川 眞一、Lena Eliasson
2. 発表標題 Pathogenic role of beta-cell CD36 in the development of type 2 diabetes with obesity
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021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
研究協力者	浅井 明 (ASAI Akira) (30500011)	日本医科大学・内分泌糖尿病代謝内科学分野・研究員 (32666)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	エリアソン レナ (ELIASSON Lena)	ルンド大学糖尿病センター・Unit of Islet Cell Exocytosis・Professor	
研究協力者	ウォルハイム クラエス (WOLLHEIM Claes B.)	ジュネーブ大学・Department of Cell Physiology and Metabolism・Professor	

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			
スウェーデン	ルンド大学			