

機関番号：24303

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591066

研究課題名 (和文) 加齢指標蛋白質 SMP30 の糖代謝における役割

研究課題名 (英文) Role of Senescence Marker Protein-30 in Glucose Homeostasis

研究代表者

長谷川 剛二 (HASEGAWA GOJI)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：00295643

研究成果の概要 (和文)：

インスリン分泌機構の抹消レベルでの障害による早期グルコース刺激インスリン分泌障害が SMP30 ノックアウトマウスにみられる軽度耐糖能障害の原因と考えられた。SMP30 の減少が加齢に伴う膵β細胞の機能障害 (インスリン分泌障害) の原因となる可能性が示された。

研究成果の概要 (英文)：

The impairment of early phase of insulin secretion due to dysfunction of the distal portion of insulin secretion pathway underlies glucose intolerance in SMP30 knockout mice. Decreased SMP30 may contribute to the worsening of glucose tolerance that occurs in normal aging.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：エネルギー・糖質代謝異常

1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病対策は医療における重要課題である。特に高齢化とライフスタイルの欧米化により糖尿病患者はさらに増加すると予想される。加齢は 2 型糖尿病の重要な発症要因である。しかし、加齢に伴う耐糖能低下の機序は明らかにされていない。加齢によるインスリン分泌低下は最近ヒトで

証明されたが、分子生物学的機序は不明である。

加齢指標蛋白質 Senescence Marker Protein-30 (SMP30)は肝臓での発現量が加齢に伴い減少することからプロテオーム解析により発見された。共同研究者の施設はノックアウトマウスの作製に成功し、その機能解析を行ってきた。その結果、SMP30 の減

少や欠損が臓器傷害の閾値を低下させ老化病態を引き起こすと考えられている。しかし、SMP30 と耐糖能障害の関連については検討されていない。

また、我々は SMP30 が哺乳類のビタミンC合成経路の酵素であるグルコノラクトナーゼと同一であることを報告しており。

2. 研究の目的

SMP30 ノックアウトマウスに高脂肪含有飼料（環境因子）を負荷することにより、SMP30 の糖代謝・インスリン分泌への関与を明らかにする。さらに SMP30 のインスリン分泌機構における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) SMP30ノックアウトマウスにおける高脂肪食投与の糖代謝への影響

- ・ 雄SMP30 ノックアウトマウス (SMP30Y^{-/-}) を研究分担者より供与。対照の野生型マウスはC57BL/6マウス。
- ・ 7週齢 雄SMP30 ノックアウトマウス (SMP30Y^{-/-})、雄野生型マウス (SMP30Y^{+/+}) をそれぞれ、高脂肪含有飼料 (High Fat Diet 32、日本クレア：脂肪カリ-比60%) 投与群、対照飼料投与群 (計4群) に分け、ビタミンC補充条件下 (飲水ビタミンC 1.5 g/l)、8週間自由摂食で観察する。下記②~⑨については8、12週間後に行う。
- ① 体重、摂食量。
- ② 血糖、中性脂肪、コレステロール、HDLコレステロール、遊離脂肪酸。
- ③ 糖負荷試験 (ipGTT)、インスリン負荷テスト
- ④ 膵インスリン含量測定
- ⑤ 皮下・腹腔内脂肪量の計測
- ⑥ 肝臓組織像の検討：H-E染色、オイルレッド染色
- ⑦ 膵像組織像の検討：H-E染色、免疫組織染色 (酵素抗体法：インスリン、BrDU) コンピューター画像解析により β cell mass、BrDU labeling indexを算出。

(2) SMP30 の膵インスリン分泌機構における役割の解析

通常飼料投与のノックアウトマウス、野生型マウスからの単離ランゲルハンス島を用いて①グルコース、KCl 刺激インスリン分泌反応。②ATP 含量を検討。

- ・ 膵ランゲルハンス島の単離：コラゲナーゼ法。
- ・ Batch incubationによるインスリン分泌実験、ATP 含量測定。

(3) ビタミンC (VC) のインスリン分泌における役割

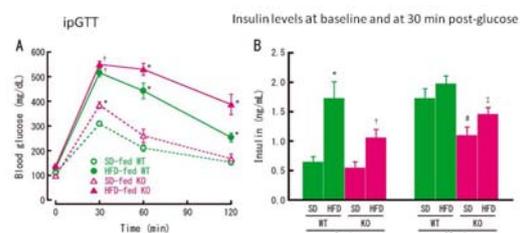
雄 SMP30 ノックアウトマウス (SMP30Y^{-/-}) と野生型マウスを8週令から VC 補充条件 (VC + ; 飲水 VC 1.5 g/l)あるいは不足条件 (VC - ; 37.5mg/l) で飼育。8週間後に ipGTT、インスリン負荷テスト、単離ランゲルハンス島を用いたインスリン分泌実験、ATP 含量の測定を行った。

4. 研究成果

- (1) SMP30 ノックアウトマウスの空腹時、随時の血糖、血中脂質プロファイル、膵インスリン含量は野生型マウスと差を認めなかった。高脂肪食投与により野生型マウスと同様の体重増加、皮下・腹腔内脂肪量増加、血糖値上昇、脂質プロファイル変化を認めた。
- (2) 糖負荷試験において SMP30 ノックアウトマウスは負荷後 30 分のみに有意な血糖上昇を伴う軽度の耐糖能障害を示した。負荷後 30

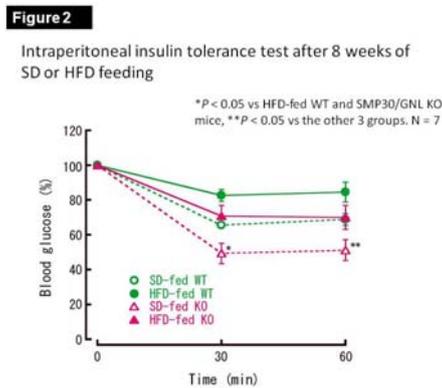
Figure 1

Impaired glucose tolerance in WT and SMP30/GNL KO mice after 8 weeks of SD or HFD feeding

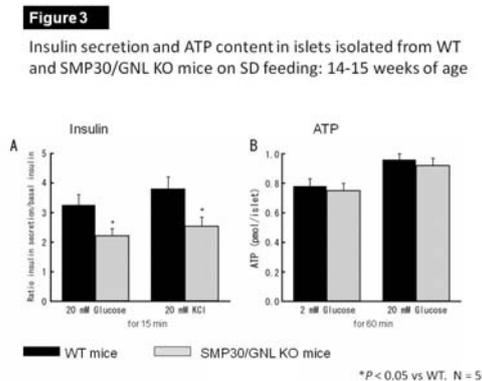


分のインスリン分泌は有意に低下した。高脂肪食により耐糖能障害は増悪した。ノックアウトマウスにおいても代償性インスリン分泌増加を認めるが、野生型と比較すると有意に低値であった (Figure 1)。

(3) インスリン負荷テストの結果、SMP30 ノックアウトマウスは野生型マウスよりも良好なインスリン感受性を示した (Figure 2)。

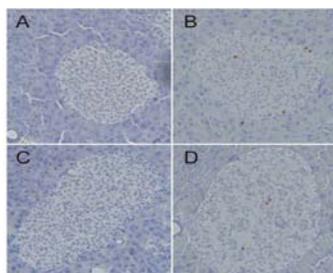


(4) 単離ラ氏島を用いての分泌実験ではグルコース、KC1 刺激インスリン分泌は SMP30 ノックアウトマウスで有意に低下していた。一方、グルコース刺激下 ATP 含量に差はなかった (Figure 3)。



(5) 組織学的検討では、高脂肪食投与による β cell mass、細胞増殖 (BrDU labeling index) の代償性増加に差を認めなかった。

Figure 4
Immunohistochemical staining of BrdU in pancreas sections



A: WT on SD, B: WT on HF, C: SMP30/GNL KO on SD, D: SMP30/GNL KO on HF

以上 (1) ~ (5) のデータを総合すると、インスリン分泌機構の抹消レベルでの障害による早期グルコース刺激インスリン分泌障害が SMP30 ノックアウトマウスにみられる軽度耐糖能障害の原因と考えられた。SMP30 はインスリン抵抗性に伴う膵 β 細胞の代償性肥大には関与しない。

SMP30 の減少が加齢に伴う膵 β 細胞の機能障害 (インスリン分泌障害) の原因となる可能性が示された。

(6) VC 不足条件下では SMP30 ノックアウトマウスの肝臓、血漿 VC 濃度は著明に低下した。野生型マウスに比し VC 欠乏 SMP30 ノックアウトマウスでは負荷後 30、60、120 分で血糖値は有意に高値であり、同インスリン値は有意に低値であった。VC 欠乏はインスリン感受性に影響を及ぼさなかった。単離ラ氏島の 15 分グルコース刺激インスリン分泌は VC 補充、VC 欠乏ともにノックアウトマウスで低下、60 分刺激では VC 欠乏のみ低下した。グルコース刺激 ATP 含量は VC 欠乏ノックアウトマウスのみが低下した。

以上より、インスリン分泌機構において VC の作用点は解糖系からミトコンドリア電子伝達系に存在することが示された。SMP30 ノックアウトマウスは VC 欠乏モデルとして、VC のインスリン分泌機構における役割の検討に有用である。

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 3 件)

- ① Hasegawa G, Yamasaki M, Kadono M, Tanaka M, Asano M, Senmaru T, Kondo Y, Fukui M, Obayashi H, Maruyama N, Nakamura N, Ishigami A. Senescence Marker Protein-30/Gluconolactonase deletion worsens glucose tolerance through impairment of acute insulin secretion. *Endocrinology* 151(2) : 529-536, 2010 査読あり
- ② Park H, Ishigami A, Shima T, Mizuno M, Maruyama N, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Minami M, Yasui K, Itoh Y, Yoshikawa T, Fukui M, Hasegawa G, Nakamura N, Ohta M, Obayashi H, Okanoue T. Hepatic senescence marker protein-30 is involved in the progression of nonalcoholic fatty diease. *J Gastroenterol* 45(4) : 426-434, 2010 査読あり
- ③ Hasegawa G. Decreased Senescence Marker Protein-30 could be a factor that contributes to the worsening of glucose tolerance in normal aging. *Islets* 2 (4): 258-260, 2010 査読あり

[学会発表] (計 6 件)

- ① Senmaru T, Hasegawa G, Ishigami A, Kondo Y, Tanaka M, Yamazaki M, Fukui M, Nakamura N. Senescence Marker Protein-30 deficient mice exhibit impaired acute insulin secretion due to dysfunction of the distal portion of secretion pathway. 8th international diabetes federation western pacific region congress. 2010 October 17-20 ; Busan, Korea.
- ② Senmaru T, Hasegawa G, Ishigami A, Kondo Y, Tanaka M, Yamazaki M, Fukui M, Nakamura N. Senescence Marker Protein-30 deficient mice exhibit impaired insulin secretion due to dysfunction of the distal portion of secretion pathway. 70th annual meeting and scientific sessions of American Diabetes Association. 2010 June 25-29 ; Orland, USA.
- ③ 千丸貴史、長谷川剛二、石神昭人、近藤嘉高、田中武兵、山崎真裕、福井道明、中村直登。Senescence Marker protein-30 (SMP30)の減少は早期インスリン分泌を障害する。第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会。2010 年 5 月 27-29 日 ; 岡山。
- ④ Hasegawa G, Ishigami A, Kondo Y, Tanaka M, Senmaru T, Yamasaki M, Fukui M,

Nakamura N. Senescence Marker Protein-30 deletion worsens glucose tolerance through impairment of acute insulin secretion. 14th international congress of endocrinology. 2010 March 26-30 ; Kyoto, Japan

- ⑤ 千丸貴史、長谷川剛二、石神昭人、近藤嘉高、山崎真裕、田中武兵、浅野麻衣、福井道明、中村直登。加齢指標蛋白質 SMP 30 の糖代謝における役割。第 82 回日本内分泌学会学術総会。2009 年 4 月 23-25 日 ; 東京
- ⑥ Hasegawa G, Ishigami A, Kondo Y, Kadono M, Asano M, Tanaka M, Hosoda H, Yamasaki M, Fukui M, Nakamura N. Role of senescence marker protein-30 in glucose homeostasis. 68th annual meeting and scientific sessions of American Diabetes Association. 2008 June 6-10 ; San Francisco, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 剛二 (HASEGAWA GOJI)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号 : 00295643

(2) 研究分担者

石神 昭人 (ISHIGAMI AKIHITO)
東邦大学・薬学部・准教授
研究者番号 : 50270658