

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17484

研究課題名（和文）肥満糖尿病モデルマウスにおける膵細胞脱分化の成因とNAFLDとの膵肝関連

研究課題名（英文）Relationship between pancreatic beta cell dedifferentiation and NAFLD in diabetic mouse model with obesity

研究代表者

石田 恵美 (Ishida, Emi)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：80806357

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：2型糖尿病では、膵細胞の機能不全によるインスリン分泌低下が臨床的に問題となる。膵細胞脱分化は、糖尿病における細胞機能不全の一因として近年注目されており、筆者らは肥満糖尿病モデルマウスにおいて、既存の糖尿病治療の中では、食事制限がよりよく、細胞脱分化を防ぐことを報告した。本研究では、糖質/脂質比を変えて食事制限を行うと、膵細胞脱分化の進行抑制の程度に違いが生じるとともに、肝脂肪化にも差が生じることをつきとめ、特に肝臓における分子機構について、その一端を明らかにした。本研究は、細胞脱分化を防ぐという新たな視点での食事療法の発展や、細胞機能と他臓器、栄養素との関連の解明の一助となりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、糖尿病における膵細胞脱分化の進展には、摂取する栄養素、特に糖質/脂質のバランスと、肝における脂肪化が関連することを明らかにしたものであり、いまだに明らかでない膵細胞脱分化の分子メカニズムの解明や、膵細胞脱分化の改善を目指した新たな食事療法の提案、膵細胞脱分化と他臓器の関連など、糖尿病の発症・進行・予防や治療と密接に結びつく知見につながると考えられる。膵細胞が脱分化した段階で治療介入できれば、膵細胞の死滅による不可逆的なインスリン分泌不全におちいることが防がれ、インスリン自己注射などの複雑で高額な療養を要したり、進行した合併症で患者も社会も負担になることを避けたりしうると期待される。

研究成果の概要（英文）：In type 2 diabetes, decreased insulin secretion due to pancreatic β -cell dysfunction is a clinical problem. Pancreatic β -cell dedifferentiation has recently proposed as a cause of β -cell dysfunction in diabetes, and the authors reported that dietary restriction better prevents β -cell dedifferentiation among existing diabetes treatments in obese diabetic mice model. In the present study, we found that dietary restriction with different carbohydrate/lipid ratios differentially suppressed the progression of pancreatic β -cell dedifferentiation as well as hepatic steatosis, and we clarified one aspect of the molecular mechanism, especially in the liver. This study may contribute to the development of dietary therapy from a new perspective of preventing β -cell dedifferentiation and to the elucidation of the relationship between β -cell function, other organs and nutrients.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：糖尿病 膵細胞機能不全 食事療法 肥満 脂肪肝

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病は、膵臓の細胞のインスリン分泌不全とターゲット臓器のインスリン抵抗性が混在し発症している。特に細胞のインスリン分泌能が徐々に低下し、相対的インスリン依存状態へ移行していく細胞機能不全は臨床問題となっている。その原因として、糖毒性や脂質毒性に伴う小胞体ストレスや酸化ストレス、アポトーシスの増加や炎症性サイトカインの増加などがこれまで論じら

れてきたが、近年細胞の脱分化が細胞機能不全の原因の一つとして提唱され注目されている(Talchai, Cell 2012)。肥満糖尿病モデルの db/db マウスは4~6週で、肥満の発症とともに高血糖が生じ、徐々にインスリン分泌不全が起こるため、細胞の脱分化を研究するのに最適なモデル動物である。

申請者は、この db/db マウスにおいて細胞脱分化が食事制限や PPAR 作動薬投与で改善されるが、SGLT 阻害薬では良好な血糖改善にも関わらず細胞脱分化に変化がないことを突き止め、既存の糖尿病治療法による血糖値の改善と脱分化の改善とは相関しないこと、即ち食事制限の質が重要である事を発見し報告した(Ishida, Diabetes 2017)。

上記の結果を受け、申請者らは次に、同一のカロリー制限であるが、炭水化物の比率が多く脂質の比率が低いカロリー制限食(HCLF)と脂質の比率が多く炭水化物の比率が低いカロリー制限食(LCHF)とを db/db マウスに投与する実験を行ったところ、カロリー減量は同一でも、糖質比が高い食事の方が細胞の脱分化が悪化する事が判明した。さらに、NAFLD の進展も糖質比が高く脂質比の低い食事でカロリー制限を行った方が悪化した。また、この時の血清インスリン値は HCLF 群の方が高く、インスリン抵抗性がより高いことが示唆された。

2. 研究の目的

2型糖尿病は、本邦における死因の約 1/3 を占める心筋梗塞や脳卒中などの動脈硬化性疾患の危険因子であり、予防法と新薬の開発は喫緊の課題である。申請者は、特に2型糖尿病において細胞脱分化を抑制し細胞機能不全を予防することで糖尿病を改善するという新たな治療戦略を立て研究を進めている。このプロジェクトの端緒となる研究として、食事制限と PPAR 作動薬の両者に共通し、かつ SGLT 阻害薬に乏しい作用として、脂質代謝へのダイレクトな影響と細胞脱分化の関連を2018-9年度に検討した(科研費若手、課題番号:18K16222)。この研究の過程で、糖質と脂質の主要栄養素バランスを変えて食事制限を行うことで、細胞脱分化に対する前述のような結果を得た。

特筆すべきことは、この研究の際、糖尿病の第4の合併症とも言われている NAFLD にも栄養素が大きく影響を与えていることが判明したことであり、本研究では、膵臓の臓器連関が細胞脱分化の進展に関与しているという仮説を立て、これを検証することを目的とした。さらに、本研究では食事制限にあり SGLT 阻害薬に乏しいもう一つの作用として、腸管シグナルの介在を想定し、インクレチンと細胞脱分化の関係の解析ももう一つの目的とした。

3. 研究の方法

(1) 同程度のカロリー制限を行った場合、脂質制限を主にするより、糖質制限を主にした方が、db/db マウスにおいては脂肪肝の進展抑制がより強い。このモデルマウスにおける、血中脂質濃度、肝臓中の脂質含有量および脂質代謝に関わる遺伝子発現量の変化等を解析し、糖質制限と脂質制限における脂肪肝進展の差の原因となる分子メカニズムを検索した。

(2) GLP-1 によって細胞機能不全が改善することはよく知られており、また GLP-1 投与による脂肪肝改善効果も報告されている(Armstrong, Aliment Pharmacol Ther 2013)ことから、db/db マウスに GLP-1 アナログ(リラグルチド)を1か月程度皮下投与し、IPGTT などの糖代謝プロファイリングを行って血糖改善効果を確認するとともに、膵臓の免疫染色、単離膵島の qPCR 等を行って細胞脱分化の改善有無を検討した。

(3) 細胞機能と脂肪肝に関わる膵臓連関を担う候補分子の一つとして、飢餓やケトン体食により肝臓で産生が増加する FGF21 が挙げられる。FGF21 は、薬理量において脂肪肝の抑制効果が報告されているが(Sanyal, Lancet 2018)、db/db マウスにおいては血糖改善効果も報告されている(Kharitonov, JCI 2005)。したがって、HCLF 食と、LCHF 食をカロリー制限下に投与した群間で FGF21 血中濃度や、FGF21 関連遺伝子発現量の比較検討を行った。

4. 研究成果

(1) 6週齢の db/db マウスを3群に分け、HCLF 食でのカロリー制限群(db-HC)、LCHF 食でのカロリー制限群(db-HF)、通常食の自由摂食群(db-AD)とした。Db-HC 群および db-HF 群には、通常食を自由摂食している db/+マウス(het-AD)の摂餌量と同じカロリーになるように調整した、HCLF 食または LCHF 食を24時間ごとに投与した。摂餌介入1か月後に解析したところ、db-AD と比較し、カロリー制限した db/db 群(db-HC および db-HF)では、体重増加、耐糖能異常およびインスリン分泌能が改善されたが、摂餌中の糖質/脂質比による差は乏しかった(図1)。

図 1

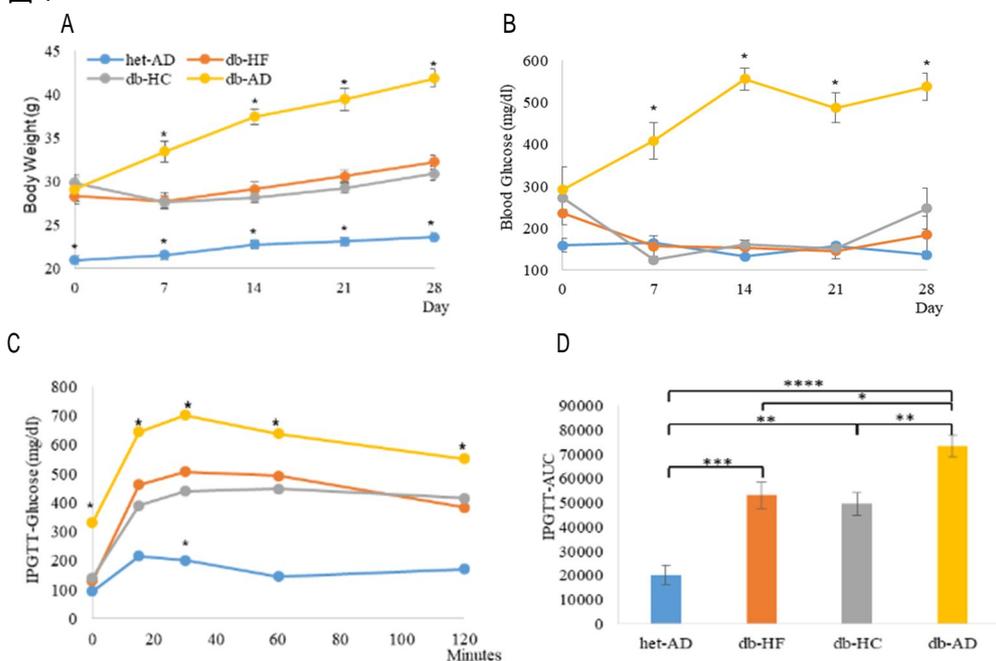


図 1、A. 各群の体重推移 B. 各群の随時血糖値推移 C. 各群のブドウ糖負荷試験 (IPGTT) 中の血糖推移 D. IPGTT における Area under curve (AUC) 値

一方、db-HC 群は db-HF 群より高コレステロール血症および肝の脂肪蓄積が著しかった (図 2)。

図 2

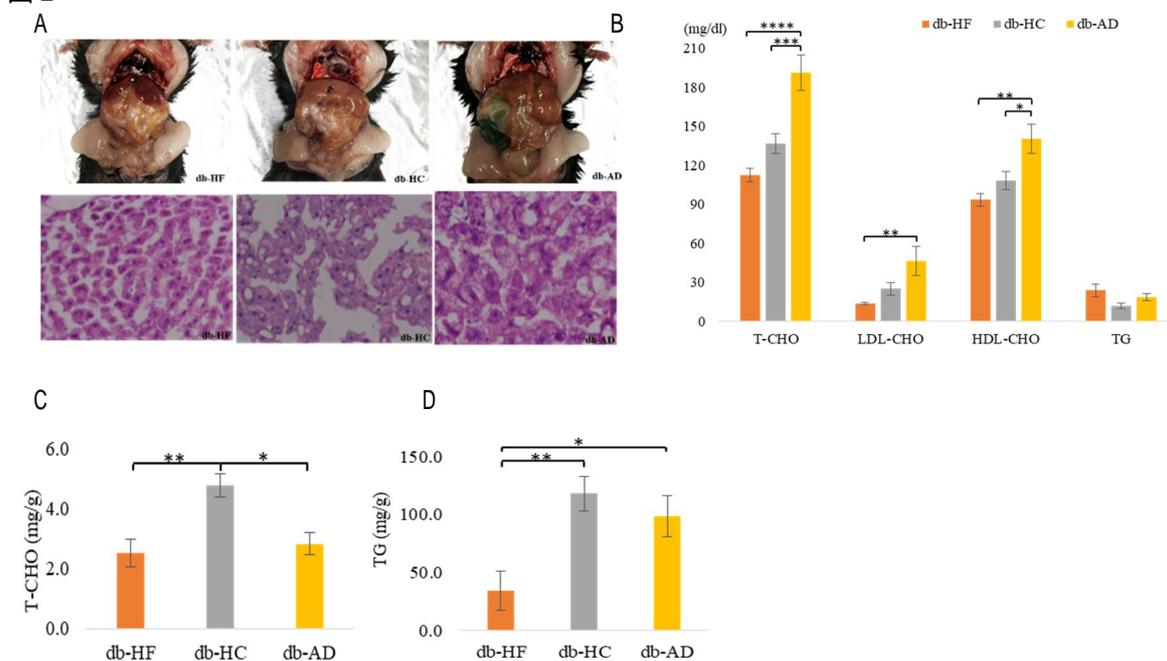


図 2、A. 解剖時の肝臓の肉眼所見および肝臓のヘマトキシリンエオジン染色 B. 血中総コレステロール (T-CHO)、LDL コレステロール (LDL-CHO)、HDL コレステロール (HDL-CHO)、中性脂肪 (TG) 濃度 C. 肝臓 1g あたりの T-CHO 含有量 D. 肝臓 1g あたりの TG 含有量

次に肝臓より抽出した RNA を用いて、次世代シーケンサーで遺伝子発現の網羅的解析 (RNA-seq) を行った。db-HF と db-HC との比較で検出された DEG は 916 個あり、KEGG Pathway Enrichment 解析にて、PPAR signaling pathway が最も関与が高いと考えられた (図 3-A, B)。RT-qPCR でも同様の結果であり、複数の脂肪代謝関連遺伝子の発現が db-HC より db-HF で有意に低下していた (図 3-C, D, E, F)。GO enrichment 解析では、脂質代謝関連遺伝子の他、細胞周期や免疫調節機能に関連する遺伝子等が db-HC で多く発現していることが示された。一方、Serpina を代表とする加水分解酵素や、Pck1、Fgl1 は db-HF で多く発現していた。

図 3

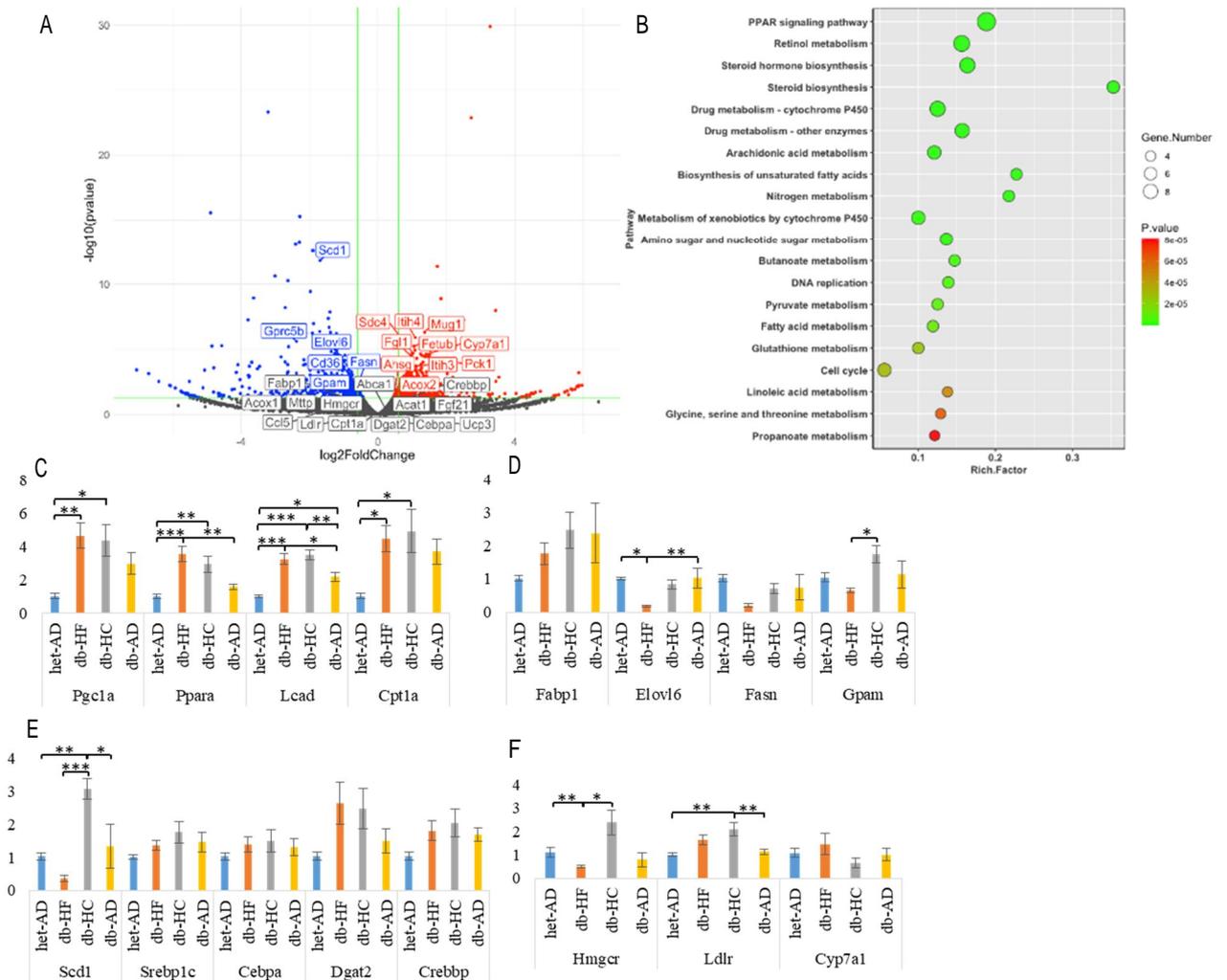


図 3 A. 肝臓における RNA-seq において、db-HF と db-HC 群間の比較で抽出された変動遺伝子 (DEG) の volcano plot B. KEGG pathway を用いた DEG のエンリッチメント解析 (Bubble plot) C-F. 肝臓中の各遺伝子発現量の qPCR 法での測定結果 C. 脂肪酸酸化関連遺伝子 D. 脂肪酸代謝関連遺伝子 E. 脂肪酸合成関連遺伝子 F. コレステロール代謝関連遺伝子

以上の結果から、カロリーを同程度に制限した場合、LCHF 食の方が HCLF 食より 細胞脱分化の進展のみならず、肝の脂肪蓄積をより抑えることが判明した。つまり、細胞脱分化、肝脂肪化の抑制は炭水化物制限に関連があることが示唆される。炭水化物過剰摂取により、肝臓の炎症と TG 蓄積を促進するという報告があり (Da Silva-Santi. *Nutrients* 2016)、HCLF 食ではカロリー制限の割に db/db の NAFLD の抑制効果が弱い本研究の結果と一致している。また、肝臓における RNA-seq の結果から、PPAR の下流遺伝子である *Cyp4a10*, *Fabp3*, *Scd1*, *Cd36* は db-HC より db-HF の肝臓で発現が低く、PPAR の活性が db-HC より db-HF の方で低いと予想された。げっ歯類の実験では、選択的 PPAR モデュレーター (ペマフィブラート) は肝脂肪化を抑制し、*Il16*, *Ccl5*, *Nlrp3*, *Lxra*, *Abca1*, *Mtp*, *Cd36* の発現量を減少させ (Kanno. *Sci Rep* 2022)、*Ucp3*, *Cpt1a*, *Acox*, *Acat1*, *Fgf21* の発現量を増加したと報告されている (Raza-Iqbal. *J Atheroscler Thromb* 2015)。本研究における肝臓の RNA-seq の結果もペマフィブラートによる変動遺伝子の傾向と部分的に一致しており、カロリー制限下における LCHF 食摂取は、肝臓においてペマフィブラートに似た PPAR の転写活性調整を行っている可能性が示唆される。

今後は、db-HC 群にペマフィブラートを投与し、db-HF 群と同等の肝脂肪化レベルおよび細胞脱分化レベルまで改善するかを検討し、NAFLD と糖尿病における細胞脱分化の進展に、栄養と PPAR による代謝制御がどのように関わっているかをより詳細に検討する予定である。

(2) 上述の db-HF 群 (LCHF) と db-HC 群 (HCLF) で血中の GLP-1 濃度を測定したが、随時摂食下では両群に有意な差はなかった (図 4-A)。また、db/db に GLP-1 作動薬 (リラグルチド) を 1 か月投与した群では、コントロール群に比べ体重低下傾向、耐糖能改善傾向が得られたが、膵臓の免疫染色では膵細胞における脱分化マーカー (*Aldh1a3*) の発現量に差は見られなかった。(図 4-B)

(3) db-HF 群(LCHF)と db-HC 群(HCLF)の血中 FGF 濃度および、肝臓中の FGF21 の RNA 発現量は差がなかった。(図 4-C、D)

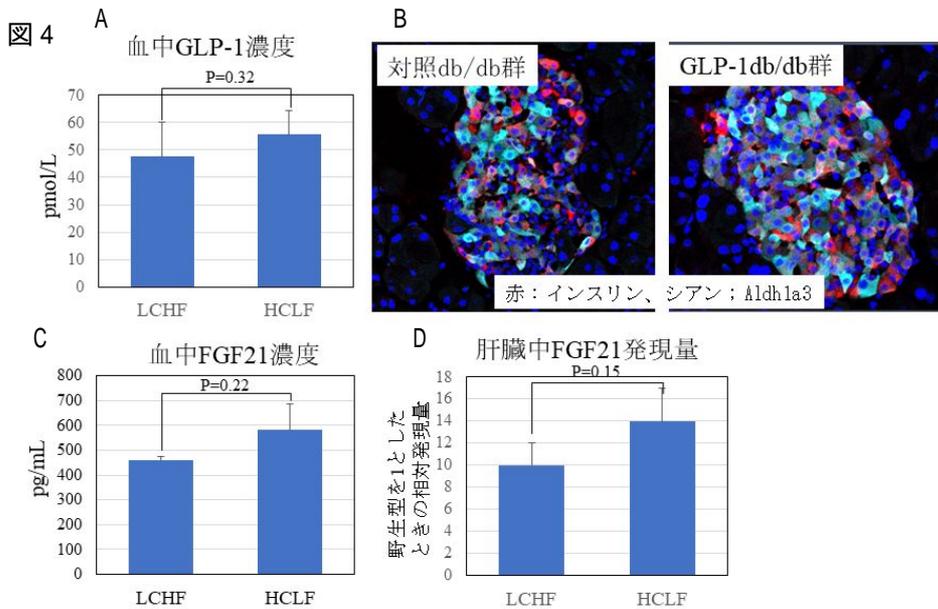


図 4、A . db-HF 群(LCHF)と db-HC 群(HCLF)における血中 GLP-1 濃度 B . db/db に GLP-1RA を投与した群と対照群における膵島の蛍光免疫染色 C . db-HF 群(LCHF)と db-HC 群(HCLF)における血中 FGF21 濃度 D . db-HF 群(LCHF)と db-HC 群(HCLF)における肝臓中の FGF21 発現量(qPCR 法による)

上記(2)、(3)の実験の結果から、肥満過食を背景とする糖尿病状態における 細胞脱分化、および肝脂肪化と食餌中の糖/脂質比の関連に、FGF21 や GLP-1 は関与が薄いことがうかがわれた。このため、既知の 細胞機能および脂肪肝改善機構に関わらない、食事療法による新規の 細胞機能改善機構を検索するため、db-HF 群、db-HC 群、db-AD 群より単離膵島を得て、3 群間で single cell RNA sequence を実施し、細胞クラスターや、脱分化した 細胞クラスターを再構築して、各群間で変化のある遺伝子発現パターンを検索する方針に切り替えた。現在共同研究先で Chromium によるシングルセル RNA ライブラリを作成し、シーケンスおよびマッピングが終了したところである。今後、得られたデータを用いてドライ解析を行い、栄養素が 細胞機能に与える影響に関連した遺伝子群を同定し、その分子機構を解明することで、細胞機能の改善に着目した新たな着眼点での食事療法の確立や新規糖尿病治療開拓を引き続き目指す方針である。

本研究の成果により、未だ解明されない 細胞脱分化機構および他臓器との関連の一端が明らかとなり、今後の同領域の研究の発展の一助となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Lei Xiao, Ishida Emi, Yoshino Satoshi, Matsumoto Shunichi, Horiguchi Kazuhiko, Yamada Eijiro	4. 巻 16
2. 論文標題 Calorie Restriction Using High-Fat/Low-Carbohydrate Diet Suppresses Liver Fat Accumulation and Pancreatic Beta-Cell Dedifferentiation in Obese Diabetic Mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 995 ~ 995
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu16070995	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8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 雷暁、石田恵美、堀口和彦、吉野聡、松本俊一、山田英二郎、山田正信
2. 発表標題 食餌中の糖質・脂質比が肥満糖尿病における 細胞脱分化と脂肪肝へ与える影響の解析
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 雷暁、石田恵美、堀口和彦、吉野聡、松本俊一、山田英二郎、山田正信
2. 発表標題 食餌中の糖質・脂質比が肥満糖尿病における膵 細胞脱分化と脂肪肝に及ぼす影響
3. 学会等名 第69回北関東医学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 雷 暁、石田 恵美、岡村 孝志、堀口 和彦、松本 俊一、中島 康代、山田 英二郎、岡田 秀一、山田 正信
2. 発表標題 肥満モデルにおける脂肪肝と 細胞脱分化をともに改善する栄養素バランスの検討
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 E Ishida, X Lei, K Horiguchi, S Matsumoto, A Yoshino, Y Nakajima, E Yamada, M Yamada
2. 発表標題 Efficient Restoration of Beta Cell Dedifferentiation by Calorie Restriction With High Fat/Low Carbohydrate Diet in Obese Diabetes Model and the Possible Role of GLP-1
3. 学会等名 ENDO 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 雷暎, 石田恵美, 吉岡誠之, 岡村孝志, 堀口和彦, 松本俊一, 吉野聡, 中島康代, 山田英二郎, 小澤厚志, 岡田秀一, 山田正信
2. 発表標題 糖質制限または脂質制限による膵 細胞脱分化と脂肪肝の関係
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石田 恵美
2. 発表標題 JES We can企画 Basicかつ若手の立場から 膵 細胞脱分化の研究
3. 学会等名 第21回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 雷暎, 石田恵美, 岡村孝志, 堀口和彦, 松本俊一, 吉野聡, 中島康代, 山田英二郎, 小澤厚志, 岡田秀一, 山田正信
2. 発表標題 主要栄養素別の食事制限による膵 細胞脱分化と脂肪肝の関係
3. 学会等名 第41回日本肥満学会・第38回日本肥満症治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石田 恵美、雷 暁、吉岡 誠之、錦戸 彩加、岡村 孝志、堀口 和彦、松本 俊一、吉野 聡、中島 康代、山田 英二郎、小澤 厚志、岡田 秀一、山田 正信
2. 発表標題 肥満糖尿モデルマウスでは糖質 / 脂質比の低い食事でのカロリー制限の方が 細胞脱分化および 脂肪肝を抑制する
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

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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