

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K17684

研究課題名（和文）高脂肪食摂取と2型糖尿病感受性遺伝子の相乗効果が膵細胞不全に及ぼす影響の解析

研究課題名（英文）Analysis of the synergistic effects of a high-fat diet and type 2 diabetes susceptibility gene on pancreatic beta cell failure

研究代表者

井上 裕行（Inoue, Hiroyuki）

神戸大学・保健学研究科・保健学研究員

研究者番号：70885293

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：Kcnq1遺伝子変異マウスの膵島を用いて高脂肪食負荷による転写因子C/EBP β および細胞周期調節因子p57発現量の解析を行った。その結果、対照群と比較してKcnq1遺伝子変異マウスの膵島においてC/EBP β 発現は亢進しp57発現量は増加した。p57プロモーター領域にはC/EBP β の結合領域が存在することが知られている。Kcnq1遺伝子変異マウスでは、p57プロモーター領域のエピジェネティックな修飾が変化し、転写亢進状態と推測されるが、高脂肪食負荷で膵島に蓄積したC/EBP β がp57プロモーター領域に結合することでp57のさらなる発現亢進が引き起こされ、膵細胞量減少をきたすと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、遺伝因子と環境因子の相互作用が膵細胞不全を加速させる可能性が明らかとなった。特に、本研究で使用した「高脂肪食負荷Kcnq1遺伝子変異マウス」は、日本人2型糖尿病モデルマウスとして非常に有用であることが確認された。2型糖尿病発症メカニズムにおける日本人特有の遺伝因子と脂質摂取という環境因子との相乗効果、すなわち「Gene-Environmental Interaction」に着目した本研究は、日本人の遺伝因子に近年のライフスタイルがどのような影響を与えているかを検証したものであり、今後、日本人に対する適切な糖尿病治療法や予防法の開発につながる点で非常に重要な結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：Using the pancreatic islets of Kcnq1 mutant mice, we analyzed the expression levels of transcription factor C/EBP β and cell cycle regulator p57 due to a high-fat dietary load. Then, the expression of C/EBP β and p57 was significantly increased in the pancreatic islets of Kcnq1 mutant mice compared to control mice. It has been reported that the binding site of C/EBP β was present at the promoter of p57. We previously reported that the expression of p57 was increased through epigenetic modification in Kcnq1 mutant mice. C/EBP β accumulated in the pancreatic islets of HFD-fed mice, which may cause pancreatic β -cell failure through enhanced Cdkn1c expression, and is considered to contribute to the development of Japanese type 2 diabetes mellitus.

研究分野：糖尿病・内分泌代謝

キーワード：膵細胞 高脂肪食 エピジェネティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

戦後の日本は食生活が激変し、その結果糖尿病をはじめとした生活習慣病が急増したと考えられる。特にカロリー摂取量と比較して、脂質摂取量が年々増加していることが厚生労働省の栄養調査によって明らかにされている。脂質、特に飽和脂肪酸が2型糖尿病発症において危険因子であるという報告は数多く見られるものの、その発症メカニズムについて十分に検討されたものは少ない。特に、欧米人と比較して明らかにBMIが低い日本人においてはインスリン分泌臓器である膵細胞の脆弱性が以前から指摘されているが、脂質摂取と膵細胞の脆弱性の関連性について検討した報告はほとんどない。また、日本人の脂質摂取量が増加しているとはいえ、欧米人のそれとは比較にならないことは明白である。そこで代表者は、日本人の膵細胞は特に脂質負荷において脆弱性を有するのではないかと、という仮説を構築した。すなわち、日本人特有の「遺伝因子」と高脂肪食摂取という「環境因子」の相互作用により、近年の糖尿病が急増している可能性を考えた。代表者は、これまで日本人2型糖尿病感受性遺伝子Kcnq1遺伝子変異が膵細胞不全に及ぼす影響を解析し、Kcnq1遺伝子変異が膵細胞量減少を引き起こすメカニズムを解明した。また、高脂肪食負荷によって転写因子C/EBPが膵島に蓄積することを見出した。本研究では、日本人特有の「遺伝因子」であるKcnq1遺伝子変異に、高脂肪食摂取による転写因子C/EBPの蓄積という「環境因子」がどのような影響を及ぼすか検討することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、日本人特有の「遺伝因子」と脂質摂取量の増加という「環境因子」が合わさることによって膵細胞不全が加速する可能性を明らかにすることである。これまでに代表者は、高脂肪食負荷によって膵島における転写因子C/EBP発現が亢進することを見出している。さらに、日本人において重要と考えられる疾患感受性遺伝子Kcnq1遺伝子変異が細胞周期調節因子p57(Cdkn1c)発現亢進を介して膵細胞不全を呈するメカニズムについて明らかにした。本研究計画では、これらの研究成果をさらに発展させるべく、高脂肪食負荷によって膵島に蓄積したC/EBPがKcnq1変異マウスにおける膵細胞不全を悪化させる可能性について検証するものである。

3. 研究の方法

1. 高脂肪食負荷を行ったKcnq1遺伝子変異マウスの膵島におけるC/EBPおよびp57発現解析：高脂肪食負荷Kcnq1遺伝子変異マウスの膵島では、高脂肪食負荷により蓄積したC/EBPがp57プロモーター領域に結合することでp57の発現がさらに増強し、膵細胞量が著明に減少するのではないかと予想した。そこで、高脂肪食負荷Kcnq1遺伝子変異マウスと対照群である野生型マウスを用いて、体重・血糖値・血清インスリン値を測定し、膵細胞量の比較検討を行った。また、単離膵島を用いてp57およびC/EBPの発現量を通常食飼育下マウスの膵島と比較した。

2. Kcnq1遺伝子変異マウスと膵細胞特異的C/EBPトランスジェニックマウスを交配させたマウスを用いた代謝データの解析：高脂肪食負荷によってC/EBP以外にも様々な因子が膵細胞において機能すると予想されることから、C/EBP発現のみ亢進させた膵細胞特異的C/EBPトランスジェニックマウス(TGマウス)とKcnq1遺伝子変異マウスを交配し、p57プロモーター領域のクロマチン構造が緩んだ状態でC/EBPが膵細胞特異的に発現亢進するマウス(KCマウス)を作製した。KCマウスの代謝データおよび膵細胞量について検討した。

3. KCマウスとp57ヘテロノックアウトマウスの交配による膵細胞量レスキュー実験：膵細胞量減少を引き起こす主たる原因がp57であれば、発現亢進状態をキャンセルすることで膵細胞量回復すると考えられる。そこで、p57ヘテロノックアウトマウスとの交配により膵細胞量を回復させられるかどうか検討した。

4. 培養細胞を用いたp57プロモーター領域へのC/EBP結合の確認：本研究の仮説はC/EBPがp57プロモーター領域に結合するかどうかの確認が必要である。マウス由来の膵細胞培養細胞であるMIN6細胞を用いてクロマチン免疫沈降アッセイを実施した。

4. 研究成果

2021年度では、代表者はKcnq1遺伝子変異マウスの膵島を用いて高脂肪食負荷によるC/EBPおよびp57発現量の解析を行った。その結果、対照群と比較して、Kcnq1遺伝子変異マウスの膵島において、C/EBP発現は亢進していた(図1)。さらに、膵細胞量は対照群と比較して減少していることも明らかとなった(図1)。p57プロモーター領域にはC/EBPの結合領域が存在す

ることが知られている。Kcnq1 遺伝子変異マウスでは、p57 プロモーター領域のエピジェネティックな修飾が変化し、転写亢進状態と推測されるが、高脂肪食負荷で膵島に蓄積した C/EBP β が p57 プロモーター領域に結合することで p57 のさらなる発現亢進が引き起こされているのではないかと考えられた。2022 年度では、C/EBP β と p57 の発現制御メカニズムを詳細に検討するため、Kcnq1ot1 truncation マウスを用いることとした。このマウスは、Kcnq1 遺伝子領域より発現する non-coding RNA である Kcnq1ot1 発現が減少したマウスである。Kcnq1ot1 truncation マウスの膵島では、p57 発現が亢進し膵細胞が減少していることをすでに明らかにしている。Kcnq1ot1 truncation マウスと膵細胞特異的 C/EBP β トランスジェニックマウスを交配し、p57 プロモーター領域のクロマチン構造が緩んだ状態で C/EBP β が膵細胞特異的に発現亢進するマウス(KC マウス)を作製・解析した。KC マウスは対照群と比較して、有意な随時血糖値の上昇および血清インスリン値の減少が認められ、膵細胞量においても対照群と比して有意に減少していた(図2)。また、KC マウスの膵島では p57 発現のさらなる亢進を認めた(図3)。続いて、高脂肪食を負荷した Kcnq1ot1 truncation マウスの膵島にも C/EBP β と p57 の有意な発現亢進が認められたが、p57 ヘテロノックアウトマウスとの交配により膵細胞量に変化が生じるか検討した。その結果、膵細胞の p57 発現量を元に戻すと膵細胞量も回復した(図4)。培養細胞を用いた C/EBP β の p57 プロモーター領域への結合確認をクロマチン免疫沈降アッセイにより行ったところ、クロマチン構造を薬剤で緩めた状態にすると、C/EBP β は結合できることを確認した(図5)。本研究により、遺伝因子と環境因子の相互作用が膵細胞不全を加速させる可能性が明らかとなった。特に、本研究で使用した「高脂肪食負荷 Kcnq1 遺伝子変異マウス」は、日本人 2 型糖尿病モデルマウスとして非常に有用であることが確認された。2 型糖尿病発症メカニズムにおける日本人特有の遺伝因子と脂質摂取という環境因子との相乗効果、すなわち「Gene-Environmental Interaction」に着目した本研究は、日本人の遺伝因子に近年のライフスタイルがどのような影響を与えているかを検証したものであり、2 型糖尿病という common disease に「Gene-Environmental Interaction」が関与する可能性を示した初めての報告である。さらに、本研究により膵細胞量減少に影響を及ぼす p57 の重要性が明らかとなり、今後の糖尿病治療または予防の新たなターゲット分子を明らかにできた点で非常に有意義であると考えられた。

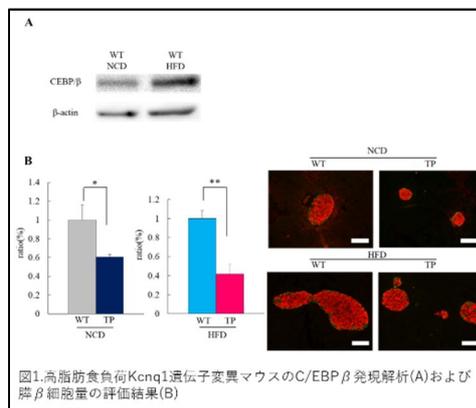


図1.高脂肪食負荷Kcnq1遺伝子変異マウスのC/EBP β 発現解析(A)および膵 β 細胞量の評価結果(B)

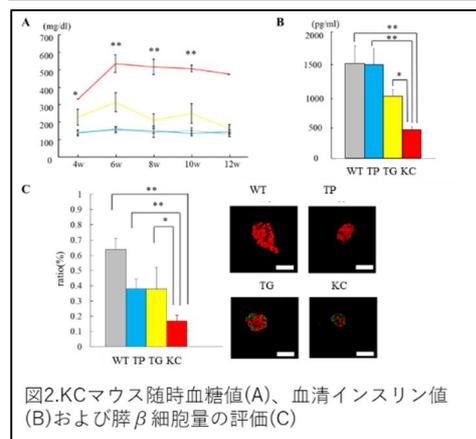


図2.KCマウス随時血糖値(A)、血清インスリン値(B)および膵 β 細胞量の評価(C)

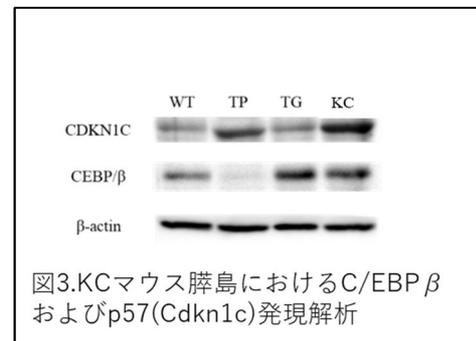


図3.KCマウス膵島におけるC/EBP β およびp57(Cdkn1c)発現解析

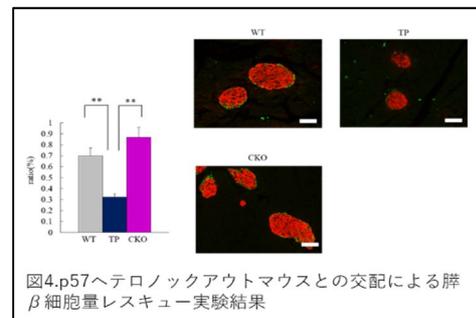


図4.p57ヘテロノックアウトマウスとの交配による膵 β 細胞量レスキュー実験結果

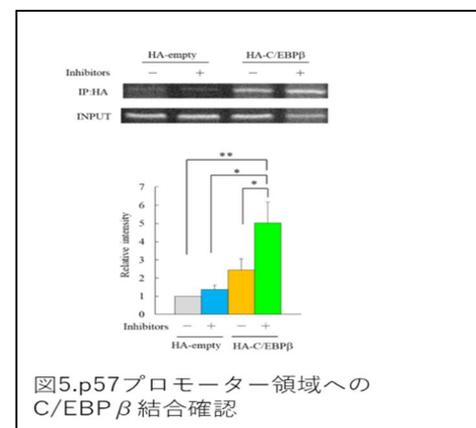


図5.p57プロモーター領域へのC/EBP β 結合確認

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 Asahara SI, Inoue H, Kido Y.	4. 巻 46
2. 論文標題 Regulation of Pancreatic β -Cell Mass by Gene-Environment Interaction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diabetes Metab J.	6. 最初と最後の頁 38-48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4093/dmj.2021.0045.	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0件

〔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
---------	---------