

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21213

研究課題名(和文) 糖尿病における分岐鎖アミノ酸代謝とグルカゴン分泌の関連の解明

研究課題名(英文) the relationship between branched-chain amino acid metabolism and glucagon secretion in diabetes mellitus.

研究代表者

和田 恵梨 (Wada, Eri)

名古屋大学・環境医学研究所・特任助教

研究者番号：90910307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病病態では高グルカゴン血症が認められる。特に食後の高グルカゴン血症が顕著であることを糖尿病患者及び糖尿病モデルマウスで明らかとしてきた。その中でも、糖尿病病態では、分岐鎖アミノ酸(BCAA)の摂取後にグルカゴンの分泌応答が亢進していることを見出している。BCAA応答性のグルカゴン分泌障害のメカニズムとして、膵細胞のBCAA代謝異常が関与していることを考えた。そこで、膵細胞特異的BCAA代謝関連酵素欠損マウス(Glucagon Cre, BDK floxedマウスを交配：BDK-KOマウス)を作製し、グルカゴン分泌能の評価を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病病態では、インスリンの分泌障害に着目されがちな中、グルカゴンの分泌障害も病態に強く影響を及ぼしている。本研究ではグルカゴンの分泌障害機序を代謝の観点から解明し、食事療法および薬物療法双方への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Dysregulation of glucagon is associated with the pathophysiology of type 2 diabetes. We previously reported that postprandial hyperglucagonemia is more obvious than fasting hyperglucagonemia in type 2 diabetes patients. Among them, postprandial hypersecretion of glucagon in the diabetic state is attributable to disordered BCAA catabolism in pancreatic islet cells. Therefore, we generated mice deficient in pancreatic α -cell-specific BCAA metabolism-related enzymes (Glucagon Cre, BDK floxed mice were crossed: BDK-KO mice) and evaluated their glucagon secretory ability.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：2型糖尿病 グルカゴン 分岐鎖アミノ酸 代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病では高グルカゴン血症が認められ、高血糖の一因となっている。しかしながら、糖尿病病態でのグルカゴンの分泌動態は不明であった。申請時の所属研究室では、2型糖尿病患者のグルカゴン動態を解析し、食後の高グルカゴン血症が顕著であることを見出した。さらに、グルカゴン過剰分泌に關与する栄養素の特定を行ったところ、分岐鎖アミノ酸(バリン、ロイシン、イソロイシン、Branched-Chain Amino Acid; BCAA)が抽出された。さらに、BCAA代謝障害がBCAAによるグルカゴン分泌過剰に關与していることを見出した。我々は、膵細胞特異的にBCAA代謝抑制酵素であるBDK欠損マウスを作製し、BCAA代謝障害とグルカゴン分泌過剰の分子機序の解明を試みた。糖尿病の膵島では、BDK発現が増加していることを我々は既に明らかにしている。これより、BDK-KOマウスで高脂肪食負荷による糖尿病モデルを作製すると、グルカゴン過剰分泌が起こりにくく、耐糖能が改善するといった仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究は、糖尿病におけるグルカゴン過剰分泌のメカニズムについて、分子レベルで解明し、膵細胞をターゲットとした新たな糖尿病治療法の開発に結び付けることを目的とする。特に糖尿病病態の食後グルカゴン分泌障害に着目し、その分子機序の解明を行う。

3. 研究の方法

(1) 膵細胞特異的BCAA代謝関連酵素ノックアウトマウスの解析

現在までに、膵島のBCAA代謝抑制酵素(BDK)の阻害剤を用いて、グルカゴンの分泌が変化することを明らかにしている。このことをより直接的に検証するため、膵細胞で特異的にBDKをノックアウトしたマウス(BDK-KO)を作製する。膵細胞特異的BDKノックアウトマウスは、すでに保有しているGlucagon Creマウスと、名古屋大学北浦靖之博士より供与いただいたBDK Floxマウスをそれぞれ交配させて作製した。続いて、BDK-KOマウスに対し、講師防食負荷で耐糖能障害を惹起し、糖尿病の表現型やグルカゴン分泌能を評価していく。また、BDK-KOから膵島を単離し、BCAA添加試験や遺伝子解析を行い、BCAA代謝の変化が細胞機能に与える影響を調べる。

(2) 膵細胞のソーティング

膵細胞そのものを評価する系を作製するため、グルカゴン陽性細胞特異的TdTomatoが発現するマウス(TdTomato)をGlucagon CreマウスとRosa TdTomatoマウスを交配することで作製した。TdTomatoマウスより膵島を単離し、膵島細胞を分離させ、フローサイトメトリー法によりTdTomato陽性細胞をソーティングし、RNA抽出を行った。また、TdTomato陰性細胞分画も回収し、遺伝子発現量の比較を行った。

4. 研究成果

(1) BDK-KOマウスの作製

BDK-KOを作製し、30週間以上の高脂肪食負荷を行い、耐糖能を評価した。BDK KOマウスにおいては、グルコース負荷試験およびインスリン負荷試験の結果、耐糖能障害の改善傾向が認められた。グルカゴン分泌能を調べるため、BCAA負荷試験を行った。しかし、BCAA応答性のグルカゴン分泌の亢進は耐糖能障害が強いほど強く認められることを確認しているが、講師防食負荷マウスの耐糖能は低度の障害のため、BCAA応答性のグルカゴン分泌亢進は強度には認められなかった。このため、検出限界以下の個体も多く、ノックアウトマウスとの比較が困難であった。

このため、今後は、BDK KOマウスにストレプトゾトシンを投与し、耐糖能障害を更に増悪させたいうで、比較検討を行う必要があることが分かった。

(2) 膵島のBCAA代謝とグルカゴン分泌障害

糖尿病モデルマウスから膵島を単離し、BCAAを添加した。その結果、BCAA添加によって上清中のグルカゴン濃度の増加が認められた。続いて、BCAA代謝阻害酵素BDKの阻害剤、BT2をBCAAと同時に添加すると、上清中のグルカゴン濃度の上昇は抑制された(図1)。以上より、糖尿病病態における膵島細胞のBCAA代謝異常が、グルカゴン過剰分泌に關与していることが考えられた。

しかしながら、BT2は膵島細胞すべてに作用するため、膵細胞そのもののBCAA代謝障害が

グルカゴン過剰分泌に関与しているかは不明なままである。そこで、BDK KO マウスより膵島を単離し、BCAA 添加試験を同様に行った。その結果、BDK KO マウスの膵島では、BCAA による上清中のグルカゴン濃度の増加が抑制された。

以上より、膵細胞のBCAA代謝異常が、グルカゴン過剰分泌に関与していることが示唆された。

(3) 膵細胞のソーティング

膵細胞におけるBCAA代謝関連酵素の発現やその意義を解析するため、膵細胞のソーティングを試みた。膵細胞特異的 TdTomato 発現マウスの膵島を単離し、膵島細胞を分離したうえで、FACS により TdTomato 陽性分画のソーティングを行った。回収した TdTomato 陽性細胞および TdTomato 陰性細胞中のグルカゴン・インスリン濃度を測定した。その結果、TdTomato 陽性分画においてグルカゴン発現量が高値であるとともに、インスリンの発現量の低値を認めた。一方 TdTomato 陰性分画においてはグルカゴン発現量が低値であり、インスリン発現量は高値であった。以上より、膵細胞特異的 TdTomato 発現マウス由来の膵島を用いることで、膵細胞をソーティングすることが可能であることが分かった(図2)。

今後、高脂肪食負荷やストレプトゾトシン投与による糖尿病モデルマウスを膵細胞特異的 TdTomato 発現マウスで作製し、膵細胞のアミノ酸代謝関連酵素の発現変動を解析する。また、カルシウムイメージング法による膵細胞刺激実験等も行い、分泌動態を *ex vivo* の実験系でも進めていく。

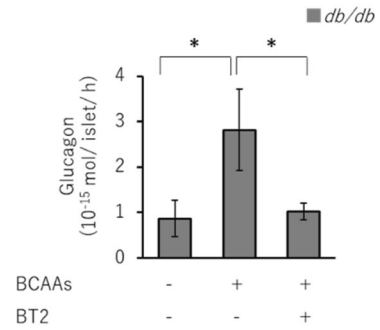


図1：膵島に対するBCAAおよびBT2添加時の上清グルカゴン濃度

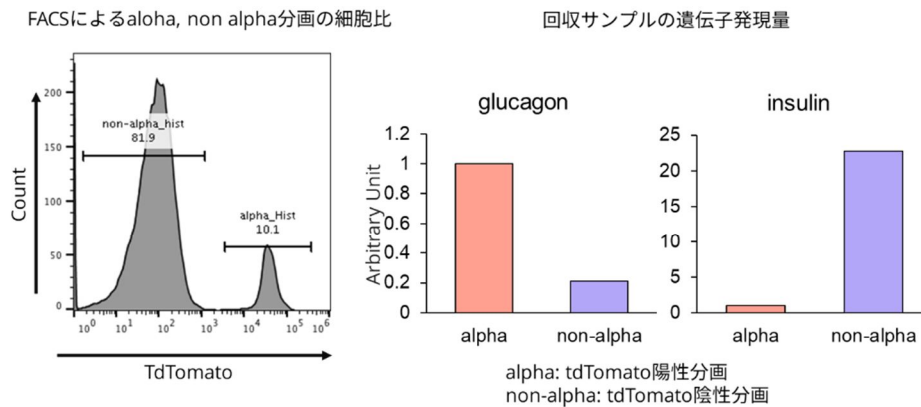


図2：膵α細胞のソーティング

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 Eri Wada, Masaki Kobayashi, Daisuke Kohno, Osamu Kikuchi, Takayoshi Suga, Sho Matsui, Hiromi Yokota-Hashimoto, Norikiyo Honzawa, Yuichi Ikeuchi, Haruka Tsuneoka, Touko Hirano, Hideru Obinata, Tsutomu Sasakia, Tadahiro Kitamura	4. 巻 97
2. 論文標題 Disordered branched chain amino acid catabolism in pancreatic islets is associated with postprandial hypersecretion of glucagon in diabetic mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Nutritional Biochemistry	6. 最初と最後の頁 108811
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jnutbio.2021.108811	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 和田恵梨, 小林雅樹, 菊池司, 平野瞳子, 大日方英, 河野大輔, 北村忠弘
2. 発表標題 膵細胞における分岐鎖アミノ酸代謝異常は糖尿病のグルカゴン過剰分泌に関与する
3. 学会等名 日本内分泌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和田恵梨, 小林雅樹, 菊池司, 平野瞳子, 大日方英, 河野大輔, 北村忠弘
2. 発表標題 膵島のBCAA代謝異常は食後のグルカゴン分泌亢進に関与する
3. 学会等名 日本糖尿病学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Eri Wada, Takayoshi Suganami, Tadahiro Kitamura
2. 発表標題 The new findings of disordered BCAA catabolism for metabolic disease
3. 学会等名 22nd International Congress of Nutrition (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------	---------