

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：14301  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22590976  
 研究課題名（和文）胎生期の低栄養が膵島の質的・機能的形成に及ぼす影響の解析  
 研究課題名（英文）Analysis about the factors that affect the postnatal formation and function of pancreatic  $\beta$ -cell in connection with the intra-uterine undernutrition.  
 研究代表者 豊田 健太郎（Kentaro Toyoda）  
 京都大学・医学（系）研究科・講師  
 研究者番号：00447971

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、胎生期の低栄養が、胎児期、出生後の膵島量と膵島機能に及ぼす影響を明らかにすることである。そのために、膵島量を経時的に観察できるマウスモデル、膵島を三次元的に解析できる画像解析法を用いて、胎仔期から成体における膵島量の推移を解析を試みた。通常栄養群の栄養摂取量の個体間のばらつきが多く、代謝ケージまで導入して解析を試みたが胎生期の低栄養の影響を群分けしての解析に至らなかった。しかしながら、Rip-Lucマウス（ラットインスリンプロモーター下にルシフェラーゼを発現する遺伝子改変マウス）の胎児期の膵島を IVIS で計量することができた。さらに、胎児期膵を OPT(optical projection tomography) で計量することができた。研究期間は終了したが、今後低栄養群と通常栄養群のマウスを用いた解析を行う予定である。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to analyze the factors that affect the postnatal formation of pancreatic  $\beta$ -cell mass and function in connection with the intrauterine undernutrition. Although, pregnant mice were divided into two groups; calorie restriction group and control diet group, an individual difference of the daily intake volume severely large unexpectedly. Therefore, in the period of this project, we could not compare with both groups. For detail observation of the change in pancreatic  $\beta$ -cell mass during embryonic and postnatal period, we analyzed the pregnant mice and fetal mice whose pancreatic  $\beta$ -cell express luciferase by using IVIS system and optical projection tomography (OPT). Luciferine injection enabled us to observe the mass of fetal islets in the pregnant mice by IVIS and the number and volume of fetal islet were quantified by OPT analysis.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2012 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2013 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2014 年度	700,000	210,000	910,000
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

キーワード：エネルギー・糖質代謝異常・イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

近年英国での疫学研究結果から、胎生期の低栄養環境が成人期の生活習慣病の発

症に影響を及ぼすとされ(Barker 仮説)、実際に妊娠期低栄養の動物モデルにおいては、低出生仔の方が出生時、成体時において膵

島量は有意に少ないことが示された (Diabetologia Vol40, 1997)。我が国は、20代と30代の女性のBMIの低下は増加し(肥満研究 2006)、また低出生体重児(2,500g未満)の出生率も9.4%と高く(厚生労働省人口動態統計)、年間10万人にも及んでいることから、近年のわが国における2型糖尿病の増加に影響を及ぼしている可能性がある。しかしながら、胎仔期から出生後、そして成体に至る過程の膵島量、膵島機能の変化についての詳細な解析はこれまでのところなされていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、胎生期の低栄養が、胎児期、出生後の膵島量と膵島機能に及ぼす影響を明らかにすることである。そのために、膵島量を経時的に観察できるマウスモデル、膵島を三次元的に解析できる画像解析法を用いて、胎仔期から成体における膵島量の推移を解析し、同時期に膵島を単離して、生理的・分子生物学的解析を行い、耐糖能異常を生じるメカニズムを探索する。

## 3. 研究の方法

交配後6.5日の雌のC57 BL/6マウス(日本クレア)を、通常食(CD)群と30%カロリー制限(RD)群に分ける。カロリー制限は、毎日CD群の食事量を計量し、その70%量を与える。RD群が生まれた仔を食べないように18.5日にカロリー増量する。胎仔数の相違による出生仔体重のばらつきが生じないように、同じ出生仔数のものだけを引継いで解析する。離乳は出生後21日とする。以後の群を通常食群(CD)と高脂肪食負荷群(HF)に分ける。低出生体重仔の通常食群のうち、その後の成長が早く正常出生仔に追いつく現象はCatch up growthといわれ、肥満・耐糖能異常のリスクであることが報告されているため、Catch up growthしたものをCR-CAG群として抽出し、さらにこれを通常食群と高脂肪食群に分ける。

IVIS、OPT scannerによる解析を胎生10、14、18日、出生時、離乳時、以後は4週間隔で解析する。この解析結果から、膵島量の変化点を特定し、その前後において以

下の(1)～(3)の検討を行う。

### (1) 膵島量の経時的定量解析

①IVISシステムによる解析：膵β細胞特異的にルシフェラーゼを発現する遺伝子改変マウス(RIP-Lucマウス)を、IVIS-200Luminaによって生体のまま観察し、膵β細胞量測定を行う。

②OPT Scannerによる解析：摘出膵臓を固定後、切片作製せずに膵臓を免疫染色し、膵島の数と膵β細胞量の測定を行う。

(2) 膵島のインスリン分泌能：膵β細胞特異的にEnhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)を発現するマウス(MIP-GFPマウス)の膵臓摘出後、細切しトリプシン処理し、蛍光実体顕微鏡下でEGFPを発現する膵島を回収する。2.8mMグルコースの培養液で前培養後5.6mM, 11.1mM, 15.6mMグルコースの培養液で培養し上清を回収し、インスリンはRIAで測定する。膵島のDNA含量で補正する。

以上(1)により膵島機能の変化点を特定する。

### (3) 膵島の分子生物学的検査

単離膵島を用いて以下の解析を行う。

①遺伝子発現解析：膵島の発生、インスリン分泌に関係する遺伝子の発現について、mRNAレベルをRT-PCRによって解析する。変化あるものについてはタンパクレベルをWestern blottingで解析する。

②DNAマイクロアレイ：既知の遺伝子解析で十分な結果が得られない場合、正常群と低栄養群の変化出現時におけるサンプルを用いてDNAマイクロアレイを行う。

### (4) 低栄養母体モデルへの介入研究

①低栄養母体への介入：低栄養の解除によって膵島量・機能低下を防げるのか、point of no returnが存在するのかを検証

②低出生体重胎仔への介入：母乳の出ない仮親を利用して、総摂取母乳量を少なくし、Catch up growthを抑制する群とCatch up growth群の間で膵島量と機能を比較する。また、膵島量と機能を上げる作用を有するDPP-4阻害薬(母乳移行性+)を母体に投与し、仔の膵島量と機能を検討する。

## 4. 研究成果

平成22年度は、胎仔膵をOPTスキャナーで解析できるかどうかをみた。その際、膵臓の処理に

ついて組織の透明化が可能な水溶性の FocusClear 液によって透明化を試みた。しかしながら、種々の条件検討を行うもサンプルの透明化がうまくいかなかったために解析ができず、結果的に予定していた経時的データが得られなかった。

平成23年度は、胎仔膵のOPT条件を検討するために、胎仔膵サンプルを調整した。交配後18.5日の胎仔より肝膵腸を一塊として摘出し固定した。固定したサンプルについてインスリン免疫染色作業を行った。OPT解析用に、透明化を通常の方法に従って行い、OPTで撮像した。その結果、膵臓に一致して膵島のスポットを認めた。画像解析ソフトで3Dイメージを構築でき、また膵島の数を定量化できた。図は、E14における胎仔膵の解析結果である。肝臓とともに固定化するため、オレンジで示される肝臓と、膵島が緑色で明瞭に示されている。3D解析ソフトで、膵島数と各膵島の容積を算出した。

図: E14胎児のOPT(オレンジ:肝、緑:膵島)

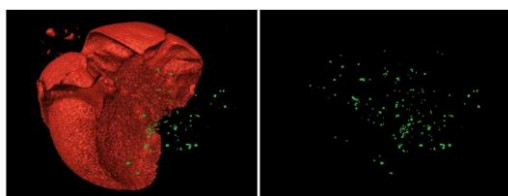
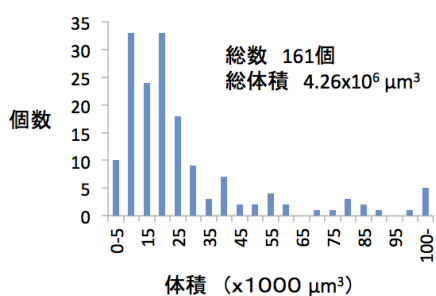


表: 上記 OPT 結果の解析

膵島(インスリン陽性部位)の大きさのヒストグラム



次に、雌の C57/BL6 マウスを、通常食(CD)群と 30%カロリー制限(RD)群に分ける予備検討を開始した。カロリー制限は、当初毎日 CD 群の食事を計量し、その 70%量を与える予定であった。食事をマウス専用のマルチファイダーを用いて測定したが、毎日の測定では食事量の変化が少なく 70%への調節が困難であった。よって、2日毎に摂取量を調節することに変更した。しかしながら、体重変動と食事摂取量の個体差が大きくCD群とRD群

に分けて解析することができなかった。

平成 24 年度は、代謝ケージを用いて摂取量を毎日測定し、通常食(CD)群と 30%カロリー制限(RD)群に分けて解析することを試みた。しかし、摂取量の個体差が大きく、また同個体においても食事量が安定しないため、十分な検討を加えることができなかった。さらに、RD 群では、出産後のマウスを食べてしまう問題もあり、解析が困難であった。

以上の結果であり、胎仔膵の膵島定量系を構築することとどまり、RD 群の作製によるCD群との比較解析、さらに、膵島量の変更点を特定することはできず、さらに、介入研究も実施することはできなかった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

i) Suzuki, K., Toyoda K., Inagaki, N (他 11 人). Transcriptional regulatory factor X 6 (Rfx6) increases gastric inhibitory polypeptide (GIP) expression in enteroendocrine K-cells and is involved in GIP hypersecretion in high-fat diet-induced obesity. *J. Biol. Chem.* 288: 1929-1938, 2013.

ii) Kondo Y, Toyoda K, Santo T, Fujii J, Fukushima M, Inagaki N, Yasuda K., A patient who developed symptomatic reactive hypoglycemia 14 years after total gastrectomy and was successfully treated with miglitol. *Diabetol. Int.* 4:66-70,2013

iii) Fujimoto, H., Toyoda, K., Inagaki N (他 6 人). Three dimensional ex vivo imaging and analysis of intraportal islet transplants. *Transpl. Int.* 24: 839-844, 2011.

iv) Ogawa, E., Yamada, Y., Toyoda, K. (他 11 人). The effect of gastric inhibitory polypeptide on intestinal glucose absorption and intestinal motility in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404: 115-120, 2011.

v) Uonaga, T., Toyoda, K., Inagaki, N. FGF-21 enhances islet engraftment in mouse syngeneic islet transplantation model. *Islets.* 2: 247-251.

vi) Kawasaki, Y., Harashima, S., Inagaki N (他 10 人). Exendin-4 protects pancreatic beta cells from the cytotoxic effect of rapamycin by inhibiting JNK and p38 phosphorylation. *Horm. Metab. Res.* 42: 311-317, 2010.

[学会発表] (計 5 件)

i) Toyoda, K. Iwanaga, Y., Kawaguchi, M., Uemoto, S., Inagaki, N. Current Status of

Clinical Pancreas and Islet Transplantation in Japan. 9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress / 4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes. Kyoto, Japan. 2012.11.27

ii) Fujimoto, H., Toyoda, K., Kimura, H., Saji, H., Inagaki, N (他 8 人). Development of Non-Invasive PET Probe for Quantifying Pancreatic B-Cell Mass Using Fluorine-18-Labeled Exendin-4. 9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress / 4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes. Kyoto, Japan. 2012.11.27

iii) Toyoda K., Kimura H, Inagaki N. (他 10 人). Development of Non-Invasive PET Probe for Quantifying Pancreatic  $\beta$ -Cell Mass Using Fluorine-18-Labeled Exendin-4. American Diabetes Association 71th Scientific Sessions. San Diego, CA. 2011.6.29

iv) Fujimoto, H., Toyoda, K., Inagaki, N (他 8 人 ). Non-Invasive SPECT Imaging of Pancreatic Islets Targeting Glucagon-Like Peptide-1 Receptors. American Diabetes Association 71th Scientific Sessions. San Diego, CA. 2011.6.30

v) 豊田健太郎、木村寛之、稲垣暢也 (他 9 人). GLP-1 受容体を標的とする非侵襲的膵島イメージングのための PET 用プローブの開発. 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会 さつぽろ芸術文化の館 北海道 2011.5.19

〔図書〕 (計 2 件)

i) 豊田健太郎、稲垣暢也 膵  $\beta$  細胞の非特異的定量法開発の現状 *Diabetes Frontier* 23:391-397,2013.

ii) 豊田健太郎、稲垣暢也 GLP-1 の膵島再生・膵島イメージングへの応用 *最新医学* 66:90-96,2011

〔産業財産権〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

豊田 健太郎 (Kentaro Toyoda)  
京都大学・医学 (系) 研究科・講師  
研究者番号 : 004477971

### (2) 研究分担者

濱崎 暁洋 (Akihiro Hamazaki)  
京都大学・医学 (系) 研究科・助教

研究者番号 : 40456900

(3) 連携研究者

なし