

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 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 年度～2011 年度

課題番号：22790863

研究課題名（和文） 低出生体重後の膵β細胞量調節機構の解明

研究課題名（英文） Effect of intrauterine undernutrition during late gestation on pancreatic beta cell mass.

研究代表者

橋本 尚子 (HASHIMOTO NAOKO)

神戸大学・大学院医学研究科・特命助教

研究者番号：40559845

研究成果の概要（和文）：①低出生体重仔の膵β細胞におけるインスリンシグナルの活性化レベルについて、および②膵β細胞特異的PDK1欠損マウスを用いて、インスリンシグナルが膵β細胞のcatch-up growthに果たす役割の検討を行った。低出生体重仔モデルでは出生時の膵β細胞量減少および出生後の急激な増加を呈するものの、24週齢では再び膵β細胞量が減少していた。また膵β細胞特異的PDK1欠損マウスでは若齢期の膵β細胞量増加が抑制されていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We examined ①the assay of the activity on insulin signaling in pancreatic β cells of the mice of food restriction group(RG), and ②the roles of insulin signaling in pancreatic β cells during catch-up growth using pancreatic β cell- specific PDK1 deficient mouse. Pancreatic β cell mass at birth was decreased in RG offspring as compared to that in control offspring (CG). A high-fat diet significantly increased the pancreatic β cell mass in RG mice as compared to that in CG mice after birth. However, RG mice fed on high-fat diets tended to exhibit a decrease in the pancreatic β cell mass at approximately 24 weeks of age. The pancreatic β cell- specific PDK1 deficient mouse showed the inhibition of increase in pancreatic β cell mass during catch-up growth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：膵β細胞、インスリンシグナル、低出生体重

1. 研究開始当初の背景

代表者は、一貫して「膵β細胞におけるインスリンシグナルの役割」に関する研究を行

ってきた。膵β細胞特異的 PDK1 遺伝子欠損マウスを作製・解析したところ、このマウスの膵β細胞は生後加齢とともに著明に減少し、

高血糖のために死亡した。この結果より、インスリンシグナルは膵β細胞の生存・維持に必須のシグナルであることを見出した。さらに、膵β細胞特異的 TSC2 遺伝子欠損マウスの作製・解析に従事し、このマウスの膵β細胞において mTORC1 が恒常的に活性化し、膵β細胞数には明らかな変化はないが、個々の膵β細胞サイズが有意な増大を示すことを見出した。以上より、インスリンシグナルは、膵β細胞の数とサイズを制御することにより、膵β細胞量を調節していることを明らかとした。

近年、妊娠後期に低栄養状態にさらされて（飢餓ストレス）低体重で出生した子は将来肥満や糖尿病・高脂血症・高血圧を発症するリスクが高くなる可能性が示唆されている。これまでに、妊娠後期に低栄養状態にした母から生まれた低体重出生ラットの膵臓では、対照群と比較して膵β細胞量が減少していることが報告されている。ヒトをはじめとする哺乳類では、低体重出生後、catch-up growth と呼ばれる体重増加が認められ、レプチンサーージの早期化などがそのメカニズムとして報告されている。代表者の研究グループにおいても、低体重出生マウスを作製・解析し、出生時の膵β細胞量の著明な減少と、その後の膵β細胞量の catch-up growth が同様に起こることを見出した。しかし、この膵β細胞量の増加のメカニズムに関しては、十分な解析はなされていない。

これまでに、飢餓の条件下では *Drosophila* においてインスリン受容体の発現が増加することが報告されている。また、近年、低出生体重モデルにおける膵β細胞量の減少に、エピジェネティクス制御が重要な役割を果たしていることが報告され注目を集めている。

以上より、代表者は、低体重出生児の膵β細胞ではインスリンシグナルが増強しており、その catch-up growth には、インスリンシグ

ナルが重要な役割を果たしているということ、また、そのメカニズムとしてのエピジェネティクス制御が関与しているという仮説を構築した。

2. 研究の目的

本研究計画において、①低出生体重仔の膵β細胞におけるインスリンシグナルの発現・活性化レベルを検討する。②インスリンシグナル低下のモデルとして膵β細胞特異的 PDK1 遺伝子欠損マウスを用いて、低出生体重仔の膵β細胞量増加への影響を検討する。③エピジェネティクス制御によるインスリンシグナル伝達分子の発現量への影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) 低出生体重モデルマウスの膵β細胞におけるインスリンシグナルの解析

低出生体重（飢餓ストレス）モデルマウスの作製に関しては、代表者の研究室においてすでに確立されている。具体的には、膣栓を確認して妊娠した雌の C57BL/6J マウスを用いて、妊娠後期(10.5dpc)から出産まで70%の食事制限を行う。これまでに得られている結果から、出生時の膵β細胞量は低出生体重マウスにおいて著明に減少しているが、8~10週齢において膵β細胞量は、対照群と同程度になる。これらの結果より、5~6週齢においては、膵β細胞量の catch-up growth の時期に当たると考えられる。この5~6週齢の低出生体重マウス及び対照マウスより、膵ラ氏島を単離し、蛋白を抽出し、インスリンシグナル伝達経路の分子（インスリン受容体、IRS1/2、Akt、Foxo1、S6等）につき、イムノブロット法にて評価する。また、単離した膵ラ氏島より RNA を抽出し、同様にインスリンシグナル伝達経路上の分子につき real-time PCR 法にて発現を検討する。以上より、低出生体重マウスモデルにおいて catch-up growth の時期の膵β細胞に生じる変化を分子レベルで解析する。

(2) 膵β細胞特異的PDK1ヘテロ遺伝子欠損マウスを用いた低出生体重マウスの作製及び解析

膵β細胞特異的PDK1ホモ遺伝子欠損マウスは、膵β細胞量が著明に減少し、高血糖のために死亡するのに対し、膵β細胞特異的PDK1ヘテロ遺伝子欠損マウスは、24週齢までの観察では、血糖値、血中インスリン値ともに、対照マウスと差を認めず、膵β細胞量の減少も示さなかった。これらの結果から、膵β細胞においては、インスリンシグナルが50%減弱しても明らかな表現型を示さない。この、膵β細胞特異的PDK1ヘテロ遺伝子欠損マウスを用いて、胎児期飢餓ストレスを負荷することにより、低出生体重マウスの作製・解析を行う。出生時の膵β細胞量、その後のcatch-up growthを経時的に観察、定量し、対照マウス(C57BL/6J)と比較検討する。

(3) 膵β細胞特異的PDK1ヘテロ遺伝子欠損マウスを用いた低出生体重マウスの解析

膵β細胞特異的PDK1ヘテロ遺伝子欠損マウスにおいて、生後4週目から低出生体重マウスと対照マウスを通常食群と高脂肪食群に分ける。4週齢から2週毎にマウスより採血し、空腹時および随時摂食時の血糖および血中インスリン値を測定する。また、腹腔内ブドウ糖負荷試験を実施し、インスリン分泌能および耐糖能を調べる。

また、経時的に膵β細胞量を定量解析する。以上より、インスリンシグナルの50%減弱が、膵β細胞のcatch-up growthに与える影響を検討する。

(4) 低出生体重が膵β細胞に及ぼすエピジェネティクス制御の検討

ここまで解析された低出生体重マウスの膵β細胞において発現上昇しているインスリンシグナル分子につき、エピジェネティクス制御の解析をする。具体的には、インスリンシグナル伝達経路の分子(インスリン受容体、IRS1/2、Akt、Foxo1、S6等)の各プロモーター領域におけるDNAメチル化の変化をバイサルファイトシーケンシング法によって検討する。またヒストン修飾(メチル化、アセチル化)についてもChIP法によって、低出生体重マウスの膵β細胞における変化を

解析する。これらの検討によって、低出生体重のエピジェネティクス制御が膵β細胞のインスリンシグナルにおいて、どの分子・領域に影響を及ぼしているかを明らかにする。

4. 研究成果

平成22年度における本研究では、低出生体重仔の膵β細胞におけるインスリンシグナルの発現・活性化レベルについての検討を行った。代表者らが作製した低出生体重仔モデルでは出生時の膵β細胞量減少および出生後の急激な膵β細胞量増加を呈するものの、24週齢では再び膵β細胞量が減少することが明らかとなった。また膵β細胞におけるインスリンシグナルを検討したところ、若齢期ではインスリンシグナルが亢進しているものの、24週齢の時点ではインスリンシグナルが低下していることがわかった。またインスリンシグナルの変化に関して、インスリンシグナル関連分子の発現量の変化が関与していることが明らかとなった。

膵β細胞量のCatch-up growthにインスリンシグナルが重要と考えられたため、平成23年度においては、膵β細胞特異的PDK1欠損マウスを用いて、インスリンシグナルが膵β細胞のcatch-up growthに果たす役割を検討した。その結果、膵β細胞特異的PDK1欠損マウスでは対照群と比較して有意に若齢期の膵β細胞量増加が抑制されていることが明らかとなった。以上の結果から、低出生体重仔における膵β細胞量はインスリンシグナルに依存しており、特に若齢期におけるcatch-up growthにおいては、重要な役割を担っていることを明らかとした。

さらに現在、インスリンシグナルがエピジェネティクス制御によって発現調節されていることを検討しているところである。

膵β細胞量の減少が糖尿病発症において重要な因子であることは、国内外問わず自明なものとなりつつあるが、その減少機序については未だ不明な点が多い。今回の研究成果によって、低出生体重児のような遺伝子変異を有さない事例の膵β細胞量増大においても、インスリンシグナルが重要な役割を担っていることが明らかとなった。このことは膵β細胞におけるインスリンシグナルがヒトの2型糖尿病においても重要な因子であることを示唆しており、今後臨床的応用につながる可能性があるものと期待される。

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 1 件）

① Ablation of TSC2 enhances insulin secretion by increasing the number of mitochondria through activation of mTORC1. Koyanagi M, Asahara SI, Matsuda T, Hashimoto N, Shigeyama Y, Shibutani Y, Kanno A, Fuchita M, Mikami T, Hosooka T, Inoue H, Matsumoto M, Koike M, Uchiyama Y, Noda T, Seino S, Kasuga M, Kido Y. PLoS ONE, 6:e23238, 2011
DOI:10.1371/journal.pone.0023238

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 尚子 (HASHIMOTO NAKO)

神戸大学・大学院医学研究科・特命助教

研究者番号：40559845