

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591313

研究課題名(和文)末梢組織における新たなインスリン作用の解析

研究課題名(英文)Study of the new insulin action in the peripheral tissues

研究代表者

吉澤 達也 (YOSHIZAWA, TATSUYA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号：40313530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：腸管は糖代謝に重要な組織であるが、腸管へのインスリン作用については明らかではない。そこで申請者らは、腸管特異的インスリン受容体ノックアウト(IR gutKO)マウスを作製し、糖代謝への影響を解析した。糖負荷試験ではIR gutKOマウスに耐糖能異常が現れたことから、腸管へのインスリン作用は糖代謝に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、DNAマイクロアレイ解析の結果では、IR gutKOマウスの十二指腸において免疫反応に関わる遺伝子群の発現が数多く変化していたことから、腸管のインスリンシグナルが免疫系へ働きかけ、腸内フローラを変化させ、糖代謝を制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Gut is the tissue that is important to glucose metabolism, but it is not clear about the insulin action to gut. Therefore applicants generated the gut-specific insulin receptor knockout (IR gutKO) mice and analyzed influence on glucose metabolism. Because IR gutKO mice showed impaired glucose tolerance in the glucose tolerance test, it was revealed that the insulin action to gut played an important role in glucose metabolism. In addition, expressions of many genes concerned with immunoreaction were changed in the duodenum of the IR gutKO mice by the result of the DNA micro array analysis. These results suggest that an enteric insulin signal modulate immune system and change intestinal flora, thereby controlling glucose metabolism.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

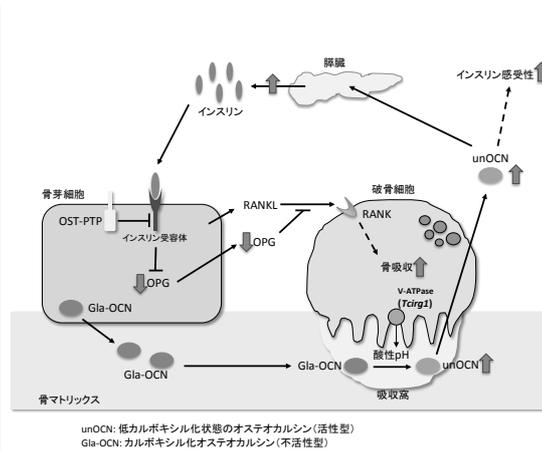
キーワード：インスリン 糖代謝 シグナル伝達 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

近年、糖尿病・肥満・メタボリックシンドロームといった生活習慣病が世界中で急増しており、その成因解明と治療法の開発は非常に重要になってきている。糖代謝において中心的な役割を担っているのは、膵臓で合成・分泌されるインスリンである。通常、インスリンは、血糖値が上昇すると分泌され、肝臓・筋肉・脂肪等の末梢組織に作用する事で血糖値を低下させるが、糖尿病患者では、このインスリン分泌の障害や末梢組織でのインスリン作用の低下（インスリン抵抗性）が重要な原因として認められる。特に後者は糖尿病のみならず、高脂血症・高血圧・動脈硬化にも関与しており、生活習慣病の全体像を解明するためには、それぞれの末梢組織において特異的なインスリン作用と、その抵抗性発症メカニズムの検討が必須である事に疑問の余地はない。

Dr. C.R. Kahnらは、各末梢組織特異的インスリン受容体ノックアウトマウスを作製・解析し、肝臓・筋肉・脂肪組織におけるインスリン作用を個体レベルで解明してきた。例えば、筋肉と脂肪組織特異的にインスリン受容体をノックアウトしたマウスでは、予想に反し、通常食では糖代謝に顕著な異常は認められず、従来からの概念が改められる結果となった。このように、各組織におけるインスリン作用の研究は、組織特異的インスリン受容体ノックアウトマウスを用いる事により、個体レベルで再確認もしくは再評価されたのである。そして、教科書的に重要とされているインスリン標的組織の解析は、全て終了したように思えた。

しかし最近、我々は、骨組織におけるインスリン作用の解明を目的とし、骨芽細胞特異的インスリン受容体ノックアウトマウスを作製・解析したところ、驚くべき事に、骨芽細胞におけるインスリン作用が糖・エネルギー代謝に非常に重要である事が明らかとなった(図1:Ferron, M.* , Wei, J.* , Yoshizawa, T.* et al, *Cell*, 2010)。具体的には、骨芽細胞におけるインスリン作用は、破骨細胞による骨吸収の促進を介して骨ホルモンであるオステオカルシンを活性化させ、このオステオカルシンが膵臓に作用してインスリンの合成・分泌を促進するのである。この研究により、骨芽細胞が糖・エネルギー代謝に重要なインスリン標的細胞である事が明らかになっただけでなく、他にも今まで注目されていなかった組織が実は重要なインスリン標的組織であるという可能性が生じた。



(図1：骨芽細胞におけるインスリン作用は、破骨細胞による骨吸収の促進を介して骨ホルモンであるオステオカルシンを活性化させ、このオステオカルシンが膵臓に作用してインスリンの合成・分泌を促進する。)

2. 研究の目的

我々は、糖・エネルギー代謝に重要な新たなインスリン標的組織の発見と、その組織特異的なインスリン作用メカニズムの解明を目的とし、主に組織特異的インスリン受容体ノックアウトマウスを用いて解析を行うこととした。我々が着目した組織は、近年、インスリン分泌等を介した糖・エネルギー代謝制御をおこなうホルモン、インクレチンが発見された腸管である。そこで、我々は、腸管特異的インスリン受容体ノックアウトマウスを用いて、糖・エネルギー代謝への影響を解析する。

本研究の特色と独創性は、今まであまり注目されていなかった組織に焦点を当て、糖・エネルギー代謝に重要な新たなインスリン標的組織を探る点にある。現在、糖尿病・肥満研究の多くは、教科書的な四大組織である肝臓・筋肉・脂肪・膵臓のみを解析している。したがって、これら組織に匹敵する重要性を持つ新たなインスリン標的組織の発見は、今後の糖尿病・肥満研究の進め方や概念を変えるものであると予想される。実際、申請者らが、糖・エネルギー代謝に骨組織のインスリン作用が重要であるという報告(*Cell* 142(2): 296-308, 2010.)をしてから、多くの糖尿病研究者が骨組織にも注目して研究するようになった。さらに、新たなインスリン標的組織において、インスリン抵抗性発症のメカニズム、インスリン標的遺伝子、インスリン作用メカニズムを明らかにできれば、将来、糖尿病等の治療法の開発に役立つと考えられる。

したがって、本研究は分子生物学的貢献のみならず、社会的貢献度も大きい研究といえる。

3. 研究の方法

(1) 腸管特異的インスリン受容体ノックアウトマウスの作製

インスリン受容体ゲノムに loxP 配列が導入された (IR floxed) マウスと腸管上皮細胞特異的に Cre 酵素を発現する (Villin-Cre) マウスを交配し、腸管特異的インスリン受容体ノックアウトマウスを作製する。

(2) 腸管特異的インスリン受容体ノックアウトマウスを用いた糖・エネルギー代謝の解析

腸管特異的インスリン受容体ノックアウトマウスを用いて、経口耐糖能試験 (OGTT)・インスリン感受性試験 (ITT)・ピルビン酸負荷試験 (PTT)・インスリン分泌能試験 (GSIS) 等の代謝実験、代謝ケージを用いたエネルギー代謝実験、血中インスリン・グルコース・脂肪酸・トリグリセリド・各種ホルモン等の濃度測定を行う。

(3) 腸管におけるインスリン標的遺伝子群の解析

腸管におけるインスリンの標的遺伝子を明らかにするため、腸管特異的インスリン受容体ノックアウトマウスとコントロールマウスの腸管を回収し、DNA マイクロアレイ法にて発現の異なる遺伝子群を網羅的に解析する。その後、qPCR 法にて定量的に遺伝子発現の差異を再確認する。

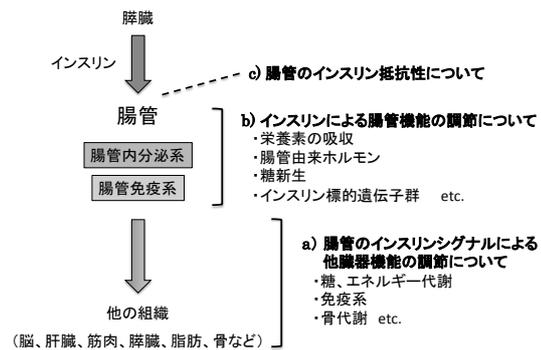
(4) 腸管特異的インスリン受容体ノックアウトマウスを用いた組織学的解析

腸管特異的インスリン受容体ノックアウトマウスの各組織を用いて組織学的解析を行い、形態学的な変異があるか否かを解析する。

(5) 腸管特異的インスリン受容体ノックアウトマウスを用いた腸内細菌叢 (腸内フローラ) の解析

最近では、腸管免疫系の変化による腸内フローラの変移と生活習慣病との関連につい

ても続々と報告されており、腸管は代謝調節に非常に重要な臓器であることが明らかにされつつある。そこで、腸管特異的インスリン受容体ノックアウトマウスの糞を用いて腸内細菌の 16S rRNA 遺伝子をリアルタイム PCR 法で解析、さらに次世代シーケンサーによるメタゲノム解析で腸内フローラを網羅的に解析する。腸内フローラの解析は、腸内細菌研究のエキスパートである福田真嗣准教授 (慶應義塾大学先端生命科学研究所) に研究協力して頂く。



(図2：研究概要)

4. 研究成果

(1) IR floxed マウスは研究代表者が留学時に既に作製しており (コロンビア大学 Dr. Gerard Karsenty 研究室)、Villin-Cre マウスはジャクソン研究所より購入し、両者のマウスを Dr. Gerard Karsenty より供与頂いた。その後、IR floxed マウスと Villin-Cre マウスを交配し、腸管特異的インスリン受容体ノックアウトマウスを作製した。

(2) 腸管特異的インスリン受容体ノックアウトマウスを用いて OGTT を行ったところ、コントロールマウスに比べ、腸管特異的インスリン受容体ノックアウトマウスの耐糖能が低下していた。この結果から、糖・エネルギー代謝における腸管へのインスリン作用の重要性と、今後の詳細な解析の必要性を強く確信した。

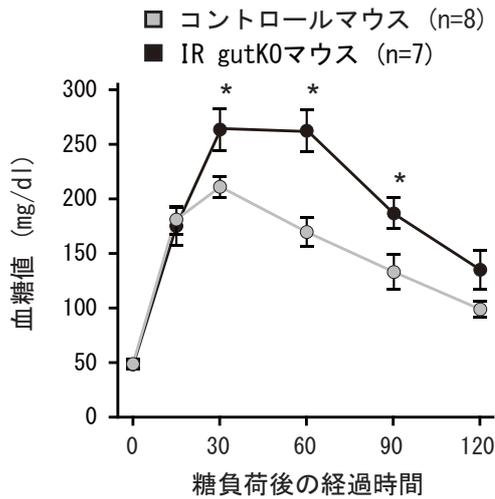


図3：腸管特異的インスリン受容体ノックアウト(IRgutK0)マウスを用いたOGTTの結果

(3) DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現解析の結果、腸管特異的インスリン受容体ノックアウトマウスの十二指腸において免疫反応に関わる遺伝子群が数多く変化していた。これは腸管におけるインスリンシグナルが腸管免疫系を調節していることを示唆するものである。特に、自然免疫に関連する遺伝子群(Immunoglobulin 関連、Defensin 関連、Reg ファミリー、Phospholipase A2 等)が多く変化していたことから、腸管のパイエル板やパネート細胞に変異がある可能性が示唆された。

(4) 小腸、肝臓、腎臓、脛骨を用いてパラフィン切片を作成し、HE 染色後、組織学的解析を行ったが、腸管特異的インスリン受容体ノックアウトマウスに明らかな形態学的な変異は認められなかった。

(5) 腸管特異的インスリン受容体ノックアウトマウスの糞を採取し、現在、腸内フローラの解析を行っている。

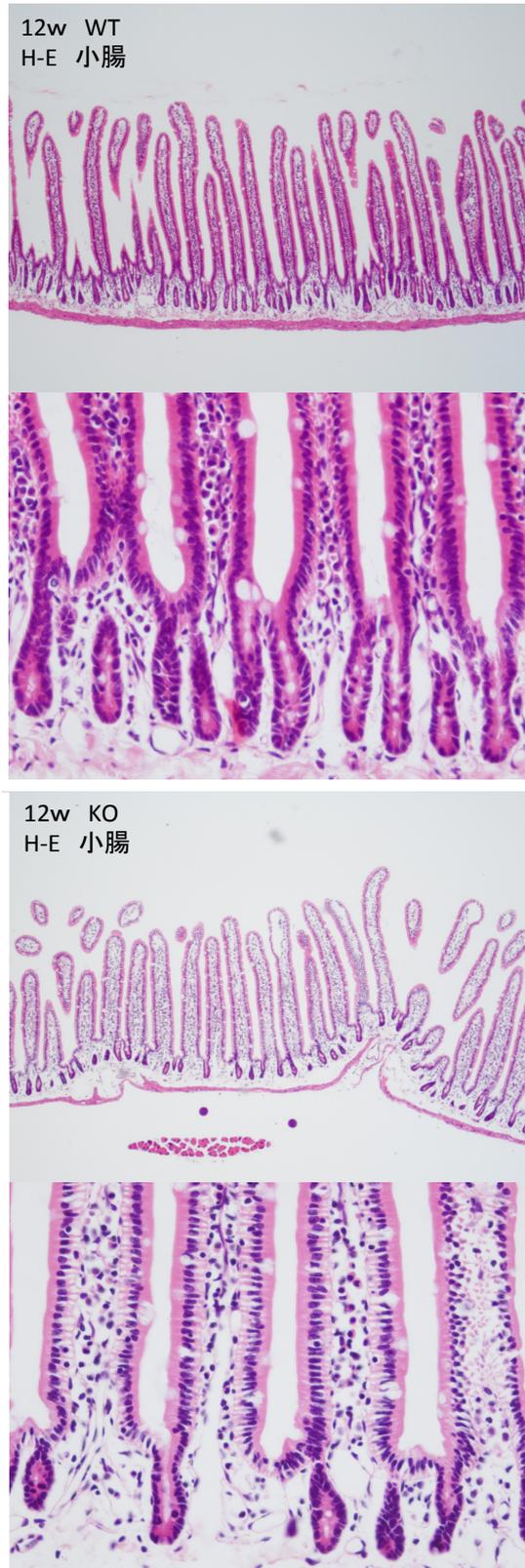


図4：腸管特異的インスリン受容体ノックアウト(IRgutK0)マウスの腸管組織像

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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉澤 達也 (Yoshizawa Tatsuya)

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号: 40313530

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: