

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500495

研究課題名(和文) スフィンゴ糖脂質による血糖調節モデルの開発と脂肪組織炎症に関与する分子病態の解明

研究課題名(英文) Development of animal model for the blood sugar regulation by glycosphingolipids and study on the molecular pathogenesis of inflammation in adipose tissue

研究代表者

三好 一郎 (MIYOSHI, ICHIRO)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10183972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴ糖脂質(GSLs)による血糖の制御について、GSLs合成の鍵酵素、グルコシルセラミド合成酵素(Ugcg)活性の高い(TgM)あるいは低い(KoHe)遺伝子組換えマウスに高脂肪食を与えその病態から比較解析した。KoHeは顕著に体重増加する一方、TgMの体重増加は抑制された。KoHeは高インスリン血漿、インスリン抵抗性を示し、著しい膵島の肥大・過形成、肝臓の脂肪・グリコーゲンの蓄積も認められた。TgMは、インスリン分泌が亢進せず、脂肪・グリコーゲンの蓄積も少なかった。KoHeは脂肪肝を伴う肥満型糖尿病、TgMマウスはやせ型の糖尿病モデルとして、GSLsが血糖調節に関与することを示唆した。

研究成果の概要(英文)：We attempted to elucidate the involvement of the glycosphingolipids in the blood sugar level regulation by comparison analysis of the pathological condition of glucosylceramide synthase(Ugcg) gene-manipulated mice fed with high-fat diet. The body weight gain was drastic in KoHe mice expressing lower Ugcg activity, but retarded in TgM mice expressing higher Ugcg activity. KoHe showed insulin resistance and hyperinsulinemia with hypertrophy and hyperplasia of pancreatic islet and severe accumulation of lipid and glycogen in liver. On the contrary, apparent impairment in insulin secretion was demonstrated in TgM. KoHe and TgM is useful model for obese diabetes and non-obese diabetes, respectively.

研究分野：実験動物学

キーワード：疾患モデル スフィンゴ糖脂質 血糖調節 遺伝子組換えマウス 脂肪組織

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病患者は糖尿病全人口の90-95%を占め、急激に増加しており対策が急がれる。これまでに、多くのモデル動物が開発・研究されてきたが、大規模なヒト遺伝子解析結果との単純な一致は見られない。2型糖尿病は、多くの異なる原因遺伝子が肥満などの環境因子と作用し、インスリン分泌障害やインスリン抵抗性を発症して病態を形成すると考えられる。発症機構の解明や治療法の開発のために、オミックス解析のような手法が期待される一方、依然として新たなモデル動物の開発が強く求められる。

スフィンゴ糖脂質(GSLs)は、細胞膜に豊富に存在し、細胞間相互作用の介在因子として、あるいはシグナル伝達系の調整因子としての機能が示唆されているが、その分子機構は殆ど不明である。我々は、数百にも及ぶGSLs分子合成経路の最も重要な酵素の一つ、セラミドにグルコースを転移するUgcg遺伝子の遺伝子組換えマウスを作製した(Miyoshi et al. Sphingolipid Biology 2006)。予想通り、Ugcg遺伝子は胎性致死遺伝子で、さらにGSLsは発生初期だけでなく個体の維持に不可欠であることを明らかにした。しかし、そのヘテロ接合体(KoHe)は、外観および繁殖力等も野生型と相違なかった。一方、全臓器高発現プロモーターの制御下でヒトUgcgを発現するトランスジェニックマウス(TgM)は、殆どの系統で外観に異常は見られなかった。

GSLs生合成はグルコース、セリン(グルコースから合成可能)、UDP-グルコース、パルミチン酸を材料とする。グルコースは、糖鎖生合成の基本分子の一つであると共に、生命を維持するための基本的なエネルギー源である。これらのことから、GSLsがエネルギー代謝制御にも深く関与する可能性が考えられるため、KoHeおよびTgMの耐糖能を調べた。驚いたことに、各々、野生型に比較して亢進および低下という対照的な傾向を示した。さらにインスリン負荷試験でも、TgMは抵抗性、一方KoHeは感受性と対照的であった。この結果は、血糖調節はGSLsの合成の抑制あるいは亢進に依存することを示唆した。

2. 研究の目的

最近、糖尿病の発症に脂肪組織の慢性炎症、マクロファージのような免疫細胞の浸潤が強く関与すること、ならびに、この脂肪(細胞)組織のGSLsの代謝がインスリン抵抗性に影響する可能性が報告された。本研究では、まず、高脂肪食給餌によりGSLsの合成経路の鍵であるグルコシルセラミド合成酵素(Ugcg)活性の高い(TgM)あるいは低い(KoHe)遺伝子組換えマウスの病態を明らかにし、これまで報告された糖尿病モデルおよび肥満モデルなどと比較する。次に、脂肪組織の慢性炎症に関わる免疫細胞やアディポサイト

カイン分子等のプロファイリング、ならびにコンディショナルUgcg遺伝子ノックアウトマウスおよび組織特異的Ugcgトランスジェニックマウスの解析を通して、GSLsがどのように血糖調節に関与するのか検討する。さらに、GSLsがインスリン分泌障害やインスリン抵抗性を惹起するのか特に、脂肪組織の免疫機能のバランスの破綻の観点から検討し、GSLsの血糖調節機構を解明する新規モデルとして有用か評価する。

さらに、連携研究者・北村が見出したUbiquitin-specific protease 2 (USP2)は、抗炎症機能を有することから、トランスジェニックマウスを作製し2型糖尿病の発症に関与する症状を抑制する作用があるか検討した。併せて、ブラジル産プロポリスが腸間膜脂肪組織の免疫機能のバランスを維持することによってその炎症を抑制し糖尿病を改善するか検討した。

3. 研究の方法

(1) TgM, KoHe マウス

Ugcg遺伝子のエクソン6-8を標的遺伝子組換えしてノックアウトしたKoHeおよび、ニワトリアクチンプロモーター/サイトメガロウイルスエンハンサー(CAG)調節領域遺伝子のもとでヒトUgcg cDNA遺伝子を発現するTgMを作出し、実験に用いた。

(2) 高脂肪食給餌によるTgM, および KoHe マウスの病態解析

高脂肪食(D12492, 541.4 kcal/100g, 60kcal%fat, Research Diet Inc., NJ, USA), を投与し、経時的に体重測定を行うと共に、各種血液指標や耐糖能、インスリン抵抗性インスリン分泌能を評価した。また、様々な臓器を採取し、病理学的解析、および、Ugcg活性やGSLs組成などの生化学的解析を行った。

(3) USP2 による肥満症・糖尿病の制御作用

USP2は、連携研究者・北村が、aP2やPAI-1等の2型糖尿病の病状悪化に関わる分子の発現を選択的に抑制することを見出したマクロファージに発現する機能分子である。マクロファージ特異的にUSP2を発現するトランスジェニックマウスを作製し、これに超高脂肪食を与え、体重、腸間膜脂肪組織のマクロファージ数や遺伝子発現を調べた。さらに空腹時インスリンレベルやインスリン感受性を評価した。

(4) ob/ob マウスの糖尿病進行に対するプロポリスの抑制効果

プロポリスの効能は、抗炎症効果や抗がん効果、抗酸化効果と多岐に渡り、近年、主にラットを用いた検討で、2型糖尿病に対する抑制効果も知られるようになった。自然発症肥満モデルob/obマウスにブラジル産プロポリスエタノール抽出液を週2回100 mg/kg

腹腔内投与し、経時的に体重測定を行うと共に、各種血液指標や耐糖能、インスリン抵抗性インスリン分泌能を評価した。また、脂肪組織を採取し、病理学的解析、および、免疫細胞集団の解析を行った。

全ての動物実験は、名古屋市立大学動物実験規程に従って実施された。

4. 研究成果

(1) TgM, KoHe マウス

Ugcg 遺伝子の両アリルをノックアウトしたホモ接合体は、殆どの主要なスフィンゴ糖脂質は合成されない。ホモ接合体は原腸陥入の直前である 7.5 日目から成長遅延を示し(図 1), 9.5 日目には相当数が痕跡程度に変性・吸収される胎生致死であった。胎齢 7.5 日目のホモ接合体は、ライヘルト膜や明確な三葉構造などを始め胚外腔および胚外体腔、羊膜腔を保持し、調べた限り分化マーカーの発現に異常が無いものの、野生型に比較して発達の程度が悪く、胚性外胚葉の内層で広範なアポトーシスを示した。一方, KoHe マウスに異常は見られなかった。

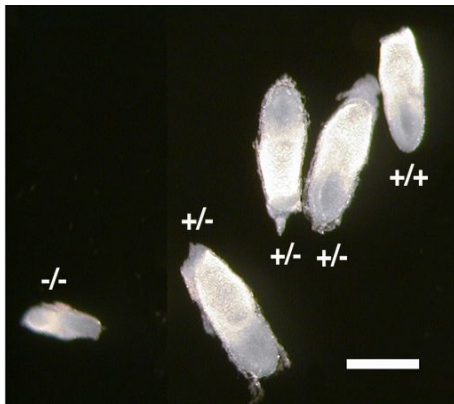
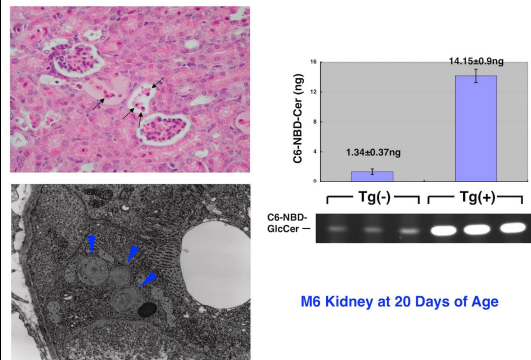


図 1. Ugcg KoHe マウスの 7.5 日胚(+/-)

Ugcg は、高発現させてもその影響がスフィンゴ糖脂質合成系路の多くの分子へ拡散するため個体レベルでの顕著な表現型は期待されなかった。しかし、CAG プロモータの下流でヒト Ugcg cDNA を高発現する TgM マウスのうち、腎臓で野生型の 15 倍程度の Ugcg 活性を示す系統は顕著な症状を呈した(図 2.)。この系統は、生後 16 日から成長が停滞し 19 日までに約半数が、42 日までは殆どの個体が衰弱した。17 日目の尿細管上皮細胞に出現した少数のアポトーシス様細胞が、20 日目には皮質で広範囲に拡がり、多くの管腔内に細胞の脱落像が観察された(図 2. 矢印)。短く疎な微絨毛を持つ丈の低い近位尿細管細胞内にガングリオシドシスに見られるリソゾームの層板構造が認められ、脂肪変性を示した(図 2. 青矢頭)。通常は、基底膜に分布する GM1 ガングリオシドが管腔側にも強く検出され(図 3), Ugcg の高発現によりスフィンゴ糖脂質構成や局在性が変化したことから細胞の極性が破綻して機能不全・アポト

シスに至った可能性がある。Ugcg の発現は、想像よりも精密に制御されているのかもし



れない。
図 2. TgM マウスの腎臓病変

CTX-B Staining of Kidney

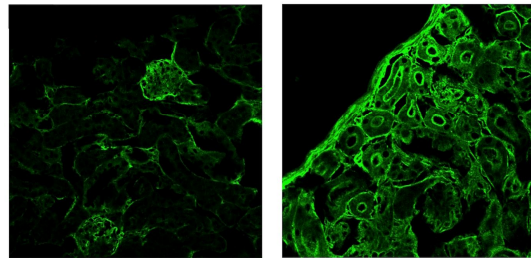


図 3. コレラトキシンによる GM1 ガングリオシドの検出

(2) 高脂肪食給餌による TgM, および KoHe マウスの病態解析

TgM マウスのうち特に症状を示さない系統は、加齢と共に耐糖能が悪化すること、逆に KoHe マウスは耐糖能が亢進する傾向を示したことから、血糖調節機能を検討した。TgM マウスは耐糖能の悪化にも関わらず、血中インスリン濃度が低い傾向があり、インスリン感受性が低下していた。一方, KoHe マウスはインスリン感受性が亢進していた。

高脂肪食投与により, KoHe マウスは野生型マウスよりも体重の増加が顕著であったが、対照的に TgM マウスは体重増加が抑制された(図 4)。

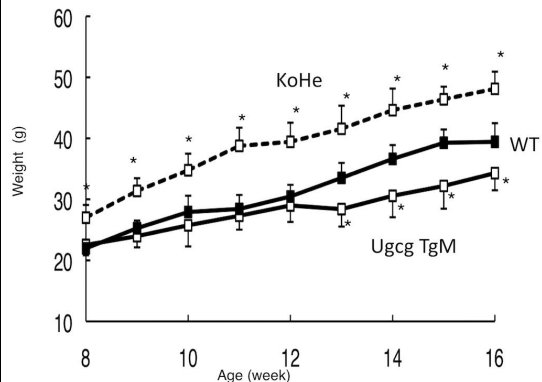


図 4. 高脂肪食投与時の体重変化

また, TgM マウスは、高脂肪食給餌下でもインスリン分泌が促進されないのに対し, KoHe マウスはインスリン分泌亢進により高インスリン血漿を示す(図 5)と同時にインスリ

ン感受性が低下した(図6)。肝臓中の脂肪・グリコーゲンの蓄積は TgM < 野生型 < KoHe マウスの順で、特に KoHe マウスでは膵島の肥大・過形成が顕著であった(図7)。以上のことから、KoHe マウスは脂肪肝を伴う肥満型糖尿病、TgM マウスは脂肪肝を伴わないやせ型の糖尿病モデルの可能性を示し、スフィンゴ糖脂質が血糖調節に關与することを示唆した。

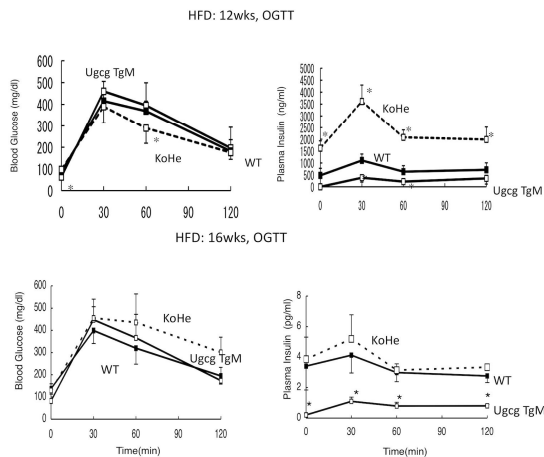


図5. 高脂肪食投与時の血糖値及び血中インスリン濃度

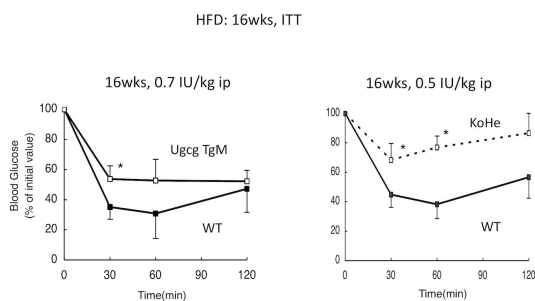


図6. 高脂肪食投与時のインスリン感受性

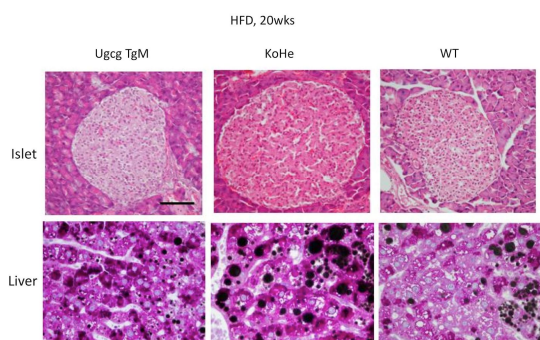


図7. 脂肪・グリコーゲンの蓄積(肝臓)と膵島の肥大・過形成

3) USP2 による肥満症・糖尿病の制御作用

北村は、USP2 ノックダウン細胞株のトランスクリプトーム解析から、USP2 が aP2 や PAI-1、MCP-1 などのメタボ疾患関連遺伝子の発現を顕著に抑えることを発見した。マクロファージ選択的に USP2A が高発現するトランスジェニックマウスを作製し USP2 の個体レベルでの役割を検討した。高脂肪食を投与して体重や摂餌量、脂肪重量、血糖値、血中脂

質量を測定したところ野生型マウスとトランスジェニックマウスで著しい相違は認められなかった。しかし腸間膜脂肪組織への F4/80(+) マクロファージの浸潤が抑制され、これらマクロファージの aP2 や PAI-1 の発現低下が認められた。またインスリン抵抗性試験における成績に若干の改善がみられた。以上の結果からマクロファージの USP2 が新たなメタ炎症の制御分子であると考えられた。

(4) ob/ob マウスの糖尿病進行に対するプロポリスの抑制効果

体重、摂餌量は殆ど変化が見られなかったが、投与開始 12 週目の血糖値の有意な減少がみられた。また、糖負荷試験、インスリン負荷試験で評価した耐糖能、インスリン感受性にも大きな改善がみられた。

北村の詳細な解析によると、腰部の皮下脂肪組織、生殖器周囲脂肪組織、腸間膜脂肪組織の重量測定では、腸間膜脂肪組織のみ有意な減少がみられた。また、腸間膜脂肪組織より間質画分を調製し FACS 解析および免疫組織化学的解析を行い、免疫細胞集団をプロファイリングしたところ、プロポリス投与群は特に好酸球の増加が顕著であった。また炎症反応を進める M1 マクロファージの減少が認められた。さらに、腸間膜脂肪組織間質画分のマイクロアレイ解析・バイオインフォマティクス的手法による解析では、プロポリス投与により増加する遺伝子には糖尿病病態や炎症反応と関わりのある集団は見いだせなかったが、減少する遺伝子群には統計学的有意に免疫反応や炎症反応に関わる集団を検出した。以上のことからプロポリスが腸間膜脂肪組織の好酸球やマクロファージの機能を変化させ 2 型糖尿病の進行を抑える可能性が示唆された。

以上は、理化学研究所脳科学総合研究センター・平林義雄博士、および国立国際医療センター研究所・岡村匡史博士、酪農学園大学・北村浩博士との共同研究である。

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 10 件)

Murakami M, Miyoshi I ら (8/12): Modified autonomic regulation in mice mutated in the 4 subunit of the lh/lh calcium channel. *Biochem Biophys Res Commun*, 461(2), 200-205, 2015. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.03.112. 査読有

Sakai Y, Miyoshi I ら (4/7): A novel transgenic mouse model carrying human Tribbles related protein 3 (TRB3) gene and its site specific phenotype. *Biol Pharm Bull*, 37(6), 1068-1074, 2014. <https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/37/6>

Sherman-Baust CA, Miyoshi I ら (9/14): A genetically engineered ovarian cancer mouse model based on fallopian tube transformation mimics human high-grade serous carcinoma development. *J Pathol*, 233(3), 228-237, 2014. doi: 10.1002/path.4353. 査読有

Taguchi K, Miyoshi I ら (13/14): Colony-stimulating factor-1 signaling suppresses renal crystal formation. *J Am Soc Nephrol*, 25(8), 1680-1697, 2014. doi: 10.1681/ASN.2013060675. 査読有

Ohara A, Miyoshi I ら (7/11): Exclusive expression of VMAT2 in noradrenergic neurons increases viability of homozygous VMAT2 knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 15, 526-532, 2013. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.02.014. 査読有

Okamura T, Miyoshi I ら (3/10): Article Phenotypic Characterization of LEA Rat: A New Rat Model of Nonobese Type 2 Diabetes. *J Diabetes Res*, 2013, 1-9, 2013. doi: 10.1155/2013/986462. 査読有

Kitamura H, Miyoshi I ら (9/9): Beneficial effects of Brazilian propolis on type 2 diabetes in ob/ob mice: Possible involvement of immune cells in mesenteric adipose tissue. *Adipocyte*, 2(4), 227-236, 2013. doi: 10.4161/adip.25608. 査読有

Kitamura H, Miyoshi I ら (18/18): Ubiquitin-specific protease 2-69 in macrophages potentially modulates meta-inflammation. *FASEB J*, 27(12), 4940-4953, 2013. doi: 10.1096/fj.13-233528. 査読有

Niimi k, Miyoshi I ら (5/7): Improvement of spontaneous alternation behavior deficit by activation of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor signaling in the ganglioside GM3-deficient mice. *Biomed Res*, 34(4), 189-195, 2013. https://www.jstage.jst.go.jp/article/biomedres/34/4/34_189/article 査読有

Ochiai N, Miyoshi I ら (4/7): Targeted disruption of fad24, a regulator of adipogenesis, causes pre-implantation embryonic lethality due to the growth defect at the blastocyst stage. *Biochem Biophys Res Commun*, 438(2), 301-305, 2013. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.07.061. 査読有

〔学会発表〕(計8件)

三好一郎(1/1): 名古屋での11年11ヶ月間. 日本技術者協会東北支部総会(招待講演), 2015年4月4日, 東北大学(宮城県).

北村浩, 三好一郎ら(9/9): マクロファージの USP2 - 新たな糖尿病制御分子 -. 日本実験動物医学会シンポジウム(第157回日本獣医学会学術集会)2014年9月10日~2014年9月10日, 北海道大学(北海道).

宮本智美, 三好一郎(2/2): Zinc Finger Nucleases (ZFNs)を用いたノックアウトマウスの作製. 第85回東海実験動物研究会, 2014年8月30日, 名古屋市立大学(愛知県).

北村浩, 三好一郎ら(9/9): マクロファージの USP2 による2型糖尿病制御の可能性. 第61回日本実験動物学会総会, 2014年5月15日~2014年5月17日, 札幌コンベンションセンター(北海道).

北村浩, 三好一郎ら(10/10): マクロファージ分子 M-mod による肥満症・糖尿病の制御. 第156回日本獣医学会学術集会, 2013年9月21日~2013年9月21日, 岐阜大学(岐阜県).

北村浩, 三好一郎ら(5/5): ob/ob マウスの2型糖尿病進行に対するプロポリスの抑制効果-腸管膜脂肪組織における免疫細胞の役割-. 第83回東海実験動物研究会, 2013年7月27日, 名古屋市立大学(愛知県).

Kitamura H, Miyoshi I ら (11/11): Possible involvement of a novel macrophage molecule in pathogenesis of type 2 diabetes. The 4th EMBO meeting, 2012年9月22日~2012年9月25日, Nice Acropolis Convention Center (Nice, France). 査読有

Kitamura H, Miyoshi I ら(10/10): Roles of a macrophage molecule M-mod in type 2 diabetes. *Experimental Biology 2012*, 2012年4月21日~2012年4月25日, San Diego Convention Center (San Diego, USA). 査読有

〔図書〕(計1件)

三好一郎: 発生工学. 久和茂(編). 獣医学教育モデル・コア・カリキュラム準拠 実験動物学. 167-180, 2013. 査読無

〔その他〕

ホームページ等

<http://>

www.med.nagoya-cu.ac.jp/animal.dir/animalweb/dcem/project.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

三好 一郎 (MIYOSHI ICHIRO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10183972

(2)研究分担者

岡村 匡史 (OKAMURA TADASHI)

独立行政法人国立国際医療研究センター

一・その他部局等・実験動物管理室長

研究者番号：00333790

(3)連携研究者

北村 浩 (KITAMURA HIROSHI)

酪農学園大学・獣医学部・教授

研究者番号：80312403