

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790915

研究課題名(和文) インスリン欠乏性脂質代謝異常の分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of diabetic lipemia in streptozotocin-treated mice

研究代表者

高梨 幹生 (Takanashi, Mikio)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70610799

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：インスリン欠乏下で生じる著しい高中性脂肪(TG)血症の成因は完全には解明されていない。研究代表者らはホルモン感受性リパーゼ欠損マウスではインスリン欠乏時のTG上昇が軽微であることに着目して、インスリン欠乏性高TG血症の分子メカニズムの解明を目指した。その結果、インスリン欠乏によるリポ蛋白リパーゼ(LPL)の発現・活性低下という従来考えられていた成因ではなく、小腸での脂質吸収亢進や、血漿LPL活性以外の要素を介した脂質クリアランスの低下などが高TG血症の成因である可能性が示唆され、さらに解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanism of diabetic lipemia in the setting of insulin deficiency is not fully understood. We have previously found that the plasma level of triglycerides is lower in hormone-sensitive lipase (HSL) deficient mice than in wild-type mice when they are challenged with streptozotocin. The current study was aimed at elucidating the molecular mechanism of diabetic lipemia through the detailed analysis of HSL-deficient mice in the insulin-deficient status. We found that the enzymatic activity and mRNA levels of lipoprotein lipase (LPL) were not significantly different between wild-type and HSL-deficient mice in the insulin-deficient status. Other factors that regulate LPL activity in vivo or other pathways such as intestinal lipid absorption may explain the phenotypic difference, which are currently under investigation.

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

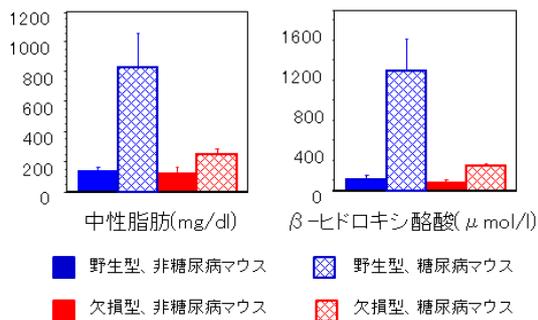
キーワード：ホルモン感受性リパーゼ リポ蛋白リパーゼ インスリン

1. 研究開始当初の背景

(1) 1型糖尿病やインスリン抵抗性の増加した2型糖尿病など、インスリン作用が減弱した病態では体重減少や高中性脂肪(TG)血症、ケトーシスなどが観察される。

ラットのストレプトゾトシン(STZ)投与膵臓β細胞破壊モデルによる検討(Tavangar K et al., J. Clin. Invest., 1992)では、糖尿病モデルでは白色脂肪組織におけるリポ蛋白リパーゼ(LPL)の発現・活性は著しく低下し、インスリン補充によってrescueされることが示されている。このことから、インスリン欠乏時の高TG血症は、LPLの作用不足が原因であると考えられている。しかし、その分子機構は完全には解明されていない。

(2) 研究代表者らはこれまでの予備検討において、下図に示す通り、ホルモン感受性リパーゼ欠損マウスでは、インスリン欠乏に伴う高TG血症やケトーシスが野生型マウスに比べて軽微であるという結果を得た。



ホルモン感受性リパーゼはATGL(adipose triglyceride lipase)とともに脂肪細胞での脂肪分解に関わる主要なlipaseである。その発現・活性はカテコラミン等によって正に制御されている他、インスリンによって負に制御されている。またその基質は多様であり、TGをジアシルグリセロール(DG)と遊離脂肪酸(FFA)に、DGをモノアシルグリセロール(MG)とFFAに加水分解するだけでなく、コレステロールエステル(CE)水解酵素活性、レチニルエステル(RE)水解酵素活性をなども併せ持っている。

(3) 一方LPLは脂肪細胞の他、血管内皮や肝臓、筋など末梢の組織で発現しており、カイロミクロン(CM)やVLDL(very low density lipoprotein)などのTGリッチリポ蛋白(TGRL)中のTGの水解と細胞内への取り込みを担っている。前述の通り、その活性はインスリンによって正に制御されることが知られている。

(4) ホルモン感受性リパーゼとATGLは脂肪細胞のTG水解の約半分ずつに寄与していると考えられているが、インスリン欠乏時の高TG血症はホルモン感受性リパーゼ欠損に

よってほぼ完全にrescueされている。このことから、ホルモン感受性リパーゼはその特有の基質特異性、あるいは特有の組織分布を介して、インスリン欠乏時の高TG血症を引き起こすと考えられ、本研究は新たな分子機構解明の糸口となることが期待された。

2. 研究の目的

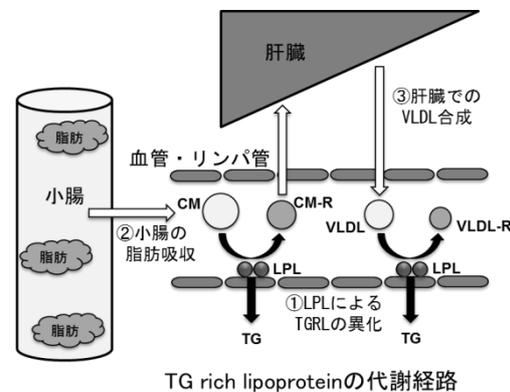
(1) インスリン欠乏時の高TG血症の成因として、

①末梢でのTGRL異化の低下

②小腸での脂質吸収・CM合成の亢進

③肝臓でのVLDL合成の亢進

のいずれかが想定される。TGRLの異化はLPLによって担われるが、インスリン欠乏時には末梢でのLPL活性は低下しているとこれまでは考えられてきた。



(2) 予備検討での「インスリン欠乏時の高TG血症の発症にはホルモン感受性リパーゼが必須である」という知見からは、ホルモン感受性リパーゼがこれら①～③のいずれかあるいは複数に関与していることが示唆される。

(3) そこで本研究ではホルモン感受性リパーゼ欠損によるインスリン欠乏時高TG血症rescueの経路を特定し、新たな分子メカニズム解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 研究代表者の所属先で作成され(Osuga et al., PNAS, 2000)、継代飼育中のホルモン感受性リパーゼ欠損マウスとその同胞野生型マウスを用いる。10～13週齢の雄マウスにSTZを投与し糖尿病マウスを作成する。

(2) このようにして作成したインスリン欠乏性糖尿病モデルマウスに対し、脂質非含有食やオリーブオイルの経口投与を行い、腸管でのCMの合成について評価を行う。またtriton WR1339投与などにより、肝臓でのVLDL合成について評価を行う。

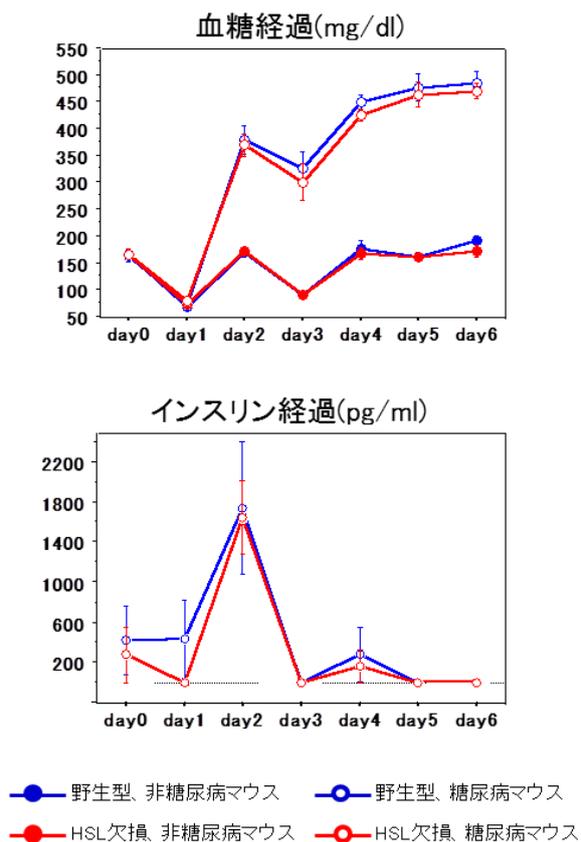
(3) 白色脂肪組織、肝臓、筋肉など各種臓器におけるLPLの発現や、Angptl3、Angptl4、

Gpihbp1、Lmf1 など LPL 関連遺伝子の発現を RT-PCR 法により測定する他、ヘパリン投与後血漿を採取してラジオアイソトープを用いた手法で LPL 活性を測定し、インスリン欠乏時の LPL の動向を検討する。

4. 研究成果

(1) 糖尿病マウスの作成

day1, day3 に 24 時間絶食下で 100mg/BW (g) の STZ を腹腔内に投与して糖尿病マウスを作成した。



上記経過図の通り血糖やインスリンの経過は、野生型マウスとホルモン感受性リパーゼ欠損マウスの間での差異を認めず、STZ 投与後 day5 以降は両群ともにインスリンが枯渇し同程度の高血糖を来すことを確認した。

(2) 様々な食餌成分が高 TG 血症に与える影響

STZ により糖尿病化させた野生型マウスの小腸での脂質吸収・CM 合成を評価するため、十分に絶食させた後、通常食と脂質を全く含有しない high sucrose (HS) 食を与え、血漿中 TG の経過を観察した。その結果、通常食では摂食開始後から徐々に血漿中 TG 値が増加したが、HS 食ではその増加を認めなかった (Takanashi M and Okazaki H, unpublished observations)。HS 食は肝臓での VLDL 合成を促進する餌としてよく知られているが、今回の結果は、インスリン欠乏時の高 TG 血症には小腸での脂質吸収・CM 合成が寄与している

可能性を強く示唆するものであった。

小腸での脂質吸収・CM 合成をより詳細に検討するため、食餌中の脂質含有を強調したモデルとしてオリーブオイルの経口投与を行った。十分に絶食させた後、オリーブオイル 300 μ l を経口投与したところ、血漿中 TG 値は野生型マウスに比べてホルモン感受性リパーゼ欠損マウスで減少する傾向が認められた。こちらは現在より詳細な検討を加えている。

(3) LPL および LPL 関連タンパクの発現

ホルモン感受性リパーゼ欠損マウスでは白色脂肪組織におけるリパーゼやエステラーゼの発現・活性が野生型マウスに比べて著しく低下していることが報告されている (W.-J. Shen, et al., Biochimica et Biophysica Acta, 2007)。LPL についても同様であり、今回の RT-PCR 法による解析でも、白色脂肪組織における LPL 発現は野生型マウスに比べホルモン感受性リパーゼ欠損マウスでは著しく低下していた。また、インスリン欠乏により野生型マウスの LPL 発現が著しく低下するのに対し、ホルモン感受性リパーゼ欠損マウスでは大きな変動を認めなかった。その結果、LPL の mRNA 発現は STZ 投与下の野生型マウスとホルモン感受性リパーゼ欠損マウスとはほぼ同レベルであり、LPL の mRNA 発現差によっては今回の現象は説明困難であった。

Angptl3, Angptl4, Gpihbp1, Lmf1 など LPL 関連遺伝子についても、全体的に野生型マウスに比べホルモン感受性リパーゼ欠損マウスでは発現が低く、一方でインスリン欠乏下ではその差が消失した。

結果的に LPL も LPL 関連遺伝子もインスリン欠乏下での発現は野生型マウスとホルモン感受性リパーゼ欠損マウスで同程度であり、高 TG 血症の成因を説明するには困難であった。

(4) LPL 活性

マウスにヘパリン 0.1 単位/BW (g) を経静脈的に投与し、投与前および投与後 1, 3, 8, 15 分時の血漿を採取して LPL 活性を測定した。野生型およびホルモン感受性リパーゼ欠損マウスではほぼ同等の活性であり、血漿の LPL 活性の差異で高 TG 血症の成因を説明するのは困難であった。

今後は白色脂肪組織、肝臓、筋肉など各種臓器ごとの組織 LPL 活性の検討などが必要であり、解析を進めている。

インスリン欠乏下では野生型マウスとホルモン感受性リパーゼ欠損マウスとでは血漿 TG 値に著しい差異を生じる。これまでの検討から、インスリン欠乏時の高 TG 血症の成因を、LPL の発現や活性の低下による CM および VLDL 異化の遅延に求める従来仮説では、

この現象の説明は困難であると考えられた。したがって、ホルモン感受性リパーゼ欠損による高TG血症 rescue の経路を特定できれば、高TG血症の新たな治療法に繋がることが期待される。

本研究の結果からは、脂質の経口投与の実験などから、小腸での脂質吸収亢進や、血漿LPL以外の要素を介した脂質クリアランスの低下などが成因である可能性が考えられ、この過程にホルモン感受性リパーゼが関与していることが示唆された。

詳細な分子メカニズムを解明するため、さらなる検討を進めている。

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)

[学会発表] (計3件)

- ① Hiroaki Okazaki, Mikio Takanashi, Guosheng Liang. “Molecular regulation of diabetic hyperlipidemia”, The 4th International Symposium on Chylomicrons in Disease, March 29-30 2014, Tokyo
- ② 高梨 幹生 他、「インスリン欠乏時の高中性脂肪血症の成因とホルモン感受性リパーゼの役割」、第45回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2013年7月18-19日、東京
- ③ 高梨 幹生 他、「インスリン欠乏時の高中性脂肪血症におけるホルモン感受性リパーゼの役割」、第56回日本糖尿病学会学術集会、2013年5月16-18日、熊本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高梨 幹生 (TAKANASHI, Mikio)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70610799