

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：11501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890027

研究課題名(和文)ジアシルグリセロールキナーゼによる血糖調節機構の解明

研究課題名(英文)Diacylglycerol kinase works as a physiological regulator of plasma glucose level

研究代表者

中野 知之 (Tomoyuki, Nakano)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：00333948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：epsilon型ジアシルグリセロールキナーゼ遺伝子欠損マウス(DGKe-KOマウス)を高脂肪食で40日間飼育した。その結果、急激な体重増加と白色脂肪量の増加が認められ、肝臓における脂質の異常沈着が生じた。耐糖能試験の結果、このマウスでは高血糖の遷延傾向が認められた。ウェスタンブロット解析の結果、白色脂肪組織においてプロテインキナーゼC(PKC)のリン酸化レベルの亢進が認められた。これらのPKCは、DGにより活性化されるタイプであることから、DGKe-KOマウス白色脂肪では、高脂肪食により増加したDGの代謝能が低く、その結果PKCの活性化が生じ、血糖調節機構に異常が惹起されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Diacylglycerol kinase epsilon knock out (DGKe-KO) mouse was fed with high fat diet (HFD) for 40 days. This induced acute increase in body weight and white adipose tissue mass, and led to severe lipid accumulation in the liver. Since hepatic lipid accumulation is known as a symptom of insulin resistance, we performed glucose tolerance test. It revealed that HFD fed DGKe-KO mouse showed prolonged time of high glucose level. Immunoblot analysis showed that phosphorylation of novel class protein kinase C (nPKC) is upregulated in white adipose tissue. It is known to be activated by diacylglycerol (DG). HFD is reported to increase DG contents in tissues or organs. Since DGKe-KO mouse is not able to manipulate increased DG adequately, nPKC activation is accelerated. nPKC is key molecule which induces insulin resistance. Present study revealed that insulin resistance is invoked particularly in WAT via acceleration of nPKC in HFD fed DGKe-KO mouse.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：血糖値 インスリン抵抗性 ジアシルグリセロールキナーゼ 高脂肪食

1. 研究開始当初の背景

食生活の欧米化と言われて久しい近年、高カロリー・高エネルギー食により発症する生活習慣病の予防・治療の重要性が増している。とりわけ糖尿病とその直接的な原因とである血糖調節機構の異常を精査することは今後の国民生活の質を維持する上で重要である。インスリン非依存的である2型糖尿病は、インスリンに対する感受性の低下、すなわちインスリン抵抗性の亢進が直接的な原因として知られる。この原因の一つとして、*novel* クラスのプロテインキナーゼC (nPKC) による insulin receptor substrate のリン酸化が報告されている。

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) は脂質性二次伝達物質ジアシルグリセロール (DG) をリン酸化してホスファチジン酸 (PA) に変換する酵素である。DG は PKC や transient receptor channel の活性化因子として機能し、PA もまた hypoxia inducible factor-1 α や mammalian target of Rapamycin などを活性化する。それゆえ、DGK は DG を介する情報伝達を停止すると同時に PA による情報伝達を開始し、細胞内情報伝達系においてハブ的な役割を果たす分子である。

インスリン抵抗性の惹起メカニズムにおいて、DG-PKC シグナルは特に重要であると考えられることから、DGK の機能的役割を解明することは、2型糖尿病の予防・治療に大きな進歩をもたらすと期待されるが、十分な解析は行われていなかった。

2. 研究の目的

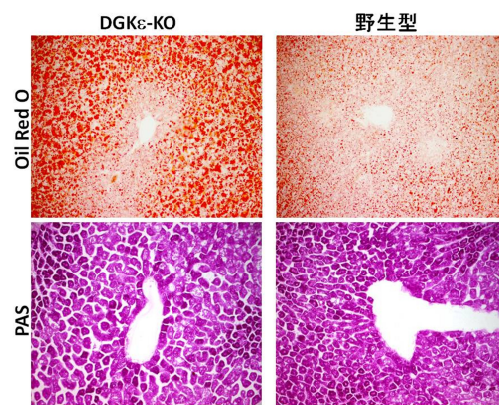
本プロジェクトは DGK による血糖調節機構の詳細を解明するために、以下の点に注目して実施された。高脂肪食給餌によって DGK 遺伝子欠損 (DGK-KO) マウスで耐糖能異常が認められるか、同マウスは2型糖尿病の表現型を呈するか、分子機序の解明する。

3. 研究の方法

6週齢の野生型 (WT) および3種 DGK-KO (DGK α , DGK ϵ , DGK ζ) マウスを高脂肪食 (HFD-60, オリエンタル酵母) および通常食で40日間飼育した。飼育の前後で体重と血糖値を測定した。HFD 給餌後、マウスから肝臓、精巣上体周囲の白色脂肪および骨格筋を摘出し、液体窒素で凍結後、-80度で保存した。このサンプルを用いてウェスタンブロット解析を行った。また摘出組織の一部は組織学的解析のために4%パラホルムアルデヒドで固定し、凍結切片を作製した。

4. 研究成果

HFD 給餌後の肝臓組織像



3種 DGK-KO マウスに高脂肪食を給餌した結果、DGK ϵ -KO マウスが野生型マウスに比べて有意な体重の増加を示したことから、本プロジェクトでは DGK ϵ -KO マウスに注目した解析を行った。高脂肪食給餌実験開始前に耐糖能試験を行った結果、野生型と DGK ϵ -KO マウスにグルコース代謝能の差は認められなかった。しかし、40日の給餌後に耐糖能試験を行った結果、DGK ϵ -KO マウスにおいて高グルコース値の遷延傾向が認められた。DGK ϵ -KO マウスでは精巣上体周囲の白色脂肪の重量が野生型を大きく上回ったことから、肥満の形質を示すことが明らかとなった。肝臓組織に oil red O による脂肪染色を施した結果、DGK ϵ -KO において脂肪滴の沈着が著しく亢進していた。一方、PAS 染色の結果から肝細胞内の多糖蓄積の程度

に関しては、両マウスに差がないことが示唆された。ウェスタンブロット解析の結果、DGK ϵ -KO マウス白色脂肪組織では PKC δ/θ のリン酸化レベルが亢進していた。一方、肝臓や骨格筋ではWT との間に差異は認められないことから、白色脂肪組織において臓器特異的なインスリン抵抗性が惹起されている可能性が考えられた。PKC δ/θ は novel class に分類されるアイソザイムであり、その活性は DG 依存性であることが知られる。高脂肪食給餌により組織中の DG が増加することが報告されている。DGK ϵ -KO マウスでは増加した DG の代謝能が低いいため、蓄積した DG によって PKC δ/θ の活性化が生じ、結果としてインスリン抵抗性が惹起されると考えられる。しかし何故、白色脂肪組織において特異的に生じるのかという点については、今後の検討課題である。一般に、げっ歯目動物では 2 型糖尿病の表現型は発生しにくいと考えられている。本研究で用いた高脂肪食給餌 DGK ϵ -KO マウスは同疾患の病態モデルとしても有効であると考えられる。

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 8 件)

T. Nakano, A. Iravani, M. Kim, Y. Hozumi, M. Lohse, E. Reicheert, T.M. Crotty, D.M. Stafforini and M.K. Topham (2014) Diacylglycerol kinase η modulates oncogenic properties of lung cancer cells harboring mutant epidermal growth factor. *Clinical and Translational Oncology*. 16:29-35. 査読有り

M. Yamamoto, T. Tanaka, Y. Hozumi, S. Saino-Saito, T. Nakano, K. Tajima T. Kato and K. Goto (2014) Expression of mRNAs for the diacylglycerol kinase family in immune cells during an inflammatory reaction. *Biomedical Research*, 35:61-68. 査読有り

T. M. Crotty, T. Nakano, D.M. Stafforini and

M.K.Topham (2013) Diacylglycerol kinase δ modulates Akt phosphorylation through pleckstrin homology domain leucin-rich repeat protein phosphatase 2 (PHLPP2). *Journal of Biological Chemistry*, 288:1439-1447. 査読有り

C. Xu, E. C. Reichert, T. Nakano, M. Lohse, A. G. Gardner, M. P. Revelo, M. K. Topham and D. M. Stafforini (2012) Deficiency of phospholipase A₂ group 7 decreases intestinal polyposis and colon tumorigenesis in Apc^{min/+} mice. *Cancer Res*. 73: 2806-2816. 査読有り

T. Nakano, Y. Hozumi, K. Goto and I. Wakabayashi (2012) Involvement of diacylglycerol kinase γ in modulation of iNOS synthesis in Golgi apparatus of vascular endothelial cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 385:787-795. 査読有り

T. Nakano, Y. Hozumi, K. Okumoto, K Iseki, T. Saito, S. Kawata, I. Wakabayashi and K. Goto (2012) Altered expression of diacylglycerol kinase isozymes in regenerating liver. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 60:130-138. 査読有り

M. Marumo, T. Nakano, Y Takeda, K. Goto and I Wakabayashi (2012) Inhibition of thrombin-induced Ca²⁺ influx in platelet by R59949, an inhibitor of diacylglycerol kinase. *J. Pharmacy Pharmacology* 64: 855-861. 査読有り

K. Goto, T. Tanaka, T. Nakano, M. Okada, Y. Hozumi, M.K. Topham and A.M. Martelli (2013) *Advances in Biological regulation*, 54:242-253. 査読有り

[学会発表](計 5 件)

中野知之、脂質モデュレーターによる病態制御機構の解析、日本解剖学会奨励賞受賞講演、2014年3月27-29日、栃木(自治医科大学)

中野知之、後藤 薫、 ϵ 型ジアシルグリセ

ロールキナーゼ欠損マウスの脂肪組織における脂質代謝メカニズム解析、第119回日本解剖学会総会、2014年3月27-29日、栃木(自治医科大学)

中野知之、後藤 薫、ε型ジアシルグリセロールキナーゼの欠損は糖・脂質代謝異常を惹起する、第59回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会、2013年9月14-15日、札幌(北海道大学)

中野知之、若林一郎、後藤 薫、ラット大動脈における cyclooxygenase-2 (COX-2) の発現調節機構の解析、第118回日本解剖学会総会、2013年3月28-30日、高松(香川大学)

中野知之、後藤 薫、血管内皮細胞における ε型ジアシルグリセロールキナーゼの発現、第58回日本解剖学会東北・北海道地区連合大会、2012年9月22-23日、山形(山形大学)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 知之 (Tomoyuki Nakano)
山形大学・医学部・助教
研究者番号：00333948