

ヒト血管内皮細胞を用いた糖尿病性微小血管症の発症機構解明と治療法開発 分担研究者 湯尾 明 国立国際医療センター研究所・部長

研究要旨

糖尿病の予後を決定するもっとも重要な要素は合併症であり、網膜症、腎症、神経症等の合併症は患者の QOL に深刻な影響を及ぼす。本研究においては、合併症の発生と進展の分子機序を解明して、合併症発生の初期の変化をとらえるマーカーやパラメーターを探索すると共に、特異性の高い分子標的療法の開発を目指す。具体的には、糖尿病の合併症の病態を「細小血管症」としてとらえ、高血糖による血管内皮細胞などの傷害（「糖毒性」）の研究を進める。血管内皮細胞は、ヒト臍帯静脈内皮細胞、ヒト大動脈内皮細胞、ヒト心臓微小血管内皮細胞、ウシ大動脈内皮細胞で、モニターするパラメーターは、本年度は、細胞内 reactive oxygen species (ROS) と AGE (advanced glycation end-product) とし、培養時のブドウ糖濃度は normal glucose (NG) : 5.5 mM、high glucose (HG) : 25 mM とした。細胞内 reactive oxygen species (ROS) は、ヒト臍帯血静脈内皮細胞とヒト心臓微小血管内皮細胞を用いて測定したところ、何れの内皮細胞においても high glucose (HG : 25 mM) で高い値を得ることができた。また、ヒト臍帯血静脈内皮細胞を用いて AGE (advanced glycation end-product) の測定を行い、high glucose (HG : 25 mM) で高い値を得ることができた。以上より、ヒト血管内皮細胞を用いて、ブドウ糖濃度の上昇に伴う細胞障害につながる細胞内機構が再現され、糖毒性の *in vitro* 解析系が確立された。今後は、ブドウ糖濃度の上昇のみではなく、網膜症の発生に重要な役割を果たし血管内皮の成熟に重要なリガンド・受容体系である angiotensin-1、angiotensin-2、Tie-2 の系も用いた研究を推進する。

A. 研究目的

糖尿病の予後を決定するもっとも重要な要素は合併症であると言っても過言ではない。合併症としては網膜症、腎症、神経症が知られており、いずれも進行すると患者の QOL に深刻な影響を及ぼすこととなる。例えば、網膜症による失明は 1 年間に 4000 人に上ることが知られている。腎症による透析に至っては、1 年間に 1.4 万人と報告されている。このような合併症による深刻な状態が無いとすると、糖尿病は恐れるに足る疾患ではなくなる。従って、合併症の発生と進展の分子機序を解明して、その分子を標的とした特異性の高い「分子標的療法」が開発されれば、糖尿病を発症したとしても、その予後は格段に改善する。また、合併症発生の初期の変化をとらえるマーカーやパラメーターが明らかになれば、診断的ならびに患者状態のモニターという面での利点も大きい。この様に重要な研究課題であるにもかかわらず、合併症の研究は必ずしも進んでいない。

以上のような状況の中で、近年、糖尿病の合併症の病態を「細小血管症」としてとらえることができるという考え方が広まっている。すなわち、高血糖による血管内皮細胞などの傷害（「糖毒性」）が中心的な現象であるという可能性も含めた展開である。

本研究においてはこのような観点から、ヒトの血管内皮細胞を用いて糖毒性解析のため

の *in vitro* の解析システムを構築して高血糖による血管内皮細胞傷害の機序を解明して、治療法開発や診断マーカー開発につなげたい。

B. 研究方法

血管内皮細胞は、これまでの研究において最も幅広く用いられてきたヒト臍帯静脈内皮細胞の他に、ヒト大動脈内皮細胞、ヒト心臓微小血管内皮細胞も用いて、できるだけ普遍的な結果を出すように試みる。また、糖毒性の機序としてミトコンドリアからの活性酸素を提唱した 2000 年の *Nature* 誌の論文において用いられたウシ大動脈内皮細胞もコントロールとして用いる。また、ヒト胚性幹細胞からヒト血管内皮細胞が分化誘導できれば、あわせて用いる。分化誘導の手法としては、まずは、*Blood* 誌に報告されたマトリゲル上で EGM-2 培地を用いる手法を試みる。その他、必要に応じてカニクイザル胚性幹細胞からの分化誘導系も併用する。

細胞内の酸化還元状態の解析は、蛍光プローブ 2',7'-dichlorofluorescein を指標とした細胞内 reactive oxygen species (ROS) を測定し、FluorImager を用いて定量化した。

AGE (advanced glycation end-product) の測定は、細胞を可溶化後に、SDS-PAGE、ウェスタンブロットを行った。様々なタンパクが AGE 化されるため、各レーン全体の濃度を FluorImager を用いて定量化した。

細胞培養時の normal glucose (NG) と high glucose (HG) の条件に関しては、NG : 5.5 mM、HG : 25 mM で実験を行った。

C. 研究結果

まず、各種の血管内皮細胞の培養の安定化を試みた。ヒト臍帯静脈内皮細胞、ヒト大動脈内皮細胞、ヒト心臓微小血管内皮細胞、ウシ大動脈内皮細胞の中で、ウシ大動脈内皮細胞が最も安定的に増殖し、次に安定な増殖を示したのがヒト臍帯静脈血管内細胞で、ヒト大動脈内皮細胞とヒト心臓微小血管内皮細胞に関しては、やや増殖が不安定であった。これらの血管内皮細胞は図1、図2のように明らかに異なる形態を有し、特に種を同じくする3種類のヒト血管内皮細胞の間でも形態が異なり(図1)、血管内皮細胞の diversity を示していると考えられた。

次に、糖毒性の検定のために、血管内皮細胞を normal glucose (NG : 5.5 mM) と high glucose (HG : 25 mM) の条件で1、2日間培養して、細胞内 reactive oxygen species (ROS) を測定した(図3)。今回はヒト臍帯血静脈内皮細胞とヒト心臓微小血管内皮細胞を用いて測定したところ、何れの内皮細胞においても high glucose (HG : 25 mM) で高い値を得ることができた。

次に、ヒト臍帯血静脈内皮細胞を用いて AGE (advanced glycation end-product) の測定を行い、high glucose (HG : 25 mM) で高い値を得ることができた(図4)。

D. 考察

今回培養に用いた4種類の血管内皮細胞の中で2種類の細胞において細胞内 reactive oxygen species (ROS) や AGE (advanced glycation end-product) がブドウ糖高濃度の状態において上昇することが示された。今後、全ての細胞において更に詳細な検討を進めて、糖毒性の培養細胞解析系を確実なものに広げてゆきたい。

高血糖の際の細胞内 ROS がどこから発生するかに関しては、ミトコンドリアという学説と細胞膜の NADPH オキシダーゼ出るといふ学説が混在している。両者の機構は全く異なり、機序の解明と分子標的の探索のためにはどちらであるかを解明することが必須である。また、細胞障害や細胞死につながる経路の解明も重要である。

ごく最近(2006年1月)、Cell 誌に糖尿病性網膜症における血管傷害機序に関する極めて重要な論文が発表された。それによると、網膜に存在するある種の細胞において AGE 関連の分子が転写に影響を与えて、その結果、

血管に問題が生じることが解明された。解明された機構の中で重要な役割を果たす分子は angiopoietin-1、angiopoietin-2、Tie-2 の系で、血管内皮の成熟に重要なリガンド・受容体系である。今後は、ブドウ糖濃度の上下以外に、この系も取り入れて研究を推進して行くことが重要であると考えられる。

E. 結論

ヒト血管内皮細胞を用いて、ブドウ糖濃度の上昇に伴う細胞障害につながる細胞内機構が再現され、糖毒性の in vitro 解析系が確立された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Nakatsu M, Doshi M, Saeki K, Yuo A: Synergistic effects of dehydroepiandrosterone and retinoic acid on granulocytic differentiation of human promyelocytic NB4 cells. *Int J Hematol* 81:32-38,2005.

Horiuchi A, Yasugi E, Yuo A: Structural requirement of dolichyl phosphate as an apoptosis inducer. *J Oleo Science* 54:341-346,2005.

Saeki K, Yasugi E, Okuma E, Breit SN, Nakamura M, Toda T, Kaburagi Y, Yuo A: Proteomic analysis on insulin signaling in human hematopoietic cells: identification of CLIC1 and SRp20 as novel downstream effectors of insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E419-E428,2005.

Yasugi E, Horiuchi A, Uemura I, Okuma E, Nakatsu M, Saeki K, Kamisaka Y, Kagechika H, Yasuda K, Yuo A: PPAR ligands stimulate myeloid differentiation and lipogenesis in the human leukemia NB4 cells. *Dev Growth Differ* in press, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

無フィーダー分化用培地及び霊長類動物胚性幹細胞からの無フィーダー分化方法
発明者: 張 弘、湯尾 明、佐伯久美子
特願 2004-365221

無フィーダー分化用培地及び霊長類動物胚性幹細胞からの無フィーダー分化方法
発明者: 張 弘、湯尾 明、佐伯久美子
国際出願番号 PCT/JP2005/003474

図 1 各種ヒト初代血管内皮培養細胞

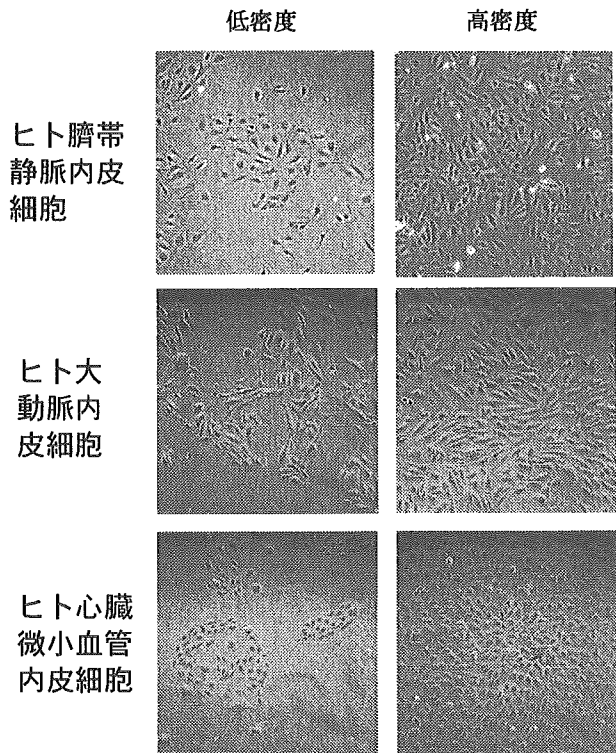


図 2 ウシ大動脈内皮細胞

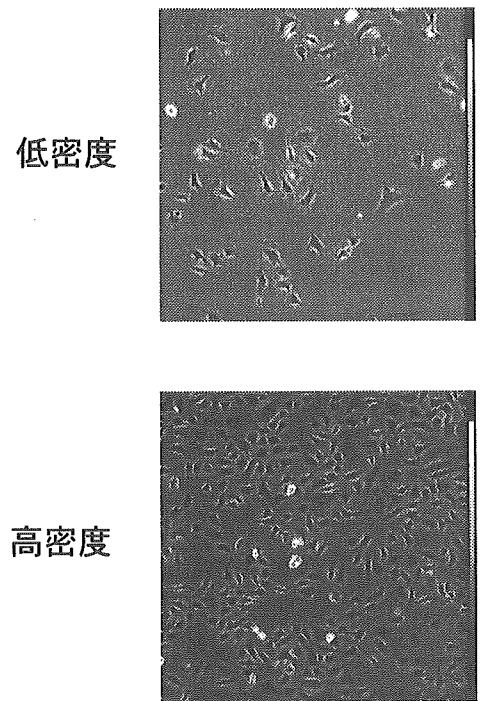


図 3 細胞内ROS

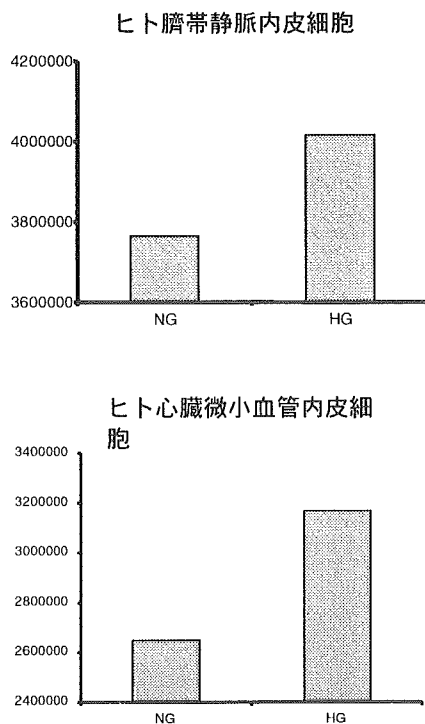
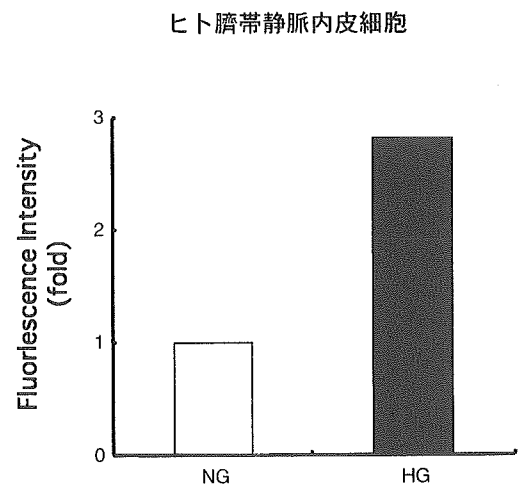


図 4 細胞内AGE



厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担報告書

糖尿病モデルを用いた個体レベルの病態解析

分担研究者 岡村 匡史 国立国際医療センター研究所・室長

研究要旨： LEA/SENDAI ラット（以下、SENDAI ラット）は Long-Evans Agouti (LEA)ラットコロニーから分離した、非肥満型糖尿病ラットである。SENDAI ラットでは加齢と共に、膵島の線維化が雄のみで進行し、経口糖負荷 120 分後の血糖値が 200~300mg/dl であった。血中のインスリン濃度は有意に低下しており、インスリン分泌不全型の軽症糖尿病を発症することがわかった。耐糖能異常は若齢（4 週齢頃）から雌雄とも見られるが、雄ラットでのみ、10-12 週齢で膵島周囲に軽度~中等度の炎症反応が観察された。雄ラットの線維化は週齢と共に進行していた。雌ラットでは耐糖能異常は見られるものの、すべての週齢で膵島の線維化は見られなかった。SENDAI ラットは日本人 2 型糖尿病に酷似した非常にユニークなモデルラットであり、インスリン分泌不全型糖尿病の優れたモデルとなることが期待される。

A. 研究目的

糖尿病は遺伝的要因と環境要因が複雑に絡み合う多因子疾患である。その病像は多彩でしかもきわめて長い経過を経て発症・進展し、病態が変遷していく。そのため、交配や飼育条件の操作により、遺伝因子と環境因子の効果を経時的に調べることができるモデル動物は、糖尿病研究において非常に有用なツールである。我々は非肥満とインスリン分泌能低下を主徴とし、日本人ヒト 2 型糖尿病に酷似した非常にユニークなモデルラット（LEA/SENDAI、以下 SENDAI ラット）を新たに開発した。SENDAI ラットの病態を詳細に解析することにより、ヒト糖尿病の病態モデルを確立する。また経時的な病態解析により、病期診断マーカーの開発を目指す。

B. 研究方法

a) SENDAI ラットの系統維持

1996 年、東北大学医学部（現大学院医学系研究科）附属動物実験施設にて飼育

されていた Long-Evans Agouti (LEA)ラットコロニーから多飲多尿個体が発見された。その後、このコロニーのラットに対し糖負荷試験を行い、120 分血糖値が 200mg/dl 以上の雄ラットを選び、兄妹交配により系統化した。対照として Wistar および Brown Norway (BN) ラット (Japan SLC) を用いた。すべての動物は Specific Pathogen Free (SPF)で飼育され、照明は 12 時間の明/暗サイクル、飼育室の温度は $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ であった。飼料 (Labo MR standard diet; Nosan Co.) および水は自由摂取とした。本研究では 6-11 世代目のラットを用いた。

b) 尿糖および尿蛋白質の測定

尿糖及び尿蛋白質は、1ヶ月毎にウロペーパー AG2 (Eiken Chemical Co.) を用いて測定した。

c) 経口糖負荷試験および血中インスリン濃度の測定

16 時間絶食させたラットに、グルコース 2g/kg 体重になるよう経口投与し、0、30、60、90 および 120 分後にそれぞれ尾

静脈から採血した。血糖値はグルテスト R 血糖測定機 (Sanwa kagaku kenkyusho, Co., Ltd) で測定し、糖負荷後 120 分血糖値が 200mg/dl 以上で、尿糖が陽性の場合を糖尿病 (Diabetes mellitus : DM)、糖負荷後血糖値のピークが 200mg/dl 以上と 120 分血糖値が 140~200mg/dl の両方が備わっている場合を耐糖能異常 (Impaired glucose tolerance : IGT)、DM でも IGT でもないものを正常 (Normal) とした。血中インスリン濃度は遠心により血漿を分離後、インスリン測定キット (Morinaga Milk Industry Co., Ltd) を用いて、ELISA 法により同定した。インスリン初期分泌能 (Δ I.I.:insulinogenic index) は次の計算式により求めた。 Δ I.I.= (30分値インスリン濃度-0分値インスリン濃度) / ((30分値血糖値-0分値血糖値)。

d) インスリン負荷試験

体重 1Kg あたり 0.75U ヒトインスリン (Eli Lilly Japan) を腹腔内投与後、30分毎に上記の方法で血糖値を測定した。

e) 組織病理学的解析

ラットをジエチルエーテルにて麻酔し、左心室から 4%のパラホルムアルデヒド/PBS 固定液を注入し灌流固定した。その後組織を摘出し、さらに 4%のパラホルムアルデヒド/PBS 固定液中に 4°Cで一晩固定後、常法に従ってパラフィン包埋し、切片を作成した。インスリンおよびマクロファージの検出は、それぞれ抗ブタインスリン・モルモットポリクローナル抗体 (DAKO) および Mouse Anti Rat macrophage 抗体 (ED1, Serotec Ltd) を用い、3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB; Nacalai Tesque Inc) 溶液 (0.03% DAB、0.02% 過酸化水素、0.05M Tris-HCl, pH7.6) で発色させた。対比染色としてヘマトキシリンを用いた。

f) 統計解析

データは平均 (Means) \pm 標準偏差 (S.D) で示し、各群間の比較は Student's

t-test 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意水準とした。

(倫理面への配慮)

動物実験を行う際には、動物実験計画書を国立国際医療センター動物実験委員会に提出し、承認を受けた後実施した。動物実験の実施に当たっては、「国立国際医療センターにおける動物実験に関する指針」を遵守し、実験動物に無用な苦痛を与えないよう麻酔薬の投与、保安等に留意するとともに、実験動物の状態を定期的に観察し、必要に応じ適切な処置を講じた。

C. 結果

a) SENDAI ラットの糖尿病発症率

糖尿病発症を経口糖負荷後 120 分血糖値が 200mg/dl 以上、かつ尿糖が陽性であることを診断基準に調べたところ、雄ラットは生後 2 ヶ月齢ですでに耐糖能異常 (IGT) 個体が現れ、6 ヶ月齢で 10.0%、12 ヶ月齢で 61.5%、14 ヶ月齢で 86.6% が糖尿病を発症した (図 1)。これに対し雌では 14 ヶ月齢で 33% の個体が耐糖能異常を示すものの、糖尿病発症個体は見られなかった。

b) 体重曲線

雄の体重は 1 ヶ月齢で 74.2 ± 7.6 g、6 ヶ月齢で 450 ± 25.5 g で、その後の増重は緩やかで、プラトー期で 520 ± 27.7 g を示した。一方、雌は 2 ヶ月齢までは雄とほぼ同様の体重を示し、6 ヶ月齢で 320 ± 15.1 g とピークに達した。雄雌とも急激な体重増加は見られなかった。6 ヶ月齢雄ラットの Body mass index (BMI) は SENDAI ラットで 0.57 ± 0.02 g/cm³、Wistar ラットで 0.59 ± 0.02 g/cm³ と両系統間で有意な差は見られなかった。

c) 尿糖及び尿蛋白陽性率

尿糖は雄では 5 ヶ月齢から検出され、6 ヶ月齢で 50% が陽性を示し、8 ヶ月齢で 100% が陽性になった。一方、雌は 7 ヶ月

齢から陽性が出始め、8 ヶ月齢で 85%、9 ヶ月齢以後は 100%陽性になった (Table 1)。雄の尿蛋白は6 ヶ月齢から検出され、加齢と共に上昇したが、9 ヶ月齢以後は 60%前後であった。雌の尿蛋白は 9 ヶ月齢で 30%検出されたが、その後の上昇は見られなかった。

d) 耐糖能試験およびインスリン分泌

SENDAI 雄ラットでは、経口糖負荷後 30 分値の血糖値は 2 ヶ月齢で既に有意に高かった。120 分値は加齢と共に上昇し、200~300mg/dl の軽症糖尿病を発症していた (図 2)。

SENDAI 雄ラットの糖負荷後の血中インスリン濃度は、2 ヶ月齢では 30 分値は正常コントロールに比べ有意に低く、12 ヶ月齢では空腹時の値を除いた全ての測定値が正常コントロールに比べ有意に低かった (図 3)。2 ヶ月齢と 12 ヶ月齢のラットを用いてインスリン初期分泌能 (Δ I.I.) を求めたところ、SENDAI 雄ラットでは、2 ヶ月齢で既にインスリン初期分泌能が有意に低かった。以上の結果から、SENDAI 雄ラットのインスリン初期分泌能は若年時から低下しており、インスリン分泌不全型の糖尿病を発症する事が示された。

e) インスリン負荷試験

12 ヶ月齢雄ラットの腹腔内にインスリン投与し、インスリンに対する感受性を調べた。インスリン投与前の随時血糖値は SENDAI ラットが有意に高かったが、投与後は血糖値がコントロールとほぼ同じ程度まで下がり、120 分経過しても血糖値の回復がコントロールと有意差が見られなかった (図 4)。従って SENDAI ラットのインスリン感受性は正常であると判断した。

f) 膵臓における組織病理学的検索

SENDAI 雄ラットの膵島の病理学的変化を経時的に観察した。一部の膵島で軽度の炎症像が観察され、浸潤細胞の大部

分はマクロファージであった (図 5)。CD4 および CD8 陽性細胞は観察されなかった (データは示さない)。膵島の数およびサイズは加齢と共に減少していた。膵島の炎症性反応は 6 ヶ月齢で消失し、それ以降は線維化が起こっていた。加齢と共にインスリン陽性細胞の分布が乱れており、インスリン陽性部位の面積も減少していた。線維化を起こした膵島と異なり、線維化が全く認められず形状も非常に小さい膵島が 8 ヶ月齢頃から多く見られた。Wistar ラット (雄) は 12 ヶ月齢で若干線維化は見られたものの、顕著な病変は見られなかった (データは示さない)。

次に、 β 細胞面積 (インスリン陽性部位) が膵臓面積に占める割合を求めた (図 6)。その結果、SENDAI ラットでは 2 ヶ月齢で 1.1%、6 ヶ月齢で 0.93%、8 ヶ月齢で 0.56%、12 ヶ月齢で 0.46%、14 ヶ月齢で 0.3% と加齢と共に膵 β 細胞面積の割合が減少していた。14 ヶ月齢時と 2 ヶ月齢時の β 細胞面積を比較では、SENDAI ラットは 72.7%減ったのに対し BN ラットは 24.4%の減少であった。また、BN ラットに比べ SENDAI ラットでは、2 ヶ月齢で既に β 細胞面積の割合が 36%減少していた。さらに、単位インスリン陽性面積当たりの核の数は、SENDAI ラット: $12.4 \pm 5.1 \times 10^{-3}$ 個/ μm^2 に対し、BN ラット: $14.1 \pm 3.8 \times 10^{-3}$ 個/ μm^2 と両系統間に有意差は認められなかった。 β 細胞面積の減少は 1) β 細胞の数が減少している、2) β 細胞一個当たりの大きさが減少している、という 2 つの可能性が考えられる。インスリン陽性部位の単位面積当たり核の数を比較したところ、個々の細胞の大きさには有意な差はなかった。このことから、 β 細胞面積の減少は、 β 細胞の萎縮ではなく、細胞数の減少によるものと考えられた。

g) SENDAI ラットの初期病態および雌雄差

初期病態を観察するため、4、8、16および24週齢の SENDAI 雌雄ラットに経口糖負荷試験を行った (図7)。BN 雄ラットとの比較では、4週齢ですでに雌雄とも血糖値の上昇が観察され、すべての週齢で有意に血糖値が上昇していた。SENDAI 雌雄ラットを比較すると、4週齢では60分値、8週齢では0分値、16週齢では60および120分値、24週齢では60および120分値で雄の血糖値が有意に高かった。糖負荷後血糖値の雌雄差は、週齢を重ねる毎に大きくなっていく傾向が見られ、特に雄では60分値以降の血糖値下降が鈍くなっていた。雄ラットでのみ、10週齢で膵島周辺に浮腫および少量の好中球・リンパ球の浸潤が観察された (図8)。12週齢ではこれらの病理像に加え、一部の膵島で出血および線維化が観察された。

D. 考察

LEA/SENDAI ラットは、ウイルソン病モデルラットである Long-Evans Cinnamon (LEC) ラットのコントロール系統として使用されていた、近交系 Long-Evans Agouti (LEA) ラットコロニーから発見された。その後、高血糖の個体を選び、兄妹交配により維持している。SENDAI ラットには、次のような特徴があった。

- 1) 糖尿病は雄のみ発症し、糖負荷後の120分血糖値が200—300mg/dlの軽症糖尿病を呈する。
- 2) 耐糖能は加齢に伴い悪化し、14ヶ月齢時の糖尿病発症率は約85%である。
- 3) インスリン初期分泌能低下は若年時から存在し、血中インスリン濃度は低い。しかし、生命維持にインスリン投与は必要でない。
- 4) 肥満は伴わず、インスリン抵抗性はない。
- 5) 膵β細胞は加齢と共に減少し、線維化による膵島の変形・小型化が観察され、膵島周辺にはマクロファージの浸潤が見られた。
- 6) 糖尿病発症には雌雄差が存在す

るが、耐糖能低下は、雌雄とも4週齢から見られた。雄でのみ膵島周辺に軽度～中等度の炎症反応が起こっていた。

ヒト2型糖尿病は遺伝的要因と環境要因が複雑に絡み合い発症する。遺伝様式も単純なメンデル遺伝を示すことは少なく、2型糖尿病は複数の遺伝因子が関与する多因子遺伝病の代表といえる。SENDAI ラット糖尿病も単純なメンデル遺伝には従わない。SENDAI ラットと非糖尿病のBN ラットを交配したF1世代では、糖尿病を発症した個体はおらず、F2世代の発症率は3.1% (7/221匹)であった。さらに、F2世代の糖負荷後血糖値は、正規分布をとることから複数の遺伝因子に支配された量的形質で事が推察される。また、量的形質遺伝子座 (Quantitative Trait Loci; QTL) 解析により、SENDAI ラットでは少なくとも3つの耐糖能異常関連遺伝子座の存在が明らかとなっている。通常のコホート維持過程において、短期間に複数の遺伝子変異が同時に起こることは、確率論的に考えにくい。さらに LEA ラットは近交系であることから、LEA ラットでは、複数の耐糖能に関連するマイナーな遺伝子変異が蓄積されており、さらに遺伝子変異が加わることにより、正常な血糖値をコントロールする機能が破綻したと考えられる。

ヒトの2型糖尿病では、グルコース負荷に対する「早期インスリン分泌」が、遺伝的に規定され、かつ将来の糖尿病発症リスクを高める形質として注目されている。さらに、日本人2型糖尿病の70～80%が遺伝的・体質的素因によるインスリン分泌不全から糖尿病を発症するとされている。SENDAI ラットは、高血糖発症前からインスリン初期分泌能低下が存在し、正常コントロールに比べ血中インスリン濃度が低かった。糖尿病に見られる経口糖負荷後のインスリン初期分泌能低値は、膵島β細胞からの第一相の

インスリン分泌の低下を反映しており、β細胞からのインスリン分泌を解析するための、優れたモデルになると考えられた。さらに、インスリン分泌不全は高血糖になる前から観察される。ことからブドウ糖毒性の影響を排除した解析が可能である。

SENDAI ラットの耐糖能異常は、雌雄とも4週齢から観察され、雄でのみ膵島周囲に炎症性反応、浮腫、出血および線維化が観察された。このことから、グルコース負荷に対する早期インスリン分泌不全は、雌雄とも遺伝的に持っており、雄のみ遺伝素因あるいは環境素因により、膵島周囲に炎症が惹起される。糖尿病発症における雌雄差は、自然発症2型糖尿病モデルラットである、OLETF ラットおよびSDT ラットでも報告されている。性差は、性染色体あるいはテストステロン・エストロジェンなど性ホルモンの関与が考えられるため、今後さらに検討したい。

E. 結論

糖尿病は遺伝的要因と環境要因が複雑に絡み合い、その病態は非常に複雑な多因子疾患である。そのため、一定の環境下で飼育でき、かつ遺伝的コントロールが可能なモデル動物は、糖尿病研究の強

力なツールとなる。特にラットはマウスとヒトの間を埋める動物として重要視されており、自然発症モデルラットの利用価値は高い。SENDAI ラットは日本人2型糖尿病に酷似した非常にユニークなモデルラットである。このラットの病態を詳細に解析することにより、日本人の2型糖尿病に特徴的なインスリン分泌不全のメカニズムを解明する、有用なモデル動物となることが期待される。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Table 1. Incidence of glucosuria and proteinuria in SENDAI rats (%).

Condition	Age (months)							
	5	6	7	8	9	10	11	12
Glucosuria								
Male	13	50	88	100	100	---	---	---
Female	0	0	25	88	100	---	---	---
Proteinuria								
Male	0	14	21	43	57	48	52	66
Female	0	0	0	0	20	20	15	30

N=32 for males; N=35 for females.

Table 2. Insulinogenic index (I.I.) for primary insulin secretion in male SENDAI rats.

Strain	Age (months)	
	2	12
Sendai Rats	0.103 ± 0.07 ^a (n=3)	0.153 ± 0.04 ^b (n=5)
Wistar Rats	0.608 ± 0.191 ^a (n=5)	0.583 ± 0.269 ^b (n=3)

^a and ^b; P < 0.05.

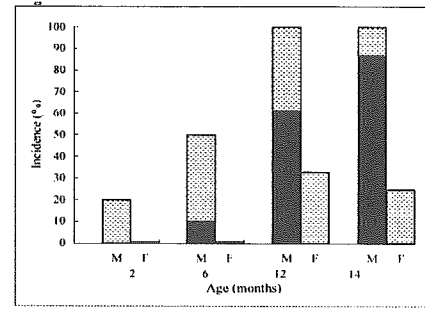


図1. SENDAIラットの糖尿病発症率。ドットおよびブラックバーは、それぞれ耐糖能異常 (IGT) および糖尿病発症率を示す。M:雄ラット、n=32; F:雌ラット、n=26

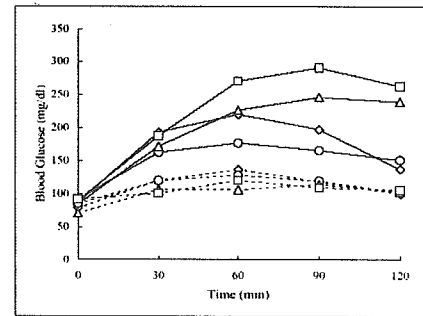


図2. 経口糖負荷後血糖値の加齢変化。実線: SENDAIラット、点線: Wistarラット。◇: 2ヶ月齢、○: 6ヶ月齢、△: 12ヶ月齢および □: 14ヶ月齢

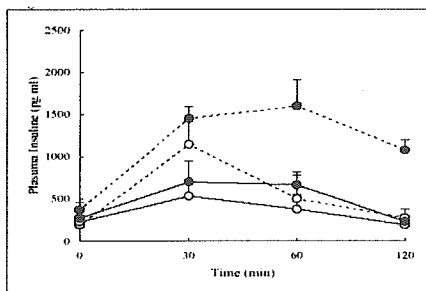


図3. 経口糖負荷後の血中インスリン濃度。実線: SENDAIラット、点線: Wistarラット。○: 2ヶ月齢、●: 12ヶ月齢。

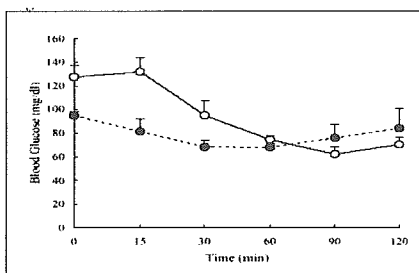


図4. インスリン負荷後の血糖値変化。12ヶ月齢の雄ラットに0.75U/kgのヒトインスリンを腹腔内投与後、血糖値を測定した。実線: SENDAIラット、点線: Wistarラット。

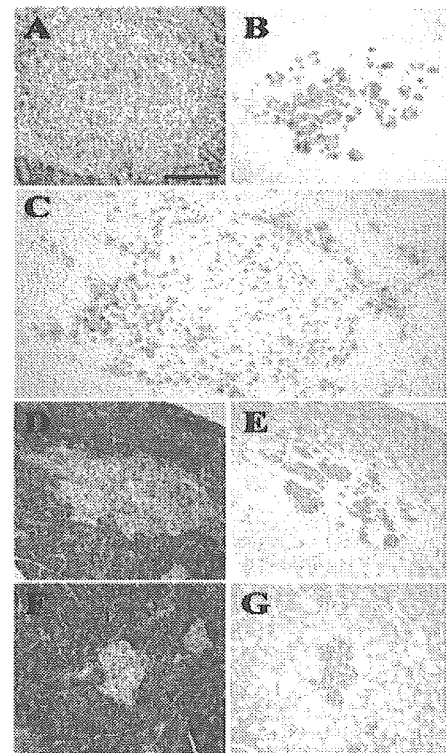


図5. SENDAIラットの膵島病変。A-C: 2ヶ月齢、D-G: 12ヶ月齢。A、DおよびF; H&E染色、B、EおよびG; インスリン免疫染色、C; 抗ED1抗体染色。Scale Bar = 100µm

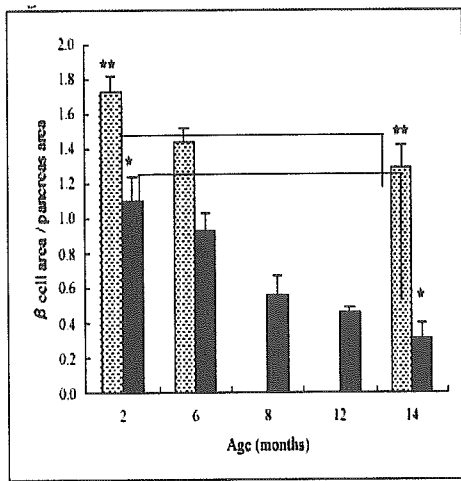


図6. 膵 β 細胞面積の加齢変化。ドットおよびブラックバーは、それぞれ雄のBNラットおよびSENDAIラットの平均インスリン陽性面積を示す。パラフィン包埋した膵臓を、75 μ m毎に切片を作成し、インスリン免疫染色を施した。切片上の全膵臓面積に占めるインスリン陽性面積を β 細胞割合(%)とした。画像解析にはNIH Image Softwareを用いた。
(*, ** $P < 0.05$)

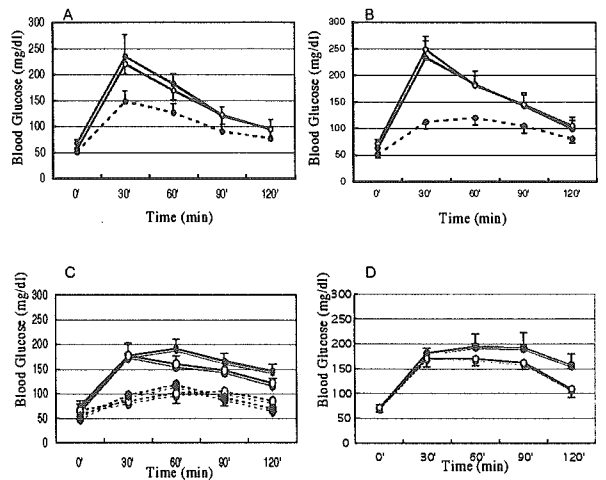


図7. 4週齢(A)、8週齢(B)、16週齢(C)および24週齢(D)における経口糖負荷後血糖値の変化。実線: SENDAIラット、点線: BNラット。
●: 雄、○: 雌。

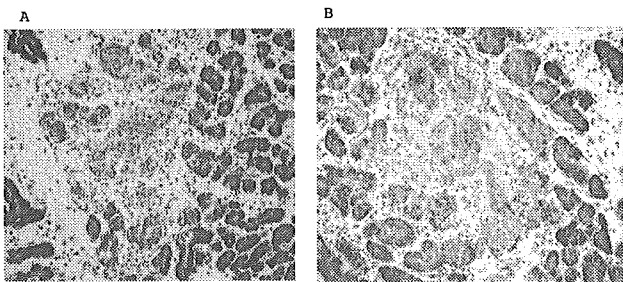


図8. 雄SENDAIラット膵島における初期病変。
10-12週齢では、一部の膵島周辺に炎症性細胞の浸潤が見られ(A)、中等度の炎症、浮腫および出血像が観察された(B)。

モデル系を用いた環境要因の分子メカニズムについての解析
分担研究者 江崎治 国立健康・栄養研究所・部長

研究要旨：運動の糖・脂質代謝改善機序について検討した。その結果、運動による体脂肪減少作用には骨格筋の AMPK、特に $\alpha 2$ AMPK の活性化が必要であることがわかった。また、運動による糖代謝改善には、体脂肪減少以外の機序も関与していること、そのうちの一つに骨格筋での GLUT4 の発現増加が示唆された。運動による PGC-1 α 増加にも $\alpha 2$ AMPK の活性化は関与せず、交感神経系の興奮が関与していることを明らかにした。一方、砂糖の多量摂取は肥満・糖尿病の罹患を増加させるが、何故砂糖摂取が肥満を発症させるか、またその予防法についてはほとんど知られていない。本研究において魚油の摂取が砂糖多量摂取による血中中性脂肪値上昇を抑制すること、及びその抑制効果に DGAT1 の発現量は関与していないことを明らかにした。

A. 研究目的

いわゆる“運動療法”は肥満や糖尿病の予防・治療に有効であり、その事実は米国で行われている大規模調査でも証明されている。運動は骨格筋における糖の取り込みを活性化させ、脂肪酸 β 酸化促進により生体内エネルギーの消費をもたらす。近年、これらの効果が AMP-activated protein kinase (AMPK) や転写共役因子の PPAR γ coactivator-1 α (PGC-1 α) で説明できるとして注目されたが、最近 AMPK の活性化だけでは GLUT4 活性化による糖取り込み亢進（急性効果）を 30~40% しか説明できないことが報告されている。

我々はこれまでに運動の長期効果（GLUT4 増加、ミトコンドリア増加）における AMPK と PGC-1 α の役割についてトランスジェニックマウスを用いて検討し、① AMPK 活性化では glucose transporter 4 (GLUT4) の発現増加や PGC-1 α 量の増加を介したミトコンドリア機能の活性化を説明できないこと、② PGC-1 α の増加だけでは GLUT4 発現量増加を説明できないこと、③ PGC-1 α の増加はミトコンドリア数を著しく増加させ、その機能の活性化に伴い脂肪

の燃焼を促進して抗肥満効果を示すが、一方でインスリン抵抗性の完全な改善作用を示さないことを明らかにした。

そこで本年度は AMPK 活性化による抗肥満効果、すなわち AMPK 活性化を介した脂肪酸のミトコンドリアへの輸送量増加が、運動による脂質代謝亢進を説明できるか検討した。また、運動がどのように PGC-1 α 発現量を増加させるのかを、交感神経系の興奮の側面から検討した。

一方、摂取カロリーが過剰になるとトリアシルグリセロール (TG) が脂肪組織に蓄積し、肥満になり糖尿病に罹りやすくなる。脂肪組織への TG の輸送は、小腸からのキロミクロン経路と肝臓からの超低密度リポ蛋白質 (VLDL) 経路とがある。アシル CoA: ジアシルグリセロール アシルトランスフェラーゼ (DGAT) は、TG 合成の最終段階で働く酵素でジアシルグリセロール (DG) から TG を合成するが、肝臓ではホモロジーのない DGAT1 と DGAT2 の 2 つの酵素の存在が知られている。これまでの研究で、DGAT1 は、ER 内腔で TG 合成を行い VLDL として TG を分泌し、VLDL レセプター (VLDLR) を発現して

いる脂肪組織の重量が増加することを示した。一方 DGAT2 は、細胞質で TG 合成を行い細胞質に蓄積させるので、肝臓で DGAT2 の発現が増加すると脂肪肝になることを示した。

本年度は、高フルクトース食による脂肪肝、肥満。糖尿病発症の予防のための方策を見出すことを目的とし、魚油による予防効果について調べた。

B. 研究方法

運動の肥満およびインスリン抵抗性抑制作用への骨格筋 AMPK の役割

骨格筋の AMPK 活性を抑制した AMPK-DN マウスを用いて、継続的な運動の肥満・糖尿病予防効果（慢性効果）への AMP キナーゼの役割について検討した。野生型と AMPK-DN マウス (C line と E line) にそれぞれ、脂肪エネルギー比 56.7% の高脂肪食を 1 ヶ月間与えて肥満にし、さらに 1 ヶ月以上の間、高脂肪食を与えながら回転かごで飼育 (running) または 30 分間の水泳を 1 日 1 回 (swimming) の 2 種類の「運動をさせる群」と特に運動を強くない「安静群」に分けて、体重変化、体脂肪率、脂肪組織重量や、インスリン抵抗性（経口糖負荷試験、インスリントラランス試験）などを指標に運動の効果への AMPK の役割について調べた。コントロールには高炭水化物食を与えた「安静群」マウスを用いた。

運動による骨格筋での PGC-1 α 発現増加機序の解析

マウスに β 2 受容体刺激薬の clenbuterol を皮下投与し、投与 4 時間後の骨格筋での PGC-1 α 発現量を調べた。また、マウスに β 受容体遮断薬の propranolol を皮下投与し、投与 1 時間後よりトレッドミル運動を 45 分間させた。運動終了 0, 3, 6, 9 時間後の骨格筋における PGC-1 α 発現量を調べた。

肝臓特異的 DGAT1 過剰発現マウスの作製

マウス DGAT1 cDNA を AdenoX ウィルスベクターに組み込み、HEK293 細胞に感染させ、

大量のウィルスを作成した後精製した。この DGAT1 アデノウィルスをマウスに静注し、肝臓特異的に DGAT1 を発現させた。

栄養実験

エサのエネルギー比を炭水化物 70%、タンパク質 20%、脂肪 10% とし、炭水化物部分をコントロール群にはスターチにして、高フルクトース食群にはフルクトースにしてマウスに投与した。魚油摂取実験の場合は、コントロール群ではサフラワーオイルを用い、実験群では DHA, EPA の含有量の異なる 3 種類の魚油を用いた。

血清リポ蛋白の解析

TSKgel LipopropakXL カラムを用いて解析を行った。

C. 研究結果

(1) 運動の肥満およびインスリン抵抗性抑制作用への骨格筋 AMPK の役割

AMPK-DN マウスの摂食量と運動量は、各群で wild-type とほぼ同じであった。

体重変化の推移は、高炭水化物食を与えた群に比べ、高脂肪食を与えた群では、4 週目まで著しく体重が増加した。4 週目以降、運動をさせないと体重はさらに増加し続けたが、running および swimming をさせた群ではそれぞれ、体重増加が有意に抑制された。しかし、これら体重の推移には wild-type と AMPK-DN (C line) マウスの差はなかった。AMPK-DN (E line) では、体重増加量が高脂肪食群で運動ありなりに関わらず、有意に高かった。

試験終了時に DEXA を用いて体脂肪を測定した (図 1)。体脂肪量は、wild-type では、高脂肪食を食べて運動をしないでいると、約 15g になった。これは高炭水化物食群の約 3 倍の重量になったが、高脂肪食を食べていても running や swimming をしていれば、体脂肪は約半分減った。ところが、AMPK-DN では、running や swimming を

しても体脂肪の減りは僅かであった。体脂肪率に換算しても wild-type で running や swimming による体脂肪減少効果はあったが、AMPK-DN ではほとんど認められなかった。マウスを解剖して脂肪組織重量も測定したが、体脂肪量および体脂肪率の変化を裏付ける結果が得られた。これら結果は AMPK-DN の C line でも E line でも同じ傾向が認められた。このように、AMPK-DN マウスでは運動による体脂肪減少効果が消失し、運動の体脂肪減少作用には骨格筋での AMPK の活性が必要であることがわかった。

空腹時血糖値は、wild-type マウスでは、高脂肪食を食べて運動しないしていると 150mg/dl を超える値となったが、高脂肪食を食べていても swimming をしていると血糖値は有意に低下し、高炭水化物食を食べている群と同じレベルになった。驚くべきことに、AMPK-DN マウスでも、swimming で体脂肪が減少しなかったのに、空腹時血糖の低下が認められた。血中インスリン濃度を測定しても同じ傾向が認められた。いずれのマウスでも、高脂肪食を食べて運動しない条件ではインスリン抵抗性を示唆する高インスリン血症が認められ、その傾向は wild-type よりも AMPK-DN マウスで高かったが、swimming をすることによりいずれのマウスでも有意なインスリン濃度の低下が認められた。

経口糖負荷試験の結果を **図 2** に示した。高炭水化物食を食べていたマウスでの曲線に wild-type と AMPK-DN で差はなかった。高脂肪食を食べて運動をしなかったマウスでは、いずれの時間でも高炭水化物食のマウスよりも高い値を示した。この糖代謝の悪化は、AMPK-DN でより顕著に認められた。ところが、高脂肪食を食べても swimming をしていれば、この曲線はより高炭水化物食マウスのものに近づいた。AMPK-DN マウスでも同じように、swimming をしていれば、糖代謝の改善が認められた。すなわち、AMPK-DN マウスでも運動で体脂肪が減らないにもかかわらず、糖代謝の改善効果が認められた。

インスリントレランス試験も行った。高脂肪食を食べて運動をしないしていると、インスリンを投与しても血糖値は低下せず、インスリン抵抗性を示した。しかし、swimming をしていると、インスリン投与による血糖値の低下が認められるようになった。程度の違いは若干あるが、AMPK-DN マウスでも swimming によるインスリン抵抗性の改善が認められた。以上の結果より、AMPK-DN マウスで運動しても体脂肪が減らないにもかかわらず、インスリン抵抗性の改善効果が認められた。このことは、運動によるインスリン抵抗性改善効果は、体脂肪減少効果によるものだけでなく、他の因子の関与を示唆するものであった。

骨格筋に GLUT4 を多めに発現させることができれば、高脂肪食で体脂肪が増加していても、糖代謝の悪化を防ぐことができるとの報告があり、AMPK-DN マウスで体脂肪が減らなくても糖代謝が改善した理由として、骨格筋での GLUT4 発現量増加が考えられた。そこで、wild-type および AMPK-DN マウスに 1 ヶ月間 swimming をさせた後に骨格筋における GLUT4 mRNA 発現量を調べた (**図 3**)。Wild-type では swimming を行うと GLUT4 が約 1.4 倍に増加した。AMPK-DN でも同様の増加が認められ、AMPK-DN マウスでも運動をすれば骨格筋での GLUT4 mRNA 量が増えることがわかった。以上の結果より、AMPK-DN マウスでも GLUT4 量が増加していたことが、体脂肪が減らなくても糖代謝を改善した理由の一つであると考えられた。

(2) 運動による骨格筋での PGC-1 α 発現増加機序の解析

運動による PGC-1 α 発現増加に交感神経系の興奮が関与しているのか調べた。 $\beta 2$ 受容体刺激薬 clenbuterol を投与すると骨格筋での PGC-1 α 発現量が用量依存的に増加した。この増加は β 受容体遮断薬 propranolol 前投与で抑制された (**図 4**)。

45 分間のトレッドミル走行を行うと、運動終了 3 時間後をピークとして骨格筋の

PGC-1 α の発現は増加したが、この増加は β 受容体遮断薬 propranolol 前投与で抑制された(図5)。同様の結果は、AMPK-DN マウスでも認められ、運動による骨格筋でのPGC-1 α 発現増加に交感神経系の興奮が深く関与していること、AMPKの活性化はそれほど重要でないことがわかった。

(3) 魚油摂取による VLDL 分泌への影響

A) 高フルクトース摂取モデル動物を用いた場合

CBA マウス(♂, 7週齢)にコントロール食(サフラワーオイル)、高フルクトース食(サフラワーオイル)、コントロール食(魚油)、高フルクトース食(魚油)を2週間摂取させ、フルクトース摂取によるVLDL-TG分泌増加が魚油により抑制されるかどうか調べた。その結果、魚油によりVLDL-TG分泌は抑制された。この抑制効果は、EPA、DHA含量の異なる魚油を用いてもみられた(図6)。

B) 肝臓特異的 DGAT1 過剰発現マウスを用いた場合

肝臓特異的にDGAT1を発現させ、VLDL-TG分泌及び脂肪重量が増加するVLDL分泌増加型肥満モデルマウスに、10%魚油食を2週間与えたところ、VLDL-TG分泌は抑制された(図7)。さらに脂肪重量の増加が抑制される傾向がみられた(図8)。しかし、DGAT1の発現は魚油摂取により抑制されなかった。

(倫理面への配慮)

研究所の動物管理規約に従い研究を行っている。また、動物に苦痛を与えないため、ネンブタール麻酔下で解剖を行なった。

D. 考察

運動は、骨格筋での糖・脂質代謝を活性化して、肥満やインスリン抵抗性を改善して糖尿病の予防をする。このメカニズムを

説明する有力な説としてAMPK説がある。AMPKの活性化は、脂肪酸のミトコンドリアへの流入量を調節している蛋白質CPT1の働きを増加させ、脂肪の燃焼量を増加させる。それがインスリン情報伝達を阻害している中性脂肪やアシルCoAを減らし、さらに脂肪組織から分泌される血中遊離脂肪酸の燃焼を促進して内臓脂肪を減らすことで、インスリン抵抗性の改善効果を説明する。また、インスリン情報伝達系を介さないGLUT4のトランスロケーション促進も、AMPK活性化によるものとされている。さらに、継続的な運動による慢性効果、すなわちGLUT4量の増加、ミトコンドリア増加もAMPK活性化によるものではないかとの報告もされている。今回、運動による体脂肪減少作用はAMPK説で説明できることがはじめてわかった。今後、AMPK-DNマウスの骨格筋での脂質代謝が本当に低下しているのかを示す必要がある。また、運動のインスリン抵抗性改善作用が、体脂肪減少によるものだけではないことがわかった。運動によって活性化される情報伝達系としてAMPK系以外に、calmodulin kinaseやcalcineurinなどの細胞内Ca²⁺濃度依存的に活性化される情報伝達系があり、それらがGLUT4の発現量を増加させることが別の実験で示されている。従って、運動によるAMPK系以外の経路の活性化と、それに伴うGLUT4発現量増加経路が、インスリン抵抗性予防機序の重要な経路であると推察され、解明が急がれる。運動のもう一つの作用としてPGC-1 α 発現増加を介したミトコンドリア量の増加や、赤筋化がある。今回、データは示さなかったが、AMPK-DNマウスでも運動させるとPGC-1 α 発現増加とそれに伴うミトコンドリアマーカー遺伝子であるCOX2やCOX4の発現増加が認められ、AMPKの活性化ではこの作用は説明できなかった。一方、別の角度からの検討より、交感神経系の興奮がこの作用を説明できる有力な説であることがわかった。

一方、高フルクトース摂取や高スクロース摂取は、VLDL分泌を増加させるという報告がある。ラットやハムスターを用いた

研究報告が多い。今回、CBA や ddY を用いたところ、2週間という短期で、VLDL 分泌増加がみられた。魚油を低濃度（10 エネルギー%）、高フルクトース食に加えると、VLDL 分泌増加は完全に抑制されたことから、清涼飲料などの過剰摂取による肥満には魚油の摂取は有効であることが推定された。肝臓 DGAT1 過剰発現マウスは VLDL 分泌増加を来し、内臓脂肪量が軽度増加することが知られている。このマウスに魚油を摂取させた所、肝臓 DGAT1 過剰発現マウスの VLDL 分泌増加を抑制し、有意ではないが、脂肪組織を増加も抑制したことから、魚油は DGAT1 発現低下とは異なる機序で VLDL 分泌増加を抑制することが推定された。

E. 結論

運動の糖・脂質代謝改善機序について検討した。その結果、運動による体脂肪減少作用には骨格筋の AMPK、特に $\alpha 2$ AMPK の活性化が必要であることがわかった。また、運動による糖代謝改善には、体脂肪減少以外の機序も関与していること、そのうちの一つに骨格筋での GLUT4 の発現増加が示唆された。運動による PGC-1 α 発現増加に交感神経系の興奮が関与していることを明らかにした。日常摂取可能な魚油の摂取量で、フルクトース多量摂取による血中中性脂肪値上昇を抑制することを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) **Increased VLDL secretion and gonadal fat mass in mice over-expressing liver acyl CoA: Diacylglycerol acyl transferase1.** Yamazaki T, Sasaki E, Kakinuma C, Yano T, Miura S, Ezaki O: *J Biol Chem*: 280: 21506-21514, 2005
- 2) **Ovariectomy in Mice Decreases Lipid Metabolism-Related Gene Expression in Adipose Tissue and Skeletal Muscle with Increased Body Fat.** Kamei Y,

Suzuki M, Miyazaki H, Tsuboyama-Kasaoka N, Wu J, Ishimi Y, Ezaki O: *J Nutr Sci Vitaminol*: 51 110-117, 2005

- 3) **Prevention of diet-induced obesity by dietary isomerized hop extract containing isohumulones, in rodents.** Yajima H, Noguchi T, Ikesima E, Shiraki M, Kanaya T, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Oikawa S, Kondo K: *International Journal Obesity*: 29; 991-997, 2005
- 4) **Effects of fish oil feeding and fasting on LXR α /RXR α binding to LXRE in the SREBP-1c promoter in mouse liver.** Nakatani T, Katsumata A, Miura S, Kamei Y, Ezaki O: *Biochim Biophys Acta*: 1736: 77-86, 2005
- 5) **The 2.3 genotype of ESRRA23 of the ERR α gene is associated with a higher BMI than the 2.2 genotype.** Kamei Y, Lwin H, Saito K, Yokoyama T, Yoshiike N, Ezaki O, Tanaka H: *Obes Res*: 13: 1843-1844, 2005
- 6) **Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation.** Watanabe M, Houten SM, Matak C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, Messaddeq N, Harney JW, Ezaki O, Kodama T, Schoonjans K, Bianco AC, Auwerx J: *Nature*: 439: 484-489, 2006

2. 学会発表

1)慢性運動効果への AMP キナーゼの関与

三浦進司、江崎治 第 48 回日本糖尿病学会年次学術集会、シンポジウム 5、運動療法の今日的課題（基礎的研究成績と臨床面の問題点）2005.05.12 神戸ポートピアホテル（兵庫県神戸市）

- 2) **食事性ヒスチジンは脳内でヒスタミンに変換されたのち摂食量を低下させる** 笠岡誠一、後藤浄子、浅見悦子、小川真紀子、笠岡(坪山)宜代、江崎治、土屋隆英、中島滋 第 59 回日本栄養・食糧学会 2005.05 東京

- 3) VLDL増加による内臓肥満；食事成分の影響
山崎聖美、江崎治 第 26 回日本肥満学会 2005.10.14 ホテルロイトン札幌
- 4) 骨格筋における FOXO1 の発現増加は筋量（赤筋）の減少をひき起こす
亀井康富、三浦進司、江崎 治：第 59 回日本栄養・食糧学会 2005.5.17 東京
- 5) Mest/Peg1 imprinted gene enlarges adipocytes
亀井康富、高橋真由美、小川佳宏、江崎治 第 10 回アディポサイエンス 研究会シンポジウム 2005.8.19 大阪
- 6) インプリンティング遺伝子 Mest/Peg1：新しい脂肪細胞肥大化促進遺伝子
亀井康富、高橋真由美、小川佳宏、江崎治 第 26 回日本肥満学会 2005.10.13 ホテルロイトン札幌
- 7) Y. Kamei, S. Miura, O. Ezaki: Skeletal muscle FOXO1 (FKHR)-transgenic mice have less skeletal muscle mass, down regulated type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control: The 35th International Congress of Physiological Sciences. 2005.4.2, San Diego, USA
- 4) 「血中 VLDL-TG 低下剤及びその使用方法」出願番号:特願 2005-299414 で 10 月 13 日に出願
山崎聖美、江崎治
- 5) 「PGC-1 α 発現促進剤及び PGC-1 α 発現抑制剤、並びにそれらの使用方法」出願番号:特願 2006-041387 で 2 月 17 日に出願 三浦進司、江崎治

2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
- 1) 「抗肥満剤」（ポッカコーポレーション中央研究所）出願番号:特願 2005-148500 で平成 17 年 5 月 20 日に出願
江崎治、仲谷照代、三宅義明、福本修一、平光正典、岡田実紀
- 2) 「肥満関連疾患診断方法、Mest 発現調節因子検査方法及び Mest 発現調節因子のスクリーニング方法」国際特許 PCT/JP2005/011810 で 6 月 28 日に出願
高橋真由美、亀井康富、江崎治
- 3) 「AMPK 活性低下マウス及びその使用方法」出願番号:特願 2005-278412 で 9 月 26 日に出願
三浦進司、江崎治

図1 体脂肪率(%)

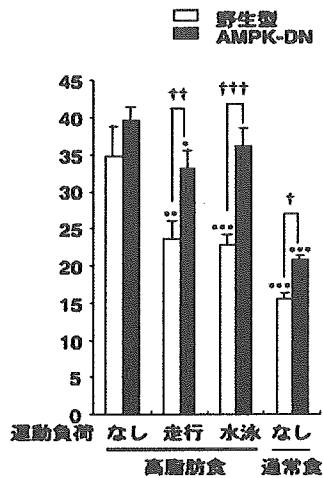


図2 グルコース負荷試験

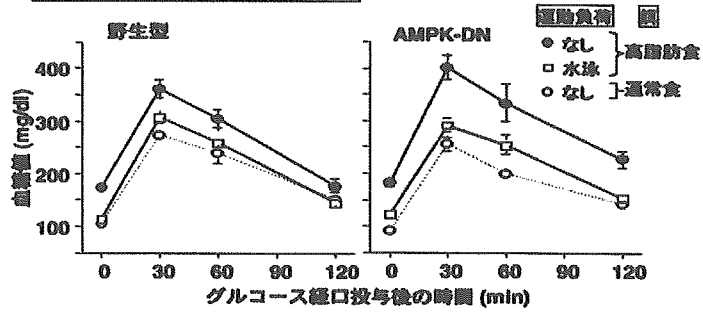
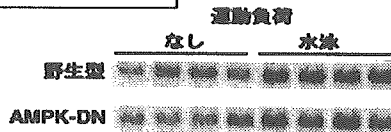


図3 GLUT4発現量



運動しても体脂肪が減らないマウス(AMPK-DNマウス)

運動によって体脂肪が減少するには、骨格筋のAMPキナーゼの活性化が必要であった(図1)。運動の糖代謝改善効果には骨格筋のAMPキナーゼの活性化は必ずしも必要でなく、運動は体脂肪の減少如何にかかわらず糖代謝を改善した(図2)。それは、GLUT4発現増加などの筋肉の変化による(図3)。

図4 β2刺激薬によるPGC-1α発現増加

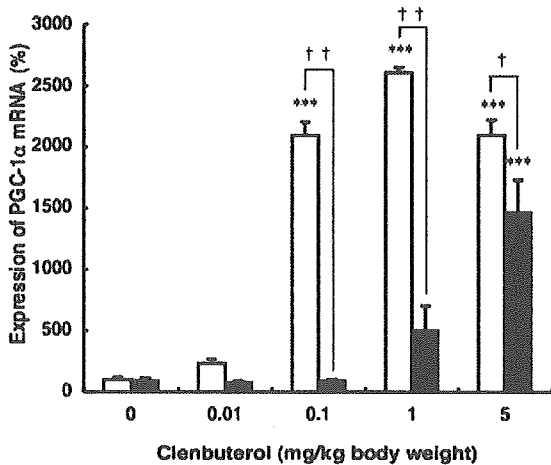
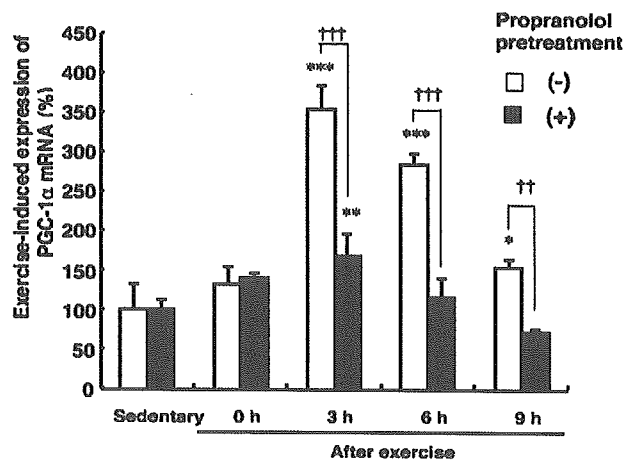


図5 β遮断薬による運動誘導性PGC-1α発現の抑制



運動による筋肉でのPGC-1α発現増加には交感神経系が関与している

β2受容体刺激薬Clenbuterolを投与すると骨格筋でのPGC-1α発現量が用量依存的に増加した。この増加はβ受容体遮断薬propranolol前投与で抑制された(図4)。45分間のトレッドミル走行を行うと、運動終了3時間後をピークとして骨格筋のPGC-1αの発現は増加したが、この増加はβ受容体遮断薬propranolol前投与で抑制された(図5)。

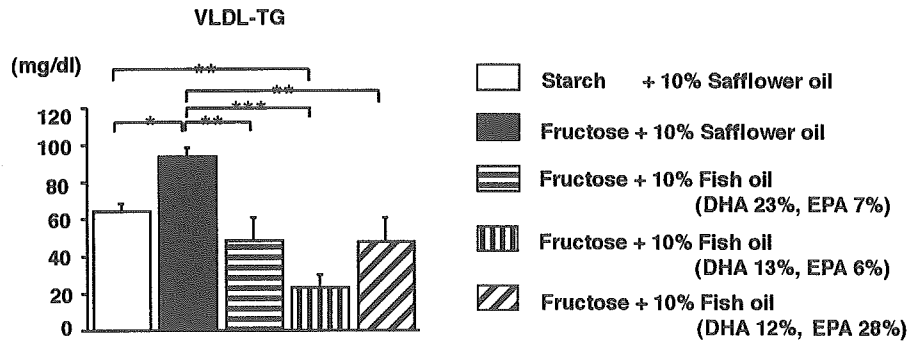


図 6 CBA マウス (♂、7 週齢) にコントロール食 (サフラワーオイル)、高フルクトース食 (サフラワーオイル)、コントロール食 (10%魚油)、高フルクトース食 (10%魚油) を 2 週間摂取させ血中 VLDL-TG 濃度について調べた。EPA、DHA 含量の異なる魚油を用いた。* P<0.05、** P<0.01、*** P<0.001

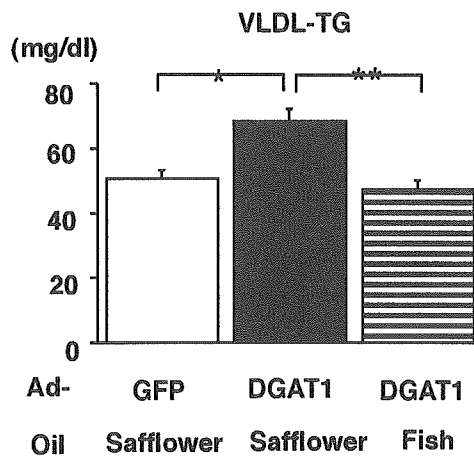


図 7 肝臓 DGAT1 過剰発現マウスに 10%魚油を与え VLDL-TG への魚油の影響について調べた。* P<0.05、** P<0.01

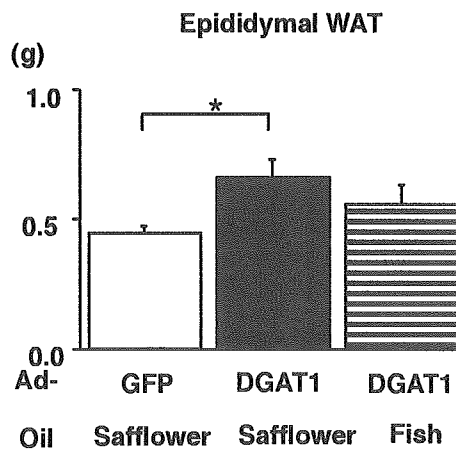


図 8 肝臓 DGAT1 過剰発現マウスに 10%魚油を与え脂肪組織重量について調べた。
* P<0.05

膵臓形成に関与する新規遺伝子群のクローニングと解析に関する研究
分担研究者 浅島 誠 東京大学大学院総合文化研究科・教授

研究要旨：ツメガエルのアニマルキャップからアクチビンとレチノイン酸処理による独自の膵臓形成系を確立し、その系を用いてディファレンシャルスクリーニングやマイクロアレイを用いて、新規に膵臓に発現する遺伝子をクローニングし、機能解析を行った。

A. 研究目的

糖尿病をはじめとする膵臓疾患の治療目的のためには、正常発生において膵臓がいかんして作られるかという器官形成

の分子メカニズム解明が非常に重要な役割を果たす。我々は、ツメガエルの未分化細胞塊であるアニマルキャップを中胚葉誘導活性を持つアクチビンで処理することにより、心臓・腎臓などを始め様々

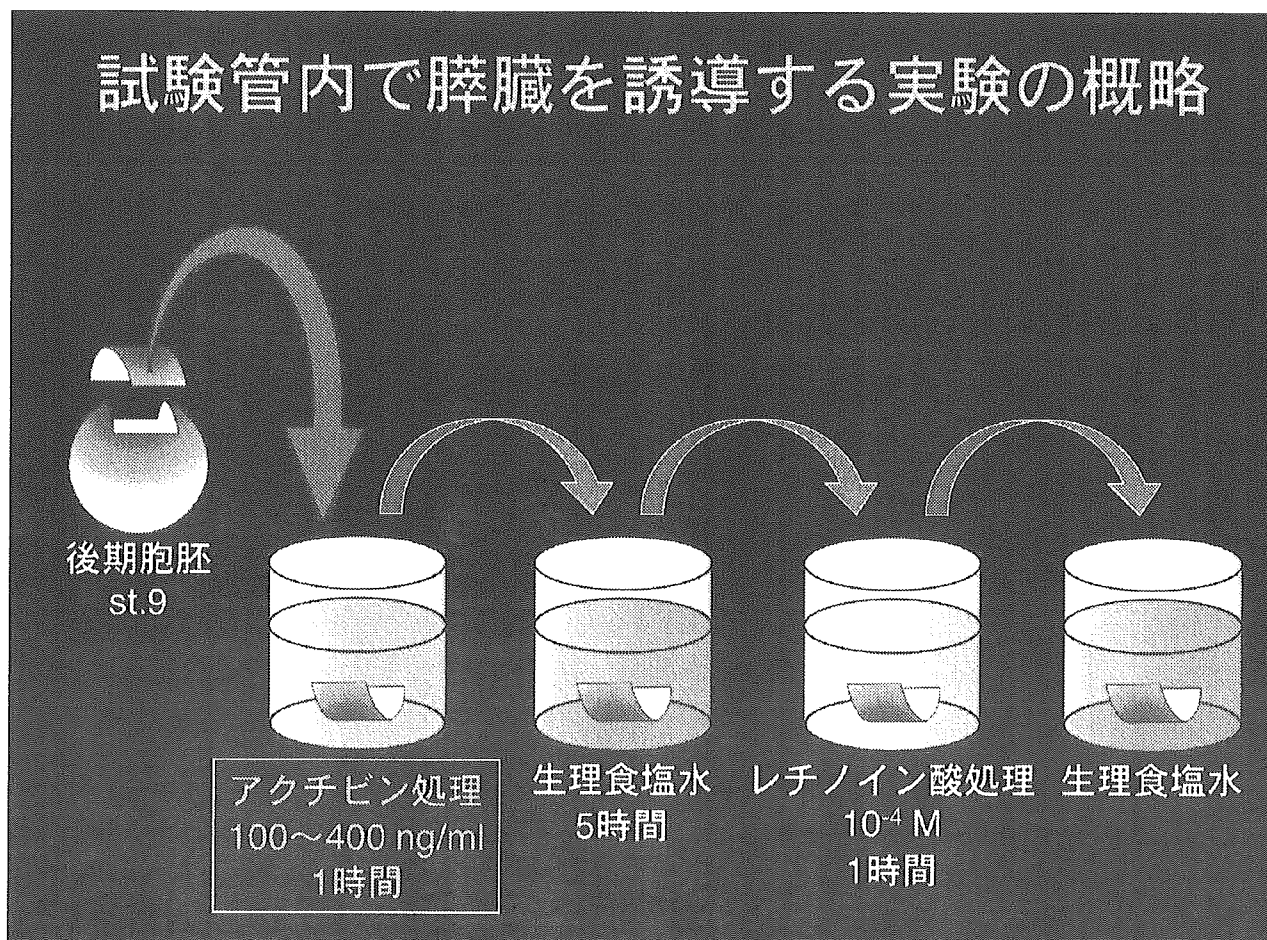


図1 試験管内で膵臓を誘導する実験の概略

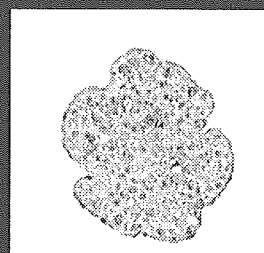
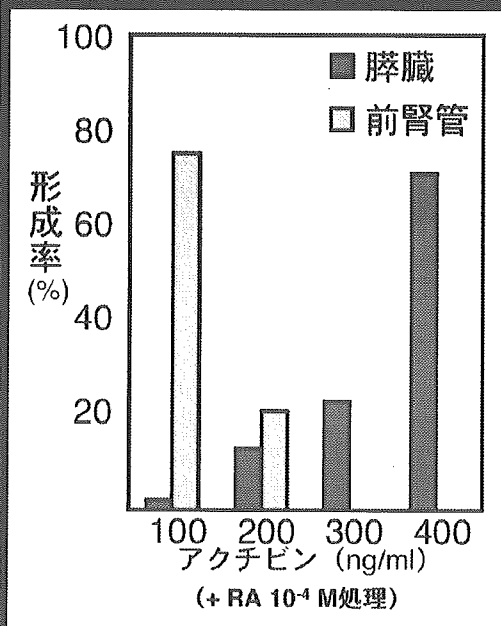
な器官・組織を誘導する系を確立している。これを応用し、ツメガエルの未分化細胞から膵臓を誘導することもまた可能であると思われた。そこで、我々はアクチビンに加えビタミンA誘導体として知られるレチノイン酸を用いて膵臓を誘導する独自の系の確立を試みた。さらに、この誘導系を用い、膵臓形成にどのような遺伝子が関与するかを解明する目的で、ディファレンシャルスクリーニングやマイクロアレイなどの手法を用いて膵臓に発現する新規遺伝子を単離し、発現領域を解析することを試みた。

B. 研究方法

1. アニマルキャップを用いた器官誘導法

中期胞胚期（ステージ-9）まで培養した受精卵から、外科的手法によりアニマルキャップを単離する。次に、アクチビン・レチノイン酸などを含む溶液中に浸し、アニマルキャップを処理する。その後、適切な時期まで培養し、膵臓の形成を組織学的に検討する。また、膵臓が誘導されたアニマルキャップ20個程度から totalRNA を抽出し、cDNA を合成する。これをテンプレートに用い、膵臓特異的な遺伝子の発現をPCRを用いて解析する。

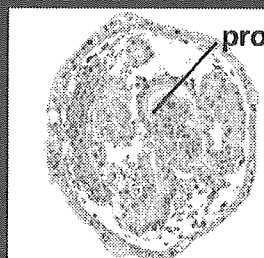
試験管内で誘導した膵臓の形成率と組織像



無処理

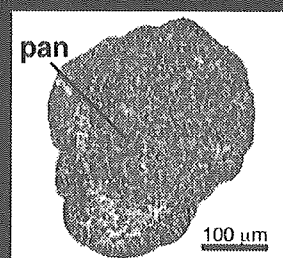


アクチビン 100 ng/ml



アクチビン 100 ng/ml

レチノイン酸 10⁻⁴ M



アクチビン 400 ng/ml

レチノイン酸 10⁻⁴ M

図 2