

## 論文の内容の要旨

論文題目 膵β細胞株 INS-1D を用いた脂肪毒性モデルの確立と  
アディポネクチンによる脂肪毒性解除作用に関する研究

指導教官 門脇孝教授

東京大学大学院医学系研究科

平成12年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 泉 和生

## 要旨本文

### 1. 研究の背景と目的

2型糖尿病は、インスリン分泌不全等の遺伝的な素因に環境的な負荷が加わることによって、インスリン抵抗性と相対的インスリン分泌不全を来たし、発症すると考えられている。典型的には、糖尿病の家族歴のある個体に、過食・高脂肪食・運動不足などの相対的エネルギー過剰という負荷が加わり、脂肪組織の肥大、骨格筋や肝のインスリン抵抗性が惹起される。当初、インスリン分泌は代償性に亢進して正常血糖を維持しながら高インスリン血症を呈するが、次第に相対的にインスリン分泌量が低下して代償不全を来たし、糖尿病を発症する。相対的インスリン分泌不全を来たさなければ糖尿病を発症しないため、糖尿病の予防・治療において相対的インスリン分泌不全への対策は重要である。特に、日本人の糖尿病患者は95%が2型糖尿病であり、また欧米の2型糖尿病患者と比較してグルコースに対するインスリン分泌能力が低いという特徴を有するため、わが国の糖尿病診療を考える上で相対的インスリン分泌不全の重要性は極めて大きいと言える。

高脂肪食や運動不足などの環境因子が糖尿病を発症させる分子メカニズムは、最近になって次第に明らかになり始めた。従来は単なる余剰エネルギーの貯蔵庫として考えられていた脂肪組織が、実はアディポサイトカインと総称される種々の生理活性物質を分泌していることが報告され、その分泌特性の変化が糖尿病発症の重大な要因となることが分かってきた。環境因子によって肥満が生じ、脂肪細胞が大

型化したり内臓脂肪が増加すると、脂肪細胞からの遊離脂肪酸 (FFA)、Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )、Plasminogen Activator Inhibitor-I (PAI-1) の分泌量が増加する一方で、アディポネクチンの分泌量は低下する。その結果、全身のインスリン抵抗性が惹き起こされて、糖尿病発症につながっていく。しかし、相対的インスリン分泌不全の発症についてはいまだ不明なところが多い。

肥満を基礎とする2型糖尿病の相対的インスリン分泌不全では、アポトーシスの増加のために次第に  $\beta$  細胞の数が減少し、個々の  $\beta$  細胞のインスリン分泌も低下していく。

アディポサイトカインのうち、FFA は2型糖尿病発症における  $\beta$  細胞の変化と同様の変化を起こすことができ、長時間刺激でグルコース反応性のインスリン分泌を抑制すること(膵  $\beta$  細胞の脂肪毒性 lipotoxicity)、また膵  $\beta$  細胞のアポトーシスを誘導すること(膵  $\beta$  細胞の lipoapoptosis) が報告されている。さらに、前糖尿病段階から既に高 FFA 血症を多く認めることから、FFA が相対的インスリン分泌不全発症に関与している可能性は以前から指摘されてきた。

また、アディポネクチンは、次第に生体に果たす役割の大きいことが明らかになり、注目を浴びている分子である。アディポネクチンはインスリン抵抗性改善作用や抗動脈硬化作用が報告されており、脂肪組織から分泌されるにも関わらず、その血中濃度は肥満個体や糖尿病患者で減少しているため、血中アディポネクチン濃度の低下がインスリン抵抗性増悪を介して糖尿病発症を促進すると考えられている。相対的インスリン分泌不全についても、アディポネクチンノックアウトマウスにおいてインスリン分泌不全の存在を疑わせる所見を認めたことから、アディポネクチン作用の減少が相対的インスリン分泌不全発症を促進している可能性が考えられた。

本研究では、FFA による脂肪毒性モデルを作成し、脂肪毒性下におけるアディポネクチンの効果とその作用機序について検討することで、相対的インスリン分泌不全発症のメカニズムについて考察することとした。

## 2. 膵 $\beta$ 細胞株 INS-1D を用いた脂肪毒性モデルの確立

膵  $\beta$  細胞は血糖値の上昇、すなわちグルコース刺激に対してインスリンを分泌する。それは、グルコースの細胞内への取り込み、グルコース代謝による ATP の産生、ATP 感受性 K チャネルの閉鎖による脱分極、電位依存性 Ca チャネル開口による細胞質遊離 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇、インスリンの開口放出という過程を経る。INS-1D 細胞は、このような正常なインスリン分泌のシグナル伝達が保たれており、実験が行ないにくい膵  $\beta$  細胞の代用として世界的によく用いられている。本研究でも INS-1D 細胞を用いることとし

た。

相対的インスリン分泌不全の発症において、 $\beta$  細胞数の減少と個々の  $\beta$  細胞のインスリン分泌能低下という2つの要素の時間的な前後関係は明らかでない。しかし、糖尿病の発症予防や治療の観点からは、 $\beta$  細胞数は減少しないが個々の  $\beta$  細胞のインスリン分泌能が低下している段階があれば、介入を行なうのに良いステージということができる。そのため、FFA 刺激によってそのようなステージが出現するのかわかるといふ点について検討した。その結果、以下の特徴を持つ脂肪毒性モデルを確立することができた。

- (1) 細胞を継代した 48 時間後から、0.25-0.35mM のパルミチン酸で 120 時間刺激する。
- (2) グルコース応答性インスリン分泌が大きく低下する。
- (3) (2) は主として細胞のインスリン含量の低下によるもので、分泌率の低下も寄与する。
- (4) グルコース非刺激条件でのインスリン分泌(基礎分泌)はやや増加する。
- (5) アポトーシスは不変または僅かに増加する。
- (6) 細胞数は変化しない。
- (7) パルミチン酸 72 時間刺激ではグルコース応答性インスリン分泌は亢進しているが、120 時間刺激では再現性よく脂肪毒性が生じる。

### 3. アディポネクチンによる脂肪毒性解除作用

前項の脂肪毒性モデルにおいて、アディポネクチンがインスリン分泌能に与える効果を検討した。アディポネクチンはマウス全長アディポネクチンを導入した大腸菌から発現・精製して用いた。

生理的濃度の(全長)アディポネクチンは、INS-1D 細胞に対して、インスリン分泌増強作用を有しており、分泌率を高めることでグルコース応答性インスリン分泌を増強した。この作用は前項の脂肪毒性系ではより顕著に認められ、脂肪毒性を解除した。また、(全長)アディポネクチンはパルミチン酸刺激で低下した細胞内インスリン含量も回復させた。このような効果が、生体内に生理的に存在する物質を生理的濃度で投与することで得られたのは注目すべき結果であった。

次に(全長)アディポネクチンが ATP 産生に与える影響を検討した。通常はグルコースに応答して速やかに細胞内 ATP が増加するが、脂肪毒性下ではこれが強く抑制されていた。脂肪毒性下の INS-1D 細胞を(全長)アディポネクチンで刺激しておくと、グルコース刺激前の段階から ATP 濃度が増加しており、グルコース刺激後の ATP 濃度上昇も回復する傾向が見られた。これらのことから、脂肪毒性下の INS-1D 細胞に対する(全長)アディポネクチンのインスリン分泌増強作用の少なくとも一部は、ATP 産生の増加による可能性が示唆された。ATP 産生に抑制的に作用する UCP2 の発現量は(全長)アディポネ

クチンによって低下しておらず、(全長)アディポネクチンによる ATP 産生の増加は UCP2 発現量の変化によるものではなかった。

一方、非脂肪毒性下の INS-1D 細胞に対しては、(全長)アディポネクチンは ATP 産生に影響を与えなかった。しかし、インスリン分泌量は増加していることから、(全長)アディポネクチンは ATP 産生以後のステップでもグルコース応答性インスリン分泌シグナルを増強していると考えられた。

また、脂肪毒性のマーカーと考えられている細胞内中性脂肪は、(全長)アディポネクチンの投与によって著明に増加していた。脂肪毒性の緩和と細胞内中性脂肪の増加を同時に認めた例はこれまでに見られない。

これらの現象を説明するため、細胞内脂肪酸プールのパーティションとキャパシティの概念を導入し、次の3つの仮定を置いた；(1)細胞質プールの増加はインスリン分泌を刺激する；(2)ミトコンドリアプールが過剰になるとインスリン分泌が抑制される；(3)ER プールはインスリン分泌能に対して中立的である。すると、これまでに報告されている脂肪毒性の現象に一定の説明を与えることができ、また、(全長)アディポネクチンのグルコース応答性インスリン分泌増強作用が脂肪毒性下でより強力なこと、また脂肪毒性解除作用と同時に細胞内中性脂肪含量が増加することについても整合性のある解釈ができた。

#### 4. 考察と総括

以上の結果から、生理的濃度のアディポネクチンの維持または投与が、相対的インスリン分泌不全の予防および治療に有用である可能性が示された。

また、INS-1D 細胞の培地には 10%の FBS を加えているため、通常血漿の 10%程度のアディポネクチンを含んだ培地で培養していると考えられる。この状態では、生理的強度のパルミチン酸刺激で脂肪毒性が認められた。従って、肥満、とくに内臓肥満の状態アディポネクチンの血中濃度が低下すると、膵β細胞の脂肪毒性を招きやすく、相対的インスリン分泌不全の発症リスクが増加している可能性も示唆された。

アディポネクチン作用の減少がインスリン抵抗性を生じさせることは既に報告されている。さらに、本研究ではアディポネクチン作用の減少が相対的インスリン分泌不全の誘発を介することでも2型糖尿病発症の自然史に関与している可能性が示された。インスリン抵抗性と相対的インスリン分泌不全の両者に関与すると考えられるアディポネクチンは、2型糖尿病の自然史において極めて重要な因子である可能性が示唆された。