

論文の内容の要旨

論文題目 高脂肪食誘導性のインスリン抵抗性に対する
膵 β 細胞過形成の分子メカニズムの解明

指導教員 門脇 孝 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 高本 偉碩

1 研究の背景と目的

糖尿病の患者数は欧米諸国のみならずわが国においても急増しており、その制御が社会的にも重要な課題である。糖尿病急増の原因としては、高脂肪食(High Fat diet ; HF)・運動不足に代表されるライフスタイルの変容とそれに伴う肥満が第一に考えられる。実際、わが国における過去 50 年間のエネルギー摂取総量に著変はないが、脂質の割合は右肩上がりに上昇し、それを追う形で肥満人口と糖尿病患者数が急増している。

急増する糖尿病の大部分を 2 型糖尿病が占めるが、その病態を決定する因子はインスリン抵抗性とインスリン分泌低下である。肥満によりインスリン抵抗性が増悪しても、膵 β 細胞の機能・量が代償性に亢進・増加して十分なインスリンを供給できれば、通常は血糖値が正常に保たれる。しかしながら、欧米人と比較して日本人では、民族的にインスリン分泌量が約半分と少なく、「小太り」でも糖尿病を発症するリスクが高い。

糖尿病を制御する上で、インスリン抵抗性に対する代償性の膵 β 細胞量増加のメカニズ

ムを解明することは極めて重要な研究テーマである。しかしながら、HF 誘導性のインスリン抵抗性に対する代償性の膵 β 細胞量増加において、どのような分子メカニズムが存在しているかはこれまで明らかではなかった。

グルコキナーゼ (Glucokinase ; Gck) は、解糖系の律速酵素であり、グルコースをグルコース-6 リン酸に変換する。主として、膵 β 細胞と肝臓に発現しており、膵 β 細胞ではグルコース応答性インスリン分泌 (glucose stimulated insulin secretion ; GSIS) において重要な役割を果たしている。実際ヒトでは、Gck 遺伝子の変異によって若年発症成人型糖尿病 MODY (maturity-onset diabetes of the young)-2 が惹起され、インスリン分泌の低下を認める。我々は以前、Gck をコードする遺伝子のなかで膵 β 細胞特異的な exon1 に注目し、膵 β 細胞特異的に Gck を欠損したマウスを作成した。Gck ホモ欠損マウスは出生直後より著明な高血糖・脱水症状を呈し、間もなく死亡してしまう。一方、Gck ヘテロ欠損マウス (Gck^{+/-}マウス) は長期生存が可能であり、普通食下では野生型マウスと比較して膵 β 細胞量やインスリン抵抗性は同等であるものの GSIS が不良であり、インスリン分泌低下型の耐糖能異常を呈する。

そこで本研究では、急増するヒト糖尿病のひとつのモデルとして、インスリン分泌低下型耐糖能異常を呈する Gck^{+/-}マウスに HF 負荷してインスリン抵抗性を惹起し、耐糖能や膵島、膵 β 細胞量に関して検討した。そして、DNA チップによる膵島の網羅的遺伝子発現解析を行った。さらに、インスリン受容体基質-2 (insulin receptor substrate -2; IRS-2) 欠損マウスならびに膵 β 細胞 IRS-2 過剰発現マウスを用いて、HF 誘導性のインスリン抵抗性に対する膵 β 細胞量増加の分子メカニズムを明らかにした。

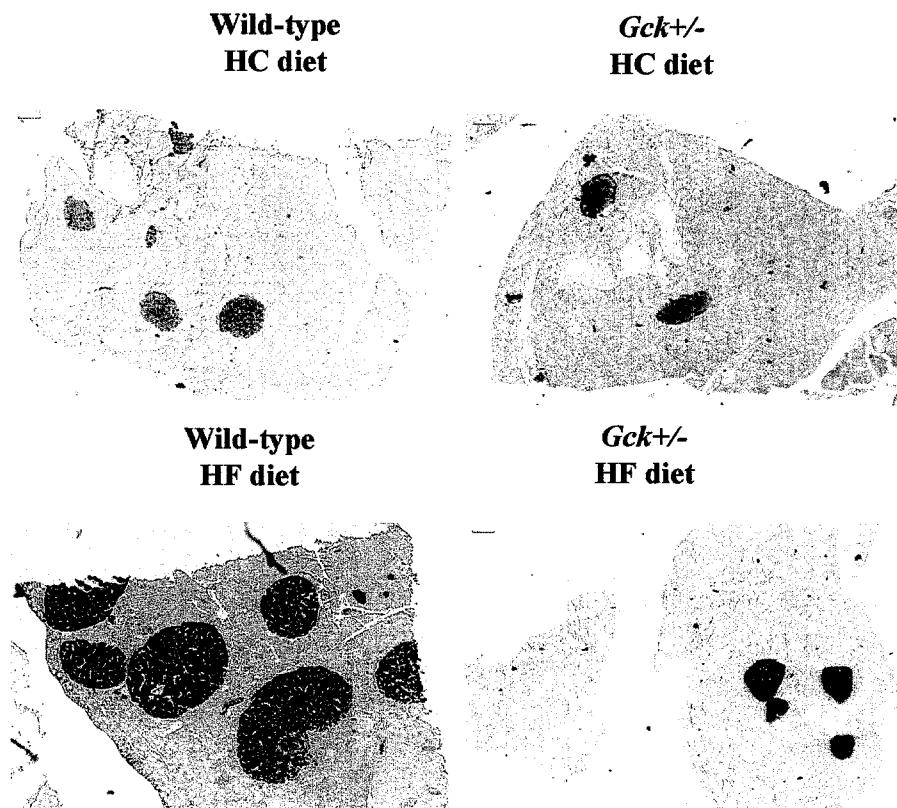
2 結果

1) HF 負荷により Gck^{+/-}マウスは早期に糖尿病を発症する

まず野生型マウス、Gck^{+/-}マウスに HF を負荷した。HF 負荷によって、両群に同程度の肥満とインスリン抵抗性の増悪を認めた。僅か 4 週間の HF 負荷であっても、糖負荷試験を行うと、HF 負荷野生型マウスは代償性高インスリン血症によりほぼ正常な耐糖能を維持したのに対し、HF 負荷 Gck^{+/-}マウスは代償性高インスリン血症を欠き、耐糖能が悪化して糖尿病を発症した。

2) HF 負荷 *Gck*^{+/-}マウスでは膵β細胞の代償性過形成が認められない

HF 負荷を 20 週間にわたり充分に行ったら後、インスリン染色により膵組織像の検討を行った。HF 負荷野生型マウスでは著明な膵島の増大を認めたが、HF 負荷 *Gck*^{+/-}マウスでは膵島の増大を欠いた(図 A)。BrdU 染色、PCNA 染色によって膵β細胞の増殖能を評価すると、HF 負荷野生型マウスでは陽性細胞数が増加していたが、HF 負荷 *Gck*^{+/-}マウスではそのような増加を欠いた。アポトーシス反応には差を認めなかった。また、1 個の膵β細胞が占有する面積には差を認めなかった。以上の結果から、野生型マウスで認められる HF 誘導性のインスリン抵抗性に対する膵島増大は、個々の膵β細胞の肥大(hypertrophy)によるものではなく、数の増加、すなわち代償性過形成(hyperplasia)によるものであり、HF 負荷 *Gck*^{+/-}マウスではこの代償性過形成が障害されているために膵β細胞量が増加しないことが明らかとなった。

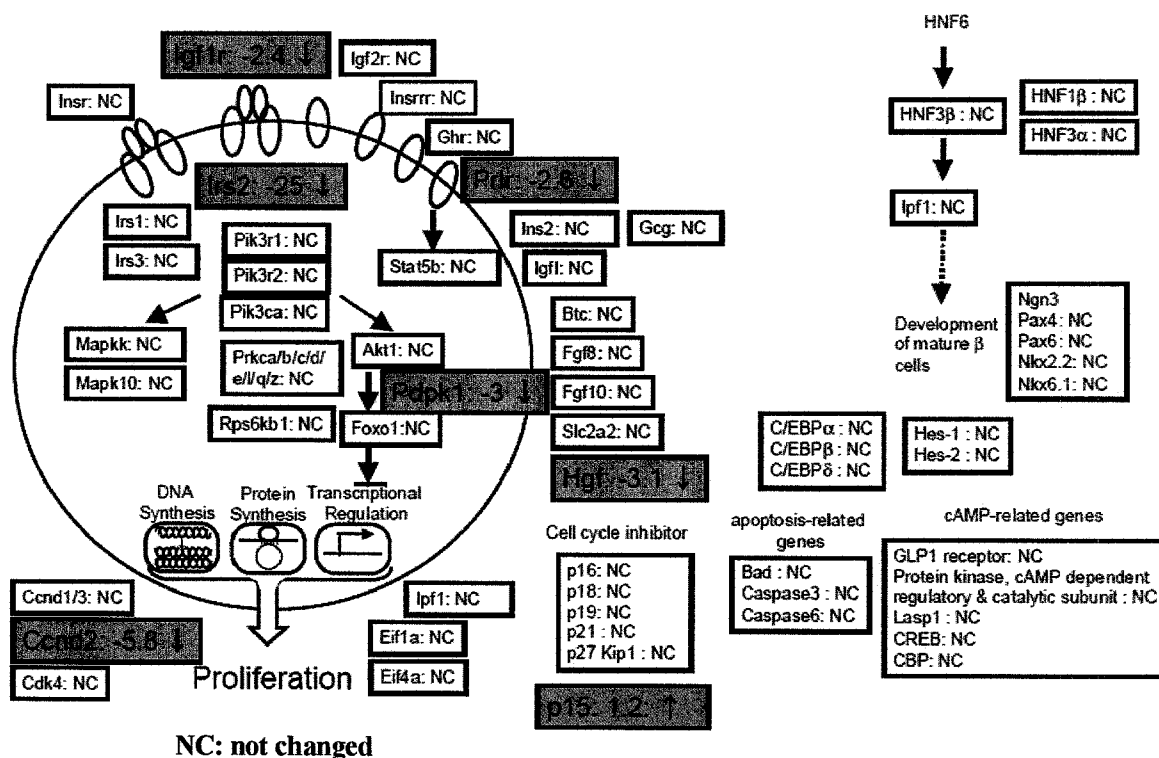


インスリン: 赤色

(図 A) 高脂肪食(HF)・高炭水化物食 (HC) 負荷 20 週後の膵組織像(インスリン染色)

3) HF 負荷マウスの膵島の遺伝子発現プロファイル

そこで、HF 負荷 *Gck*^{+/-}マウスにおける膵β細胞の代償性過形成障害の分子メカニズムを明らかにするべく、HF 負荷野生型マウスと HF 負荷 *Gck*^{+/-}マウスの膵島の遺伝子発現プロファイルを DNA チップにより比較解析した。総数 12490 パネルの遺伝子のうち、HF 負荷野生型マウスに比較して HF 負荷 *Gck*^{+/-}マウスで発現が亢進していたものは 144 個、低下していたものは 134 個あった。極めて興味深いことに、HF 負荷 *Gck*^{+/-}マウスの発現低下遺伝子群のなかで、IRS-2 の発現レベルは-25 倍と最も低下していた。その上流に位置する IGF-I 受容体 (insulin-like growth factor- I receptor) は-2.4 倍に、その下流に位置する 3-phosphoinositide dependent protein kinase-1(Pdkp-1)は-3 倍に低下していた。このほか、プロラクチン受容体(prolactin receptor; *Prlr*)は-2.6 倍に、hepatocyte growth factor (HGF)は-3.1 倍に、Cyclin D2 は-5.8 倍に各々発現レベルが低下していた(図 B)。



(図 B) 高脂肪食負荷 20 週後の *Gck*^{+/-}マウス膵島の遺伝子発現プロファイル

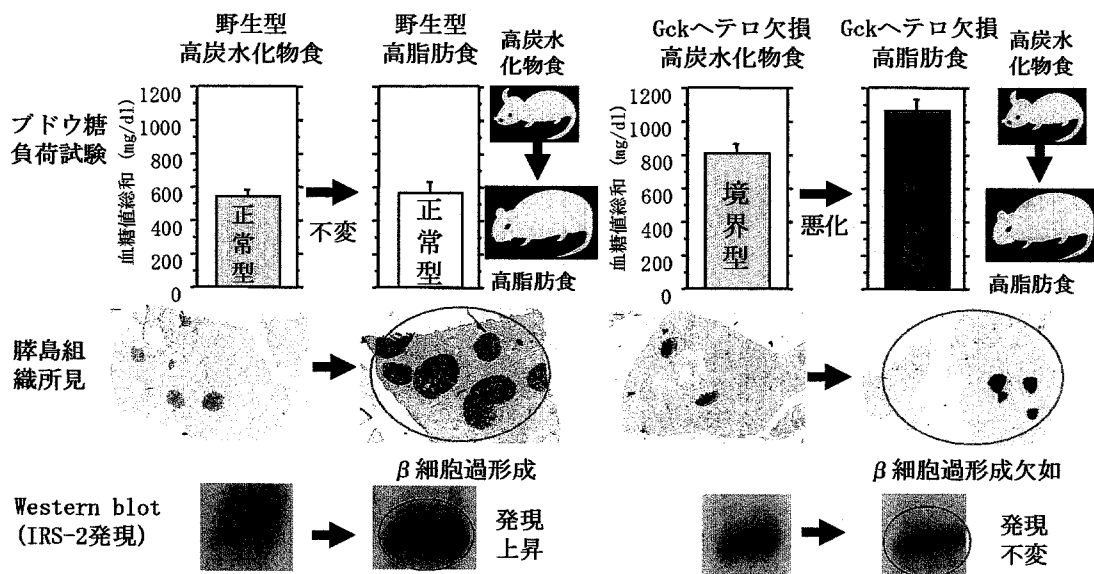
RT-PCR ならびに蛋白レベルによる検討でも、HF 負荷野生型マウスで認めた IRS-2 や IGF-I 受容体の発現亢進を HF 負荷 *Gck*^{+/-}マウスは欠くことが確認された(図 C)。以上から、HF 誘導性のインスリン抵抗性に対する膵β細胞の代償性過形成に、IRS-2 が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

4) HF 負荷 IRS-2 欠損マウスは膵β細胞増加が不十分である

次に、HF 誘導性のインスリン抵抗性に対する膵β細胞過形成において、IRS-2 が果たしている役割をより直接的に検証するために、IRS-2 の発現低下モデルとして IRS-2 ヘテロ欠損(IRS-2+/-)マウスに HF 負荷して解析した。負荷 10 週で IRS-2+/-マウスは野生型マウスと同程度の肥満とインスリン抵抗性の増悪を認めた。そのときの膵島最大長径・膵島β細胞面積を評価すると、HF 負荷 IRS-2+/-マウスは HF 負荷野生型マウスに比較して増加量が少なかった。さらに、IRS-2 ホモ欠損(IRS-2-/-)マウスについても同様に検討した。IRS-2-/-マウスは僅か 5 週間の HF 負荷でさらに糖尿病が悪化するが、HF 野生型マウスで認められた膵島最大長径の増加が HF 負荷 IRS-2-/-マウスでは認められなかった。従って、HF 誘導性のインスリン抵抗性に対する膵β細胞代償性過形成において、IRS-2 が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

5) Gck+/-マウスの膵β細胞に IRS-2 を補充すると HF 負荷時の膵β細胞代償性過形成能と耐糖能が部分的に改善した

最後に、膵β細胞で IRS-2 を 2~3 倍程度に過剰発現するマウス(Rip-IRS-2-Tg)と Gck+/-マウスとを交配し、膵β細胞に対する IRS-2 の補充によって HF 負荷 Gck+/-マウスの表現型が rescue されるか検討した。HF 負荷 6 週において、膵β細胞 IRS-2 過剰発現 Gck+/-マウスは Gck+/-マウスと比較して、膵β細胞面積の増加・BrdU 陽性細胞数の増加を認め、糖負荷試験では耐糖能の部分的な改善を認めた。さらに、HF 負荷 20 週後の糖負荷試験においても、膵β細胞 IRS-2 過剰発現 Gck+/-マウスは Gck+/-マウスと比較して、インスリン分泌と耐糖能の部分的な改善を認めた。

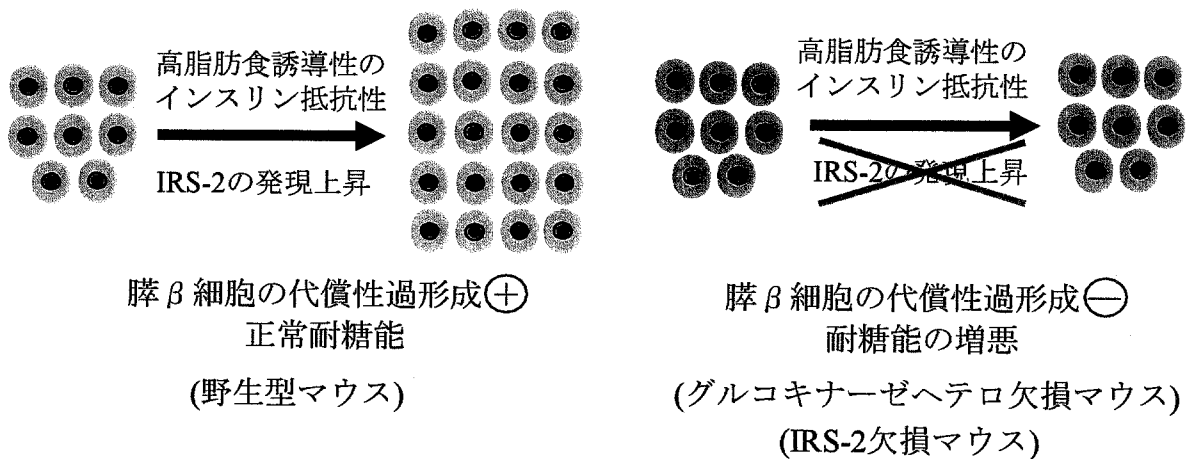


(図 C) 高脂肪食誘導性のインスリン抵抗性に対する膵β細胞の代償性過形成に Gck・IRS-2 は重要である

3 結論

Gck は、これまで膵β細胞のグルコース・センサーとして機能し、GSIS に重要な役割を担っていることは知られていたが、膵β細胞量の調節に関与しているとは認識されていなかった。本研究の結果から、Gck は HF 負荷時の膵β細胞量の調節、すなわち代償性過形成にも関与していることが初めて明らかとなった。そして、HF 負荷マウス膵島を用いた DNA チップによる網羅的遺伝子発現解析により、インスリンシグナルの鍵分子である IRS-2 が、HF 誘導性のインスリン抵抗性に対する膵β細胞の代償性過形成において重要な役割を担う可能性が示唆された。さらに、IRS-2 欠損マウスと膵β細胞 IRS-2 過剰発現マウスを用いた解析から、実際に IRS-2 が重要な役割を担うことが明らかとなった(図 D)。

今後、Gck・IRS-2 の両分子をターゲットにした研究が、糖尿病の画期的な治療法の開発に結実するものと強く期待している。



(図 D) 高脂肪食誘導性のインスリン抵抗性に対する膵β細胞の代償性過形成