



Compensatory hyperinsulinemia in high-fat diet-induced obese mice is associated with enhanced insulin translation in islets

Kanno, Ayumi

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2015-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6456号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006456>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Compensatory hyperinsulinemia in high-fat diet-induced obese mice is associated with enhanced insulin translation in islets

高脂肪食負荷マウスの高インスリン血症は膵β細胞におけるインスリン合成亢進に起因する

神戸大学大学院医学研究科 糖尿病・内分泌・総合内科学分野

糖尿病・内分泌内科学部門

(指導教員：小川 渉教授)

神野 歩

肥満や生活習慣病人口の急速な増加は世界中で重大な問題となっている。アジア諸国においては、生活習慣の欧米化に伴って肥満や生活習慣病人口が特に増加しているが、日本においては、脂肪摂取量の増加に比例し 2 型糖尿病の有病率が増加している。高脂肪食を摂取することによって肥満やインスリン抵抗性、耐糖能異常が引き起こされることが知られている。さらに膵β細胞では、高脂肪食負荷によって惹起された全身のインスリン抵抗性によって代償反応が生じる。既報によると、動物実験では膵β細胞の代償反応として膵β細胞量の増加や膵β細胞におけるカルシウムシグナルの亢進とインスリンの開口分泌の増強などが起こることが報告されている。一方、高脂肪食負荷によって膵β細胞におけるインスリンの生合成にどのような変化が認められるかどうかについては現在までに報告がない。

そこで、高脂肪食負荷時に起こる膵β細胞の代償反応についてさらに明らかにすることを研究の目的とした。C57BL/6 マウスを通常食(脂肪 4.8%)もしくは高脂肪食(脂肪 30.3%)下に飼育し、膵β細胞におけるインスリン翻訳の程度について調べることを研究の目的とした。高脂肪食下に飼育されたマウスにおいては、通常食下に飼育されたマウスと比較して有意に体重が増加した。また、高脂肪食下に飼育されたマウスにおいては、有意なインスリン分泌の亢進と耐糖能異常が認められた。インスリン負荷試験の結果からもインスリン抵抗性が著明に増大していることが示された。高脂肪食負荷マウスの膵β細胞量は約 2 倍に増加していた。これらの結果から、高脂肪食で飼育することにより、マウスのインスリン抵抗性が増大し、インスリン分泌が増強していることが明らかとなった。

次に、膵β細胞内のインスリン貯蔵量についてインスリンコンテンツの測定や電子顕微鏡を用いて観察したインスリン顆粒数によって評価した。インスリンコンテンツは、ELISA 法で測定したインスリン値を DNA 量で補正した。高脂肪食下に飼育したマウスの膵β細胞では、インスリンコンテンツが有意に増加しており、インスリン顆粒数は明らかに増加していた。すなわち、高脂肪食下に飼育することにより、マウスの膵β細胞ではインスリンの貯蔵量が増加することが明らかとなった。

さらに、インスリン需要増大が膵β細胞においてインスリン遺伝子に与える影響について調べた。ラット膵β細胞株である INS-1 細胞に高グルコースを負荷して解析したところ、インスリン遺伝子には特に変化が認められなかったが、インスリンの蛋白レベルは有意に増加した。一方、高脂肪食負荷で血中に増加することが知られているパルミチン酸を INS-1 細胞に負荷しても、インスリン遺伝子、インスリンの蛋白レベルともに変化は認められなかった。次に、通常食及び高脂肪食下に飼育したマウスの膵島を単離し、同様にインスリン遺伝子とインスリン蛋白について解析したところ、インスリン遺伝子の発現レベルには有意な差は認められなかったが、インスリンの前駆体であるプロインスリンの蛋白レベルは高脂肪食下に飼育したマウスの膵島で有意に発現亢進していた。このことから、高脂肪食負荷ではインスリンの転写レベルではなく、翻訳レベルが亢進している可能性が考えられた。

現在までの報告では、膵 β 細胞におけるインスリンの翻訳レベルの評価は、放射性同位体である $[^{35}\text{S}]$ -メチオニンのインスリン蛋白中への取り込みを解析することにより行われてきたが、今回われわれは $[^{35}\text{S}]$ -メチオニンの代わりに化学物質である L-Azidohomoalanine(AHA)のインスリン蛋白中への取り込みをみることで新生インスリンについて解析することとした。それぞれの条件で INS-1 細胞や単離膵島に 30 分間 AHA を取り込ませた後に蛋白を回収し、抗インスリン抗体で免疫沈降し、biotin-alkyne で標識し、streptavidin-HRP で検出した。高グルコース負荷をした INS-1 細胞においては、インスリン中の AHA の取り込みが有意に増加し、この取り込みは蛋白翻訳阻害剤によって抑制された。同様の方法で通常食下飼育マウスと高脂肪食下飼育マウスの単離膵島における新生インスリンについて評価を行ったところ、高脂肪食下飼育マウスの膵島において AHA の取り込みが有意に増加していた。つまり、高脂肪食下に飼育したマウスの膵島ではインスリンの翻訳は著明に亢進することが明らかとなった。

今回の研究で、高脂肪食下に飼育したマウスにおいてはインスリン抵抗性が増大し、インスリン分泌が亢進していること、膵島においてはインスリンの貯蔵量が増加しており、インスリン合成も亢進していることが明らかとなった。さらに、AHA を用いたインスリン翻訳の解析は安全かつ有用な方法であることが示された。近年、膵 β 細胞への小胞体ストレスの亢進はインスリン翻訳を抑制することが報告されているが、今回我々が用いた方法を小胞体ストレス診断の早期マーカーとして使用できる可能性があると考えられる。インスリン抵抗性増大状態における膵 β 細胞量増加のメカニズムとして、神経を介した臓器間連関による調節が報告されている。しかし、高脂肪食下の膵 β 細胞において、どのようなメカニズムでインスリン翻訳が亢進するのかは不明である。既報によると、分泌されたインスリン自身はインスリン合成に変化を与えないためインスリンがメディエーターとなることは考えにくい。グルコースはインスリン翻訳を亢進させるため、高脂肪食下におけるインスリン翻訳亢進のメディエーターである可能性はあるが、その他の神経性因子や内分泌因子がメディエーターとなっている可能性も考慮される。我々は以前、肥満、インスリン抵抗性亢進モデルである db/db マウスの膵島において、リボソーム関連分子の発現が増加していることを報告したが、高脂肪食下に飼育されたマウスの膵島においても同様の遺伝子の増加からインスリン翻訳亢進を引き起こしている可能性がある。

今回の研究により、高脂肪食負荷による膵 β 細胞の代償機構として、膵 β 細胞量の増加やインスリン分泌能の増加だけではなく、インスリン翻訳の亢進が重要であることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 2520 号	氏 名	神 野 歩
論 文 題 目 Title of Dissertation	Compensatory hyperinsulinemia in high-fat diet-induced obese mice is associated with enhanced insulin translation in islets 高脂肪食負荷マウスの高インスリン血症は膵β細胞におけるインスリン合成亢進に起因する		
審 査 委 員 Examiner	主 査 平 田 健 一 Chief Examiner 副 査 西 村 善 博 Vice-examiner 副 査 河 野 誠 司 Vice-examiner		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

【目的】

高脂肪食の摂取は肥満やインスリン抵抗性、耐糖能異常を引き起こし、さらに全身のインスリン抵抗性によって膵β細胞では代償反応が起こる。動物実験では膵β細胞の代償反応として膵β細胞量の増加やインスリンの開口分泌の増強などが報告されている。一方、高脂肪食負荷によってインスリンの生合成にどのような変化が認められるかについては現在までに報告がない。申請者らは、高脂肪食負荷時に起こる膵β細胞の代償反応についてさらに明らかにすることを目的に本研究を行った。

【方法及び結果】

C57BL/6 マウスを通常食 (脂肪 4.8%) もしくは高脂肪食 (脂肪 30.3%) 下に飼育し解析した。高脂肪食下に飼育されたマウスは、通常食下に飼育されたマウスと比較し体重増加とインスリン分泌の亢進、インスリン感受性の低下を示した。これらの結果から、今回の高脂肪食負荷マウスでインスリン抵抗性が増大し、インスリン分泌が亢進していることが確認された。

次に、膵β細胞内のインスリン貯蔵量についてインスリンコンテンツの測定や電子顕微鏡を用いて観察したインスリン顆粒数によって評価した。高脂肪食下に飼育したマウスの膵β細胞では、インスリンコンテンツの増加と、インスリン顆粒数の増加が認められた。すなわち、高脂肪食下に飼育することにより、マウスの膵β細胞ではインスリンの貯蔵量が増加することが明らかとなった。

さらに、インスリン需要増大が膵β細胞においてインスリン遺伝子に与える影響について調べた。ラット膵β細胞株である INS-1 細胞に高グルコースを負荷したところ、インスリン遺伝子には変化が認められなかったが、インスリンの蛋白レベルは有意に増加した。一方、高脂肪食負荷で血中に増加するパルミチン酸を INS-1 細胞に負荷しても、インスリン遺伝子、蛋白レベルに変化は認められなかった。次に通常食及び高脂肪食下に飼育したマウスの膵島を単離し同様の解析を行ったところ、インスリン遺伝子の発現レベルには有意な差は認められなかったが、インスリンの前駆体であるプロインスリンは高脂肪食下に飼育したマウスの膵島で有意に発現亢進していた。高脂肪食負荷ではインスリンの転写レベルではなく、翻訳レベルが亢進する可能性が考えられた。

既報では、膵β細胞におけるインスリンの翻訳レベルの評価は、放射性同位体である^[35S]-メチオニンのインスリン蛋白中への取り込みを解析することにより行われてきた。今回われわれは^[35S]-メチオニンの代わりに化学物質である L-Azidohomoalanine(AHA)のインスリン蛋白中への取り込みを解析することで新生インスリンの評価を行った。通常食下飼育マウスと高脂肪食下飼育マウスの単離膵島で比較した所、高脂肪食下飼育マウスの膵島において AHA の取り込みが有意に増加していた。つまり、高脂肪食下に飼育したマウスの膵島ではインスリンの翻訳は著明に亢進することが明らかとなった。

【結論】

本研究は、高脂肪食負荷による膵β細胞の代償機構として膵β細胞量の増加やインスリン分泌能の増加に加えて、インスリン翻訳の亢進が重要であることを示したものであり、高脂肪食負荷による糖尿病の膵β細胞の病態を解明した重要な成果であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。