

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659464

研究課題名（和文） 脂肪酸伸長酵素 Elovl6 欠損マウスの 2 型糖尿病の発症・進展抑制機序の解明

研究課題名（英文） Role of fatty acid elongase Elovl6 in the sucrose preference formation

研究代表者

松坂 賢 (MATSUZAKA TAKASHI)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：70400679

研究成果の概要（和文）：2 型糖尿病の発症・進展における脂肪酸伸長酵素 Elovl6 の意義を検討した。肥満・2 型糖尿病を発症する *db/db* マウスと Elovl6KO マウスを交配し作成した *db/db-Elovl6KO* マウスの血糖値、インスリン値、HbA1c 値の測定、経口糖負荷試験、膵臓ランゲルハンス氏島（ラ氏島）の免疫組織化学染色、遺伝子発現解析を行い、膵β細胞の性状と機能を検討した。*db/db-Elovl6KO* マウスは *db/db* マウスと同様に肥満を呈するが、高血糖および耐糖能異常の改善が認められた。また、*db/db* マウスに比べて *db/db-Elovl6KO* マウスではラ氏島の肥大とそれに伴う血中インスリン値の上昇が認められた。*db/db-Elovl6KO* マウスのラ氏島では、炎症性サイトカインやケモカインの遺伝子発現の減少が認められた。Elovl6 は 2 型糖尿病における膵β細胞量の減少や機能不全に関与することが明らかとなり、Elovl6 の阻害は 2 型糖尿病の新しい治療標的となる可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the effects of Elovl6 deletion in leptin receptor-deficient *db/db* mice, a model of type 2 diabetes. We analyzed the body weights, serum glucose, insulin and HbA1c levels of *db+/m*, *db/db*, and *db/db-Elovl6KO* mice. We also performed immunohistochemical staining and quantitative RT-PCR analysis of islet. Although the obesity of *db/db-Elovl6KO* mice was similar to *db/db* mice, development of hyperglycemia and glucose intolerance was dramatically improved. Histological examination indicated that Elovl6 deletion was associated with increased islet mass in *db/db* mice, and this correlated with serum hyperinsulinemia and glucose-responsive insulin secretion. The expression of several inflammatory genes such as TNF- α and MCP-1 were reduced, and the expression of genes related to β cell function such as PDX-1 and insulin were increased in islets from *db/db-Elovl6KO* mice compared with *db/db* mice. These results suggest that Elovl6 is an important factor on both beta-cell mass and function in T2D. Elovl6 inhibition can be a novel therapeutic target for T2D.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：内分泌学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：脂肪酸、嗜好性

1. 研究開始当初の背景

我が国の糖尿病の 90%以上を占める 2 型

糖尿病の発症と進展には、肥満を含めたインスリン抵抗性と、それに対する膵β細胞の代

償性インスリン分泌の破綻による膵β細胞機能不全が関与するといわれている。インスリン抵抗性の発症や膵β細胞機能不全のメカニズムとして、細胞内脂肪酸代謝異常が深く関わっていると考えられている。申請者は脂質合成転写因子 SREBP の標的遺伝子として新規脂肪酸伸長酵素 Elov16 をクローニングし、本酵素が炭素数 12-16 の飽和・一価不飽和脂肪酸を基質とする新規脂肪酸伸長酵素であり、炭素数 18 以上の長鎖脂肪酸の合成に重要なリポジェニック酵素であることを明らかにした(*J Lipid Res.* 43:911, 2002)。さらに Elov16 ノックアウト (KO) マウスの作製、解析により、食餌性および遺伝性肥満モデルマウスにおいて、Elov16 の欠損がインスリン抵抗性からマウスを保護することを報告し、本酵素が生活習慣病の発症に重要な役割を果たしていることを明らかにした (*Nat. Med.* 13:1193, 2007)。しかし、Elov16 の欠損により糖尿病の発症や進展が抑制されるかについては未だ検討されていない。そこで我々は先天的にレプチン受容体欠損により肥満を通して 2 型糖尿病を発症する db/db マウスと Elov16KO マウスの交配動物を作成し、その表現型を解析した。その結果、db/db マウスに比べて db/db-Elov16KO マウスは空腹時・随時血糖および HbA1c 値が大幅に低下し、糖尿病の発症・進展が抑制されることを見出した。

2. 研究の目的

そこで本研究では、2 型糖尿病モデル動物である db/db マウスと Elov16KO マウスの交配動物のエネルギー代謝および糖尿病病態を解析し、2 型糖尿病の発症・進展における Elov16 の意義を解明し、細胞内脂肪酸組成の制御を基盤とした 2 型糖尿病の新規治療法の開発を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 解析対象の作製、表現型解析

db/db マウスと Elov16KO マウスを交配し、生まれてくる db/db マウスおよび db/db-Elov16KO マウスの個体としての表現型を体重、体脂肪量、組織重量、血糖値、血中インスリン・アディポサイトカイン濃度、血中・臓器脂質含量、糖負荷試験、インスリン負荷試験、酸素消費量などエネルギー代謝の従来の解析法により明らかにする。

(2) 膵β細胞の機能解析

様々な週齢の WT、db/db、db/db-Elov16KO マウスから膵臓を摘出、病理切片を作製し、H&E 染色やインスリン、β、α細胞の免疫組織化学染色によりラ氏島およびβ細胞の組織化学的变化を、週齢を追って観察する。同時に BrdU の投与および免疫染色により膵β細胞の増殖を、TUNEL 染色により膵β細胞

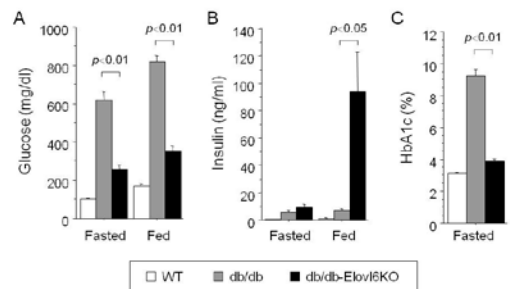
死を評価する。また経口糖負荷試験および単離ラ氏島でのインスリン分泌能試験、単離ラ氏島での脂質分析、遺伝子発現解析、糖毒性・脂肪毒性病態の解析を行い、糖尿病で認められる膵β細胞機能の破綻における Elov16 の関与、および Elov16 欠損による予防・治療効果について検討する。

(3) 肝臓および脂肪組織の解析

耐糖能異常、インスリン抵抗性、膵β細胞機能に影響をおよぼす可能性のある肝臓および白色脂肪組織の糖・脂質代謝関連因子、インスリンシグナル伝達機能、酸化ストレス、炎症、小胞体ストレスなどについて、組織学的解析、遺伝子発現解析、タンパク質解析にて検討する。

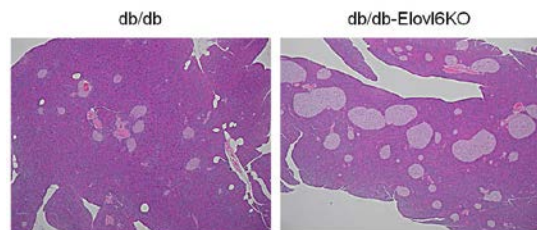
4. 研究成果

db/db-Elov16KO マウスは db/db マウスと同様に肥満、インスリン抵抗性を呈したが、高血糖の改善、耐糖能異常の改善、HbA1c 値の低下が認められた。



野生型 (WT)、db/db、db/db-Elov16KO マウスの血糖値 (A)、インスリン値 (B) および HbA1c 値 (C)。16 週齢のマウスで一晩絶食 (Fasted) または自由摂食 (Fed) 条件にて採血を行った。db/db マウスに比べて db/db-Elov16KO マウスでは血糖値の低下、自由摂食時のインスリン値の上昇、HbA1c 値の低下が認められた。

db/db マウスは正常マウスに比べて週齢の経過とともにラ氏島の萎縮や形態異常が認められたが、db/db-Elov16KO マウスではラ氏島の著明な肥大、数の増加、摂食時の血中インスリン値の上昇が認められた。



db/db マウスおよび db/db-Elov16KO マウスの膵臓 H&E 染色像。db/db マウスに比べて db/db-Elov16KO マウスでは膵臓ラ氏島の数および 1 つあたりの面積の増加が認められた。

正常マウスと比較して、db/db マウスのラ氏島ではパルミチン酸 (C16:0)、パルミトレイン酸 (C18:0)、オレイン酸 (C18:1n-9)

が増加し、ステアリン酸 (C18:0) は減少した。db/db-Elovl6 欠損マウスのラ氏島では、db/db マウスに比べてオレイン酸が有意に減少し、パルミチン酸、パルミトオレイン酸、ステアリン酸は増加傾向を示した。

血中脂肪酸組成は、db/db マウスに比べて db/db-Elovl6 欠損マウスではパルミチン酸とパルミトオレイン酸の増加、ステアリン酸とオレイン酸の減少、およびリノール酸 (C18:2n-6) の減少が認められた。ラ氏島と血中の脂肪酸組成変化のパターンが異なることから、ラ氏島内に独自の脂肪酸組成制御機構が存在し、Elovl6 がこの脂肪酸組成制御機構に重要な生理的・病態生理的機能を持つ可能性が示唆された。

単離ラ氏島の解析では、db/db マウスのラ氏島に比べて db/db-Elovl6KO マウスのラ氏島では、グルコース誘導性インスリン分泌が亢進し、TNF- α や MCP-1 といった炎症性サイトカインやケモカインの遺伝子発現の減少と膵 β 細胞機能に重要な PDX-1 や MafA、Insulin の遺伝子発現の増加が認められた。

本研究の結果から、Elovl6 は 2 型糖尿病における膵 β 細胞量の減少や機能不全に関与することが明らかとなった。膵 β 細胞の脂肪酸組成の変化は 2 型糖尿病の発症リスクと考えられ、Elovl6 の阻害が新しい糖尿病治療標的として期待される。

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 4 件)

(1) Naka A, Iida KT, Nakagawa Y, Iwasaki H, Takeuchi Y, Satoh A, Matsuzaka T, Ishii KA, Kobayashi K, Yatoh S, Shimada M, Yahagi N, Suzuki H, Sone H, Yamada N, Shimano H. TFE3 inhibits myoblast differentiation in C2C12 cells via down-regulating gene expression of myogenin. *Biochem Biophys Res Commun.* 430(2):664-669, 2013. 査読有

(2) Matsuzaka T, Atsumi A, Matsumori R, Nie T, Shinozaki H, Suzuki-Kemuriyama N, Kuba M, Nakagawa Y, Ishii K, Shimada M, Kobayashi K, Yatoh S, Takahashi A, Takekoshi K, Sone H, Yahagi N, Suzuki H, Murata S, Nakamuta M, Yamada N, Shimano H. Elovl6 promotes nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 56(6):2199-2208, 2012. 査読有

(3) Fujimoto Y, Nakagawa Y, Shingyouchi A, Tokushige N, Nakanishi N, Satoh A, Matsuzaka T, Ishii KA, Iwasaki H, Kobayashi K, Yatoh S, Suzuki H, Yahagi N,

Urayama O, Yamada N, Shimano H. Dicer has a crucial role in the early stage of adipocyte differentiation, but not in lipid synthesis, in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 420(4):931-936, 2012. 査読有

(4) Iwasaki H, Naka A, Iida KT, Nakagawa Y, Matsuzaka T, Ishii KA, Kobayashi K, Takahashi A, Yatoh S, Yahagi N, Sone H, Suzuki H, Yamada N, Shimano H. TFE3 regulates muscle metabolic gene expression, increases glycogen stores, and enhances insulin sensitivity in mice. *302(7): E896-902*, 2012. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

(1) Yuta Nakano, Takashi Matsuzaka, Nie Tang, Marii Suzuki, Noriko Suzuki-Kemuriyama, Motoko Kuba, Keita Shoshi, Tomotaka Yokoo, Yoshimi Nakagawa, Kiyooki Ishii, Masako Shimada, Hitoshi Iwasaki, Kazuto Kobayashi, Shigeru Yatoh, Akimitsu Takahashi, Naoya Yahagi, Hiroaki Suzuki, Nobuhiro Yamada, Hitoshi Shimano. Deletion of Elovl6 protects against the failure of pancreatic beta-cell mass and function in db/db mice. 第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日、マリンメッセ福岡、福岡

(2) Takashi Matsuzaka, Tang Nie, Noriko Suzuki-Kemuriyama, Motoko Kuba, Yoshimi Nakagawa, Kiyooki Ishii, Masako Shimada, Kazuto Kobayashi, Shigeru Yatoh, Akimitsu Takahashi, Hirohito Sone, Naoya Yahagi, Hiroaki Suzuki, Makoto Nakamuta, Nobuhiro Yamada, Hitoshi Shimano. Elovl6 promotes nonalcoholic steatohepatitis in mice and humans. 9th IDF-WPR Congress and 4th AASD Scientific Meeting, 2012 年 11 月 26 日、国立京都国際会館、京都

(3) 松坂 賢、齋藤 亮、唐澤 直義、松森理恵、煙山 紀子、中川 嘉、石井 清朗、岩崎 仁、小林 和人、矢藤 繁、高橋 昭光、曾根 博仁、鈴木 浩明、矢作 直也、山田 信博、島野 仁。マクロファージ泡沫化および動脈硬化における脂肪酸伸長酵素 Elovl6 の役割。第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、2012 年 5 月 19 日、パシフィコ横浜、横浜

[その他]

ホームページ等

<http://www.u-tsukuba-endocrinology.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松坂 賢 (MATSUZAKA TAKASHI)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：70400679

(2) 研究分担者

矢藤 繁 (YATOH SHIGERU)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：50451703