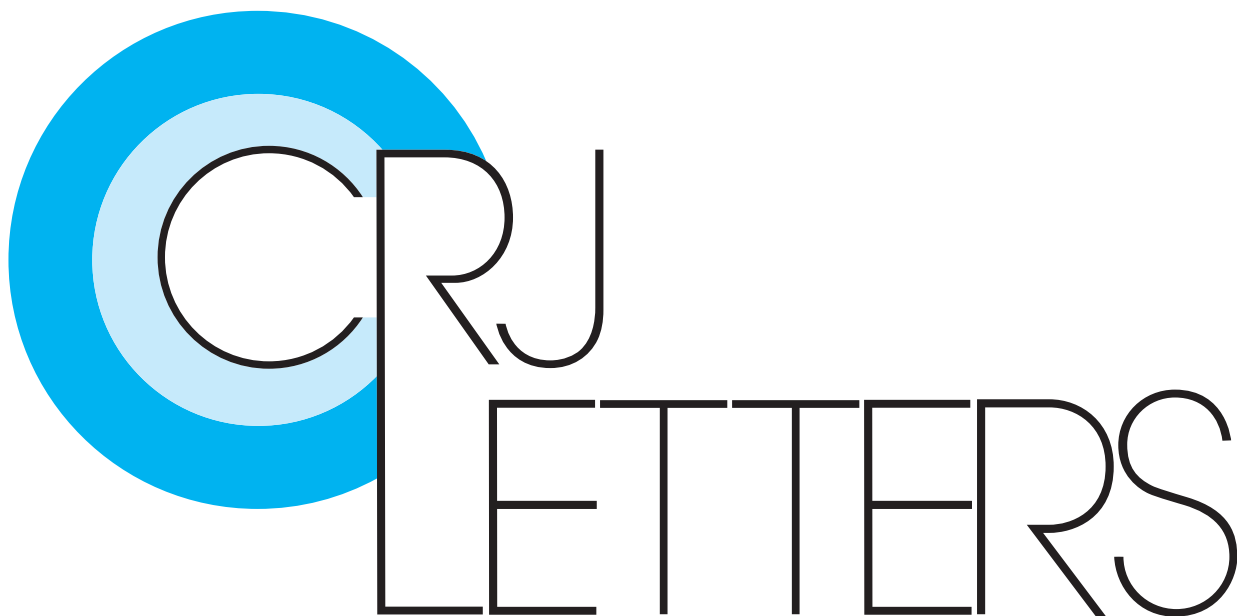


Vol.18 No.1

April 2009

The logo for CRJ LETTERS. It features a large, stylized 'C' composed of two concentric circles, the outer one in bright blue and the inner one in a lighter blue. To the right of the 'C' is the 'RJ' in a black outline font. Below 'RJ' is the word 'LETTERS' in a black outline font. A thin black line extends from the bottom right of the 'S' in 'LETTERS' diagonally towards the bottom right corner of the page.

CRJ LETTERS

—— 卷頭論文 ——

糖尿病モデル動物の解析

日本チャールス・リバー株式会社

糖尿病モデル動物の解析

(インスリン受容体基質(IRS)欠損マウスを用いて)

東京大学大学院 医学系研究科 糖尿病・代謝内科 窪田哲也、窪田直人、門脇孝

はじめに

食生活の欧米化や車の普及などによる運動不足といったいわゆる“ライフスタイルの変化”に伴い、個人のインスリン抵抗性は増悪し、糖尿病のみならず、肥満・高血圧・脂質代謝異常などの動脈硬化症の危険因子が重積し、いわゆるメタボリックシンドロームを発症する。その結果、我が国では心筋梗塞や脳梗塞といった動脈硬化性疾患の発症率が増加の一途をたどっている。従って、インスリン抵抗性発症メカニズムとインスリン抵抗性がメタボリックシンドロームや動脈硬化症を惹起するメカニズムを解明し、それに立脚した根本的治療法の確立が極めて重要である。

インスリン抵抗性は、生理的なインスリンシグナル伝達機構のいずれかの段階に異常が生ずることによって発生すると考えられている。そこで我々は、インスリン作用の初期シグナルであるインスリン受容体基質(IRS)に着目し、IRS欠損マウスあるいは臓器特異的なIRS欠損マウスを作製・解析し、インスリン抵抗性、糖尿病、動脈硬化症におけるIRSの役割を明らかにしたいと考え、取り組んでいる。本稿では、これまでに報告してきたIRS欠損マウスや臓器特異的なIRS欠損マウスについて概説するとともに、インスリン感受性や耐糖能を検討するときの一般的な実験方法について概説したい。

1. インスリンシグナル伝達機構について

生理的なインスリンシグナル伝達は、インスリンが細胞膜上のインスリン受容体と結合し、内在するチロシンキナーゼが活性化され、活性化されたインスリン受容体より4種類のIRSがリン酸化される。IRS-1,2はインスリン標的臓器のみならず広範な組織分布を示し、インスリン作用の主要な担い手と考えられている。IRS-3は主として脂肪に、IRS-4は腎臓、胸腺、視床下部に高発現している。チロシンリン酸化したIRS蛋白にSH2ドメインを有するp85が結合し、ホスファチジルイノシトール(PI)3キナーゼが活性化する。PI3キナーゼの下流分子には、atypical PKCとAktがある。Atypical PKCは相互に高い相同性を示すPKC λ とPKC ζ からなり、脂肪細胞や筋肉細胞においてインスリン依存性糖輸送を行う。一方、3種類のアイソフォームからなるAktは、グリコーゲン合成酵素キナーゼ(GSK)3 β を介してグリコーゲン合成酵素を活性化しグリコーゲンを合成したり、内皮型NO合成酵素(eNOS)を活性化しNOを産生させる。またインスリンは、ShcからRasを介してMAPキナーゼを活性化し、細胞増殖を促す。

以上をまとめるとインスリンシグナルは、インスリン受容体・IRSのチロシンリン酸化を介し、PI3キナーゼを活性化する経路とMAPキナーゼを活性化する経路があり、PI3キナーゼ経路は主として糖新生、インスリン依存性糖輸送、グリコーゲン合成などのインスリンの代謝作用やNO産生を、MAPキナーゼ経路は細胞増殖などを司っていると考えられている。

2. インスリン感受性や耐糖能の評価方法

A. インスリン負荷試験(全身のインスリン抵抗性の評価)

インスリン負荷試験は安楽死させることなく、簡便に全身のインスリン抵抗性を評価できる実験方法である。体重あたり一定量のインスリンをマウスに投与し、

血糖値を測定する。インスリン抵抗性は、インスリンによる血糖降下の程度がコントロールマウスに比べ減弱しているかどうかで判断する。スタート時の血糖値が異なる場合には、血糖値の低下率(100%表示)で評価する。以下にその概要を記す⁽¹⁾。

- ① 生食20mlに15 μ lのインスリン(Humalin R 100)を入れたものを用意し、体重1gあたり10 μ lを27G前後の注射針でマウス腹腔内に投与する(体重30gのマウスであれば300 μ lの投与量となる)。腹腔内投与が安定しないと、血糖降下の程度にばらつきを生じるため、慣れるまではひとりがマウスを固定し、もう一人が投与するとより確実である。なお試験中は絶食とする。
- ② タイムコースとしては0分・20分・40分・60分・80分・100分・120分の7ポイントで血液を採取し、血糖値を測定する。

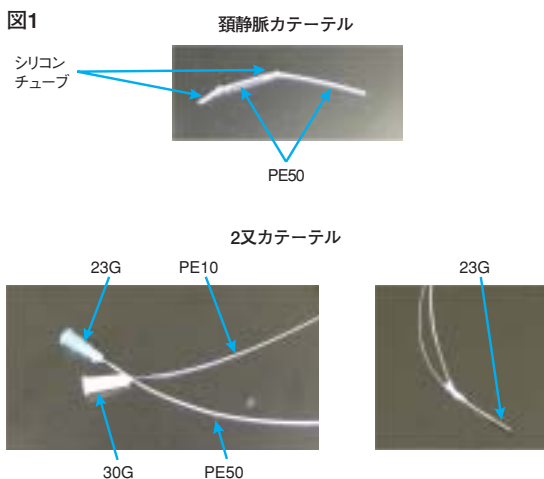
B. グルコースクランプ試験

(hyperinsulinemic-euglycemic clamp:インスリン抵抗性の責任臓器の評価)

インスリン抵抗性の主な責任臓器は、肝臓、骨格筋と考えられている。インスリン負荷試験では全身のインスリン抵抗性の有無は判定できるが、どの臓器がインスリン抵抗性の責任臓器かは区別できない。グルコースクランプ試験では全身の糖利用率(GIR: glucose infusion rate)だけでなく、肝臓での糖産生率(HGP: hepatic glucose production)と骨格筋の糖取込み率(Rd: rate of glucose disappearance)を測定でき、全身のインスリン抵抗性のみならず、各臓器のインスリン抵抗性の状態についても評価できる。グルコースクランプ試験では、一定量のインスリンに対し、一定の血糖値を維持するようにグルコースを投与し、その投与量が全身のGIRとなる。骨格筋で代謝を受けないデオキシグルコースを混合して使用することで、投与したデオキシグルコース量と血中で検出されたデオキシグルコース量から、骨格筋に取り込まれたグルコース量(Rd)が算出される。さらにこれをもとに肝臓の糖産生量(HGP)を求める。グルコースクランプには、インスリン分泌を抑制するためにソマトスタチンを

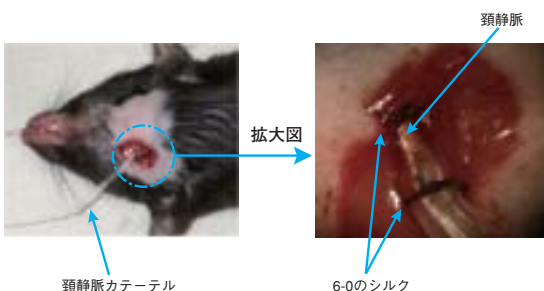
使用したものや、放射性同位体でラベルしたグルコースを使用した方法など、さまざまなバリエーションが存在するが、本稿では放射線同位体を使用しない、最も簡便で基本的な方法を以下に記す⁽²⁾。

- ① 頸静脈に留置するカテーテルは、ポリエチレンチューブPE50とシリコンチューブを組み合わせて作製する(図1)。また、インスリンとグルコースを同時に注入するために使用する2又カテーテルは、23G針(針先をカットしたもの)、30G針(針先をカットしたもの)、PE50、PE10を組み合わせて作製する(図1)。



- ② グルコースクランプを施行する2~5日前に、頸静脈にカテーテルを留置する。麻酔下に頸静脈を露出後、遠位部を6-0のシルクで結紮して頸静脈にカテーテルを留置する(図2)。このとき他の血管を傷つけないことが重要である。

図2 頸静脈カテーテルを留置した図



- ③ グルコスクランプ当日は朝から3時間絶食を行い、50%グルコースとグルコースの安定同位体である6.6D2グルコースを4:1の割合で混合して、2又カテーテルの30G針側にシリンジを接続する。体重を測定してインスリンの量を決定する。インスリン抵抗性の状態あるいは実験内容によってインスリン投与量を変更する必要があるが、コントロールマウスなどでは5mU/kg/minで十分である。インスリン溶液で3回カテーテルをフラッシュした後、インスリン溶液を2又カテーテルの23G側にシリンジを接続し、ハーバードポンプにセッティングする。まずインスリンを25mU/kg/minで5分間投与した後、5mU/kg/minで120分間持続注入する。5分毎に血糖値を測定し、血糖値が120mg/dlになるようにグルコースを投与する。90分、105分、120分のグルコースの注入率の平均からGIRを算出する。
- ④ 0分、90分、105分、120分後だけ約30 μ lの血液を採取する。血液を遠心して、蛋白を除去する目的で血漿10 μ lに対して60 μ lの100%エタノールを混合し、15,000回転10分間遠心して、上清を取る(この検体は-20℃保存が可能である)。次に窒素ガスで蒸発させた後、ピリジンと無水酢酸を1:2の割合で混合した溶液を100 μ l添加して攪拌する。そのサンプルをガストロクロマトグラフィー質量分析計にてグルコースの同位体比を算出し、Rdを求める。GIRとRdからHGPを算出する。

C. インスリンシグナルの検討

上記の方法で、各臓器のインスリン抵抗性を把握した後、各臓器におけるインスリンシグナル障害の程度を検討することとなる。麻酔の後、出血させないように下大静脈を露出させ、24Gのサーフローの外筒を下大静脈に留置する(図3)。

留置した24Gのサーフローよりヒューマリン100Rを5単位投与し、肝臓は70秒後、骨格筋は2分後に組織をすばやく採取、液体窒素にて凍結保存する。その後、各組織をホモジナイズし、western blotあるいはphosphatidylinositol (PI)3kinase活性にて評価する⁽²⁾。

D. グルコース負荷試験

(耐糖能とインスリン分泌能の評価)

耐糖能とインスリン分泌能を評価する最も基本的な方法がグルコース負荷試験である。体重あたり一定量のグルコースをマウスに投与し、血糖値やインスリン値を測定する。複数のバリエーションが存在し、実験の目的に応じて各々最適な条件を設定する。以下にその概要を記す⁽¹⁾。

- ① グルコース3gを生理食塩水20mlに溶かしたものを、マウスの体重1gあたり10 μ l投与する(体重30gのマウスであれば300 μ lの投与量となる)。
- ② 経口投与(OGTT)では専用のゾンデを使用し、確実に胃内に投与する。過度の力をかけると消化管を損傷する恐れがあるので注意を要する。腹腔内注射(IPGTT)や静脈注射(IVGTT)によりグルコースを投与する場合もある。OGTTでは消化管ホルモンの作用も含めた生理的なインスリン分泌能を評価できる点がIPGTT・IVGTTと大きく異なる。
- ③ タイムコースとしては0分・15分・30分・60分・120分の5ポイントで血液を採取し、血糖値を測定する。また、0分・15分・30分ではインスリン値も測定する。

図3 24Gサーフローの外筒を下大静脈に留置した図



3. IRS-1,-2欠損マウスとインスリン抵抗性、耐糖能異常について

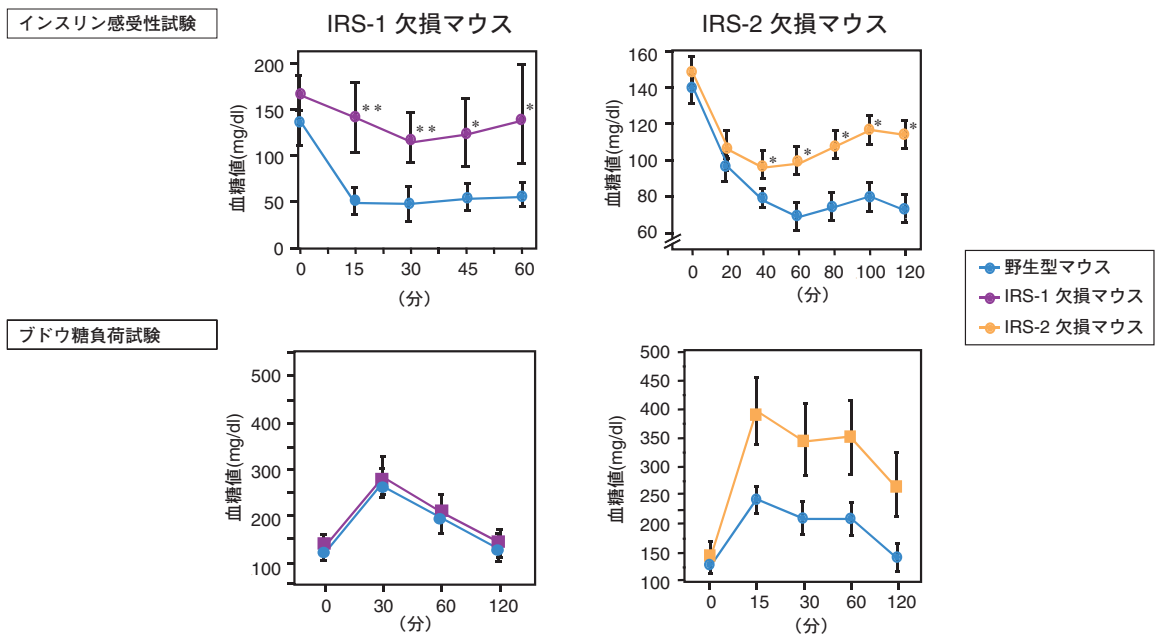
我々は、インスリン受容体の主要な基質であるIRS-1とIRS-2のインスリン抵抗性及び糖尿病発症における役割を明らかにするため、IRS-1欠損マウス及びIRS-2欠損マウスを作成し、上記2で述べた方法を用いて解析した^(3,4)。

まずはじめにIRS-1欠損マウスとIRS-2欠損マウスの成長について検討したところ、IRS-1欠損マウスの大きさは胎児期より野生型マウスの2/3の大きさであったが、IRS-2欠損マウスは野生型マウスとほぼ同等であった。次に、インスリン感受性について検討したところ、両マウスとも、インスリン抵抗性を示した(図4)。両マウスのインスリン抵抗性の機序を明らかにするため、肝臓及び骨格筋でのインスリン依存性のPI3キナーゼ活性の上昇を検討した。IRS-1欠損マウスの肝臓では、野生型マウスとほぼ同程度のPI3キナーゼの上昇を示

したが、骨格筋での上昇は野生型マウスの約25%であった。従ってIRS-1欠損マウスのインスリン抵抗性は骨格筋が責任臓器と考えられた。一方、IRS-2欠損マウスの場合のPI3キナーゼは、肝臓では野生型マウスに比べ約50%に低下し、骨格筋でも野生型マウスに比べわずかであったが低下したことから、IRS-2欠損マウスのインスリン抵抗性の責任臓器は、肝臓と骨格筋であると考えられた。

次に、両欠損マウスの耐糖能について検討すると、IRS-1欠損マウスは、高インスリン血症による代償により、糖負荷前後いずれにおいても血糖値は野生型マウスと同程度であった。一方、IRS-2欠損マウスは、6週齢では高インスリン血症による代償により、糖負荷前後での血糖値は野生型マウスと同程度であったが、10週齢になると糖負荷後に野生型マウスに比べ高血糖を呈した(図4)。

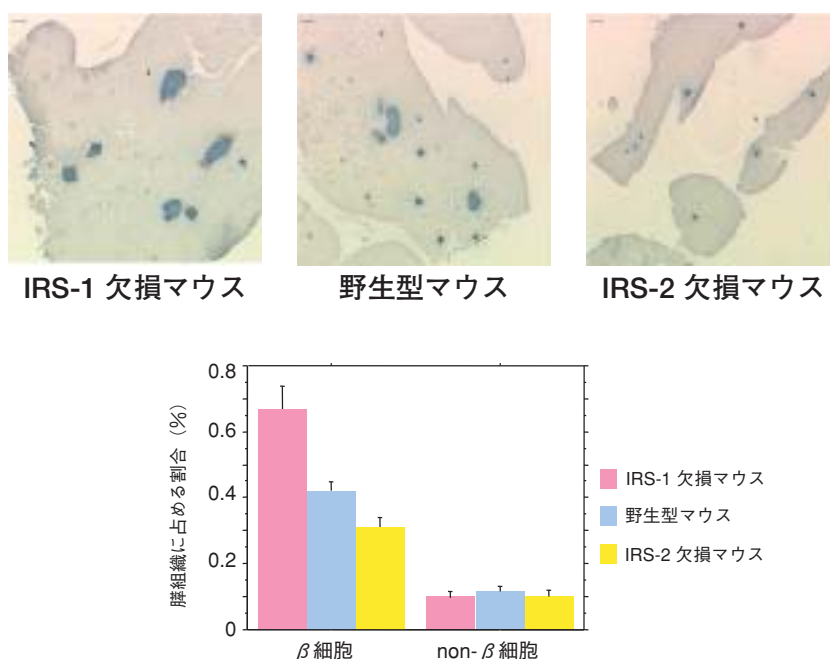
図4 IRS-1欠損マウス、IRS-2欠損マウスは同程度のインスリン抵抗性を示すが、IRS-2欠損マウスのみが糖尿病を発症する



そこで、膵組織切片を作製し、抗インスリン抗体による免疫染色で膵 β 細胞の面積を検討すると、IRS-1欠損マウスでの膵 β 細胞の面積は野生型マウスに比べ1.83倍に増加していたが、IRS-2欠損マウスの膵 β 細胞の面積は、野生型マウスの0.85倍とむしろ縮小し

ていた(図5)。このことから、IRS-1欠損マウスではインスリン抵抗性に対し膵 β 細胞が増殖するのに対し、IRS-2欠損マウスではインスリン抵抗性があるにもかかわらず、膵 β 細胞が増殖できないことにより、10週齢より耐糖能異常を呈したと考えられた。

図5 IRS-1欠損マウス、野生型、IRS-2欠損マウスの膵組織

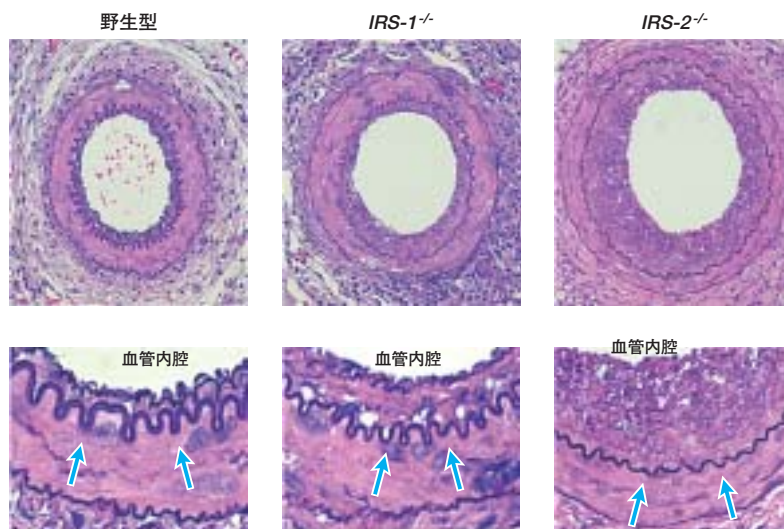


4. IRS -1,-2欠損マウスと動脈硬化について

IRSの動脈硬化に対する役割を解明するために、まずIRS-1欠損マウス、IRS-2欠損マウスがメタボリックシンドロームを来すかどうかを8週齢と20週齢で検討した⁴⁵⁾。その結果、IRS-1欠損マウス、IRS-2欠損マウスは共に8週齢よりメタボリックシンドロームを認めたが、その程度はIRS-2欠損マウスの方がIRS-1欠損マウスに比べ重篤であった。次にIRS-1欠損マウス、IRS-2欠損マウスにカフ傷害モデルによる血管内膜肥厚を検討したところ、8週齢ではIRS-2欠損マウスは野生型マウスやIRS-1欠損マウスに比べ血管内膜肥

厚は増大していたが、IRS-1欠損マウスは野生型マウスと同程度であった。そこで血管におけるIRS-1とIRS-2の分布を検討したところ、野生型マウスの血管においてIRS-2蛋白は検出されたがIRS-1蛋白は検出されなかった。一方、20週齢ではIRS-1欠損マウス、IRS-2欠損マウスは共に野生型マウスに比し有意な血管内膜肥厚の増大を示したが、その程度はIRS-2欠損マウスの方がIRS-1欠損マウスより増大していた(図6)。以上のことより、IRS-1欠損マウスとIRS-2欠損マウスではそれぞれ骨格筋、肝臓におけるインスリン抵抗性の結果、共にメタボリックシンドロームを呈したが、カフ傷害誘導性の内膜肥厚は8週齢では

図6 20週齢ではIRS-1欠損マウスは野生型マウスに比し、カフ傷害に対する内膜肥厚が大きかった



IRS-2欠損マウスでのみ認められたことから、メタボリックシンドロームが重積した状態ではその程度が重篤なものほど動脈硬化が進展しやすくなるという可能性と、血管に存在するIRS-2が抗動脈硬化作用を有する可能性が示唆された。また、メタボリックシンドロームを有する状態ではIRS-1のみならず、IRS-2も動脈硬化抑制に重要な働きがあると考えられた。

5. 肝臓特異的IRS-1,-2欠損マウスについて

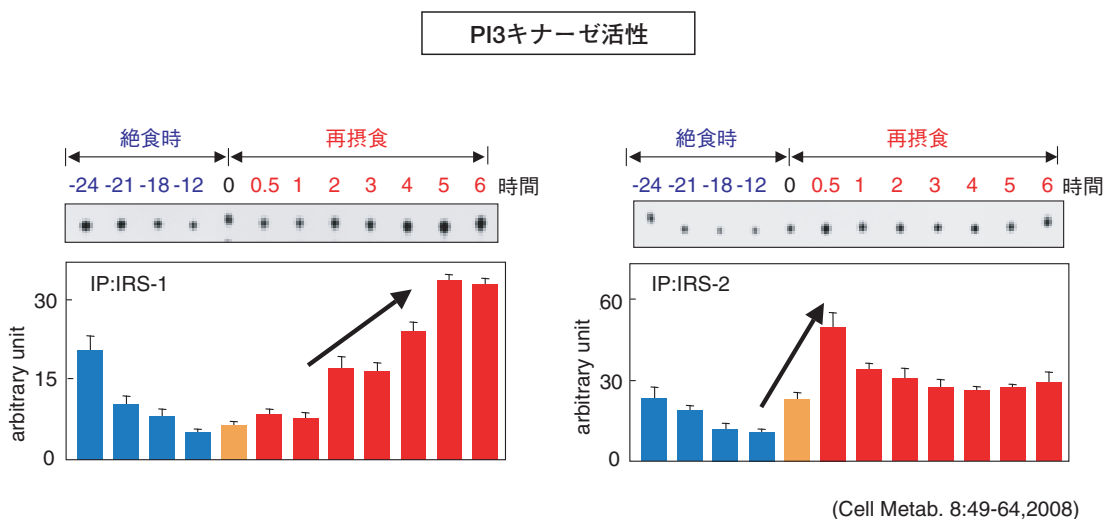
上記で述べたIRS-1,-2欠損マウスは、生体内すべての臓器において欠損するため、全身の影響を受けてしまい、個々の臓器における遺伝子の機能について十分な解析が不可能である。そこで我々は、Cre-loxPシステムを使用し、臓器特異的欠損マウスを作成した。上記で述べたように、我々が作成したIRS-1欠損マウスは骨格筋のインスリン抵抗性を呈していたが、肝臓ではインスリン抵抗性を認めなかった。一方、IRS-2欠損マウスは、骨格筋のインスリン抵抗性のみならず、肝臓のインスリン抵抗性を呈していた。この

ことから、肝臓における糖・脂質代謝調節には主にIRS-2が重要な役割を果たしていると考えられた。そこで我々はまず肝臓特異的IRS-2欠損マウスを作製し解析した⁽⁶⁾。驚いたことに肝臓特異的IRS-2欠損マウスでは、絶食時にインスリン抵抗性を呈したが、再摂食時にほとんど糖・脂質代謝に異常を認めなかった。このことは、肝臓にあるもう一つのIRSであるIRS-1が再摂食時にインスリンシグナルを伝達している可能性を示唆するものと考えられた。そこで我々は、肝臓特異的IRS-1欠損マウスを作製し解析した。肝臓特異的IRS-1欠損マウスは、絶食時にインスリン抵抗性を認めなかったが、再摂食時にインスリン抵抗性を呈していた。このことは、絶食時にIRS-2が、再摂食時にはIRS-1が重要な働きをしている可能性が示唆された。そこでさらにIRS-1、IRS-2の生理的な役割を明らかにするために、野生型マウスを使用し、絶食時から再摂食時におけるIRS-1やIRS-2に結合したPI3キナーゼ活性について検討した。絶食時にIRS-2に結合したPI3キナーゼ活性は上昇し、再摂食直後をピークに再摂食30分後には速やかに低下した。

一方、IRS-1は再摂食数時間後よりIRS-1に結合したPI3キナーゼ活性が上昇することを明らかにした(図7)。これらの結果から、IRS-2は主に絶食時と再摂食直後に、一方IRS-1は主に再摂食時に糖脂質代謝の調整を行っていることが明らかとなった。また、肝臓特

異IRS-1/IRS-2欠損マウスでは、絶食、再摂食時どちらにおいても、重度のインスリン抵抗性を認め、糖尿病を呈しており、この表現型は肝臓特異的IR欠損マウスに似ており、肝臓におけるインスリンシグナルは、ほとんどIRS-1、IRS-2で伝えられていると考えられた。

図7 IRS-2にassociateするPI3キナーゼ活性は絶食後半から再摂食直後に増加し、IRS-1にassociateするPI3キナーゼ活性は摂食数時間後から増加が認められた



おわりに

今後さらに肝臓以外の臓器特異的IRS-1,-2欠損マウスを作成・解析することにより、その個々の組織におけるIRSの詳細なメカニズムを解明することができ、この解析結果をもとに、インスリン抵抗性、糖尿病、動脈硬化に対するまったく新しい予防法や治療法を確立していきたいと考えている。

著者プロフィール



くぼた てつや
窪田 哲也

平成9年 東邦大学医学部卒業
平成15年 東邦大学医学部大学院終了
平成16年 東京大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝内科 研究生
平成20年 独立行政法人国立健康・栄養研究所 臨床栄養プログラム
栄養療法プロジェクトリーダー

研究テーマ

インスリン抵抗性・糖尿病の動脈硬化発症メカニズムの解明、特に血管内皮細胞やマクロファージに着目し研究を行っている。

参考文献

- (1) Kubota N, et al. J Clin Invest. 114:917-927, 2004.
- (2) Suzuki R et al. J Biol Chem. 279: 25039-25049, 2004.
- (3) Tamemoto H et al. Nature. 372:182-186,1994.
- (4) Kubota N, et al. Diabetes. 49:1880-1889,2000.
- (5) Kubota T, et al. Circulation. 107: 3073-3080, 2003.
- (6) Kubota N, et al. Cell Metab. 8:49-64, 2008.

Zucker Diabetic Fatty Rat **ZDF-*Lepr*^{fa}/CrI**CrIj

Ⅱ型糖尿病モデルラットの国内生産を開始しました。

ZDFは突然変異遺伝子とPurina5008(蛋白質23.5%、脂肪6.5%)の摂餌により、
ヒト成人のⅡ型糖尿病及びその合併症に近い症状を発症する近交系ラットです。



・背景データを用意しています。お気軽にお問い合わせください。

日本チャールス・リバー株式会社

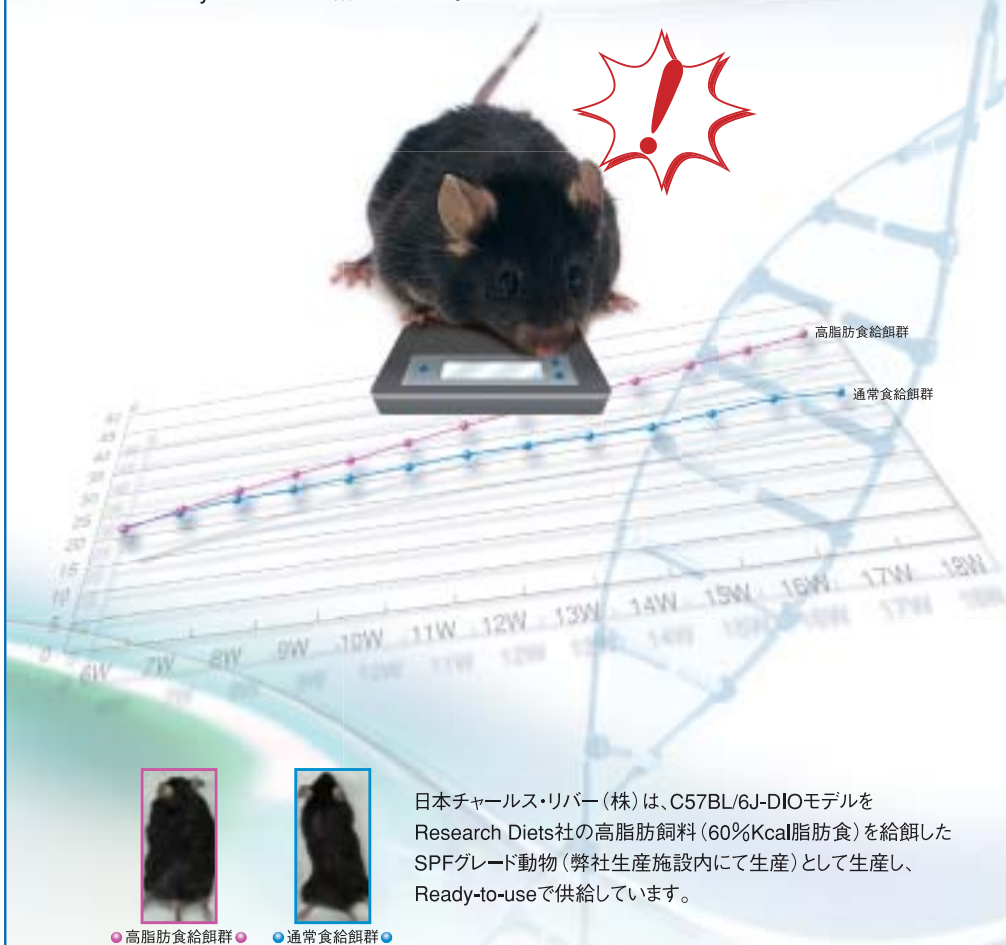
〒222-0033 横浜市港北区新横浜3-17-6 イノテックビル11F
TEL 045 (474) 9340 FAX 045 (474) 9341

E-mail: web_order@crl.com

<http://www.crj.co.jp>

チャールス・リバーの高脂肪食負荷肥満モデル動物

JAX® Mice Strain C57BL/6Jを使用したDiet Induced Obesityモデルを Ready-to-useで供給しています。



日本チャールス・リバー（株）は、C57BL/6J-DIOモデルを Research Diets社の高脂肪飼料（60%Kcal脂肪食）を給餌した SPFグレード動物（弊社生産施設にて生産）として生産し、 Ready-to-useで供給しています。

日本チャールス・リバー株式会社

本 社 〒222-0033 横浜市港北区新横浜3-17-6 インテックビル11F TEL.045(474)9340 FAX.045(474)9341

<http://www.crj.co.jp>

お問い合わせは

カスタマーサポートセンター(東日本) TEL 045(474)9340
FAX 045(474)9341

カスタマーサポートセンター(西日本) TEL 06(6307)2850
FAX 06(6307)2851

CRJ LETTERS この小冊子に関するご意見、ご要望を下記までお寄せください。

発行 日：平成21年4月

発行 所：日本チャールス・リバー株式会社

〒222-0033 横浜市港北区新横浜3-17-6インテックビル11階
電話045(474)9340

企画・編集：日本チャールス・リバー株式会社 制 作：株式会社 ティ・ティ・アイ
Copyright (C) 2009 Charles River Laboratories Japan Inc. All Rights Reserved.

本書の無断複写複製および転載は、特定の場合を除き、著作者、出版社の権利侵害になります。

日本チャールス・リバー株式会社

・ 弊社の英文社名はCharles River Laboratories Japan, Inc. です

お問合せ、ご注文は下記にて承ります。

国内飼育動物	カスタマーサポートセンター(受注)	TEL. 045(474)9350	FAX. 045(474)9351
輸入動物	業務部 輸出入グループ	TEL. 045(474)9340	FAX. 045(474)9341
受託サービス他	リサーチモデルサービス	TEL. 045(474)9340	FAX. 045(474)9341

<http://www.crj.co.jp>