

犬におけるインスリン抵抗性と糖尿病発症に関する
メタボローム研究

(Metabolome study on canine insulin resistance and diabetes onset)

学位論文の内容の要約

獣医生命科学研究科獣医学専攻博士課程 平成 24 年入学

野澤 聡司

(指導教員：田崎弘之)

犬の糖尿病は治療に一生のインスリン投与を必要とする、ヒトでは1型に分類されている糖尿病である。しかし、ヒトでは肥満が原因となり、相対的にインスリン作用が不足する2型糖尿病が主体であり、犬とヒトとでは糖尿病発症メカニズムが大きく異なっていると考えられている。そこで、本研究ではインスリン抵抗性に続き糖尿病を発症することが報告されている犬の副腎皮質機能亢進症（HAC）と、インスリン抵抗性が生じるものの糖尿病の発症が報告されていない犬の肥満の違いを比較することで、犬における糖尿病発症の特性を解析することを目的とした。

本研究では、ポストゲノム研究の中で最もフェノタイプに近くホメオスタシスの破綻をより直接的に評価できる手法であり、代謝産物を対象とするメタボローム解析を主に用いることにした。

第1章 副腎皮質機能亢進症の犬における末梢血好中球のインスリンシグナリング遺伝子発現量の解析

本章は後に続くメタボローム研究の予備実験と位置づけ、研究対象であるHAC症例犬の末梢血白血球を、グルココルチコイドの影響評価に利用できるか検討するため、遺伝子の定量に十分な量が確保できる末梢血好中球を用いて、インスリンシグナリング遺伝子（IRS-1、IRS-2、PI3-K、Akt2、PKC-λ）の発現量の変化を調べた。

HAC症例犬の末梢血好中球においてIRS-1の発現量は軽度の低下傾向を示し、IRS-2、PI3-K、Akt2ではControl群の約半分に低下した。このことから、HAC群の末梢血好中球のインスリンシグナリング遺伝子発現量に変化していることが明らかであり、グルココルチコイドの影響を評価するために末梢血白血球を利用することは妥当であると考えられた。遺伝子発現量の変動から、その代謝も変動していると考えられ、第2章において単離した末梢血白血球を用いて、グルココルチコイド添加時の細胞内代謝産物の解析を行うことにした。

第2章 デキサメサゾン添加による単離した犬末梢血単核球の代謝産物解析

培養方法が確立されている末梢血単核球を使用して、*in vitro*の実験系でグルココルチコイドが細胞内の代謝産物に及ぼす影響を検討した。単核球にグルココルチコイド製剤であるデキサメサゾンを追加、48時間の培養後に代謝産物を抽出し、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計を用いて代謝産物を分析した。

分析の結果、96個の代謝産物が同定され、パスウェイ解析の結果デキサメサゾン添加群において主に TCA サイクルおよび解糖系／糖新生経路に変化が認められた。また、糖新生経路上流の代謝産物の増加傾向と、TCA サイクル中間体、ピルビン酸の減少傾向から、デキサメサゾンの添加は、培養犬末梢血単核球におけるグルコースの異化作用を減少させることが示唆された。デキサメサゾンによる糖取り込み能の変化は培養犬末梢血単核球で認められず、また細胞内での糖異化作用が減少していることから、細胞内のグルコース濃度が維持され、細胞への糖取り込みが不要であり、高血糖を招きやすい状態にあることが考えられる。

第3章 デキサメサゾンおよび TNF- α が犬骨格筋培養細胞の代謝産物とインスリンシグナル遺伝子発現に及ぼす影響の解析

HAC ではグルココルチコイドが、肥満では TNF- α がそれぞれ血液中で増加し、インスリン抵抗性を惹起する。そこで HAC と肥満が骨格筋に及ぼす影響を検討する目的で、デキサメサゾンと TNF- α の添加試験を正常骨格筋細胞に対して行った。犬正常骨格筋細胞の分化誘導により得られた筋管様細胞を対象とし、代謝産物をガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS)、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を使用して測定した。糖取り込み能は LC-MS/MS を用いて細胞内の 2-デオキシグルコース-6-リン酸量により評価し、IRS-1、PI3-K、Akt2 の発現量は定量 PCR 法にて測定した。

デキサメサゾンの添加は、多くの代謝産物の減少と糖取り込み量の減少傾向を示し、第2章で述べた培養犬末梢血単核を用いた実験と同様に、細胞におけるグルコースの異化作用が減少していること示唆された。また、特に分岐鎖アミノ酸 (BCAA) の減少は著しく、これはグルココルチコイドによる細胞内 BCAA の分解促進と、細胞内への BCAA 輸送減少の2つの作用により細胞内 BCAA の著しい低下が生じたと考えられた。細胞内 BCAA 量の低下はタンパク質翻訳系を抑制することから、筋の萎縮が起こることが知られている。骨格筋は生体における最大の糖取り込み器官であることから、デキサメサゾンにより生じる筋萎縮は糖取り込み量の減少に繋がり、HAC において高血糖を引き起こす要因の一つとなると考えられる。

TNF- α の添加は、IRS-1 遺伝子発現量に減少傾向を示したものの、糖取り込み量に変化は認められなかった。げっ歯類の筋管細胞に TNF- α を添加すると糖取り込みが抑制されるが、本研究で用いた犬筋管様細胞では、肥満で血液中に増加する TNF- α を添加しても

糖取り込みが抑制されず、犬ではげっ歯類より糖取り込み抑制が起こりにくいことが示された。さらに、TNF- α の添加で筋管様細胞内の β -アミノイソ酪酸の顕著な増加を認められた。げっ歯類の筋管細胞の培養液中に β -アミノイソ酪酸を添加すると糖代謝異常が改善することが知られており、今回の TNF- α 添加による細胞内性 β -アミノイソ酪酸の増加は、犬が肥満しても糖代謝異常を引き起こしにくい要因の一つであると考えられる。

第4章 健康犬の血清中グルコースおよびインスリン濃度変動と血清中代謝産物 変動の比較

本研究では、これまでに末梢血白血球と犬骨格筋培養細胞を用いて、グルココルチコイドや TNF- α によるインスリン作用抑制時のアミノ酸を含む代謝産物の変化について、細胞レベルで明らかにした。そこで本章では、健康な犬に静脈内糖負荷試験を行い、インスリン分泌を促した時の血清中アミノ酸を GC-MS にて測定した。

BCAA であるロイシン、イソロイシンおよびバリンとフェニルアラニンはインスリンがピークを示す 0-60 分で有意に減少しており、インスリン動態に鋭敏に反応するアミノ酸であると考えられた。これらのアミノ酸は、ヒトでも糖尿病リスク評価に有用であり、また BCAA はインスリン依存的に骨格筋への取り込みが促進されることから、犬においてもインスリン作用の低下を評価するのに有用なマーカーとなる可能性が示された。

第5章 副腎皮質機能亢進症の犬と肥満犬の血清中代謝産物の比較検討

インスリン抵抗性から糖尿病へ進行するケースが知られる HAC 症例犬 (HAC 群) と、糖尿病の発症に至らない肥満犬 (Obesity 群) の血清中代謝産物の解析を行い、HAC および肥満が惹起するインスリン抵抗性の違いを代謝産物レベルで比較した。

HAC 群では Obesity 群と比較し、ALP と ALT が有意に高値を示し、これらの変化は既報と一致する結果であった。血液中のシスチンは、ヒトでは肥満と強い正の相関があるとされているが、本研究において Control 群と比較して、HAC 群では有意な増加を認め、Obesity 群では減少傾向であるという、ヒトとは異なる動態が示された。ヒトでは、過剰なシスチンはインスリン分泌抑制とインスリンシグナリング抑制に繋がることが報告されている。また、HAC 群で、Obesity 群に対して有意に血清中グルタミンが低下していたが、ヒトやマウスでのグルタミンの低下は、インスリン感受性の低下に繋がるとされている。さらに、stearoyl-Coenzyme A desaturase 1 活性が HAC 群は Obesity 群より上昇してい

た。これはヒトにおいて肝臓での糖新生が亢進していることを示す指標である。BCAA であるバリンとイソロイシンは Control 群と比較し、HAC 群、Obesity 群ともに有意に高値であった。BCAA はヒトの 2 型糖尿病では血中で上昇するが、これはインスリン抵抗性が生じると細胞内への BCAA 取り込みが抑制されるからであると説明されている。したがって、本研究でも HAC 群、Obesity 群ともにインスリン抵抗性が生じていたと考えられる。

これらのことから、HAC 群、Obesity 群のどちらでも Control 群に比べてインスリン抵抗性が生じていたが、HAC 群は、Obesity 群と比較してインスリン感受性が低下し、糖新生も亢進しており、より糖尿病を発症しやすい状態であると考えられる。

以上のように、健常な犬では血清中インスリン増加に伴い血清中 BCAA が低下したが、これはインスリン依存的に BCAA が細胞に取り込まれたことを示している。デキサメサゾンを追加した犬筋管様細胞では、細胞内の BCAA がコントロール群に対して有意に低値であったことから、インスリン抵抗性が高まっていたと示唆される。さらに、デキサメサゾンを追加した犬筋管様細胞では、糖取り込み能が抑制され、糖の異化作用が減少する傾向にあった。糖異化作用の減少は、健常な犬から単離した末梢血単核球にデキサメサゾンを追加した時の代謝産物の解析結果でも示されていた。一方、TNF- α を追加した犬筋管様細胞では、逆にインスリン感受性を増強する β -アミノイソ酪酸が有意に高値を示し、生じたインスリン抵抗性を代償する作用が働いたと考えられる。また、HAC 群と Obesity 群の血清中代謝産物を Control 群と比較したところ、血清中 BCAA が高値であった。これはどちらもインスリン抵抗性が生じていることを示唆しているが、HAC 群では、Obesity 群と比較してインスリン感受性低下の指標である血清中グルタミンの低下と、糖新生が亢進している傾向が見られた。

本研究の結果から、HAC で認められるが肥満では認められない、これらの代謝産物の違いは、犬の HAC が糖尿病発症に至る一方、犬の肥満が糖尿病に至らない一因を示しており、犬における糖尿病の発症機序を解明していく上で有用な知見になると考えられる。また、犬骨格筋培養細胞を対象としたメタボローム研究は、犬特有の糖尿病発症機序を解明する有用な手段であると考えられる。