

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06919

研究課題名(和文) シンデカン4ノックアウトマウスにおけるインスリン分泌機能の解析

研究課題名(英文) Analysis of insulin secretory function in syndecan-4 knockout mice

研究代表者

高橋 巖 (Takahashi, Iwao)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：20552912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：シンデカン4(SDC4)はヘパラン硫酸プロテオグリカンを構成するコアタンパク質の1つであり、培養細胞実験系ではブドウ糖刺激インスリン分泌(GIS)への関与が報告されている。SDC4ノックアウト(KO)マウスを用いてGIS機能を解析したところ、C57BL/6J(B6)系統SDC4KOマウスはGIS障害を呈したが、ICR系統では異常は認められなかった。ストレプトゾトシンによる緩徐進行型糖尿病を発症させたICR系統SDC4KOマウスでは、対照群に比し随時血糖値の著しい増加と随時インスリン値の減少が確認された。系統間に差はあるもののマウス生体内でもSDC4がGIS機能に関与することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵細胞におけるインスリン分泌機能にシンデカン4(SDC4)が関与することが、マウス培養細胞実験系のみならずマウス生体内でも明らかとなった。SDC4ノックアウトマウスを用いた研究報告は複数あるが、インスリン分泌機能を詳細に解析した報告は本研究報告が初めてである。本研究により、SDC4が糖尿病の病態解明や治療のための新しい標的分子となる可能性が高まった。

研究成果の概要(英文)：Syndecan-4 (SDC4) is one of the core proteins that compose heparan sulfate proteoglycans and has been reported to be involved in glucose-induced insulin secretion (GIS) in cultured cell lines. Analysis of GIS function using SDC4 knockout (KO) mice revealed that C57BL/6J (B6) strain-derived SDC4KO mice exhibited GIS disorders, but no abnormalities were observed in the ICR strain-derived SDC4KO mice. Investigation of the effects of SDC4 in an ICR strain-derived mouse model of slowly progressive diabetes induced using low doses of STZ showed markedly higher casual blood glucose levels and lower casual insulin secretion values in SDC4KO mice than in controls. These results indicate that SDC4 is involved in GIS function of β -cells not only in cultured cells but also in living mice, although there are differences among strains.

研究分野：分子生物学、生化学、糖鎖生物学

キーワード：ヘパラン硫酸プロテオグリカン コアタンパク質Syndecan-4 インスリン分泌 膵細胞 糖尿病

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

機能性高分子多糖として知られているヘパラン硫酸はコアタンパク質に結合した複合糖質(ヘパラン硫酸プロテオグリカン)として細胞膜表面などに存在し、種々のシグナル伝達を調節している(図1)。申請者らは、マウス膵臓のランゲルハンス島(ラ島)β細胞(膵β細胞)に局所的にヘパラン硫酸が存在しており、膵β細胞に存在しているヘパラン硫酸がラ島の形態形成やβ細胞増殖、インスリン分泌機能に重要な役割を果たしていることを見出している。さらにマウス膵β細胞由来の培養細胞実験系において、ヘパラン硫酸プロテオグリカンのコアタンパク質の一つであるシンデカン4(SDC4)がインスリン分泌機能に関与していることを明らかにした。しかし、マウス生体内におけるインスリン分泌機能へのSDC4の関与については不明であった。

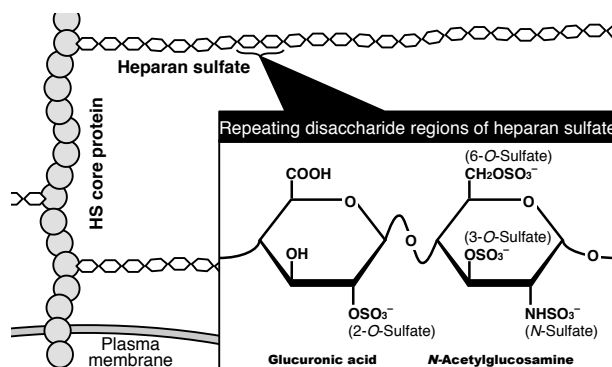


図1 ヘパラン硫酸プロテオグリカンの構造

2. 研究の目的

本研究では、マウス膵β細胞由来の培養細胞実験系においてインスリン分泌機能に関与することが明らかになっているSDC4について、マウス生体内においてもインスリン分泌機能にSDC4が関与しているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) マウス個体におけるブドウ糖・インスリン負荷試験
絶食時のSDC4ノックアウト(KO)および野生型マウスの腹腔にブドウ糖やインスリンを投与し、尾部より採血する。血中の血糖値測定および構造安定性が高くインスリン分泌量をより正確に反映する血漿中のC-ペプチド濃度を測定する。
- (2) 単離ラ島におけるインスリン分泌試験
SDC4KOおよび野生型マウスの膵臓からラ島を単離し、ブドウ糖刺激後の分泌インスリン量やラ島内インスリン含量を測定する。
- (3) 単離ラ島における各種遺伝子発現やヘパラン硫酸定量
SDC4KOおよび野生型単離ラ島から、mRNAを抽出し逆転写後、定量PCR法やDNAマイクロアレイを用いてヘパラン硫酸コアタンパク質やインスリン分泌機構構成因子の遺伝子発現などを定量する。また、単離ラ島からヘパラン硫酸を抽出し、HPLCなどを用いてヘパラン硫酸の量や二等組成分析によるO-硫酸基(ヘパラン硫酸の機能の多様性の一部を担っている)を分析する。
- (4) ラ島の形態や膵β細胞の面積・数
SDC4KOおよび野生型の膵臓組織を固定・包埋・薄切し、インスリンやグルカゴン、SDC4に対する抗体による免疫染色により、ラ島の形態や膵β細胞/膵臓の面積比を解析する。

上述の項目について、C57BL/6J(B6)系統とICR系統のSDC4KOマウスを解析することで、SDC4のインスリン分泌機構への関与について系統間の違いを確認した。また、必要に応じて実験方法の適宜追加省略を実施した。

4. 研究成果

- (1) SDC4KOマウスにおける糖代謝
B6系統の8週齢雄のSDC4KOマウスを解析したところ、インスリン抵抗性を伴わない耐糖能異常が認められた(図2A,C)。このSDC4KOマウスでは野生型に比しC-ペプチド分泌能の低下が認められた(図2D)。B6系統のSDC4KOマウスのラ島の形態に異常は認められず(図3)、

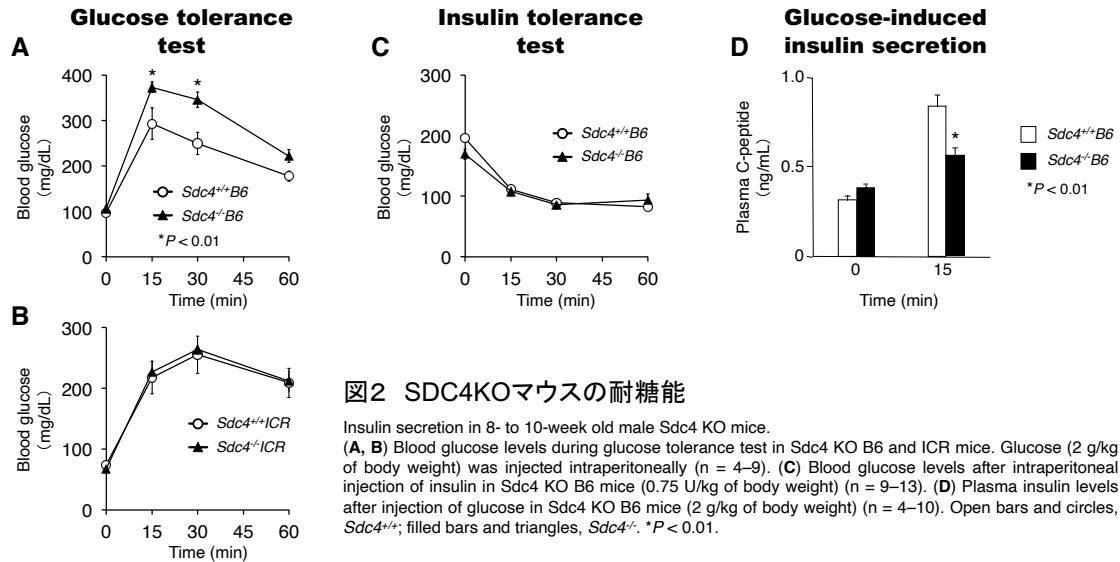


図2 SDC4KOマウスの耐糖能

Insulin secretion in 8- to 10-week old male *Sdc4* KO mice. (A, B) Blood glucose levels during glucose tolerance test in *Sdc4* KO B6 and ICR mice. Glucose (2 g/kg of body weight) was injected intraperitoneally (n = 4-9). (C) Blood glucose levels after intraperitoneal injection of insulin in *Sdc4* KO B6 mice (0.75 U/kg of body weight) (n = 9-13). (D) Plasma insulin levels after injection of glucose in *Sdc4* KO B6 mice (2 g/kg of body weight) (n = 4-10). Open bars and circles, *Sdc4*^{+/+}; filled bars and triangles, *Sdc4*^{-/-}. **P* < 0.01.

膵臓あたりのβ細胞面積も有意な差は認められなかった (表1)。したがって、8週齢雄のSDC4KOマウスにおける耐糖能異常は、膵β細胞数の減少ではなく、インスリン分泌機能障害が原因と考えられた。一方、ICR系統の8週齢雄のSDC4KOマウスでは、耐糖能異常は確認されなかった (図2B)。

Immunostaining for *Sdc4*, insulin, and glucagon in pancreatic islets

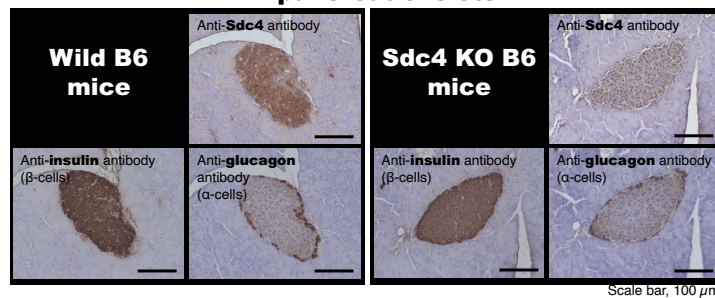


図3 B6系統のSDC4KOラ島の形態

表1 B6系統のSDC4KOマウスにおける膵β細胞面積/膵臓面積の割合

	Wild B6 mice	<i>Sdc4</i> KO B6 mice	<i>P</i> -value
Insulin-positive area / pancreatic area (%)	0.6419 ± 0.0981	0.6272 ± 0.1914	0.9536

(2) B6 系統の SDC4KO 単離ラ島における遺伝子発現変動とヘパラン硫酸の二等組成分析

B6 系統の SDC4KO 単離ラ島では、インスリン分泌機構構成因子や膵β細胞分化マーカーの遺伝子発現が低下していた。これが B6 系統の SDC4KO マウスにおけるインスリン分泌障害の原因と考えられた。一方、KO ラ島のヘパラン硫酸量は野生型よりも増加しており (表2)、SDC4 以外のコアタンパク質が結合したヘパラン硫酸では、SDC4 をコアタンパク質とするヘパラン硫酸のインスリン分泌機能を代償できない可能性が示唆された。

表2 B6系統のSDC4KOマウスのラ島におけるヘパラン硫酸(HS)の二糖組成

Disaccharides	fmol / islet (%)	
	<i>Sdc4</i> ^{+/+} B6	<i>Sdc4</i> ^{-/-} B6
ΔHexA*-GlcNAc	5.7 (49.1)	9.9 (56.3)
ΔHexA-GlcNAc(6S)	0.6 (5.2)	1.2 (6.8)
ΔHexA-GlcN(NS)	3.2 (27.6)	5.4 (30.7)
ΔHexA-GlcN(NS,6S) [†]	1.5 (12.9)	0.2 (1.1)
ΔHexA(2S)-GlcN(NS) [†]	0.6 (5.2)	0.9 (5.1)
Total	11.6 (100)	17.6 (100)

* ΔHexA, unsaturated hexuronic acid; GlcN, glucosamine; GlcNAc, N-acetyl-glucosamine; 6S, 6-O-sulfate; NS, 2-N-sulfate; 2S, 2-O-sulfate.
[†] Since the disaccharides ΔHexA-GlcN(NS,6S) and ΔHexA(2S)-GlcN(NS) could not be discriminated, their total amount is presented.

(3) ストレプトゾトシンを投与した ICR 系統の SDC4KO マウスの解析

耐糖能に異常を示さない ICR 系統の SDC4KO 雄マウスに、ストレプトゾトシンを投与し緩徐進行性糖尿病を発症させたところ、KO マウスでは野生型に比し体重に差は認められなかったものの、随時血糖上昇やインスリン分泌障害 (図4A-C)、β細胞数減少を呈した (図5A, B)。ストレプトゾトシン投与した ICR 系統の SDC4KO 単離ラ島ではヘパラン硫酸分解酵素のヘパラーナーゼの発現が上昇しており、ラ島保護作用もあるヘパラン硫酸がヘパラーナーゼにより分解され、β細胞数が減少したと考えられた。

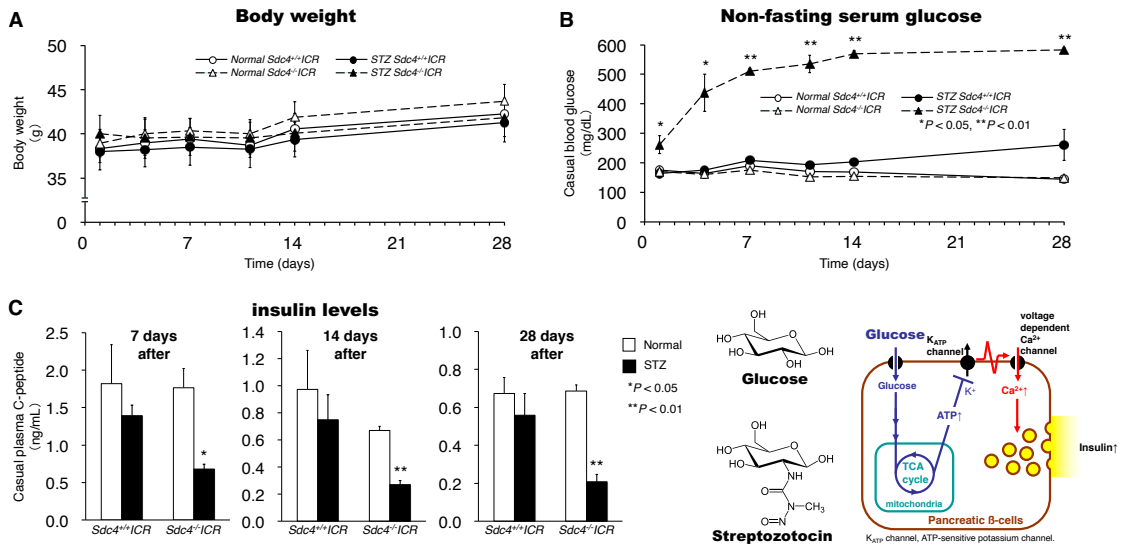


図4 ストレプトゾチン処理したICR系統のSDC4KOマウスの体重、随時血糖とCペプチド値

Changes in body weight (A), non-fasting serum glucose (B) and insulin levels (C) in *Sdc4* KO ICR mice after a single intraperitoneal injection (i.p.) injection of streptozotocin (STZ). Open circles, triangles and bars, Normal; filled circles, triangles and bars, STZ; open circles and triangles, *Sdc4*^{+/+}; filled circles and triangles, *Sdc4*^{-/-}. Differs from respective normal at **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

系統によって表現型に違いがあるものの、マウス生体においても SDC4 が膵β細胞のインスリン分泌や生存に関与しており、SDC4 が糖尿病の病態解明や治療の標的分子となりうることを示された。

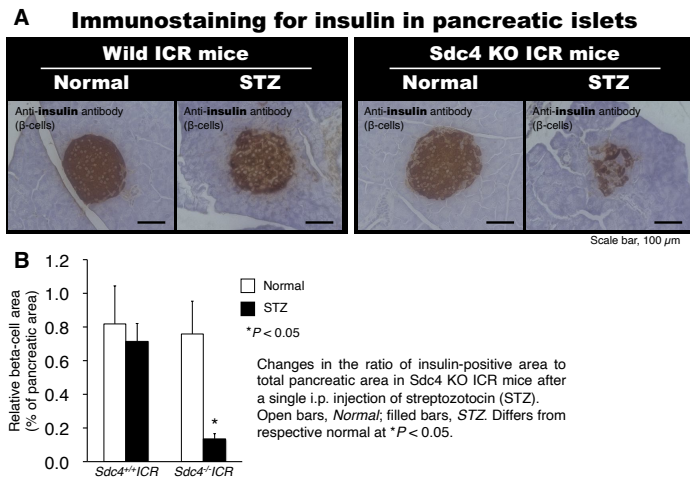


図5 ストレプトゾチン処理したICR系統のSDC4KOマウスのラ島の形態変化と膵β細胞面積／膵臓面積の割合

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 牛抱和也, 渡邊大輔, 小野泰誠, 岸承俊, 岡崎優, 那谷耕司, 高橋巖
2. 発表標題 マウス膵臓ランゲルハンス島インスリン産生 細胞におけるシンデカン 4 の機能解析
3. 学会等名 第86回 日本生化学会東北支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋 巖
2. 発表標題 インスリン産生膵 細胞の機能におけるヘパラン硫酸プロテオグリカン・シンデカン 4 の機能解析とその制御
3. 学会等名 第67回日本臨床検査医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 早川瑛美子, 諏訪唯斗, 能登暁子, 小野泰誠, 渡邊大輔, 牛抱和也, 那谷耕司, 高橋巖
2. 発表標題 シンデカン 4 ノックアウトマウスにおける膵ランゲルハンス島 細胞の機能解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊大輔, 小野泰誠, 岸 承俊, 岡崎 優, 牛抱和也, 那谷耕司, 高橋 巖
2. 発表標題 シンデカン 4 欠損マウスの耐糖能へのストレプトゾトシン投与の影響
3. 学会等名 日本生化学会東北支部 第85回例会・シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Iwao Takahashi, Shuhei Yamada, Koji Nata
2. 発表標題 Deletion of heparan sulfate proteoglycan syndecan-4 impairs pancreatic β -cell function in mice
3. 学会等名 11th International Conference on Proteoglycans (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋 巖, 那谷耕司
2. 発表標題 インスリン産生膵 細胞におけるヘパラン硫酸プロテオグリカン・シンデカン4の役割
3. 学会等名 第30回日本臨床化学会東北支部総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野泰誠, 渡邊大輔, 岸 承俊, 磯 直輝, 岡崎 優, 牛抱和也, 那谷耕司, 高橋 巖
2. 発表標題 マウス膵 細胞におけるSyndecan-4の機能解析
3. 学会等名 第58回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋 巖, 那谷耕司
2. 発表標題 遺伝子改変マウスを用いたインスリン産生膵 細胞におけるヘパラン硫酸の機能解析
3. 学会等名 第30回東北動物実験研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田代陽香梨、田嶋淳、伊藤圭汰、堀内優弥、佐藤夏樹、那谷耕司、高橋巖
2. 発表標題 シンデカン4欠損マウスにおけるインスリン分泌能の解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山田 修平 (Yamada Shuhei) (70240017)	名城大学・薬学部・教授 (33919)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------