

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

令和 4 年 3 月 24 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 国立大学法人群馬大学大学院医学系研究科  
職 名 講師  
研究代表者 宮田 茂雄

下記のとおり令和3年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号: 21015 )

1. 共同研究課題名	糖代謝調節機構における膵β細胞由来 GABA の生理作用の解明			
2. 共同研究目的	本研究では膵β細胞が産生・分泌するγ-アミノ酪酸(GABA)に着目し、糖代謝調節機構における生理学的な意義を解明する。GABA 合成酵素「GAD67」を膵β細胞特異的に欠失させた遺伝子改変マウスを新規に作製し、膵β細胞におけるGABA産生不全が引き起こす膵島の病変を検証する。また、血糖値や耐糖能、さらには膵島のインスリン分泌能に対して与える影響についても検討する。			
3. 共同研究期間	令和3年 4 月 1 日 ~ 令和4年 3 月31日			
4. 共同研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役割分担	
(研究代表者) 宮田 茂雄	群馬大学大学院医学系研究科遺伝発達行動学分野	講師	研究の総括・実験	
(分担研究者)				
5. 群馬大学生体調節研究所の共同研究担当教員	分野名	分子糖代謝制御	氏 名	藤谷 与士夫

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

## 6. 共同研究計画

本研究では生体調節研究所の研究リソースである Rip-Cre マウスを利用し、申請者が保有する GAD67-flox マウスと交配させることで、GABA 合成酵素「GAD67」を膵β細胞特異的に欠失する GAD67flox/flox;Rip-Cre マウスを作製する。このマウスの膵島機能について、病理解析はもとより、in vivo(血糖値や耐糖能の評価)による検討を行い、膵β細胞における GABA 産生不全が糖代謝調節機構に及ぼす影響について検討する。

【実験①】GAD67flox/flox; Rip-Cre マウスを作製する。なお、同腹仔の GAD67flox/flox マウスおよび GAD67+/+; Rip-Cre マウスを対照群として使用する。

【実験②】GAD67flox/flox; Rip-Cre マウスの膵臓病理切片を作製し、蛍光免疫染色法により膵島内内分泌細胞の病的変化(膵島の形態異常、内分泌細胞の構成比率の変化、細胞死など)の有無について対照群と比較検討する。

【実験③】GAD67flox/flox; Rip-Cre マウスの体重、血糖値、血中インスリン値の変化について検討する。加えて、糖負荷試験ならびにインスリン負荷試験を行い、GAD67flox/flox; Rip-Cre マウスの耐糖能の異常について検討する。

## 7. 共同研究の成果

野生型マウスの膵臓および小脳の病理切片を作製し、GAD67 および GAD65 について免疫染色を行ったところ、小脳ではどちらの GAD も免疫反応を認められたが、膵臓(膵島)においては GAD67 のみに免疫反応が認められた。野生型マウスの小脳および単離膵島を用いて RT-PCR を行ったところ、Gad1 mRNA は両組織に発現を認めただのに対して、Gad2 mRNA は小脳においてのみ発現していたことから、マウス膵島では2種類ある GAD のうち GAD67(Gad1 mRNA)のみが発現していることを確認した。また、GAD67 免疫反応はインスリン発現細胞に認められ、グルカゴンまたはソマトスタチン発現細胞には認められなかったことから、GAD67 は膵β細胞特異的に発現していることを確認した。

そこで、Rip-Cre マウスと GAD67-flox マウスとの交配により GAD67flox/flox;Rip-Cre マウスを作製し、膵β細胞特異的に GAD67 を欠損させた。この遺伝子改変マウスの膵島では GABA に対する免疫反応性が消失していた。また、LC/MS による定量解析の結果、GAD67flox/flox;Rip-Cre マウスの膵島では対照群である GAD67+/+;Rip-Cre マウスと比べて、GABA 含有量が約 98%減少していた。このことから、マウス膵β細胞における GABA 産生は GAD67 依存的事であることが示された。

GAD67flox/flox;Rip-Cre マウスの随時血糖および空腹時血糖に明らかな変化は認められなかったが、OGTT を行ったところグルコース負荷後 30 分の血糖値が GAD67+/+;Rip-Cre マウスと比べて有意に低値を示したことから、グルコース負荷に対するインスリン分泌反応が亢進している可能性が示唆された。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況及び本研究担当教員との共同研究に関する情報交換(本研究の担当教員の氏名の記載のある論文、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

①本研究の担当教員の氏名の記載のある論文  
該当無し

②この共同研究に基づくとの記載のある論文  
該当無し

③学会発表を行った主なもの3件以内(学会名、開催日、演題)

1. 第 68 回北関東医学会、前橋(2021.9.30-10.1)、マウス膵島が産生する GABA の主要合成酵素の解明
2. 第 95 回日本薬理学会年会、博多(2022.3.7-9)、Glucose tolerance in mice lacking glutamate decarboxylase 67 in pancreatic β cells.

④本研究担当教員と申請代表者との共同研究に関する情報交換の状況(主なやり取りを箇条書き)

- メールによるディスカッションを適宜行っている。
- 膵島の単離操作を教えていただいた。
- 本研究の進捗状況について、藤谷研、北村研、白川研による合同ラボセミナー(R3.11.1)で発表し、今後の研究の方向性についてディスカッションした。