

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19512

研究課題名(和文) インスリン分泌における ケトグルタル酸脱水素酵素の役割

研究課題名(英文) The role of a-ketoglutarate dehydrogenase on insulin secretion

研究代表者

小倉 雅仁(Ogura, Masahito)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：00547812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：膵細胞におけるグルコースによるインスリン分泌に必要なATPの合成にクエン酸回路は重要な代謝経路で、ケトグルタル酸脱水素酵素はその酵素の一つである。現在、糖尿病と認知症の関連が注目されているが、アルツハイマー病の神経細胞では酸化ストレスによってケトグルタル酸脱水素酵素活性が低下していると報告されている。

ケトグルタル酸脱水素酵素が膵細胞のインスリン分泌に及ぼす影響を、膵細胞株やげっ歯類の単離膵島を用いて検討したところ、ケトグルタル酸脱水素酵素の阻害や発現量の低下によって、インスリン分泌が影響を受けることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：TCA cycle is important for insulin secretion from pancreatic cells via ATP synthesis. a-ketoglutarate dehydrogenase is one of the enzyme in TCA cycle. Recently, there are some reports that indicate relationship between diabetes and dementia. It is also reported that the activity of a-ketoglutarate dehydrogenase is inhibited in the neuron in Alzheimer disease by oxidative stress.

We investigate the effect of a-ketoglutarate dehydrogenase on insulin secretion from pancreatic cells using cell line or isolated islet from rodents. It was revealed that insulin secretion is affected by the inhibition of a-ketoglutarate dehydrogenase or depression of expression levels of a-ketoglutarate dehydrogenase.

研究分野：代謝学

キーワード：KGDHのインスリン分泌に及ぼす影響

1. 研究開始当初の背景

健常人は食事の前後においても血糖値の変動は非常に小さく、この血糖の恒常性は膵細胞においてグルコース代謝とインスリン分泌が連関し、血糖値に応じて速やかに、かつ適切な量のインスリンが分泌されることでもたらされる。この血糖の恒常性が破綻している病態が糖尿病である。

生理的なグルコース依存性のインスリン分泌には膵細胞内でのグルコース代謝が重要である。膵細胞ではグルコースが代謝されることで ATP が産生され、その ATP により ATP 依存性カリウムチャンネルが閉鎖され膜電位が脱分極し、電位依存性のカルシウムチャンネルが開放されることで細胞内カルシウム濃度が上昇し、インスリンの開口分泌がもたらされる。

糖代謝に重要な代謝経路である解糖系内の酵素であるグルコキナーゼの変異によりヒトにおいて遺伝性の糖尿病である Maturity onset diabetes of the young (MODY)2 が生じることが知られている。

このことから、生理的なインスリン分泌において糖代謝は必須で、その障害によって糖尿病をきたすことが明らかとなっており、膵細胞内の糖代謝は生理学的に意義にのみならず、病態生理的な意義も大きい。

日本人の糖尿病の中でおよそ 90% を占める 2 型糖尿病患者では膵細胞においてグルコース代謝が障害されることで、インスリン分泌が障害されているとの報告がある。

しかし、グルコース代謝内の障害部位の詳細や、障害に至るメカニズムは明らかではない。これらを解明することは 2 型糖尿病の病態の理解、また新規治療標的の探索に重要である。

研究代表者はこれまで肝細胞での新規代謝調節機構の解明や膵細胞での代謝とインスリン分泌連関機構の解明など細胞内代謝と、その生理的及び病態生理学的意義について研究を行ってきた。

また、研究代表者のグループでは酸化ストレスが膵細胞内での代謝障害を介してインスリン分泌を抑制することを過去に報告してきている。

現在、本邦では人口の高齢化にともなって糖尿病患者の高齢化も临床上の重要な問題となっている。高齢者糖尿病の管理が困難である理由の一つが、食事や服薬のセルフコントロールを困難にする認知症である。

糖尿病も認知症も加齢に伴って発症リスクが増える疾患である。また、高血糖の持続が認知機能低下のリスク因子であるとも報告されており、両疾患には共通した病因または病態が存在する可能性がある。

酸化ストレスは認知症の原因となるアルツハイマー病の病態にも寄与しており、酸化ストレスによる細胞機能障害が糖尿病と認知症の双方に存在していると考えられる。

膵細胞からのグルコース依存性インス

リン分泌に重要な ATP は、細胞質内の代謝経路である解糖系とミトコンドリア内の代謝経路であるクエン酸回路によって生じた NADH や FADH₂ を器質として、ミトコンドリア内の電子伝達系によって合成される。

クエン酸回路は解糖系と異なり、酸素をもちいた好気性の代謝回路であり、効率よく NADH や FADH₂ を合成することができるが、一方では酸化ストレスを生じやすい代謝経路でもある。

近年、アルツハイマー病の神経細胞内では酸化ストレスにより、クエン酸回路内の酵素である α -ケトグルタル酸脱水素酵素の活性低下が生じていることが報告されている。

一方、 α -ケトグルタル酸脱水素酵素の酵素反応は酸化ストレスが生じ得る反応であり、酸化ストレスと α -ケトグルタル酸脱水素酵素の関連は興味深い。

膵細胞における生理的なインスリン分泌における α -ケトグルタル酸脱水素酵素の意義や、2 型糖尿病病態での酸化ストレスを介したインスリン分泌障害における α -ケトグルタル酸脱水素酵素の寄与は明らかではない。

インスリン分泌と α -ケトグルタル酸脱水素酵素の関係について検討することは、2 型糖尿病の病態解明や新規治療標的の探索のみならず、糖尿病と認知症の共通した病態基盤の考察や、高血糖と認知機能低下の双方に効果を持つ治療法の開発にも有意義であると考えられたので、本研究を着想した。

2. 研究の目的

本邦では人口の高齢化にともなって、糖尿病患者も高齢化しており、高齢者糖尿病の認知症により血糖管理に難渋する例も多い。2 型糖尿病と認知症は共に加齢に伴って発症リスクが上昇する。

認知症の発症リスクは高血糖状態で高まることが報告されており、認知症の原因の一つであるアルツハイマー病の神経細胞では酸化ストレスにより α -ケトグルタル酸脱水素酵素活性が低下しているという報告がある。

一方、膵細胞においても酸化ストレスはグルコース代謝を障害することで、グルコース依存性インスリン分泌を低下させ、2 型糖尿病を惹起する。

α -ケトグルタル酸脱水素酵素はグルコース代謝に関わるクエン酸回路内の主要な酵素であり、 α -ケトグルタル酸脱水素酵素の反応からは電子伝達系の器質である NADH が産生され、 α -ケトグルタル酸脱水素酵素は膵細胞内での ATP 合成に直接関わる代謝酵素でもある。

膵細胞において酸化ストレスによるグルコース依存性インスリン分泌の障害と α -ケトグルタル酸脱水素酵素の関係は不明である。

研究代表者は 2 型糖尿病と認知症の病態に

共通に寄与する可能性のある ーケトグルタル酸脱水素酵素に着目し、膵 細胞における酸化ストレスの ーケトグルタル酸脱水素酵素がグルコース依存性インスリン分泌に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、検討を行った。

本研究計画は2型糖尿病の病態解明に有用のみならず、糖尿病と認知症の病態の関連を説明し得るものであり、重要である。

また、膵 細胞のグルコース代謝障害は2型糖尿病の病態として重要であるが、現在まで臨床で使用可能な膵 細胞のグルコース代謝障害を改善する薬剤はない。研究計画は2型糖尿病の新規の治療標的探索として意義を有すると思われる。

3. 研究の方法

ーケトグルタル酸脱水素酵素の特異的阻害剤である α -keto- γ -methyl- δ -valeric acid (以下、KMV) を用いて ーケトグルタル酸脱水素酵素活性を阻害し、げっ歯類の単離膵島からのインスリン分泌を評価した。マウス膵 細胞株において ーケトグルタル酸脱水素酵素を siRNA にてノックダウンして同様の検討を行った。

4. 研究成果

げっ歯類の単離膵島膵島を ーケトグルタル酸脱水素酵素の特異的阻害剤である KMV で処理してインスリン分泌を評価しところ、クエン酸回路の酵素である ーケトグルタル酸脱水素酵素を抑制するのでインスリン分泌は抑制されると仮定していたが、逆にインスリン分泌は亢進した。

次に KMV の非特異的な作用を除外するために、マウス膵 細胞株において ーケトグルタル酸脱水素酵素を siRNA にてノックダウンして同様の検討を行ったが、やはりインスリン分泌は亢進していた。

ーケトグルタル酸脱水素酵素の酵素反応はクエン酸回路内で NADH を補酵素として行うものであり、酸化ストレスを生じさせる可能性もある。阻害剤やノックダウンによる ーケトグルタル酸脱水素酵素が抑制されたことで酸化ストレスが減少し、インスリン分泌が亢進した可能性も考えられた。酸化ストレスが細胞機能に保護的にも障害的にも作用し得る可能性が考えられた。

結果が興味深く、CRISPR/Cas システムを用いた膵 細胞株を用いた安定細胞株の樹立を試み、細胞株樹立には至らなかったが、

ーケトグルタル酸脱水素酵素によって発生する酸化ストレスは細胞に保護的にも障害的にも与える可能性や、その各々の作用が細胞によって異なることも考えられ、神経細胞と膵 細胞では ーケトグルタル酸脱水素酵素の生理機能また病態における役割が異なっている可能性や、酸化ストレスが与える影響が細胞によって異なる可能性も考えられた。

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6件)

1.Ogura K, Ogura M, Shoji T, Sato Y, Tahara Y, Yamano G, Sato H, Sugizaki K, Fujita N, Tatsuoka H, Usui R, Mukai E, Fujimoto S, Inagaki N, Nagashima K. Oral Administration of Apple Procyanidins Ameliorates Insulin Resistance via Suppression of Pro-inflammatory Cytokines Expression in Liver of Diabetic ob/ob Mice.

J Agric Food Chem. 64:8857-8865, 2016.

2.Nakamura T, Iwasaki Y, Yamane S, Ogura M, Yasoda A, Nagashima K, Inagaki N.

Adiposity induced by interleukin-17A blockade.

Diabetes Metab. S1262-3636:30441-30444, 2016.

3.Sato H, Nagashima K, Ogura M, Sato Y, Tahara Y, Ogura K, Yamano G, Sugizaki K, Fujita N, Tatsuoka H, Usui R, Mukai E, Fujimoto S, Inagaki N.

Src regulates insulin secretion and glucose metabolism by influencing subcellular localization of glucokinase in pancreatic β -cells.

J Diabetes Investig. 7:171-8,2016.

4.Obara A, Fujita Y, Abudukadier A, Fukushima T, Oguri Y, Ogura M, Harashima S, Hosokawa M, Inagaki N.

DEPTOR-related mTOR suppression is involved in metformin's anti-cancer action in human liver cancer cells.

Biochem Biophys Res Commun. 460:1047-52,2015

5.谷川 幸洋, 原田 範雄, 後藤 久典, 村岡 敦, 小倉 雅仁, 八十田 明弘, 長嶋 一昭, 稲垣 暢也

リラグルチドとイブラグリフロジン併用が血糖安定に有効であったインスリン抗体陽性2型糖尿病の1例 糖尿病 58(12) 702-706, 2015

6. 小倉 雅仁, 原島伸一, 西村亜希子, 稲垣 暢也 インスリンデグルデクを使用中に重症低血糖をきたした2例 糖尿病 58(9) 895-901, 2015

〔学会発表〕(計3件)

1. 小倉 雅仁, 玉井由美子, 御石絢子, 辻秀美, 幣憲一郎, 八十田明宏, 長嶋一昭, 稲垣

暢也 2 型糖尿病患者におけるサルコペニア、サルコペニア肥満、肥満の比較検討(第 31 回日本糖尿病合併症学会 (2016 年 10 月 7 日~10 月 8 日, 仙台)

2. **小倉雅仁**, 玉井由美子, 御石絢子, 辻秀美, 八十田明宏, 幣憲一郎, 長嶋一昭, 稲垣暢也 2 型糖尿病患者の入院中の骨格筋量変化に関する検討; 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2016 年 5 月 19 日~5 月 21 日, 京都)

3. **小倉雅仁**, 玉井由美子, 御石絢子, 幣憲一郎, 八十田明宏, 長嶋一昭, 稲垣暢也 糖尿病患者における入院による骨格筋量の変化; 第 30 回日本糖尿病合併症学会 (2015 年 11 月 27 日~11 月 28 日, 名古屋)

〔図書〕(計 2 件)

1. **小倉雅仁**, 幣憲一郎, 稲垣暢也 糖尿病の栄養管理 (1) 医師の立場から 臨床栄養医歯薬出版株式会社 42-46, 2016

2. **小倉雅仁**, 稲垣暢也 糖尿病ってどんな病気?: ダウンロードでそのまま使える! 患者さんがみるみる変わる! 魔法の糖尿病患者説明シート 50+□ 唱えて変身! 魔法の言葉つき メディカ出版 2016

3. 近藤祥司, **小倉雅仁**, 稲垣暢也 「超高齢者のための運動療法」女性医療のすべて 編集 太田博明 メディカルレビュー社 206-261, 2016

4. **小倉雅仁**, 稲垣暢也 糖尿病ってどんな病気? 糖尿病ケア 12-15. 2016

5. **小倉雅仁** 新発売のインスリン製剤が登場している エキスパートナース 12 月号 46-48. 2016

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小倉雅仁 (OGURA, Masahito)
京都大学 医学研究科 特定助教
研究者番号: 00547812