

令和元年5月20日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09803

研究課題名(和文) 血糖降下薬がmTORC1調節を介して糖尿病発症抑制効果を示す可能性に関する検討

研究課題名(英文) The effect of antihyperglycemic drugs on prevention of the diabetes via mTORC1 signal

研究代表者

木村 真希(小柳真希)(Maki, Koyanagi-Kimura)

神戸大学・医学部附属病院・特定助教

研究者番号：40623690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：膵 細胞保護は2型糖尿病発症予防において重要な因子である。本研究では、各種薬剤がmTORC1シグナルに与える影響を検討し、膵 細胞量を維持することで糖尿病発症を予防すると期待される薬剤を同定することを目的とした。膵 細胞特異的TSC2遺伝子欠損マウス(TSC2<sup>-/-</sup>マウス)にDPP-4阻害薬を、肥満2型糖尿病モデルマウスdb/dbマウスにSGLT2阻害薬を投与した。その結果、TSC2<sup>-/-</sup>マウスの膵島においてDPP-4阻害薬のインスリンシグナル維持効果と、db/dbマウスに対するSGLT2阻害薬の膵 細胞量保持効果を認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DPP-4阻害薬はインスリンシグナルの減弱化の改善を介して膵 細胞保護に寄与すると考えられた。早期SGLT2投与db/dbマウスではAgr2、Tff2、Gkn3遺伝子発現上昇により膵 細胞量保持のlegacy effectに寄与している可能性が考えられた。また、GCN2は高脂肪食負荷による過栄養の際、プロインスリンmRNAの翻訳が亢進すると活性化され、SESN2の発現低下によるmTORC1活性の亢進を介して膵 細胞量維持が破綻する可能性が示唆された。すなわち本研究は、2型糖尿病候補遺伝子GCN2のSNPを有する患者が過食による膵 細胞不全を未然に防ぎうる手段を講じることに役立つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The preservation of pancreatic cell mass is an essential factor in the onset and development of type 2 diabetes mellitus. In this study, we aimed at identification of antihyperglycemic drugs on prevention of the diabetes via mTORC1 signal. We administered TSC2<sup>-/-</sup> mice to DPP-4 inhibitors, SGLT2 inhibitors to db/db mice. DPP-4 inhibitors prevented decrease in insulin signaling. SGLT2 inhibitors preserved pancreatic beta cell mass more effectively if administration is earlier.

Maintenance of GCN2-deficient mice on a high-fat diet results in a loss of pancreatic beta cell mass. Our data suggest that GCN2 senses amino acid deficiency in beta cells and limits signaling by mechanistic target of rapamycin complex 1 to prevent beta cell failure during the consumption of a high-fat diet. The present results provide an insight into the genetic predisposition to T2DM in non-obese Asian populations, and they may inform a strategy for intervention in those with the risk allele for this SNP.

研究分野：糖尿病における膵 細胞量調節機構

キーワード：mTORC1活性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病の病態はインスリン作用不足であり、インスリン分泌障害とインスリン抵抗性に原因があると考えられている。膵β細胞障害がインスリン抵抗性とともにより2型糖尿病早期から認められること、さらに膵β細胞障害の増悪が病態の進展を規定することも明らかとなってきた。なかでも、膵β細胞量の減少が2型糖尿病を発症させるという概念が提唱されている。これまでに、我々は膵β細胞量調節におけるインスリンシグナルの重要性を明らかにしてきた。

General control nonderepressible 2(GCN2) は、アミノ酸欠乏を感知する分子であり、細胞内アミノ酸欠乏状態で増加した uncharged transfer RNA (tRNA)が結合することにより活性化される。日本人における SNP (一塩基多形)解析で、GCN2 の SNP と2型糖尿病発症に有意な相関が報告された (Nat Genet 40: 1092, 2008)。アミノ酸欠乏により uncharged tRNA が GCN2 のリン酸化を誘導し、eIF2 のリン酸化を介してタンパク翻訳を抑制する。同時に、アミノ酸代謝に関わる ATF4 の翻訳促進に関与する。

これまでの既報により GCN2 は肝臓におけるロイシン欠乏を感知して脂肪生成を抑制することや、乳酸負荷に反応して肝糖新生を制御すること、ロイシン欠乏によりインスリン感受性を亢進させることなどが報告されているが、2型糖尿病発症と GCN2 の関連については明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、各種薬剤が mTORC1 シグナルに与える影響を検討し、膵β細胞量を維持することで糖尿病発症を予防すると期待される薬剤を同定する。この研究により、膵β細胞量維持を介して糖尿病発症を未然に予防する薬剤の解明につながる。

また、高脂肪食下における GCN2 によるアミノ酸感知が mTORC1 活性を介して膵β細胞量調節に寄与するメカニズムを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) DPP-4 阻害薬 MK-626 が  $\beta$ TSC2<sup>-/-</sup>マウスの代謝パラメータに及ぼす影響を検討するため、4週齢から12週齢まで MK-626 を混餌投与し、体重・随時血糖値・随時インスリン値・経口糖負荷試験による各種パラメータを測定した。

(2) db/db マウスに経口血糖降下薬の一つである dapagliflozin (SGLT2)を投与し、膵β細胞量およびその調節に寄与する分子メカニズムについて解析する。

(3) mTORC1 シグナルが亢進している GCN2 遺伝子欠損マウスの糖代謝・膵β細胞量・高脂肪食負荷下におけるアミノ酸代謝・mTORC1 活性を制御する分子メカニズムについて解析する。

## 4. 研究成果

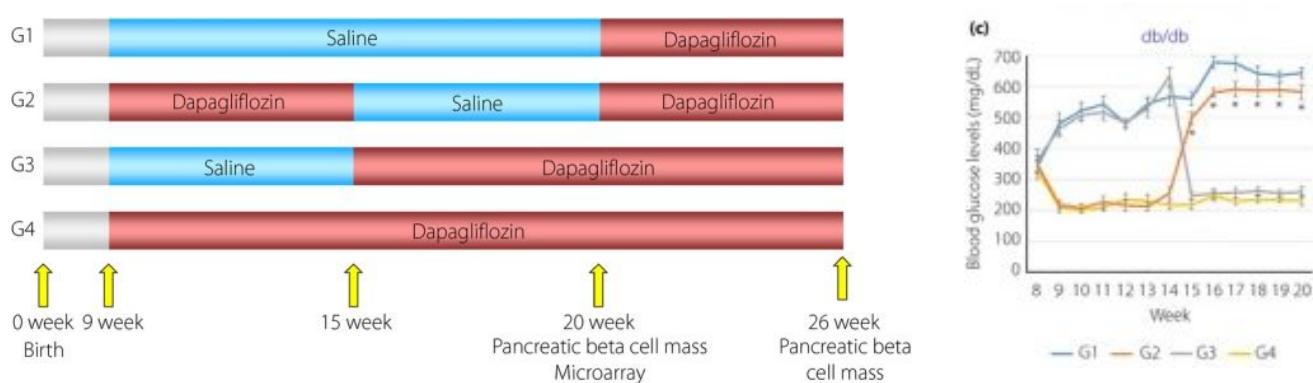
本研究では、現在臨床現場で使用されている血糖降下作用を有する薬剤がインスリンシグナルの下流に位置する TSC2 を膵β細胞特異的に欠損させたマウス ( $\beta$ TSC2<sup>-/-</sup>マウス) の代謝パラメータに与える影響およびそのメカニズムの解明することを通じて mTORC1 活性を適正範囲内に調節する薬剤を同定することが目的の一つであり、DPP-4 阻害薬 MK-626 が  $\beta$ TSC2<sup>-/-</sup>マウスの膵β細胞量に及ぼす影響について検討した。

MK-626 投与による体重に有意な差は認められなかった。次に12週齢における経口糖負荷試験および膵β細胞量に MK-626 は影響するののかについて検討した。経口糖負荷試験は、随時血糖値・随時インスリン値と同様に  $\beta$ TSC2<sup>-/-</sup>マウスは野生型マウスに比べて有意な低血糖、高インスリン血症を呈したが、MK-626 投与による変化は認められなかった。膵β細胞量は  $\beta$ TSC2<sup>-/-</sup>マウスは野生型マウスに比べて有意に膵β細胞量が増加したが、MK-626 投与によるさらなる変化は認められなかった。しかしながら、MK-626 投与  $\beta$ TSC2<sup>-/-</sup>マウスの膵島では、インスリンシ

グナルの減弱化が改善されており、膵β細胞保護に寄与すると考えられた。

研究期間内に mTORC1 シグナル活性亢進モデルマウスとして飼育してきた膵β細胞特異的 TSC2 遺伝子欠損マウスの表現系として、高血糖を生じる時期が大幅に遅くなり、遺伝子検査などでは明らかな原因を認めなかった。血糖上昇時期の変動は本研究に大きく影響するため、同じく mTORC1 シグナルが亢進している肥満 2 型糖尿病モデルマウスである db/db マウスや GCN2 欠損マウスを解析に用いることとした。

db/db マウスに経口血糖降下薬の一つである dapagliflozin (SGLT2) を投与し、その投与期間に比例して膵β細胞量が維持されること、投与期間が同じであれば、より早期投与が膵β細胞量を保持することを明らかとした。さらに、SGLT2 投与を終了後も血糖改善作用が続いており、SGLT2 の早期投与による膵β細胞量保持が legacy effect として影響することが分かった。早期 SGLT2 投与 db/db マウスでは Agr2、Tff2、Gkn3 遺伝子発現が上昇していることが分かり、これらの遺伝子が膵β細胞量保持の legacy effect に寄与している可能性が考えられた。



次に、GCN2 遺伝子欠損マウスを用いた解析において、GCN2 がアミノ酸欠乏を感知することで高脂肪食負荷時の膵β細胞保持に寄与していることが明らかとなった。高脂肪食負荷によりアミノ酸濃度の低下と uncharged tRNA の増加が膵β細胞にて認められた。膵β細胞特異的 GCN2 遺伝子欠損マウスは高脂肪食負荷によりインスリン分泌が低下すること、また、GCN2 は膵β細胞内においてプロインスリン mRNA の翻訳が亢進するときに活性化されることが明らかとなった。本研究により、高脂肪食下における GCN2 によるアミノ酸感知が膵β細胞量調節に寄与するメカニズムが明らかとなった。

GCN2 欠損マウスの膵島における発現を確認した結果、mTORC1 活性を負に制御する SESN2 のみが有意に発現低下していることが明らかとなった。SESN2 のノックダウンによって、膵β細胞株の mTORC1 活性は有意に亢進した。さらに SESN2 の発現ベクターを導入することにより、mTORC1 シグナルの抑制に伴った細胞増殖能の回復が認められた。これらの結果より、SESN2 は mTORC1 活性亢進に伴う膵β細胞不全において、治療標的分子となることが示唆された。

GCN2 は当初アミノ酸欠乏時に低栄養状態に対処するために機能するタンパクとして発見されたが、当研究室の研究により高脂肪食負荷による過栄養状態に対処する際に寄与する働きを担う可能性が示唆された。すなわち本研究は、2 型糖尿病候補遺伝子 GCN2 の SNP を有する患者が過食による膵β細胞不全を未然に防ぎうる手段を講じることに役立ち、将来的には SNP 解析によって割り出した疾患感受性遺伝子と食生活などの環境因子を加味した上で、患者個々に応じたオーダーメイド治療の実現へ導くものと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Kanno A, Asahara S, Kawamura M, Suzuki E, Takai T, Koyanagi-Kimura M, Matsuda T, Okada

Y, Ogawa W, Kido Y. Early administration of dapagliflozin preserves pancreatic beta cell mass through a legacy effect in type 2 diabetic mice. *J. Diab. Invest.* 査読有,10:577-590

Suzuki E, Matsuda T, Kawamoto T, Takahashi H, Mieda Y, Matsuura Y, Takai T, Kanno A, Kimura-Koyanagi M, Asahara S.-i, Inoue H, Ogawa W, Kido Y. Docosahexaenoic acid reduces palmitic acid-induced endoplasmic reticulum stress in pancreatic  $\beta$  cells. *Kobe J. Med. Sci.* 査読有,64:E43-55

Takai T, Matsuda T, Matsuura Y, Inoue K, Suzuki E, Kanno A, Kimura-Koyanagi M, Asahara S.-i, Hatano N, Ogawa W, Kido Y. Casein kinase 2 phosphorylates and stabilizes C/EBP in pancreatic  $\beta$  cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有,497:451-456

Kawada Y, Asahara S, Sugiura Y, Sato A, Furubayashi A, Kawamura M, Bartolome A, Terashi-Suzuki E, Takai T, Koyanagi-Kimura M, Matsuda T, Hashimoto N, Kido Y. Histone deacetylase regulates insulin signaling via two pathways in pancreatic  $\beta$  cells. *PLoS ONE*. 査読有,12:e0184435

〔学会発表〕(計 9 件)

古林鮎子、2型糖尿病感受性遺伝子 GCN2 は Sestrin2 を介して膵 $\beta$ 細胞量の調節に関与する、第 91 回日本内分泌学会学術集会、2018

韓 桂栄、グルタミングルタミン酸シグナルによるインスリン分泌増強機構の解明、第 61 回日本糖尿病学会学術集会、2018

山田瑞姫、ヒト iPS 細胞を用いた膵内分泌細胞への分化誘導、第 61 回日本糖尿病学会学術集会、2018

高井智子、膵 $\beta$ 細胞の小胞体ストレス誘導性アポトーシスにおける CK2 の役割、第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会、2017

鈴木江美、脂肪酸が膵 $\beta$ 細胞の小胞体に及ぼす影響、第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会、2017

下野名奈子、ヒト iPS 細胞を用いた 2 型糖尿病発症機序の解明、第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会、2017

井上佳歩、膵 $\beta$ 細胞の小胞体ストレス誘導性アポトーシスにおける CK2 の役割、第 40 回分子生物学会年会、2017

古林鮎子、高脂肪食負荷 GCN2 欠損マウスの膵島における mTORC1 シグナル調節機構の解明、第 40 回分子生物学会年会、2017

山田瑞姫、ヒト iPS 細胞を用いた膵内分泌細胞への分化誘導法の確立、第 40 回分子生物学会  
年会、2017

〔図書〕(計 0 件)

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：神野 歩

ローマ字氏名：Ayumi Kannno

研究協力者氏名：浅原 俊一郎

ローマ字氏名：Shun-ichiro Asahara

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。