

平成21年 6月12日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19390251  
 研究課題名（和文） インスリン抵抗性に対する膵β細胞量調節の分子メカニズムの解明  
 研究課題名（英文） Study on the molecular mechanism for the regulation of pancreatic beta-cell mass in response to insulin resistance  
 研究代表者  
 寺内 康夫  
 横浜市立大学大学院医学研究科・教授  
 研究者番号：40359609

## 研究成果の概要：

高脂肪食誘導性膵β細胞過形成の分子機構に関して、糖代謝を介した IRS-2 発現上昇が膵β細胞量増加に重要であることを明らかにした。グルコキナーゼ活性化薬が膵β細胞増殖作用を有することを明らかにした。野生型メスマウスおよびグルコキナーゼヘテロ欠損メスマウス、IRS-2 欠損メスマウスの非妊娠時・妊娠期の耐糖能・β細胞量を経時的に検討し、妊娠時の膵β細胞増加過程にグルコキナーゼ、IRS-2 非依存性経路が存在することを見出した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
平成20年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：インスリン、インスリン抵抗性、膵β細胞量

## 1. 研究開始当初の背景

日本人はもともとインスリン分泌能が低い民族であったが、肥満の進行に伴いインスリン抵抗性が増加した結果、低いインスリン分泌能力では十分にインスリン抵抗性を代償できなくなり、糖尿病の発症・進展につながったと考えられているが、その分子機構は不明な点が多い。また、2型糖尿病において膵β細胞量低下が注目されるようになったが、その病態や機序は未だ不明な点が多い。

また、2型糖尿病において膵β細胞量低下が注目されるようになったが (Bonner-Weir S.

Endocrinology, 141: 1926, 2000; Terauchi Y, et al. Endocr J, 49: 247, 2002; Rhodes CJ. Science, 307: 380, 2005)、その病態や機序は未だ不明な点が多い。

私たちは日本人の2型糖尿病モデルとして、膵β細胞型グルコキナーゼ欠損マウスを樹立した(Terauchi Y, et al. J. Biol. Chem., 1995; Terauchi Y, et al., J. Clin. Invest., 1997)。膵でのグルコース代謝の律速段階を担うグルコキナーゼの活性低下は、グルコース応答性インスリン分泌の低下を引き起こし、耐糖能障害を呈した。私たちはグルコキナーゼ欠損マウスが高脂肪食下では膵β細胞増殖障

害のために耐糖能が速やかに悪化すること、グルコキナーゼとインスリン受容体基質(IRS)-2を解したシグナルが高脂肪食下での膵β細胞過形成に重要であり、糖尿病の発症・進展抑制の鍵を握っていることを見出し、本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

第1に高脂肪食誘導性インスリン抵抗性下での膵β細胞代償性過形成の分子機構の全体像を解明する。第2に妊娠誘導性インスリン抵抗性下での膵β細胞代償性過形成の分子機構を解明する。第3に膵β細胞量を増大させる2型糖尿病の画期的な治療法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

### 1. 高脂肪食摂取によって招来される膵β細胞過形成の分子機構の解明

(1-1) IRS-2 過剰発現によるグルコキナーゼヘテロ欠損マウスの膵β細胞過形成障害改善の機序の解明: IRS-2 過剰発現グルコキナーゼヘテロ欠損マウス、グルコキナーゼヘテロ欠損マウス、IRS-2 過剰発現マウス、野生型マウスに高脂肪食を負荷、耐糖能、膵β細胞量、膵島のグルコース応答性インスリン分泌を検討する。IRS-2 過剰発現によるインスリン情報伝達経路の下流の遺伝子の膵島での発現変化を検討する。

(1-2) Pdx1 過剰発現によるグルコキナーゼヘテロ欠損マウスの膵β細胞過形成障害の救済: Pdx1 過剰発現グルコキナーゼヘテロ欠損マウスとグルコキナーゼヘテロ欠損マウス、さらに対照として野生型マウスに高脂肪食を負荷し、経時的に体重、耐糖能、インスリン感受性、膵β細胞の機能(インスリン分泌能と膵β細胞量)について検討する。

(1-3) 高脂肪食下での IRS-2 発現上昇のメカニズムの解明

(1-4) 高脂肪食負荷 IRS-1, グルコキナーゼダブル欠損マウスにおける膵β細胞量変化の検討

### 2. 妊娠誘導性の膵β細胞代償性過形成の分子機構の解明

(2-1) グルコキナーゼ欠損マウスの妊娠中・出産後の膵β細胞量変化の評価: メス野生型マウスおよびメスグルコキナーゼヘテロ欠損マウスの非妊娠時、妊娠期、出産後の耐糖能、β細胞量、β細胞機能(単離膵島のグルコース応答性インスリン分泌)を経時的に検討する。

(2-2) グルコキナーゼ欠損マウスの妊娠中・出産後の膵β細胞での遺伝子発現変化: 非妊娠時と比較して妊娠中のIRS-2およびインスリン情報伝達経路の下流の遺伝子の膵島における発現変化を検討する。

### 3. 膵β細胞量を増大させる2型糖尿病の画期的な治療法の開発

(3-1) 低分子量グルコキナーゼ活性化薬の膵β細胞量増加効果の検討

(3-2) GLP-1 注射剤、DPP-IV 阻害薬などGLP-1 活性を上昇させる薬剤の膵β細胞量増加効果の検討

## 4. 研究成果

### 1. 高脂肪食摂取によって招来される膵β細胞過形成の分子機構の解明

高脂肪食誘導性膵β細胞過形成の分子機構の解明に関しては、IRS-2 過剰発現グルコキナーゼヘテロ欠損マウス、グルコキナーゼヘテロ欠損マウス、IRS-2 過剰発現マウス、野生型マウスに高脂肪食を負荷、耐糖能、膵β細胞量、膵島のグルコース応答性インスリン分泌を検討し、IRS-2 発現上昇が膵β細胞量増加の鍵であることを明らかにした。また、高脂肪食下での IRS-2 発現上昇のメカニズムに関しては、糖代謝と CREB、IRS-2 を結びつけるカルモデュリンキナーゼ (CaMK) の役割を検討している。さらに負荷 IRS-1, グルコキナーゼダブル欠損マウスにおける膵β細胞量変化について検討し、2007年9月の欧州糖尿病会議で報告した。

### 2. 妊娠誘導性の膵β細胞代償性過形成の分子機構の解明

野生型メスマウスおよびグルコキナーゼヘテロ欠損メスマウス、IRS-2 欠損メスマウスの非妊娠時、妊娠期の耐糖能、β細胞量、β細胞機能を経時的に検討し、妊娠時の膵β細胞増加過程にグルコキナーゼ、IRS-2 非依存性経路が存在することを見出した。野生型マウス、グルコキナーゼ欠損マウスの妊娠中の膵β細胞での遺伝子発現変化を非妊娠時と比較するため、DNAチップ解析を行った。高脂肪食負荷時の遺伝子発現変化とあわせて比較すると、高脂肪食では発現が変化しないものの妊娠時に発現が上昇する遺伝子群を見出し、その病態生理学的意義を検証中である。

### 3. 膵β細胞量を増大させる2型糖尿病の画期的な治療法の開発

グルコキナーゼ活性化薬はグルコキナーゼのアロステリック部位に結合してそれを活性化する化合物で、グルコキナーゼの活性化によりグルコースに対する親和性や  $V_{max}$  が上昇する。その結果、膵β細胞ではインスリン分泌の血糖閾値が低下し、グルコース応答性インスリン分泌が亢進し、肝ではグルコースの取り込みが増加してグリコーゲン合成や解糖が促進する。このことよりグルコキ

ナーゼ活性化薬は、膵β細胞でのインスリン分泌能増強作用と肝での糖利用亢進作用を有しており、新しいタイプの糖尿病治療薬として期待されている。しかしグルコキナーゼ活性化薬の長期投与による糖代謝への影響やGKAの膵β細胞量に対する影響については不明であった。

野生型マウスおよび膵β細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損マウスを用いてグルコキナーゼ活性化薬の糖代謝や膵β細胞量に及ぼす影響を検討した。方法は両マウスに高脂肪食を負荷した群、および高脂肪食に0.04%のグルコキナーゼ活性化薬を混合させた特別食を負荷した群の4群において、20週間投与後の耐糖能、膵β細胞量について比較検討を行った。その結果、両マウスともに特別食群は高脂肪食群に対し投与開始後すぐに随時血糖の有意な低下を認め、負荷後20週の段階でも、同様に4群間で体重に差を認めず、特別食群での随時血糖の有意な低下が持続していた。また4群間で脂質代謝や脂肪組織重量、トランスアミナーゼ、肝重量、肝内中性脂肪含量に差を認めず、OGTTの結果においても、両マウスとも特別食群で耐糖能の明らかな改善を認めた。そして、負荷後20週での膵β細胞量（膵組織全体に占めるβ細胞の割合）は、両マウスとも高脂肪食群と特別食群で差を認めなかった。

では、われわれの仮説、「グルコキナーゼはIRS-2を介して膵β細胞量を調節している」は、グルコキナーゼ活性化薬に関しては当てはまらないのか。そこで、細胞レベルにおいてグルコキナーゼ活性化薬が膵β細胞量に与える影響について検討した。INS1細胞に低グルコース下で0μM、0.3μM、3μMグルコキナーゼ活性化薬、または高グルコースを加えたところ、高グルコース下では低グルコース下に比し、有意に増殖能を示すBrdUの取り込み率が増加した。また低グルコース下においては、グルコキナーゼ活性化薬投与により濃度依存性にBrdU取り込み率が増加した。さらにBrdU取り込み率と並行にIRS-2発現量が増加した。また、マウス単離膵島においてもグルコキナーゼ活性化薬投与によるIRS-2発現増加を確認した。次に個体レベルでのグルコキナーゼ活性化薬が膵β細胞量に与える影響を検討するために、両マウスに高脂肪食を20週間負荷した後、さらに高脂肪食を3日間だけ継続する群と特別食群に分け、その3日間、BrdU含有水を自由飲水させ、膵β細胞のBrdU取り込み率を検討した。その結果、両マウスとも特別食群において、BrdU取り込み率が明らかに増加している個体を認めた。

以上の成績より個体レベルにおいてもグルコキナーゼ活性化薬の膵β細胞増殖能増加作用を確認した。負荷後20週で膵β細胞

量の増加を認めなかったという点に関しては、GLP-1と膵β細胞量に関する報告<sup>11)</sup>より、改善された耐糖能が膵β細胞量に影響を与える可能性が想定される。実際、グルコキナーゼ活性化薬の投与により耐糖能がすみやかに改善しており、持続的な血糖降下がグルコキナーゼ活性化薬によるグルコキナーゼ活性化による細胞増殖効果を打ち消し、一層の膵β細胞量増加が抑制された可能性が考えられた。

日本人は欧米人の約2分の1のインスリン分泌能しかなく、インスリン分泌低下の素因を有している。現代社会における高脂肪食・運動量低下などのライフスタイルの変化は肥満をきたし、その結果としてのインスリン抵抗性の増悪がインスリン分泌低下の素因と相まって相対的インスリン作用不足を招き、2型糖尿病の発症が増大していると考えられる。グルコキナーゼヘテロ欠損マウスはインスリン分泌能が野生型マウスの約2分の1であることより高脂肪食負荷グルコキナーゼヘテロ欠損マウスは日本人の2型糖尿病の病態モデル動物と言える。そこで今回の検討で示されたグルコキナーゼ活性化薬の糖代謝改善作用の面から考えると、グルコキナーゼ活性化薬の血糖降下作用はインスリン分泌能低下という体質を有する日本人2型糖尿病にとっても参考になる基礎データといえる。またグルコキナーゼ活性化薬の膵β細胞増殖作用の面から考えた場合に、今回のデータでは個体レベルにおいて、耐糖能の改善が膵β細胞量の調節に関与していると考えられたが、例えば膵島移植や膵切除後糖尿病など、膵β細胞量の保持あるいは増加がもっとシビアに求められる病態においては、グルコキナーゼ活性化薬の膵β細胞量増殖作用を期待した治療応用なども考えられる。さらに日本人を含めた2型糖尿病患者において膵β細胞量が低下しているという報告があり、膵β細胞量減少糖尿病モデル動物を確立した上で、グルコキナーゼ活性化薬の膵β細胞量増加薬としての意義や抗アポトーシス作用などを検討していく必要がある。

## 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 4件)

Nakamura, A., Terauchi, Y., Ohyama, S., Kubota, J., Shimazaki, H., Nambu, T., Takamoto, I., Kubota, N., Eiki, J., Yoshioka, N., Kadowaki, T., and Koike, T. Impact of small molecule glucokinase activator on glucose metabolism, β cell function and mass. *Endocrinology*, 150: 1147-1154, 2009, 査読あり.

Takamoto, I., Terauchi, Y., Kubota, N., Ohsugi, M., Ueki, K., and Kadowaki, T. : Crucial role of IRS-2 in compensatory  $\beta$ -cell hyperplasia in response to high-fat-diet-induced insulin resistance. *Diabetes Obes. Metab.*, 10 Suppl 4: 147-156, 2008, 査読あり.

Kubota, N., Kubota, T., Itoh, S., Kumagai, H., Kozono, H., Takamoto, I., Mineyama, T., Ogata, H., Tokuyama, K., Ohsugi, M., Sasago, T., Moroi, M., Sugi, K., Kakuta, S., Iwakura, Y., Noda, T., Nagai, R., Tobe, K., Terauchi, Y., Ueki, K., and Kadowaki, T. : Dynamic functional relay between insulin receptor substrate 1 and 2 in hepatic insulin signaling during fasting and feeding. *Cell Metab.* 8: 49-64, 2008, 査読あり.

Terauchi, Y., Takamoto, I., Kubota, N., Matsui, J., Suzuki, R., Komeda, K., Hara, A., Toyoda, Y., Miwa, I., Aizawa, S., Tsutsumi, S., Tsubamoto, Y., Hashimoto, S., Eto, K., Nakamura, A., Noda, M., Tobe, K., Aburatani, H., Nagai, R., and Kadowaki, T. : Glucokinase and Irs2 are required for compensatory  $\beta$ -cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 117 : 246-257, 2007, 査読あり.

[学会発表] (計 14 件)

Nakamura A, Takamoto I, Kubota N, Ohshima S, Kubota J, Shimazaki E, Nambu T, Eiki J, Kadowaki T, Terauchi Y. Impact of small molecule glucokinase activator on glucose metabolism,  $\beta$ cell function and mass. 68<sup>th</sup> American Diabetes Association. San Francisco, 2008, 6.

Terauchi Y., Nakamura A, Takamoto I, Kubota N, Kadowaki T: Role of glucokinase in the regulation of  $\beta$  cell mass under insulin resistant conditions. 43<sup>rd</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes. Amsterdam, 2007, 9.

Nakamura A, Takamoto I, Kubota N, Ohshima S, Shimazaki E, Eiki J, Kadowaki T, Terauchi Y. Impact of small molecule glucokinase activator on glucose metabolism in response to high-fat-diet in mice with  $\beta$ -cell specific haploinsufficiency of glucokinase gene. 67<sup>th</sup> American Diabetes Association. Chicago, 2007, 6.

中村昭伸, 寺内康夫, 吉岡成人, 小池隆夫 : グルコキナーゼ依存性・非依存性 $\beta$ 細胞量調節機構の解明と治療法の開発. 第 45 回日本臨床分子医学会学術集会, 神戸, 2008, 7.

中村昭伸, 高本偉碩, 窪田直人, 大山純加, 久保田順子, 島崎裕子, 南部忠洋, 永木淳一, 門脇孝, 寺内康夫 : グルコキナーゼ活性化薬が糖代謝と $\beta$ 細胞量に及ぼす影響. 第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会, 東京, 2008, 5.

中村昭伸, 高本偉碩, 窪田直人, 門脇孝, 寺内康夫 : グルコキナーゼヘテロ欠損マウスにおける高脂肪食負荷と妊娠における $\beta$ 細胞量調節機構の差異. 第 81 回日本内分泌学会学術総会, 青森, 2008, 5.

中村昭伸, 寺内康夫 : グルコキナーゼ活性化薬が糖代謝と $\beta$ 細胞量・機能に及ぼす影響. 第 12 回シンポジウム糖尿病, 東京, 2008, 4.

中村昭伸, 高本偉碩, 窪田直人, 大山純加, 久保田順子, 島崎裕子, 南部忠洋, 永木淳一, 門脇孝, 寺内康夫 : グルコキナーゼ活性化薬が糖代謝と $\beta$ 細胞量・機能に及ぼす影響. 第 22 回日本糖尿病肥満動物学会, 東京, 2008, 2.

中村昭伸, 寺内康夫 : グルコキナーゼ活性化薬が糖代謝と $\beta$ 細胞量に及ぼす影響. 第 19 回分子糖尿病学シンポジウム, 神戸, 2007, 12.

中村昭伸, 高本偉碩, 窪田直人, 門脇孝, 寺内康夫 : グルコキナーゼ活性化薬の $\beta$ 細胞量に及ぼす影響. 第 44 回日本臨床分子医学会, 和歌山, 2007, 7.

中村昭伸, 高本偉碩, 窪田直人, 門脇孝, 寺内康夫 : グルコキナーゼヘテロ欠損マウスにおける高脂肪食負荷と妊娠における $\beta$ 細胞量調節機構の差異. 第 80 回日本内分泌学会学術総会, 東京, 2007, 6.

高本偉碩, 寺内康夫, 窪田直人, 鈴木亮, 橋本信嗣, 窪田哲也, 峯山智佳, 伊藤晋介, 中村昭伸, 山内敏正, 植木浩二郎, 戸辺一之, 門脇孝 : 高脂肪食誘導性のインスリン抵抗性に対する $\beta$ 細胞過形成の分子メカニズムの解明. 第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会, 仙台, 2007, 5.

寺内康夫 : インスリン抵抗性下の $\beta$ 細胞量の調節異常. 第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会シンポジウム 5 「2 型糖尿病の $\beta$ 細胞異常 (機能・量)」, 仙台, 2007, 5.

中村昭伸, 高本偉碩, 窪田直人, 大山純加, 島崎裕子, 永木淳一, 門脇孝, 寺内康夫 : 高脂肪食負荷グルコキナーゼヘテロ欠損マウスにおけるグルコキナーゼ活性化薬の効果. 第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会, 仙台, 2007, 5.

[図書] (計 7 件)

中村昭伸, 寺内康夫 :  $\beta$ 細胞を増やす : グルコキナーゼ活性化と $\beta$ 細胞増殖. 最新医学, 64: 196-202, 2008

寺内康夫 : 序文. 2 型糖尿病における $\beta$ 細胞研究の進歩, 5, 2008.

寺内康夫 : インスリン抵抗性下の $\beta$ 細胞量の異常. 2 型糖尿病における $\beta$ 細胞研究の進歩, 42-48, 2008.

白川純, 中村昭伸, 寺内康夫 : インスリン抵抗性下における $\beta$ 細胞量調節障害. 細胞

40(10) : 19-23, 2008.

中村昭伸, 寺内康夫 : IRS-2 と膵β細胞量.  
2008年 増刊号新時代の糖尿病学 1-病因・  
診断・治療研究の進歩-

寺内康夫 : 膵β細胞量の調節異常. 糖尿病学  
の進歩 41, 日本糖尿病学会編, 16-20, 2007.

寺内康夫 : インスリン分泌におけるグルコキ  
ナーゼの役割. カラー版 糖尿病学 基礎と  
臨床, 西村書店, 60-64, 2007.

[その他]

ホームページ

[http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~n  
ai3naib/](http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~n<br/>ai3naib/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

寺内 康夫 (TERAUCHI YASUO)  
横浜市立大学大学院医学研究科・教授  
研究者番号 : 40359609

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

木村 真理 (KIMURA MARI)  
横浜市立大学医学部・准教授  
研究者番号 : 40363840  
青木 一孝 (AOKI KAZUTAKA)  
横浜市立大学医学部・助教  
研究者番号 : 60336542  
高橋 まゆみ (TAKAHASHI MAYUMI)  
横浜市立大学医学部・助手  
(現 済生会横浜市南部病院・医長見習い)  
研究者番号 : 10405003