

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2007 年～2008 年度

課題番号：19591046

研究課題名（和文） インクレチンによる膵β細胞増殖・抗糖尿病作用の研究

研究課題名（英文） Effect of incretin on beta cell proliferation and prevention of diabetes

研究代表者 清野 裕 (SEINO YUTAKA)

京都大学 医学研究科 名誉教授

研究者番号：40030986

研究成果の概要：膵β細胞機能の障害は糖尿病発症の重要な要因である。腸管から分泌されインスリン分泌促進作用を持つホルモンであるインクレチンの一つ、GLP-1 のアナログの投与により、糖尿病モデルマウスの膵β細胞障害を抑制し、膵β細胞の数・量が保たれ、血糖の上昇が抑制されることが示された。今後β細胞障害抑制機序の詳細に関して、さらなる組織学的・分子学的検討を継続し、そのメカニズムを解明する。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：エネルギー・糖質代謝異常

1. 研究開始当初の背景

腸管における栄養素の吸収は代謝の最初のステップであるが、腸管の役割は栄養の吸収に止まらず、吸収された栄養素の代謝にも内分泌器官として作用を有していることが近年解明されてきた。GLP-1 や GIP などのインクレチンは腸管から分泌されるホルモンであり、研究代表者らは、これらのインクレチンが食後早期に膵β細胞からのインスリン分泌を増強し食後高血糖の抑制に働くこと (*Proc Natl Acad Sci USA*, 1999; *Am J Physiol*, 2003; *Eur J Endocrinol*, 2004; *Diabetes*, 2004 など) や、GIP が脂肪細胞にも直接作用し糖や脂肪の取り込みを促進さ

せることを明らかにしてきた (*Nature Med*, 2002)。また、これらインクレチンは、細胞内 cAMP 濃度の調節によってインスリン分泌を促進するが、cAMP は膵β細胞の増殖にも関与している (*Mol Cell Biol*, 2004 など) ことから、膵β細胞の増殖効果が期待されている。

一方、膵β細胞機能の障害は糖尿病発症の重要な要因であり、2型糖尿病において膵β細胞は経年的に機能が低下すると同時に数的・量的にも減少することが、UKPDS などの大規模臨床試験で示唆されている。特に日本人の2型糖尿病はインスリン分泌不全が主体となることが多く、進行性にインスリン

分泌が低下する。この膵β細胞障害の機序の一因として、近年、小胞体ストレス(ERS)が注目されている。

現在臨床試験が進んでいるインクレチンシグナルを活用した糖尿病治療薬(インクレチン誘導体やインクレチン分解阻害薬)は、インスリン分泌を増強させるだけでなく、長期的使用により膵β細胞量を増加させ糖尿病を改善する効果や、糖尿病早期より使用することにより膵β細胞の減少を抑制する効果が期待されていることから、インクレチンの膵β細胞増殖・抗糖尿病作用の検討を試みた。

2. 研究の目的

本研究では ERS が原因で糖尿病を発症する自然発症糖尿病マウスをモデル動物とし、GLP-1 シグナルの増強が、ERS によって惹き起こされる膵β細胞障害に与える効果について検討した。

3. 研究の方法

(1)対象：モデル動物

Akita マウスは、インスリン2遺伝子の点突然変異により、インスリンA鎖とB鎖を結合するS-S結合が形成されなくなることから、蛋白構造が変化した異常インスリンが小胞体に増加・蓄積することで、ERSを介したアポトーシスが惹起され、高度の膵β細胞障害を来す自然発症糖尿病モデルマウスであり、ERSのモデルとしても広く用いられている。

このAkitaマウスに対し、GLP-1アナログであるexendin-4(Ex-4)を2週齢から4週齢までの2週間、24nmol/kg、1日2回腹腔内投与し、血糖値、膵ラ氏島の形態的变化および小胞体ストレスマーカー(CHOP)に関して、PBS投与群と比較した。また同時にアポトーシス(TUNEL)・細胞増殖能(PCNA)についても免疫染色を用いて組織学的に検討した(図1)。さらに血糖値の改善による膵島保護効果とGLP-1シグナル固有の作用とを区別するため、Akitaマウスにフロリジンを投与し、Ex-4投与群と同等の血糖値に降下させた群で、同様の検討を行った。

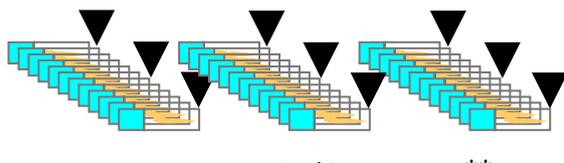


図1 組織学的検討(インスリン染色)

Wild、Akita(Ex-4+)、Akita(Ex-4-)各群の膵臓摘出標本から5枚おきに5枚の切片を抽出、インスリン染色し、陽性領域の形態(染色性・形状)を観察、面積・数を測定した。

4. 研究成果

[研究の結果]

- (1) Ex-4投与群ではPBS投与群に比し血糖値の上昇が有意に抑制されていた(図2)。そこで、フロリジン群では、フロリジンを同等の血糖になるよう調整して投与した。観察期間中の各群の体重に著明な差は見られなかった。

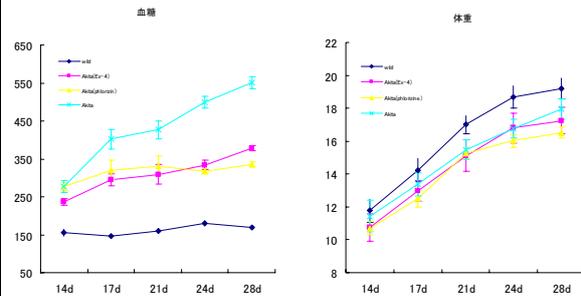
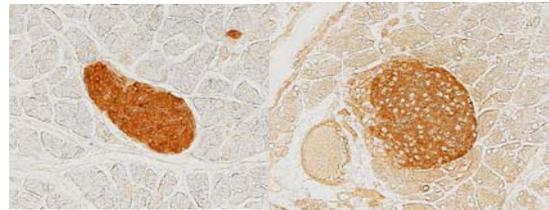
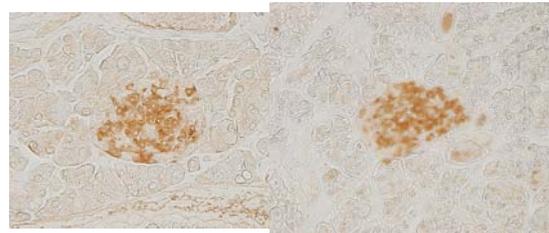


図2 随時血糖・体重

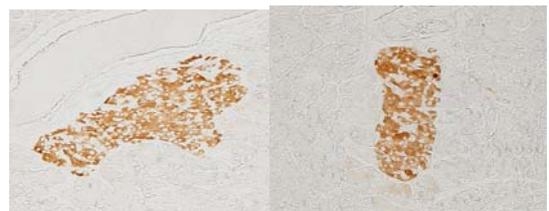
- (2) 膵ラ氏島の組織学的検討: Ex-4投与群ではPBS投与群に比べ膵ラ氏島面積は高値で、PBS投与群に見られたインスリン染色陽性部分の染色性低下や形状の崩壊が抑制されていた(図3,4)。一方、PBS投与群・フロリジン投与群の間には有意な差を認めなかった。



Wild(正常)の膵島

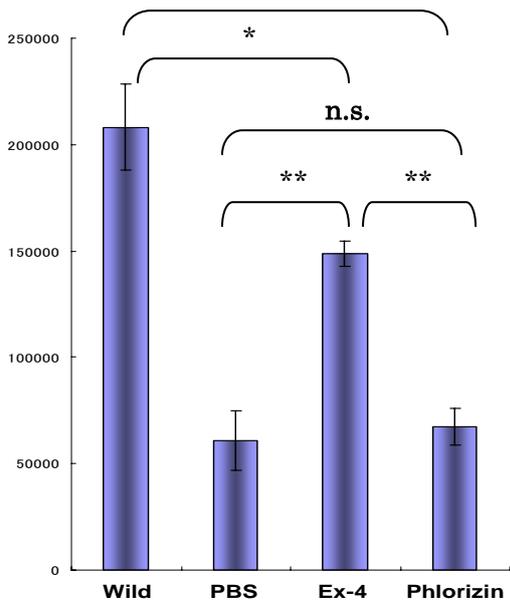


PBS群の膵島



Ex-4群の膵島

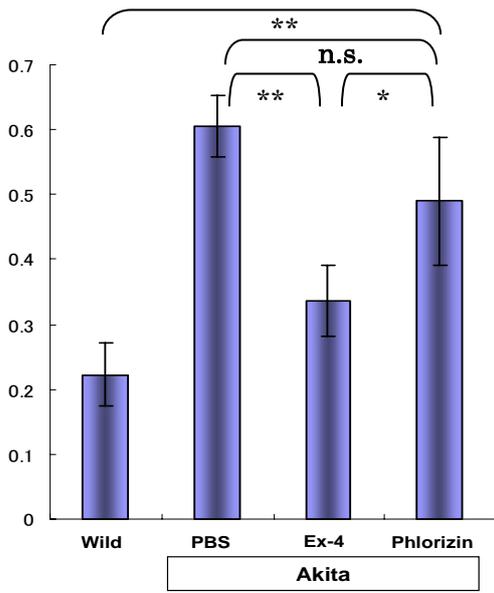
図3 膵ラ氏島の組織



(* p<0.05, **p<0.01)

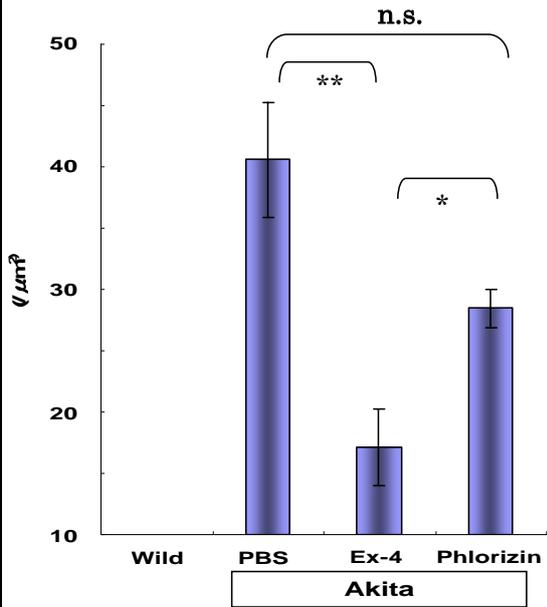
図4 インスリン陽性細胞面積の比較

(3) ERS に対する影響の検討：定量的 real time PCR を用いて検討した膵島での CHOP の mRNA 発現量は、Ex-4 投与群で PBS 群に比し有意に低値であった(図 5)。また免疫染色により比較した膵ラ氏島単位面積あたりの TUNEL 陽性細胞数は Ex-4 投与群で有意に減少し(図 6)、PCNA 陽性細胞数は増加の傾向を示した(図 7)。同様の傾向がフロリジン投与群においても認められたが、Ex-4 投与群はフロリジン群に対しても有意に TUNEL 陽性細胞数を抑制していた。



(* p<0.05, **p<0.01)

図5 CHOP mRNA の比較



(* p<0.05, **p<0.01)

図6 膵島あたりの TUNEL 陽性細胞数の比較

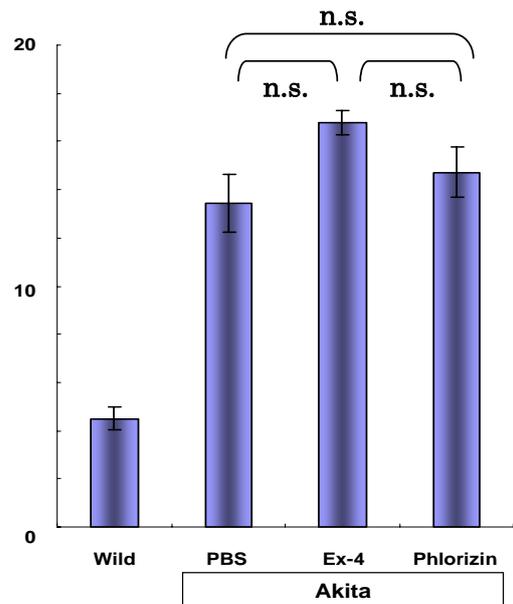


図7 膵島あたりの PCNA 陽性細胞数の比較

[成果のインパクト]
Ex-4 投与による GLP-1 シグナルの増強が、ERS による膵β-細胞障害を抑制し、膵β細胞の増殖を促進して抗糖尿病作用を発揮することが示唆された。この作用は、フロリジンと比べても有意差が見られることから、EX-4 の作用は血糖降下を通じた糖毒性の解除のみならず、β細胞への直接の保護作用が存在することが示唆された。

これらの結果は、現在注目されているインクレチンの新たな作用の解明の可能性として、国内及び国外の学会に演題採択され、発表を行った。

[今後の展望] GLP-1 アナログを用いてシグナルを増強することにより、小胞体ストレスに伴う膵β細胞障害を抑制しうることを示唆された。Ex-4 投与による膵β細胞保護効果は ERS に起因するアポトーシスの減少を介しており、その効果は血糖効果とは独立した作用であることが示唆される結果となった。これらの作用がインクレチン固有の直接作用であることを証明するためには、インスリンの影響を排除する必要がある、インスリン治療群を加えてさらなる検討を行う。また、これらの作用の機序の詳細に関しては未だ明らかではない部分も多く、今後β細胞障害抑制機序の詳細に関して、さらなる組織学的・分子学的検討を継続する。

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)

[学会発表] (計 2 件)

山根俊介、原田範雄、山田千積、豊田健太郎、浜本芳之、清野裕、稲垣暢也

GLP-1 シグナルの増強は Akita マウスの膵β細胞障害を抑制する

第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会 2008 年 5 月 23 日

山根俊介、浜本芳之、原田範雄、豊田健太郎、清野裕、稲垣暢也

GLP-1 receptor activation attenuates beta cell damage in Akita mice

第 44 回欧州糖尿病学会 2008 年 9 月 9 日
ローマ、イタリア

[産業財産権]

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清野 裕 (SEINO YUTAKA)

京都大学・医学研究科・名誉教授

研究者番号：40030986

(2) 研究分担者

浜本 芳之 (HAMAMOTO YOSHIYUKI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50390787

豊田 健太郎 (TOYODA KENTAROU)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：00447971

(3) 連携研究者

山根 俊介 (YAMANE SYUNSUKE)

京都大学・医学研究科・大学院