

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08992

研究課題名(和文) グルコキナーゼの制御による膵 細胞量調節メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of pancreatic beta-cell mass regulation mechanism by glucokinase

研究代表者

中村 昭伸 (Nakamura, Akinobu)

北海道大学・医学研究院・講師

研究者番号：70552420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病の病態の特徴の一つとして、進行性の膵 細胞量の低下があげられる。それゆえ、膵 細胞量の進行性低下を予防し、膵 細胞量を保持することが2型糖尿病の病態に即した治療として考えられる。われわれはグルコキナーゼの制御による膵 細胞量調節メカニズムの解明をすすめた。その結果、肥満2型糖尿病モデルマウスへのグルコキナーゼ活性化薬投与において、インスリン分泌能および膵 細胞量は増加しないこと、グルコキナーゼの活性抑制が、膵 細胞機能ならびに膵 細胞量を保持することで耐糖能を改善することを個体レベルで明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グルコキナーゼ活性の抑制は、糖尿病病態で認められる過剰な糖代謝を適正化するという膵 細胞overworkの軽減、すなわち「Beta cell rest」という概念に一致しており、膵 細胞を刺激してインスリンを分泌させることで血糖を低下させるという従来の方と逆の発想による2型糖尿病治療へのアプローチであり、極めて創造性、新規性は高い。さらに本研究は、トランスレーショナルリサーチとして、将来的な臨床試験を含めた2型糖尿病の臨床応用に展開できることが大いに期待される。

研究成果の概要(英文)：One of the pathophysiological features of type 2 diabetes is the progressive decrease in pancreatic beta-cell mass. Therefore, prevention of the progressive decrease in beta-cell mass and maintenance of beta-cell mass are considered as therapeutics in type 2 diabetes. We aimed to elucidate the beta-cell mass regulation mechanism by glucokinase. As a result, administration of a glucokinase activator to a mouse model of obese diabetes did not increase insulin secretion and beta-cell mass. On the other hand, glucokinase inactivation improved glucose tolerance by maintaining beta-cell function and mass.

研究分野：糖尿病内分泌代謝内科学

キーワード：グルコキナーゼ 膵 細胞

## 1. 研究開始当初の背景

日本を含めた世界における糖尿病患者の増加が大きな医学的・社会的問題となっている。糖尿病とはインスリン作用不足による慢性の高血糖状態を主徴とする代謝症候群と定義され、血糖値の調節は、膵細胞からのインスリン分泌動態と、肝、筋、脂肪細胞などの糖の取り込みや代謝に関わる器官におけるインスリン感受性との精妙なバランスのうえに成り立っている。インスリン感受性が低下し、血中インスリンレベルに見合ったインスリン作用が得られない病態をインスリン抵抗性と呼び、糖尿病の9割以上を占める2型糖尿病の病態の中心であると理解されてきた。しかし、2型糖尿病においても常に膵細胞の障害が認められることが明らかになってきた。肥満などによって生じるインスリン抵抗性に対する正常な膵細胞の反応は、血糖値を維持するため代償的にインスリンをより多く分泌することであり、膵細胞の代償反応が破綻すると2型糖尿病を発症する。この膵細胞の障害は膵細胞の機能障害に加え、膵細胞量の低下とも関係していることが明らかになっている。そのため、進行性に低下する膵細胞量を保持することが2型糖尿病の病態に即した治療として考えられる。

グルコキナーゼは膵細胞において、グルコース応答性インスリン分泌(膵細胞機能)を制御するのみならず、膵細胞量の調節機構にも重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。これまでの遺伝子改変マウスおよびヒト遺伝子変異症例の知見より、グルコキナーゼの活性化が、膵細胞機能の亢進、膵細胞量の増加をもたらし、2型糖尿病の治療標的になり得ると考えられた。しかしながら、2型糖尿病で見られる進行性の膵細胞量の低下に対するグルコキナーゼの影響は明らかでない。2型糖尿病病態においては、グルコキナーゼの活性化により、膵細胞内のグルコースシグナルが過剰となり、長期的には膵細胞不全が生じる可能性が考えられ、反対に膵細胞グルコキナーゼの抑制により、長期的には進行性の膵細胞機能・量の低下を予防し得る可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では肥満2型糖尿病モデル動物を用いて、第1にグルコキナーゼの活性化が膵細胞量に与える影響を、第2にグルコキナーゼの抑制が膵細胞量に与える影響を検討し、グルコキナーゼの制御による膵細胞量調節メカニズムの解明をすすめ、グルコキナーゼを標的とした2型糖尿病に対する新たな予防法・治療法の確立を目指す。第1の検討においては、グルコキナーゼの活性化により、短期的には膵細胞内のグルコースシグナルの流入により膵細胞の機能亢進および増殖を引き起こし耐糖能は改善するが、長期的には2型糖尿病病態でみられる「ブドウ糖毒性」、すなわち高血糖状態が持続することで膵細胞内のグルコースシグナルが過剰となり膵細胞不全が生じるという現象を引き起こすのではないかという仮説を検証し、そのメカニズムを解明することを目的とする。第2の検討においては、膵細胞のグルコキナーゼ活性を抑制することで、外的刺激による膵細胞内のグルコースシグナルの過剰な活性化を抑制(適正化)することにより、「ブドウ糖毒性」による膵細胞不全を抑制し、進行性の膵細胞量の低下を予防するのではないかという仮説を検証し、そのメカニズムを解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) グルコキナーゼの活性化が膵細胞量に与える影響

肥満2型糖尿病モデルマウスであるdb/dbマウス雄6週齢を普通食飼育群と0.04%グルコキナーゼ活性化薬(GKA)混合食群に群別して飼育した。1、6、14、および28日間の複数の飼育期間に分け、体重、随時血糖の測定に加え、インスリン負荷試験、経口ブドウ糖負荷試験の評価を行った。また、各飼育期間後に各臓器を摘出した上で膵臓・肝臓を用いて組織学的分析や遺伝子発現分析、蛋白発現分析を行った。

### (2) グルコキナーゼの抑制が膵細胞量に与える影響

グルコキナーゼヘテロ欠損db/dbマウスを作製し、db/dbマウスを対照とし、耐糖能、膵細胞量および生存時間を比較検討した。また、単離された膵島の遺伝子発現をDNAマイクロアレイ法および定量的リアルタイムPCR法を用いて評価した。また、単離された膵島のメタボローム解析を行い、代謝産物を比較検討した。

## 4. 研究成果

## (1) グルコキナーゼの活性化が膵 細胞量に与える影響

体重は2群間で明らかな差はなかった。随時血糖は普通食飼育群に比し、GKA混合食群では投与6日目まで低下したが、以後は上昇し差は消失した(投与6日目:普通食飼育群  $454 \pm 84$  mg/dl、GKA混合食群  $257 \pm 85$  mg/dl、投与28日目:普通食飼育群  $588 \pm 102$  mg/dl、GKA混合食群  $508 \pm 129$  mg/dl)。

経口ブドウ糖負荷試験で評価した耐糖能は、普通食飼育群に比しGKA混合食群では投与4、11日目でのみ改善し、投与25日目には2群間の差は消失した。インスリン負荷試験で評価したインスリン感受性は、2群間で差はなかった。また、空腹時インスリン血糖比や膵 細胞量、膵 細胞増殖能はいずれも、投与1週目、4週目とも2群間で差はなかった。さらに、投与6日目に単離した膵島を用いて、膵 細胞の増殖や機能に関わる遺伝子群の発現をリアルタイム PCR法で比較検討したが、普通食飼育群とGKA混合食群の比較においては有意な変化を示す遺伝子は認めなかった。

インスリン分泌や膵 細胞の検討では、GKA治療による効果はみられなかったため、GKAのもう一つの作用器官である肝臓の検討を行った。解剖時の肝重量は、普通食飼育群に比してGKA混合食群で増加した。肝組織を用いたヘマトキシリン・エオジン染色やオイルレッドO染色での評価では、投与6日目において普通食飼育群と比べてGKA混合食群で顕著な脂肪蓄積がみられた。肝内中性脂肪含量は、投与6日目において普通食飼育群と比較し、GKA混合食群で増加した(普通食飼育群  $130 \pm 18$  mg/g liver、GKA混合食群  $226 \pm 20$  mg/g liver)。投与1日目の肝遺伝子発現解析では、普通食飼育群に比し、GKA混合食群では脂肪合成関連遺伝子であるChrebp-bが上昇し、糖新生促進に関与する遺伝子であるPepckが低下した。さらに投与6日目の検討では、GKA混合食群ではさらに下流の脂肪合成関連遺伝子であるAcc、Fas、Elavl6が上昇し、投与1日目においてみられたChrebp-bやPepckの変化は消失した。また、投与0、1、6、14日目の肝組織を用いたインスリンシグナルに関連する蛋白であるAKT、forkhead box protein O1、extracellular signal-regulated kinasesのリン酸化の評価では、GKA混合食群において経時的な変化を認めなかった。

以上より、db/dbマウスへのGKA投与により、第 相臨床試験と同様の一過性の血糖降下作用が再現されたと考えた。db/dbマウスへのGKAの投与により、膵 細胞量やインスリン分泌が増加しないこと、また肝臓の脂肪蓄積が亢進することが明らかとなった。特に肝において、GKA投与初期からのChrebpやその下流の脂肪合成関連遺伝子の増加と、糖新生促進関連遺伝子であるPepckの抑制がみられた。すなわち、GKA投与初期から肝での糖利用として脂肪合成が亢進したと同時に、肝からの糖新生が抑えられることで、血糖低下作用を示したと考えられる。さらにGKAによるChrebpやPepckの発現の一過性の変化は、GKAによる血糖降下作用と同様に経時的に消失することが分かった。

## (2) グルコキナーゼの抑制が膵 細胞量に与える影響

グルコキナーゼヘテロ欠損db/dbマウスでは、db/dbマウスよりも随時血糖値が13週齢以降徐々に低下した。経口ブドウ糖負荷試験では、グルコキナーゼヘテロ欠損db/dbマウスはdb/dbマウスと比較して有意に耐糖能が改善した。また、24週齢のグルコキナーゼヘテロ欠損db/dbマウスでは、db/dbマウスと比較して、膵 細胞量が有意に増加していた(グルコキナーゼヘテロ欠損db/dbマウス  $22.5 \pm 10.1$  mg vs. db/dbマウス  $7.0 \pm 7.1$  mg)。さらに、グルコキナーゼヘテロ欠損db/dbマウスの生存期間は、db/dbマウスの生存期間よりも有意に長かった。DNAマイクロアレイ法を用いて膵島の遺伝子発現を網羅的に解析したところ、グルコキナーゼヘテロ欠損db/dbマウスと比較してdb/dbマウスの膵島では、酸化ストレス関連遺伝子の発現が低下していることが明らかになった。定量的リアルタイムPCRを用いた遺伝子発現の比較検討の結果、グルコキナーゼヘテロ欠損db/dbマウスではdb/dbマウスと比較して、ブドウ糖代謝に関わるピルビン酸カルボキシラーゼ(Pcx)、膵 細胞機能や成熟に関わる転写因子であるNkx6.1、Mafa、Pdx1、増殖に関わるKi67、Ccnd2の発現が増加していることが明らかになった。一方、酸化ストレスに関連する遺伝子であるAtf3やCybaはグルコキナーゼヘテロ欠損db/dbマウスで減少していた。メタボローム解析では、解糖系に属するフルクトース6-リン酸、ピルビン酸、乳酸などの代謝物が減少し、TCA回路や酸化的リン酸化に関連するイソクエン酸やATPが増加していた。

これらの結果から、膵 細胞のグルコキナーゼを抑制することで、酸化ストレスが軽減し、膵 細胞関連転写因子の発現が上昇すると同時に、膵島の代謝パターンが糖尿病性膵島で観察されるような解糖系優位から、TCAサイクルと酸化的リン酸化優位へとシフトすることで、膵 細胞量が増大し、耐糖能が改善することが示唆された。

以上よりグルコキナーゼの抑制が、過剰なグルコースシグナルを抑制(適正化)することにつながり、ブドウ糖毒性による膵 細胞不全を抑制し、膵 細胞機能ならびに膵 細胞量を保持す

ることで耐糖能を改善するということを、個体レベルで明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakamura Akinobu, Omori Kazuno, Terauchi Yasuo	4. 巻 23
2. 論文標題 Glucokinase activation or inactivation: Which will lead to the treatment of type 2 diabetes?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diabetes, Obesity and Metabolism	6. 最初と最後の頁 2199 ~ 2206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dom.14459	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawata Shinichiro, Nakamura Akinobu, Miyoshi Hideaki, Yang Kelaier, Shigesawa Ikumi, Yamauchi Yuki, Tsuchida Kazuhisa, Omori Kazuno, Takahashi Kiyohiko, Nomoto Hiroshi, Kameda Hiraku, Cho Kyu Yong, Terauchi Yasuo, Atsumi Tatsuya	4. 巻 24
2. 論文標題 Glucokinase activation leads to an unsustained hypoglycaemic effect with hepatic triglyceride accumulation in db/db mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diabetes, Obesity and Metabolism	6. 最初と最後の頁 391 ~ 401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dom.14586	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsuchida Kazuhisa, Nakamura Akinobu, Miyoshi Hideaki, Yang Kelaier, Yamauchi Yuki, Kawata Shinichiro, Omori Kazuno, Takahashi Kiyohiko, Kitao Naoyuki, Nomoto Hiroshi, Kameda Hiraku, Cho Kyu Yong, Seino Yusuke, Terauchi Yasuo, Atsumi Tatsuya	4. 巻 12
2. 論文標題 Glucokinase is required for high starch diet induced cell mass expansion in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 1545 ~ 1554
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13532	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Omori Kazuno, Nakamura Akinobu, Miyoshi Hideaki, Yamauchi Yuki, Kawata Shinichiro, Takahashi Kiyohiko, Kitao Naoyuki, Nomoto Hiroshi, Kameda Hiraku, Cho Kyu Yong, Terauchi Yasuo, Atsumi Tatsuya	4. 巻 70
2. 論文標題 Glucokinase Inactivation Paradoxically Ameliorates Glucose Intolerance by Increasing $\beta$ -Cell Mass in db/db Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 917 ~ 931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2337/db20-0881	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Omori Kazuno, Nakamura Akinobu, Miyoshi Hideaki, Takahashi Kiyohiko, Kitao Naoyuki, Nomoto Hiroshi, Kameda Hiraku, Cho Kyu Yong, Takagi Ryo, Hatanaka Kanako C., Terauchi Yasuo, Atsumi Tatsuya	4. 巻 98
2. 論文標題 Effects of dapagliflozin and/or insulin glargine on beta cell mass and hepatic steatosis in db/db mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Metabolism	6. 最初と最後の頁 27 ~ 36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.metabol.2019.06.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Akinobu	4. 巻 69
2. 論文標題 Glucokinase as a therapeutic target based on findings from the analysis of mouse models	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 479 ~ 485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ21-0742	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Yamauchi Y, Nakamura A, Yokota T, Takahashi K, Kawata S, Tsuchida K, Omori K, Nomoto H, Kameda H, Cho KY, Anzai T, Tanaka S, Terauchi Y, Miyoshi H, Atsumi T.
2. 発表標題 Improved mitochondrial function by luseogliflozin prevents pancreatic beta-cell damage.
3. 学会等名 81st Scientific Sessions for American Diabetes Association. (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村昭伸、寺内康夫
2. 発表標題 グルコキナーゼの制御が膵 細胞量に与える影響
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村昭伸
2. 発表標題 モデル動物を用いた2型糖尿病治療法の確立に向けた研究
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会研究奨励賞受賞講演（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川田晋一朗、中村昭伸、三好秀明、重沢郁美、山内裕貴、関崎知紀、土田和久、大森一乃、高橋清彦、北尾直之、野本博司、亀田啓、曹圭龍、寺内康夫、渥美達也
2. 発表標題 db/dbマウスを用いたグルコキナーゼ活性化薬の血糖降下作用消失機序の解明
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuno Omori, Akinobu Nakamura, Hideaki Miyoshi, Shinichiro Kawata, Kiyohiko Takahashi, Hiroshi Nomoto, Hiraku Kameda, Kyu Yong Cho, Yasuo Terauchi, Tatsuya Atsumi
2. 発表標題 Glucokinase haploinsufficiency ameliorates glucose intolerance by increasing beta-cell mass in db/db mice
3. 学会等名 56th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村昭伸、大森一乃、三好秀明、野本博司、亀田啓、曹圭龍、寺内康夫、渥美達也
2. 発表標題 膵 細胞グルコキナーゼの抑制が肥満2型糖尿病モデルマウスの膵 細胞機能・量を保持する
3. 学会等名 第41回日本肥満学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Omori K, Nakamura A, Miyoshi H, Takahashi K, Kitao N, Nomoto H, Kameda H, Cho KY, Terauchi Y, Atsumi T.
2. 発表標題 Effects of dapagliflozin and/or insulin glargine on beta cell mass and hepatic steatosis in db/db mice.
3. 学会等名 American Diabetic Association 's 79th Scientific Sessions. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawata S, Nakamura A, Miyoshi H, Tsuchida K, Omori K, Takahashi K, Kameda H, Cho KY, Terauchi Y, Atsumi T.
2. 発表標題 Reduced hypoglycemic property of glucokinase activator by longitudinal administration in db/db mice.
3. 学会等名 55th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大森一乃、中村昭伸、三好秀明、川田晋一郎、土田和久、高橋清彦、寺内 康夫、渥美達也
2. 発表標題 SGLT2阻害薬またはインスリンによる血糖降下作用が膵 細胞量および肝脂肪化に与える影響
3. 学会等名 第56回臨床分子学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大森一乃、中村昭伸、三好秀明、川田晋一郎、土田和久、高橋清彦、寺内 康夫、渥美達也
2. 発表標題 SGLT2阻害薬またはインスリンによる血糖降下作用が肝脂肪化に与える影響
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川田晋一郎、中村昭伸、土田和久、大森一乃、高橋清彦、野本博司、亀田啓、曹圭龍、寺内 康夫、三好秀明、渥美達也
2. 発表標題 グルコキナーゼ活性化薬の長期投与に伴う血糖降下作用の消失機序の解明
3. 学会等名 第34回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大森一乃、中村昭伸
2. 発表標題 膵 細胞量保持を目指した2型糖尿病の治療戦略
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大森一乃、中村昭伸、三好秀明、山内裕貴、川田晋一郎、野本博司、亀田啓、曹圭龍、寺内康夫、渥美達也
2. 発表標題 グルコキナーゼの抑制が2型糖尿病病態下の膵 細胞量を保持する
3. 学会等名 第35回日本糖尿病・肥満動物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川田晋一郎、中村昭伸、三好秀明、山内裕貴、土田和久、大森一乃、高橋清彦、野本博司、亀田啓、曹圭龍、寺内康夫、渥美達也
2. 発表標題 グルコキナーゼ活性化薬の長期投与に伴う血糖降下作用の消失機序の解明
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------