

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591327

研究課題名(和文) 膵細胞ブドウ糖毒性(膵細胞機能障害)の分子メカニズムの解析

研究課題名(英文) Molecular mechanism for pancreatic beta-cell glucose toxicity

研究代表者

金藤 秀明(Hideaki, Kaneto)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：80448034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：膵細胞機能維持におけるインスリン転写因子PDX-1の重要性：糖尿病状態では膵細胞においてPDX-1の発現が低下することを踏まえて、糖尿病モデルであるAkitaマウスにおいて膵臓特異的にPDX-1を高発現する遺伝子改変マウスを作成したところ、HbA1cの有意な低下が認められた。

膵細胞機能維持におけるインクレチンの重要性：糖尿病状態ではGLP-1受容体の発現が有意に低下することを踏まえて、膵細胞特異的にGLP-1受容体を高発現する遺伝子改変マウスを作成したところ、インクレチンであるexendin-4投与下のインスリン分泌の上昇が認められた。

研究成果の概要(英文)：It is well known that pancreatic transcription factor PDX-1 plays a crucial role in maintenance of pancreatic beta-cell function but that its expression level is decreased under diabetic conditions. We made beta-cell-specific PDX-1 overexpressing transgenic mice. As the results, such PDX-1 overexpression ameliorated glycemic control in diabetic Akita mice.

It is also known that incretins (GLP-1 and GIP) play a crucial role in maintenance of beta-cell function but that GLP-1 and GIP receptor levels are decreased. We made beta-cell-specific GLP-1 receptor overexpressing transgenic mice. As the results, such GLP-1 receptor overexpression augmented exendin-4-mediated insulin secretion in diabetic db/db mice.

研究分野：糖尿病

キーワード：膵細胞機能

## 1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病の特徴は、膵β細胞におけるインスリンの生合成、分泌の低下および肝臓や末梢組織でのインスリン抵抗性である。そして临床上最も大きな問題は、高血糖が持続すると、β細胞におけるインスリン生合成および分泌障害はさらに顕著化し、また肝臓や末梢組織でのインスリン抵抗性もさらに増加するという悪循環に陥ることである。これは「高血糖毒性」として臨床的にも広く知られている。申請者らはこの「高血糖毒性」の悪循環の原因の一つとして糖尿病状態において惹起される酸化ストレスに注目して研究を進めてきている。これまでに、酸化ストレスが膵β細胞におけるインスリン生合成、分泌を低下させ、β細胞機能障害を引き起こすこと、また「高血糖毒性」によるインスリン遺伝子の発現低下には、酸化ストレスおよびその下流のストレスシグナル経路が活性化されることにより、(インスリン遺伝子の極めて重要な転写因子である)PDX-1 の発現および活性の低下が関与することを見いだしている。

一方、インクレチンのひとつである GLP-1 は食事摂取に応じて腸管から分泌されるホルモンの、多彩な作用を有している。また、糖尿病状態においては「インクレチン効果」が低下していることが知られている。すなわち、健常者の場合、グルコースを静脈注射した時に比べて経口摂取した時の方が、より多くのインスリンが分泌されて血中インスリン濃度が高くなるが、糖尿病状態ではこの差が少なくなっている。血中 GLP-1 濃度自体は糖尿病状態でも低下しているわけではなく、申請者らは膵β細胞におけるインクレチンの受容体の低下が関与しているのではないかと考えている。実際、申請者らはこれまでに、いくつかの糖尿病モデル動物において GLP-1 受容体の発現が低下すること、またそのような糖尿病動物から単離した膵島においては GLP-1 応答性インスリン分泌が低下していること、さらにインスリン療法などで高血糖を是正することによって膵β細胞における GLP-1 受容体の発現が回復することを見いだしている。海外からは 2 型糖尿病症例においても膵β細胞における GLP-1 の発現が低下していることも報告されている。膵β細胞における GLP-1 シグナルの重要性から考えると、「高血糖毒性」の悪循環の原因の一つとして GLP-1 受容体の発現低下が関与する可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

### **膵β細胞機能維持における転写因子 PDX-1 の重要性:**

糖尿病状態において認められる膵β細胞での転写因子 PDX-1 の発現低下とβ細胞機能障

害(高血糖毒性)との関連を検討するために、糖尿病モデルマウスにおいて膵β細胞特異的かつ誘導性に PDX-1 を高発現させて、β細胞における PDX-1 の役割を検討すること

### **膵β細胞機能維持におけるインクレチンの重要性:**

糖尿病状態において認められる膵β細胞での GLP-1 受容体の発現低下とβ細胞機能障害(高血糖毒性)との関連を検討するために、糖尿病モデルマウスにおいて膵β細胞特異的かつ誘導性に GLP-1 受容体を高発現させて、β細胞における GLP-1 シグナルの役割を検討すること

## 3. 研究の方法

### **膵β細胞機能維持における転写因子 PDX-1 の重要性:**

研究代表者らは以前に chicken β-actin gene (CAG) promoter の下流に stuffer 構造 CAT を介して PDX-1 遺伝子をつないだ construct を作成し、これを組み込んだトランスジェニックマウスを作成している(CAG-CAT-PDX-1 マウス)。このマウスは Cre 酵素の存在下においてのみ stuffer gene が除かれ、CAG promoter の支配下に PDX-1 が発現するようになる。本研究においては、この CAG-CAT-PDX-1 マウスを(膵β細胞特異的に、またタモキシフェン投与した際のみ Cre 酵素を発現する)PDX-1 promoter-Cre-ER マウスと交配することにより、膵β細胞における PDX-1 の gain of function がβ細胞機能に及ぼす影響を検討する。さらに、PDX-1-Cre-ER マウス、CAG-CAT-PDX-1 マウスを C57BLKsJ line と 10 回 backcross 行った後、(肥満 2 型糖尿病マウスである)C57BLKsJ-db/db マウスにおいてβ細胞特異的かつ誘導性に PDX-1 を過剰発現させるマウス(PDX-1-Cre-ER/CAG-CAT-PDX-1/C57BLKsJ-db/db マウス)を作成して、PDX-1 を過剰発現させることによって、膵β細胞を「高血糖毒性」から保護できるかどうかを検討する。

具体的には、PDX-1-Cre-ER/CAG-CAT-PDX-1/C57BLKsJ-db/db マウス(8 週齢)にタモキシフェンを投与して PDX-1 を高発現させ、16~20 週くらいまで血糖値、体重変化などを経時的に測定し、また、適時腹腔内ブドウ糖負荷試験などを行ない、血糖値および血中インスリン値を測定する。さらに、やはり 16~20 週くらいにおいて、膵組織を取り出して組織学的に検討し、インスリンをはじめとする膵β細胞関連因子の発現がどのように変化しているか、膵島の mass、β細胞の増殖能、アポトーシスの頻度がどのように変化しているかなどを詳細に検討する計画である。また、PDX-1 はグルコキナーゼ、

GLUT2 遺伝子の重要な転写因子なので、単離した膵島を用いて単位蛋白あたりのインスリン含量を測定し、さらに膵島より単離した total RNA を用いて real-time RT-PCR 法にてインスリン、グルコキナーゼ、GLUT2 などの mRNA 量を検討する計画である。

### **膵β細胞機能維持におけるインクレチンの重要性：**

研究代表者らはこれまでに、糖尿病状態において膵β細胞が慢性的に高血糖に曝されると、GLP-1 受容体の発現が低下することを報告している。膵β細胞における GLP-1 シグナルの重要性から考えると、「高血糖毒性」の悪循環の原因の一つとして GLP-1 受容体の発現低下が関与する可能性が考えられる。本研究においては、Cre-loxP システムを用いて、タモキシフェン投与により Cre 酵素を発現させた時のみ、膵β細胞特異的に GLP-1 受容体を過剰発現する遺伝子改変マウスを作製し、膵β細胞における GLP-1 シグナルの重要性を検討する。すなわち、糖尿病状態においては「高血糖毒性」のため膵β細胞機能は障害されるが、GLP-1 受容体を過剰発現させることにより膵β細胞機能障害が軽減するか否かを検討する。

本研究においては、(上記の CAG-CAT-PDX-1 マウスの作成と同じ手法で) Cre-loxP システムにより GLP-1 受容体を異所性に、かつ恒常的に発現誘導できる遺伝子改変マウス (CAG-CAT-GLP-1 receptor マウス) を作成し、この CAG-CAT-PDX-1 マウスを (タモキシフェン応答性に、また膵β細胞特異的に Cre 酵素を発現する) PDX-1 promoter-Cre-ER マウスと交配することにより、膵β細胞における GLP-1 受容体の重要性を検討する。すなわち膵β細胞における GLP-1 receptor の gain of function がβ細胞機能に及ぼす影響を検討する。さらに、PDX-1-Cre-ER マウス、CAG-CAT-GLP-1 receptor マウスを C57BLKsJ line と 10 回 backcross 行った後、(肥満 2 型糖尿病マウスである) C57BLKsJ-db/db マウスにおいてβ細胞特異的かつ誘導性に GLP-1 receptor を過剰発現させるマウス (PDX-1-Cre-ER/CAG-CAT-GLP-1 receptor/C57BLKsJ-db/db マウス) を作成する。

#### 4. 研究成果

### **膵β細胞機能維持における転写因子 PDX-1 の重要性：**

Akita マウスはインスリン 2 遺伝子に変異を有し、異常インスリン遺伝子の蓄積により小胞体ストレスを介したβ細胞死が誘導され、5 週齢頃には高血糖状態となる。本検討においては、Akita マウスにインスリンの転写因子である PDX-1 を膵臓特異的かつ誘導性に発現させる遺伝子改変マウスを作成し、

PDX-1 発現の重要性に関して検討している。バッククロスを 2 回終えた Akita マウスにおいて、PDX-1 を 4 週齢より過剰発現させ、8 週齢で検討したところ、HbA1c の有意な低下が認められた。現在、バッククロスをさらに進め、同様の検討を進めている。Akita マウスにおいて膵β細胞特異的かつ誘導性に 4~5 週齢頃において PDX-1 を高発現させ、膵島を単離し、その遺伝子プロファイルを対象マウスと比較検討する。さらに、(血糖値のかなり上昇した) 6 週齢以降の Akita マウスに PDX-1 を過剰発現させて、β細胞死が進行し、糖尿病が顕在化した状態における外因性 PDX-1 のβ細胞保護効果を解析する。

### **膵β細胞機能維持におけるインクレチンの重要性：**

db/db マウスおよびコントロールの膵島単離を行い、TaqMan array によりβ細胞特異的遺伝子の発現を継時的に定量化を行ったところ、GLP-1 受容体の発現は、4 週齢では同程度だったが、8 週齢以降では db/db マウスの方が有意に低下していた。この結果をふまえて、現在膵β細胞特異的 GLP-1 受容体高発現マウスを作成し、C57BKS とのバッククロスをさらに進めている。CAG-CAT-GLP-1 receptor (GFP) マウスを PDX-1-Cre-ER マウスと交配し、タモキシフェンを投与したところ、膵島に GFP の発現が確認でき、GFP 陽性細胞はほぼインスリンが陽性となっていることが確認できたので、今後そのコロニーの拡大と BKS への backcross をさらに進めていく。

#### 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 7 件)

1. **Kaneto, H.** and **Matsuoka, T.** Role of pancreatic transcription factors in maintenance of mature β-cell function. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 6281-6297, 2015, 査読有り, doi: 10.3390/ijms16036281
2. **Kaneto, H.** Pancreatic β-cell glucose toxicity in type 2 diabetes mellitus. *Curr. Diabetes Rev.* 11, 2-6, 2015, 査読有り
3. **Matsuoka, T.**, **Kaneto, H.**, Kawashima, S., **Miyatsuka, T.**, Tochino, Y., Yoshikawa, A., Imagawa, A., Miyazaki, J., Gannon, M., Stein, R., and Shimomura, I. Preserving MafA expression in diabetic islet β-cells improves glycemic control in vivo. *J. Biol. Chem.* 290, 7647-7657, 2015, 査読有り, doi: 10.1074/jbc.M114.595579
4. Kimura, T., **Kaneto, H.**, Shimoda, M.,

- Hirukawa, H., Okauchi, S., Kohara, K., Hamamoto, S., Tawaramoto, K., Hashiramoto, M., and Kaku, K. Protective effects of pioglitazone and/or liraglutide on pancreatic  $\beta$ -cells: comparison of their effects between in an early and advanced stage of diabetes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 400, 78-89, 2015, 査読有り, doi: 10.1016/j.mce.2014.11.018
5. Miyashita, K., **Mivatsuka, T.**, **Matsuoka, T.**, Sasaki, S., Takebe, S., Yasuda, T., Watada, H., **Kaneto, H.**, and Shimomura, I. Sequential introduction and dosage balance of defined transcription factors affect reprogramming efficiency from pancreatic duct cells into insulin-producing cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 444, 514-519, 2014, 査読有り, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.083
6. **Kaneto, H.** and **Matsuoka, T.** Down-regulation of insulin gene transcription factors and incretin receptors in type 2 diabetes. *World J. Diabetes* 15, 263-269, 2013, 査読有り, doi:10.4239/wjd.v4.i6.263
7. Yamamoto, K., **Matsuoka, T.**, Kawashima, S., Takebe, S., Kubo, N., **Mivatsuka, T.**, **Kaneto, H.**, and Shimomura, I. A novel function of Onecut 1 as a negative regulator of MafA. *J. Biol. Chem.* 288, 21648-21658, 2013, 査読有り, doi: 10.1074/jbc.M113.481424
- 〔学会発表〕(計 23 件)
1. **金藤秀明**「2型糖尿病の病態と治療を再考する」第58回日本糖尿病学会年次学術集会 ランチョンセミナー、海峡メッセ下関(下関)5月22日(2015)
2. **金藤秀明**「膵細胞保護を考えた2型糖尿病治療」第88回日本内分泌学会学術総会、ホテルニューオータニ東京(東京)4月25日(2015)
3. **金藤秀明**「膵細胞機能障害」第52回日本臨床分子医学会学術集会 シンポジウム、みやこめっせ(京都)4月11日(2015)
4. **金藤秀明**「2型糖尿病の病態と治療に関するトピックス」第52回日本糖尿病学会関東甲信越地方会、パシフィコ横浜(横浜)1月24日(2015)
5. **金藤秀明**「糖尿病経口薬の使い方 第2
- 選択薬について 従来薬か新薬か？」第24回臨床内分泌 Update デイベートセッション、大宮ソニックシティ(大宮)11月29日(2014)
6. **金藤秀明**「2型糖尿病の病態と治療に関するトピックス」日本糖尿病学会中国四国地方会第52回総会 ランチョンセミナー、リーガロイヤルホテル広島(広島)10月25日(2014)
7. **金藤秀明**「2型糖尿病病態と最近の薬物療法 ~インクレチン関連薬を中心に~」第47回日本薬剤師会学術大会 ランチョンセミナー、山形市民会館(山形)10月12日(2014)
8. **金藤秀明**「2型糖尿病の病態と治療のトピックス」第14回日本加齢医学会総会ランチョンセミナー、大阪国際会議場(大阪)6月6日(2014)
9. **金藤秀明**「2型糖尿病の病態と治療のトピックス」第84回日本衛生学会学術総会ランチョンセミナー、岡山コンベンションセンター(岡山)5月27日(2014)
10. **金藤秀明**「膵細胞機能とブドウ糖毒性」第57回日本糖尿病学会年次学術集会教育講演、大阪国際会議場(大阪)5月24日(2014)
11. **金藤秀明**「2型糖尿病の病態と最近の薬物療法」第57回日本糖尿病学会年次学術集会ランチョンセミナー、大阪国際会議場(大阪)5月23日(2014)
12. **金藤秀明**「2型糖尿病の病態と最近の薬物療法」第48回糖尿病学の進歩ランチョンセミナー、札幌コンベンションセンター(札幌)3月8日(2014)
13. **金藤秀明**「膵細胞ブドウ糖毒性の分子メカニズム」第28回日本糖尿病肥満動物学会年次学術集会、宮崎市民プラザ(宮崎)2月14日(2014)
14. **金藤秀明**「2型糖尿病の病態と最近の薬物療法」第17回日本心血管内分泌代謝学会総会ランチョンセミナー、千里ライフサイエンスセンター(大阪)11月22日(2013)
15. **金藤秀明**「2型糖尿病の病態と最近の薬物療法~DPP-IV阻害剤の有効性と期待~」国立病院総合医学会ランチョンセミナー、石川県立音楽堂(金沢)11月9日(2013)
16. **金藤秀明**「膵細胞糖毒性の分子機構が

らみた早期インスリン導入の重要性」日本  
内科学会学会イブニングセミナー、久留  
米大学筑水会館(福岡)10月5日(2013)

17. **金藤秀明**「2型糖尿病の病態と最近の薬物療法～DPP-IV阻害剤の有効な使用法～」第2回鹿児島糖尿病合併症学会、城山観光ホテル(鹿児島)9月27日(2013)
18. **金藤秀明**「2型糖尿病の最近の薬物療法」第46回日本薬剤師学会大会 ランチョンセミナー、大阪国際会議場(大阪)9月22日(2013)
19. **金藤秀明**「Molecular mechanism for pancreatic  $\beta$ -cell glucose toxicity」第7回 Diabetes Leading-edge Conference、ロイヤルオークホテル(滋賀)8月3-4日(2013)
20. **金藤秀明**「膵細胞のブドウ糖毒性」ランチョンセミナー第56回日本糖尿病学会年次学術集会、ホテル日航熊本(熊本)5月16-18日(2013)
21. **金藤秀明**「持効型インスリン使用症例においてDPP-IV阻害剤導入により血糖日内変動が軽減する」第56回日本糖尿病学会年次学術集会、ホテル日航熊本(熊本)5月16-18日(2013)
22. **金藤秀明**「Molecular Mechanism for Pancreatic  $\beta$ -cell Glucose Toxicity」Asia Pacific Obesity and Diabetes symposium, Ramada Hong Kong Hotel(Hong Kong)4月20日(2013)
23. **金藤秀明**「糖毒性と膵細胞」第47回糖尿病学会の進歩、四日市市文化会館(四日市)2月15-16日(2013)

〔図書〕(計 26 件)

1. **金藤秀明**「膵細胞の高血糖毒性」DITN 紙 Editorial, 447, 1, 2015
2. **金藤秀明**「SGLT2阻害剤に期待される臨床効果」月刊糖尿病 特集: SGLT2阻害剤の新時代 Vol. 7, No. 7, 2015
3. **金藤秀明**「超速効型・速効型インスリン」糖尿病 最新の治療 2016-2018, 2015
4. **金藤秀明**「インスリンから経口剤への切り替え・インスリン離脱」糖尿病治療のニューパラダイム第3巻「薬物治療の実践～インスリンを中心に～」186-189, 2014
5. **金藤秀明**「初診患者の診断と検査のすず

め方」Medical Practice, 32巻, 1号, 55-58, 2014

6. **金藤秀明**「リナグリプチン -CAROLINA, MARLINA」糖尿病の最新治療 -Current Diabetology 特集: DPP-IV阻害剤 -前向き大規模臨床試験に期待するもの, Vol. 6, No. 1, 28-31, 2014
7. **金藤秀明**「GLP-1受容体作動薬」動脈硬化予防 Vol. 13, No. 2, 14-17, 2014
8. **金藤秀明**「現在および将来のインスリン製剤に関するトピックス」Medicina, 第51巻8号, 1512-1515, 2014
9. **金藤秀明**、河盛隆造「SGLT2阻害剤～その期待と問題点～」Clinic magazine, No.542, 8-15, 2014
10. **金藤秀明**「膵細胞糖毒性の分子メカニズム」Islet Equality, Vol.3, No.2,17-21, 2014
11. **金藤秀明**「糖尿病状態では膵細胞が脱分化し、インスリン療法の導入により細分化する」Diabetes Update Vol. 3, No.4, 14-15, 2014
12. **金藤秀明**「糖質制限と尿糖排泄増加を考える」Diabetes Contemporary, Vol. 1, No. 2, 30-35, 2014
13. **金藤秀明**、**松岡孝昭**「糖毒性と膵細胞」ホルモンと臨床 特集 臨床医にもわかる糖尿病基礎研究, Vol. 60, No. 11, 3-7, 2014
14. **金藤秀明**「糖尿病の病因と診断(3)」プラクティス 第31巻 第2号, 285-287, 2014
15. **金藤秀明**、**松岡孝昭**「膵細胞の sourceとしての膵細胞」内分泌・糖尿病・代謝内科 38, 384-386, 2014
16. **金藤秀明**「糖尿病の病因と診断(2)」プラクティス Vol. 31, No. 2, 145-147, 2014
17. **金藤秀明**「糖尿病の病因と診断(1)」プラクティス Vol. 31, No. 1, 13-15, 2014
18. **金藤秀明**「2型糖尿病においては膵細胞の転写因子が不活化している」Diabetes Update Vol. 3, No.1, 14-15, 2014
19. **金藤秀明**、**松岡孝昭**「Pancreatic

lipotoxicity 細胞ストレスの視点から」月刊糖尿病 9, 12-17, 2013

20. **金藤秀明**「メタボリックシンドロームに潜む健康リスク」職業・災害医学会誌 61, 295-299, 2013
21. **金藤秀明**「糖尿病の薬物療法 ～最近のトピックス～」守口市医師会会報 第100号, 137-146, 2013
22. 宮下和幸、河盛 段、**金藤秀明**「インクレチン(GIP、GLP-1)」内科」111巻6号 特集 検査値を読む, 1173-1174, 2013
23. 佐々木周伍、**宮塚 健**、**金藤秀明**「転写遺伝子変異による膵無形成 - GATA6 遺伝子変異を中心に - 」内分泌・糖尿病・代謝内科 36, 226-230, 2013
24. **金藤秀明**「DPP-IV 阻害剤にはできないこと」GLP-1 受容体作動薬 29-32, 2013
25. **金藤秀明**「インクレチン関連薬による膵細胞の保護作用とその機構」座談会 Islet Equality Vol. 2, No. 1, 4-14, 2013
26. 河盛 段、相田絵理、**金藤秀明**「膵α細胞の生物学」Annual Reviews 糖尿病・代謝・内分泌 2013, 28-38, 2013

〔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：  
出願年月日：  
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

金藤 秀明 (HIDEAKI KANETO)  
川崎医科大学・医学部・教授  
研究者番号：80448034

### (2)研究分担者

松岡 孝昭 (TAKA-AKI MATSUOKA)  
大阪大学・医学系研究科・講師  
研究者番号：10379258

宮塚 健 (TAKESHI MIYATSUKA)  
大阪大学・医学系研究科・講師  
研究者番号：60622363

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：