

平成 29 年 5 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860683

研究課題名(和文)2型糖尿病病態における膵細胞量増加への治療戦略

研究課題名(英文)The treatment strategy of increasing pancreatic beta cell mass

研究代表者

中村 昭伸(Akinobu, Nakamura)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：70552420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病病態におけるインスリン分泌低下の原因の一つとして、膵細胞量の低下があげられる。それゆえ、膵細胞量を増やすことが2型糖尿病治療戦略の一つとして考えられる。われわれは短期高脂肪食負荷による膵細胞増殖メカニズムがグルコキナーゼ、insulin receptor substrate-2 (Irs2)を介さない経路であることを見出し、長期高脂肪食負荷誘導性膵細胞増殖メカニズムとは異なることが示唆された。また、2型糖尿病モデルマウスであるdb/dbマウスにSGLT2阻害薬を投与したところ、耐糖能の改善とともに膵細胞量が保持され、SGLT2阻害薬の膵細胞量保持作用を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Considering that one of the main reasons of insulin deficiency is a reduction in pancreatic beta cell mass, expanding beta cell mass could represent attractive therapeutic approaches to the treatment of diabetes. We showed that the pancreatic beta cell replication mechanism induced by short-term HF diet feeding in mice involved a glucokinase- and Irs2-independent pathway. Our results suggest that the beta cell replication pathways involved in short-term HF diet feeding may differ from those involved in chronic HF diet feeding. In addition, we demonstrated that sodium glucose co-transporter 2 inhibitor improved glucose tolerance and maintained beta cell mass in the mouse model of type 2 diabetes.

研究分野：糖尿病内分泌代謝内科学

キーワード：膵細胞量

## 1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病の病因を考える上で、膵細胞の機能とともに、膵細胞量の調節機構を解明することが重要であると考えられるようになった。われわれは以前より「膵細胞量を増やす治療」という観点に着目しており、近年われわれも含め多数の報告があるインクレチン関連薬に加え (Sato K, Nakamura A, et al. *Endocrinology*, 2012) グルコキナーゼの活性化を介した治療戦略が有用であることを唱えてきた。グルコキナーゼ活性化薬による糖尿病治療の可能性に注目が集まる中、私はグルコキナーゼ活性化薬が長期にわたる糖代謝改善作用に加え、膵細胞増殖作用も有し、その増殖作用には Insulin receptor substrate (IRS) -2 が重要であることを明らかにした (Nakamura A, et al. *Endocrinology*, 2009; *J Diabetes Investig*, 2011; *Diabetologia*, 2012)。このグルコキナーゼ及び IRS-2 を介するグルコースシグナルは 20 週間という長期の高脂肪食誘導性インスリン抵抗性に対する膵細胞増殖メカニズムにおいて重要な役割を果たしている (Terauchi Y, et al. *J Clin Invest*, 2007)。しかしながら、長期高脂肪食負荷の検討においては膵細胞増殖の引き金になっている因子が、高脂肪食負荷そのものであるのか、高脂肪食により惹起されるインスリン抵抗性であるのかは明らかでない。そこでインスリン抵抗性が生じないと想定される短期の高脂肪食負荷での方法により、インスリン抵抗性とは独立した高脂肪食負荷そのものによる膵細胞増殖への影響を検討することができる。そして短期高脂肪食負荷による増殖メカニズムが、高脂肪食誘導性インスリン抵抗性に対する膵細胞増殖のメカニズムと共通しているのか、異なったメカニズムなのかを明らかにすることができる。さらには増殖メカニズムの解明により、新たな膵細胞増殖シグナルおよび分子ターゲットを同定できる可能性があり、創薬といった視点からも「膵細胞量を増やす治療」に展開できることが考えられる。

一方 2 型糖尿病病態においては、経時的に膵細胞量が減少していると考えられていることから「膵細胞量を減らさない治療」、すなわち減少の要因となり得るアポトーシスや脱分化を抑制するメカニズムを解明することが 2 型糖尿病に対する治療戦略につながる。とりわけアポトーシスに関しては、慢性的高血糖の持続 (ブドウ糖毒性) による酸化ストレスなどが原因の一つと考えられ、ブドウ糖毒性改善による膵細胞量への影響を検討し、そのメカニズムを解明することが「膵細胞量を減らさない治療」を目指す上で重要であると考えられる。特に近年臨床応用された sodium-glucose transporter (SGLT) -2 阻害薬は、尿細管におけるグルコースの再吸収という恒常的維持の基礎的機能を担う糖輸送単体を阻害することで、イン

スリン分泌亢進を介さない持続的な血糖降下作用を有する糖尿病治療薬であり、SGLT-2 欠損マウスを用いた検討において、SGLT-2 の欠損が膵細胞量の低下を抑制したという報告もみられる (Jurczak MJ, et al. *Diabetes*, 2011) ことから、単なる経口血糖降下薬の一つとしてのみならず、「膵細胞保護薬」としても期待できる可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) インスリン抵抗性が生じないと想定される短期の高脂肪食負荷による膵細胞の増殖を検討し、そのメカニズム、特にグルコキナーゼを介したグルコースシグナルの役割を明らかにしていく。

(2) SGLT-2 阻害薬の持続的な血糖降下作用が、ブドウ糖毒性を改善することで酸化ストレス誘導性膵細胞アポトーシスを抑制するという仮説のもと、SGLT-2 阻害薬が膵細胞量に与える効果およびその分子メカニズムに関して、2 型糖尿病モデルマウスを用いて検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 短期高脂肪食負荷膵細胞増殖メカニズムの解明

高脂肪食負荷後、どの時期からインスリン抵抗性が生じるか、またどの時期から膵細胞が増殖するのかを検討するために、雄 8 週齢 C57bl/6J マウスを普通食飼育マウス群と高脂肪食負荷マウス群に群別し、2 日間、4 日間、7 日間、4 週間、8 週間、12 週間、20 週間飼育後にインスリン負荷試験を行い、その後各臓器を摘出し、膵細胞増殖能および膵細胞量を比較した。

7 日間飼育後の上記両マウスの膵島を単離し、IRS-2 の遺伝子発現または蛋白発現を比較検討した。

雄 8 週齢野生型およびグルコキナーゼヘテロ欠損マウスを普通食飼育マウス群と高脂肪食負荷マウス群に群別し、7 日間飼育後の膵細胞増殖能を比較検討した。

雄 8 週齢野生型および IRS-2 欠損マウスを普通食飼育マウス群と高脂肪食負荷マウス群に群別し、7 日間飼育後の膵細胞増殖能を比較検討した。

雄 8 週齢 C57bl/6J マウスを 7 日間普通食及び高脂肪食下で飼育後に膵島を単離し、その遺伝子発現をマイクロアレイ法および real-time PCR 法で解析した。

雄 48 週齢 C57bl/6J マウスを普通食飼育マウス群と高脂肪食負荷マウス群に群別し、7 日間飼育後の膵細胞増殖能を比較検討した。

(2) SGLT-2 阻害薬によるブドウ糖毒性の改善が膵細胞量に与える効果に関する検討

雄 6 週齢の db/db マウスを普通食飼育群 (db/db 群) と 0.01% Luseogliflozin 含有特

別食群 (Luseo 群) に分け 4 週間飼育し、膵細胞の形態学的解析及び機能評価を行った。

上記の 4 週間飼育後の db/db 群と Luseo 群の膵島を単離し、遺伝子発現をマイクロアレイ法および real time PCR 法を用いて解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 短期高脂肪食負荷膵細胞増殖メカニズムの解明

インスリン負荷試験によるインスリン抵抗性の評価を行ったところ、負荷 4 週までは普通食飼育マウス群と高脂肪食負荷マウス群で明らかな差を認めなかったが、負荷 8 週以降で普通食飼育マウス群に比し、高脂肪食負荷マウス群でインスリン抵抗性の増大を認めた。膵細胞増殖能を示す膵細胞における BrdU 陽性細胞率は、負荷後 2 日目で差を認めず、4 日目において高脂肪食負荷マウス群で高値の傾向を認め、負荷後 7 日目において高脂肪食負荷マウス群で有意に高値であった。負荷後 2 週目以降においても膵細胞における BrdU 陽性細胞率は高脂肪食負荷マウス群で有意に高値であった。一方、膵細胞量は、負荷後 7 日目において両群で差を認めず、負荷後 12 週以降から高脂肪食負荷マウス群で有意に高値であった。以上より高脂肪食負荷後 7 日目において、インスリン抵抗性を生じることなく膵細胞が増殖することを見出し、短期高脂肪食誘導性膵細胞増殖はインスリン抵抗性とは独立して起こり得ることが示唆された。

上記の結果に基づき、7 日間の高脂肪食負荷マウスを用いて、同週齢の普通食飼育マウスを対照とし、両マウスの膵島を単離し、膵細胞の機能や増殖に関する検討を行った。単離膵島でのグルコース応答性インスリン分泌能は 2 群間で差を認めず、膵細胞機能関連因子に関して、PDX-1 やグルコキナーゼ、Glut2、Ins1、Ins2、MafA の遺伝子発現は 2 群間で差を認めなかった。一方、増殖に関連する Ki67 は高脂肪食群で有意に増加、PCNA は増加傾向を示したが、長期の高脂肪食誘導性インスリン抵抗性に対する膵細胞増殖メカニズムにおいて重要な役割を果たしている IRS2 は蛋白発現も含め、差を認めなかった。この結果より 7 日間の短期高脂肪食負荷膵細胞増殖メカニズムにおいては、グルコキナーゼ、IRS-2 を介さない経路である可能性が示唆された。

上記の結果に基づき、雄 8 週齢野生型およびグルコキナーゼヘテロ欠損マウスを普通食飼育マウス群と高脂肪食負荷マウス群に群別し、7 日間飼育後の膵細胞増殖能を比較検討したところ、グルコキナーゼヘテロ欠損マウスにおいても、野生型マウスと同様に BrdU 取り込み率は高脂肪食群で有意に高値であり、短期高脂肪食負荷による膵細胞増殖はグルコキナーゼ非依存性であるこ

とが明らかとなった。

上記の結果に基づき、雄 8 週齢野生型および IRS-2 欠損マウスを普通食飼育マウス群と高脂肪食負荷マウス群に群別し、7 日間飼育後の膵細胞増殖能を比較検討したところ、IRS-2 欠損マウスにおいても、野生型マウスと同様に BrdU 取り込み率は高脂肪食群で有意に高値であり、短期高脂肪食負荷による膵細胞増殖は IRS-2 非依存性であることが明らかとなった。

上記の結果より、短期高脂肪食負荷膵細胞増殖メカニズムはグルコキナーゼ及び IRS-2 非依存性であることが明らかとなったが、その経路を明らかにするために、雄 8 週齢 C57bl/6J マウスを 7 日間普通食及び高脂肪食下で飼育後に膵島を単離し、マイクロアレイ解析によりこの 2 群間の遺伝子発現を網羅的に比較したところ、高脂肪食群で発現が有意に 1.5 倍以上亢進していた遺伝子は 62 個存在していた。そして Gene Ontology 解析を行ったところ、細胞周期や細胞分裂といった機能をもつ遺伝子が多くを占めることがわかった。さらに階層型クラスタリング解析を行ったところ、CENP-A、CyclinB1、CyclinA2 が近傍に位置していることがわかった。既報によると、これらの上流に位置しているのが FoxM1 であるため、FoxM1 ならびにその下流に存在する遺伝子発現を real-time PCR 法で比較したところ、普通食群に比し、高脂肪食負荷群でこれらの遺伝子群の発現が有意に上昇していた。またマイクロアレイ解析で発現に差を認めた細胞周期関連因子の CyclinB1 や CyclinA2 の遺伝子発現が real-time PCR 法においても高脂肪食負荷群で有意な上昇を認めた。

高齢になるにつれ、増殖刺激因子による膵細胞増殖作用は低下すると報告されていることから、加齢による膵細胞増殖の影響を検討するために、雄 48 週齢 C57bl/6J マウスを普通食飼育マウス群と高脂肪食負荷マウス群に群別し、7 日間飼育後の膵細胞増殖能を比較検討した。その結果、48 週齢野生型マウスにおいても、8 週齢マウスと同様に 7 日間の高脂肪食負荷で膵細胞の BrdU 取り込み率は、普通食群に比し、高脂肪食群で有意に高値であった。さらに単離膵島を用いた検討においても、8 週齢マウスと同様に高脂肪食負荷群で FoxM1 の遺伝子発現の有意な上昇を認めた。FoxM1 の活性化により、12 か月齢マウスの膵細胞増殖が亢進した、という報告もあることより、上記の短期高脂肪食負荷膵細胞増殖メカニズムの解明により、加齢による膵細胞増殖能の低下を抑制できる可能性が示唆された。

##### (2) SGLT-2 阻害薬によるブドウ糖毒性の改善が膵細胞量に与える効果に関する検討

db/db 群に比し、Luseo 群で随時血糖は有意に低下した。臓器重量では、Luseo 群で db/db 群に比し肝重量が有意に低下していた

が、内臓脂肪及び皮下脂肪は差を認めなかった。負荷後4週目でのブドウ糖負荷試験ではLuseo群はdb/db群に比し耐糖能の改善を認めた。db/db群に比しLuseo群で膵細胞におけるBrdU陽性細胞率および膵細胞量の有意な増加を認めた。in vivoにおける膵細胞機能評価では、空腹時血中インスリン血糖比はLuseo群で有意に高値であった。

単離膵島におけるインスリン含量はLuseo群で有意に高値であった。単離膵島の遺伝子発現比較では、Luseo群でMafA、Pdx1、Nkx6.1、CyclinD2の有意な上昇を認めた。さらに、免疫組織学的検討でも膵細胞のMafA陽性細胞率はdb/db群に比しLuseo群で有意に高値であった。以上の結果より2型糖尿病モデルマウスであるdb/dbマウスにおいて、SGLT-2阻害薬の投与は、膵細胞量保持作用やその機能を改善させることを明らかにした。

#### 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3件)

中村昭伸、三好秀明：糖尿病の新規治療薬そのポジショニングと治療への展望 糖尿病新規治療薬の開発と動向 プラクティス 33: 39-43, 2016 査読無

中村昭伸、寺内康夫：新たな治療標的と創薬 グルコキナーゼ Mebio 32: 64-68, 2015 査読無

Nakamura A, Terauchi Y. Present status of clinical deployment of glucokinase activators. J Diabetes Investig. 6: 124-132, 2015 査読有  
DOI: 10.1111/jdi.12294

[学会発表](計15件)

中村昭伸、北尾直之、三好秀明、寺内康夫、渥美達也：高脂肪食負荷誘導性膵細胞増殖メカニズムの解明 第20回日本病態栄養学会年次学術集会 2017年1月13-15日 国立京都国際会館(京都府京都市)

Takahashi K, Nakamura A, Kitao N, Cho KY, Miyoshi H, Terauchi Y, Atsumi T. The protective effect of Luseogliflozin on pancreatic beta cell mass, 52nd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes 2016年9月12-16日 Munich, Germany

Nakamura A, Takahashi K, Kitao N, Miyoshi H, Terauchi Y, Atsumi T. Transient effect of glucokinase activator on beta cell proliferation, 52nd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes 2016年9月12-16日 Munich, Germany

中村昭伸、北尾直之、高橋清彦、三好秀明、寺内康夫、渥美達也：2型糖尿病の新たな治

療に向けて～膵細胞を増やす、守る、復活させる～ 第34回内分泌代謝学サマーセミナー若手シンポジウム 2016年7月14-16日 久山温泉ホテル夢家(福岡県久山町)

北尾直之、中村昭伸、高橋清彦、山本浩平、三好秀明、寺内康夫、渥美達也：マウスへの短期高脂肪食負荷はインスリン抵抗性を伴わず膵細胞を増殖させる 第59回日本糖尿病学会年次学術集会 2016年5月19-21日 国立京都国際会館(京都府京都市)

中村昭伸、高橋清彦、北尾直之、三好秀明、寺内康夫、渥美達也：グルコキナーゼ活性化薬による膵細胞増殖機構の解明 第59回日本糖尿病学会年次学術集会 2016年5月19-21日 国立京都国際会館(京都府京都市)

高橋清彦、中村昭伸、北尾直之、三好秀明、寺内康夫、渥美達也：グルコキナーゼ活性化薬による膵細胞増殖は一過性である 第53回日本臨床分子医学会学術集会 2016年4月15-16日 東京国際フォーラム(東京都千代田区)

北尾直之、中村昭伸、高橋清彦、山本浩平、三好秀明、寺内康夫、渥美達也：高脂肪食誘導性膵細胞増殖効果の検討 第30回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会 2016年3月11-12日 大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)

中村昭伸、北尾直之、三好秀明、寺内康夫、渥美達也：高脂肪食誘導性膵細胞増殖機構の検討 第36回日本肥満学会 2015年10月2-3日 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

北尾直之、中村昭伸、山本浩平、三好秀明、寺内康夫、渥美達也：短期高脂肪食の膵細胞増殖効果 第58回日本糖尿病学会年次学術集会 2015年5月21-24日 海峡メッセ下関(山口県下関市)

Kitao N, Nakamura A, Nomoto H, Miyoshi H, Terauchi Y, Atsumi T. Different effect of short-term and long-term high-fat diet feeding on pancreatic beta cell proliferation, 6th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes 2014年11月21-24日 Singapore

中村昭伸、北尾直之、野本博司、三好秀明、寺内康夫、渥美達也：短期高脂肪食負荷と長期高脂肪食負荷による膵細胞増殖機構の差異 第29回日本糖尿病合併症学会 2014年10月3-4日 都市センターホテル(東京都千代田区)

Nakamura A, Kitao N, Nomoto H, Miyoshi H, Terauchi Y, Atsumi T. Different regulation of beta cell proliferation induced by short-term and long-term high-fat diet loading, 50th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes 2014年9月15-19日 Vienna, Austria

北尾直之、中村昭伸、高野善成、一山芽衣、小梁川直秀、宮愛香、三次有奈、山本浩平、山本知穂、野本博司、亀田啓、近藤琢磨、三

好秀明、寺内康夫、渥美達也：短期高脂肪食が膵細胞増殖に与える影響 第57回日本糖尿病学会年次学術集会 2014年5月22-24日 大阪国際会議場（大阪府大阪市）

北尾直之、中村昭伸、野本博司、亀田啓、近藤琢磨、三好秀明、寺内康夫、渥美達也：高脂肪食負荷期間による膵細胞増殖のメカニズムの差異 第51回日本臨床分子医学会学術集会 2014年4月11-12日 東京国際フォーラム（東京都千代田区）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 昭伸 (NAKAMURA AKINOBU)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：70552420

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：