

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390235

研究課題名(和文) 膵細胞量に着目した糖尿病テーラーメイド医療の基盤整備

研究課題名(英文) Establishing a base for tailor-made therapy on diabetes from the view point of the pancreatic beta cell mass

研究代表者

寺内 康夫 (Terauchi, Yasuo)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40359609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：解糖系の酵素であるグルコキナーゼを介した糖代謝シグナルが、膵細胞の増殖と関与することを示した。膵細胞におけるグルコキナーゼの新規標的遺伝子の単離とその機能解析、膵細胞増殖におけるグルコキナーゼを介したグルコースシグナルの役割の検討、膵細胞アポトーシスにおけるグルコキナーゼを介したグルコースシグナルの役割を行った。膵切除後膵細胞増殖機構における責任分子同定のため、IRS-2欠損マウスおよび野生型マウスにおいてSham手術後の膵細胞量を評価し、膵切除施行後の単離膵島における遺伝子発現マイクロアレイを施行した。

研究成果の概要(英文)：We investigated changes in the expression of genes involved in beta cell function and proliferation in mouse islets stimulated with glucokinase activator (GKA) in order to elucidate the mechanisms by which GKA stimulates beta cell function and proliferation. GKA-stimulated IRS2 production affected beta cell proliferation but not beta cell function. We investigated the impact of glucokinase activation by GKA on ER stress in  $\beta$  cells. GKA administration improved  $\beta$ -cell apoptosis in Akita mice, a model of ER stress-mediated diabetes. GKA ameliorated ER stress-mediated apoptosis by harmonizing IRS-2 upregulation and the IRS-2-independent control of apoptosis in  $\beta$  cells. IRS-2 knockout mice exhibited an enhancement in  $\beta$ -cell proliferation after a pancreatectomy equal to that observed in wild-type mice. A pancreatectomy stimulated  $\beta$ -cell proliferation via a signaling pathway different from that involved in high-fat diet-induced  $\beta$ -cell expansion.

研究分野：糖尿病学

キーワード：膵細胞 グルコキナーゼ グルコースシグナル

## 1. 研究開始当初の背景

日本人の糖尿病の90%以上を占める2型糖尿病の発症・進展を膵細胞の調節異常という観点から捉えると、その発症前から膵細胞の機能低下に加えて、アポトーシス亢進による量の減少が認められる(Sakuraba H, et al. Diabetologia, 2002; Rhodes CJ. Science, 2005)。また、2型糖尿病発症時には膵細胞量は既に50%に低下していると想定されている。すなわち、2型糖尿病における膵細胞量低下に対する治療戦略として、膵細胞量がまだ保たれている状態に対してはアポトーシス制御による膵細胞量減少の抑制、膵細胞が減少し既に糖尿病が発症した状態に対しては増殖促進による膵細胞増殖の増大、分化再生促進による膵細胞への転化という2つの方法論が考えられる。

私たちは、糖代謝の律速段階を担うグルコキナーゼはグルコース応答性インスリン分泌のみならず、高脂肪食誘導性膵細胞過形成に重要であること(J. Biol. Chem., 1995; J. Clin. Invest., 1997; J. Clin. Invest., 2007; Diabetes Obes. Metab., 2008)を明らかにした。こうした知見に基づき、膵細胞のグルコースシグナルを標的としたグルコキナーゼ活性化薬(GKA)のtranslational researchを推進し、GKAが個体レベルで血糖降下作用、膵細胞増殖作用(Endocrinology, 2009; J. Diabetes. Invest, 2011)を有することを明らかにした。また、膵細胞のグルコキナーゼを欠損した状態では、食事の脂肪酸の組成により膵細胞の小胞体ストレスが亢進しアポトーシスが増大し、DPP-4阻害により改善すること(Diabetes, 2011; J. Biol. Chem., 2011)、膵細胞の小胞体ストレスモデルであるAkitaマウスにおいてGKAがアポトーシス改善作用を有すること(米国糖尿病学会発表, 2011)も見出していた。

一方、私たちは妊娠時の代償性膵細胞増殖や、膵臓部分切除後の膵細胞量増大において、グルコキナーゼ非依存的膵細胞増殖経路が存在することも発見しており、糖尿病の病態や残存膵細胞量に応じて膵細胞量増加および膵細胞減少抑制のメカニズムが異なることが予想された。

## 2. 研究の目的

本研究では、グルコキナーゼを介したグルコースシグナルの膵細胞量制御における位置づけを明らかにすることにより、個々の糖尿病の病態における膵細胞量制御機構を解明し、膵細胞増加に適切な薬剤選択や治療法を個別に選択できるテーラーメイド医療の開発を目指した。

我々は、膵細胞においてグルコキナーゼが膵細胞増殖および膵細胞アポト

シス制御に関与していることを明らかにしてきたが、そのメカニズムは不明な点が多い。本研究の目的は、これらの分子メカニズムを明らかにし、どのような病態の時に、どのような膵細胞量調節制御が有効であるかという観点に立脚した糖尿病治療という、新たな糖尿病の治療法を開発することである。具体的な研究目的を以下に示す。

(1)膵細胞におけるグルコキナーゼの新規標的遺伝子の単離とその機能解析

(2)膵細胞増殖におけるグルコキナーゼを介したグルコースシグナルの役割の解明

(3)膵細胞アポトーシスにおけるグルコキナーゼを介したグルコースシグナルの役割の解明

(4)膵細胞への分化誘導、再生促進におけるグルコースシグナルの役割

## 3. 研究の方法

(1)膵細胞におけるグルコキナーゼの新規標的遺伝子の単離とその機能解析

膵細胞においてグルコキナーゼ活性化薬およびグルコースシグナルにより発現変化する分子群を同定し、グルコキナーゼの新たな標的遺伝子を同定する。

グルコキナーゼの標的候補遺伝子をクローニングし、膵細胞における機能を解析する。

糖尿病モデルによる新規標的遺伝子の役割を解明する。

新規標的遺伝子の遺伝子発現マウスの作成および表現型解析を行う。

(2)膵細胞増殖におけるグルコキナーゼを介したグルコースシグナルの役割の解明

グルコキナーゼを介した膵細胞増殖メカニズムを検討する。

酸化ストレス下でもグルコキナーゼ活性化を介し膵細胞を増殖させる治療法を創出する。

様々な膵細胞増殖モデルにおけるグルコキナーゼシグナルの役割を明らかにする。

糖尿病発症モデルにおけるグルコキナーゼを介した膵細胞量調節機構を検討する。

(3)膵細胞アポトーシスにおけるグルコキナーゼを介したグルコースシグナルの役割の解明

小胞体ストレスモデルのAkitaマウスにおけるGKAの効果を検討する。

小胞体ストレス誘導下におけるグルコースシグナルを介したアポトーシス制御を検討する。

個体モデルにおける膵細胞アポトーシスとグルコキナーゼの関連性を解明する。

(4)膵細胞への分化誘導、再生促進におけるグルコースシグナルの役割

膵腺房細胞および膵管細胞におけるグルコースシグナルの機能を解明する。

膵細胞におけるグルコキナーゼの役割

を検討する。

ES細胞、iPS細胞を膵細胞に分化誘導させる過程におけるGKAの効果を検証する。

#### 4. 研究成果

膵細胞におけるインスリンシグナルが膵細胞の増殖・生存に重要であることが報告されているが、インスリン分泌の著明に低下した糖尿病モデルマウスにおいて、消化管ホルモンであるGLP-1の受容体活性化薬が、膵細胞からのインスリン分泌に依存せずに膵細胞量を保護することを解明した (*Endocrinology*, 2012)。これより、インスリンに依存しない膵細胞量保護を目指した治療の可能性を示唆した。

小胞体ストレスは、アポトーシスによる膵細胞量低下を引き起こし2型糖尿病の発症・進展に重要な役割を果たすことが知られている。解糖系の酵素であるグルコキナーゼを介した糖代謝シグナルが、膵細胞の増殖と関与することを示した (*Diabetologia*, 2012)。6週齢db/dbマウスに2週間Exendin-4またはプラセボを腹腔注射し、単離膵島にグルコキナーゼ活性化薬刺激を行い、IRS-2の発現を比較したところ、プラセボ群ではこれらの発現は上昇しなかったが、Exendin-4注射群では有意に発現が上昇した (*Diabetologia*, 2012)。

グルコキナーゼおよびその下流分子の小胞体ストレス誘導性アポトーシスにおける役割を明らかにするために、Akitaマウスと各遺伝子改変マウスを掛け合わせ、グルコキナーゼ欠損Akitaマウス、IRS-2欠損Akitaマウス、膵細胞特異的IRS-2過剰発現Akitaマウスを作製し、糖尿病発症や小胞体ストレス誘導性の膵細胞アポトーシスに対するグルコキナーゼおよびIRS-2を介した小胞体ストレス制御の役割を個体レベルで解析し、生体内での意義を明らかにした (*Diabetes*, 2013)。

グルコキナーゼの活性化が、インスリンシグナルの増強を介したGSK-3の活性抑制と、MAPキナーゼのERKを介した小胞体ストレス関連分子群の発現制御との複数の異なる経路を介して膵細胞アポトーシスを抑制し膵細胞量を保護することを見いだした (*Diabetes*, 2013)。

膵切除後膵細胞増殖機構における責任分子同定のため、Sham手術と膵切除施行後の単離膵島における遺伝子発現マイクロアレイを施行した。新規分子をクローニングし、単離膵島や膵細胞株で過剰発現もしくは発現低下させ、GKAやグルコースシグナルの影響を検証した (*Endocrinology*, 2014)。

DNA発現マイクロアレイにてGKAを作用させた時に発現が変化する新規分子群を同定したが、その中のFibulin5 (Fbln5)に注目し、研究を進めた。Fbln5は細胞外マトリックスを形成する弾性線維の形成に必須の分泌タンパクで、Fbln5欠損マウス (Fbln5KO)

は弛緩性皮膚や肛門脱、肺気腫などを来すが、代謝調節への関与は未報告。Fbln5ノックアウトマウス (Fbln5KO) および遺伝的背景が同じ野生型 (WT) に、生後8週齢より通常食または高脂肪食を負荷し解析した。

食事中的リノール酸やパルミチン酸による膵細胞障害モデルにおけるグルコキナーゼの役割を、Gck<sup>+/-</sup>マウスやGKA投与による治療効果を用いて解析した。

GKAの開発状況と今後の課題について、総説 (依頼原稿) を執筆した (*J Diabetes Investig*, 2015)。

#### 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 9 件)

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

Shirakawa J, Okuyama T, Yoshida E, Shimizu M, Horigome Y, Tuno T, Hayasaka M, Abe S, Fuse M, Togashi Y, Terauchi Y. Effects of the antitumor drug OSI-906, a dual inhibitor of IGF-1 receptor and insulin receptor, on the glycemic control,  $\beta$  cell functions, and  $\beta$  cell proliferation in male mice. *Endocrinology*, 査読有, 155(6): 2102-11, 2014.  
doi: 10.1210/en.2013-2032.

Togashi Y, Shirakawa J, Orime K, Kaji M, Sakamoto E, Tajima K, Inoue H, Nakamura A, Tochino Y, Goshima Y, Shimomura I, Terauchi Y.  $\beta$  cell proliferation after a partial pancreatectomy is independent of IRS-2 in mice. *Endocrinology*, 査読有, 155(5), 1643-52, 2014.  
doi: 10.1210/en.2013-1796.

Orime K, Shirakawa J, Togashi Y, Tajima K, Inoue H, Ito Y, Sato K, Nakamura A, Aoki K, Goshima Y, Terauchi Y. Trefoil factor 2 promotes cell proliferation in pancreatic  $\beta$  cells through CXCR-4-mediated ERK1/2 phosphorylation. *Endocrinology*, 査読有, 154(1): 54-64, 2013.  
doi: 10.1210/en.2012-1814.

Shirakawa J, Togashi Y, Sakamoto E, Kaji M, Tajima K, Orime K, Inoue H, Kubota N, Kadowaki T, Terauchi Y.

Glucokinase activation ameliorates ER stress-induced apoptosis in pancreatic  $\beta$  cells. *Diabetes*, 査読有,62(10): 3448-58, 2013.  
doi: 10.2337/db13-0052.

Tajima K, Shirakawa J, Togashi Y, Inoue H, Sato K, Orime K, Ito Y, Kaji M, Sakamoto E, Nakamura A, Aoki K, Goshima Y, Atsumi T, Terauchi Y. AMPK is involved in the regulation of incretin receptors expression in pancreatic islets under a low glucose concentration. *PLoS One*. 査読有,22;8(5):e64633, 2013.  
doi: 10.1371/journal.pone.0064633.

Nakamura A, Togashi Y, Orime K, Sato K, Shirakawa J, Ohsugi M, Kubota N, Kadowaki T, Terauchi Y. Control of beta cell function and proliferation in mice stimulated by small molecule glucokinase activator under various conditions. *Diabetologia*, 査読有,55: 1745-1754, 2012.  
doi: 10.1007/s00125-012-2521-5.

Shirakawa J, Tanami R, Togashi Y, Tajima K, Orime K, Kubota N, Kadowaki T, Goshima Y, Terauchi Y. Effects of liraglutide on  $\beta$  cell-specific glucokinase-deficient neonatal mice. *Endocrinology*, 査読有,153:3066-3075, 2012.  
doi: 10.1210/en.2012-1165.

Sato K, Nakamura A, Shirakawa J, Muraoka T, Togashi Y, Shinoda K, Orime K, Kubota N, Kadowaki T, Terauchi Y. Impact of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor vildagliptin on glucose tolerance, beta cell function and mass in insulin receptor substrate-2-knockout mice fed a high-fat diet. *Endocrinology*, 査読有,153: 1093-1102, 2012.  
doi: 10.1210/en.2011-1712.

[学会発表](計 18 件)

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. 10<sup>th</sup> IDF-WPR Congress/6<sup>th</sup> AASD Scientific Meeting, November 20-21, 2014, Singapore, Singapore.

Yoshida E, Shirakawa J, Okuyama T, Kyohara M, Togashi Y, Kimura A, Hirano H, Terauchi Y. Isolation of target genes of

liraglutide, a GLP-1 receptor agonist, in pancreatic islets by using nano-LC-MS/MS system. 50th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes September 15-19, 2014, Vienna, Austria.

Inoue H, Shirakawa J, Orime K, Togashi Y, Tajima K, Terauchi Y. The role of S100A8 and S100A9 in inflammatory interaction between pancreatic islets and macrophages. 50th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes September 15-19, 2014,

Shirakawa J, Terauchi Y. Characterization of target genes of glucokinase activator (GKA) in pancreatic islets. 73rd American Diabetes Association (ADA) meeting, June 21-25, 2014, Chicago, USA.

Inoue H, Shirakawa J, Orime K, Togashi Y, Terauchi Y. Coordinated effects of macrophages and free fatty acids on the inflammatory gene expression in pancreatic islets. 49<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes September 23-27, 2013, Barcelona, Spain.

Togashi Y, Shirakawa J, Orime K, Inoue H, Nakamura A, Terauchi Y. Partial pancreatectomy facilitated  $\beta$  cell proliferation in glucokinase haploinsufficient mice and IRS-2 deficient mice. 73rd American Diabetes Association (ADA) meeting, June 21-25, 2013, Chicago, USA.

Terauchi Y: Impact of glucokinase activation on proliferation and apoptosis of pancreatic beta cells. Beta Cell Workshop 2013 Kyoto, April 23-26, 京都国際会館(京都府京都市) 招聘講演.

Shirakawa J, Terauchi Y. Glucokinase activation ameliorates ER stress-induced apoptosis in pancreatic  $\beta$  cells. Beta Cell Workshop 2013 Kyoto, April 23-26, 京都国際会館(京都府京都市) 招聘講演.

Togashi Y, Shirakawa J, Terauchi Y.  $\beta$  cell proliferation in glucokinase haploinsufficient mice and IRS-2 deficient mice after a partial pancreatectomy. Beta Cell Workshop 2013 Kyoto, April 23-26, Kyoto, Japan.

Tajima K, Shirakawa J, Togashi Y, Terauchi Y. AMPK is involved in the regulation of incretin receptors expression in pancreatic islets under low and medium glucose concentrations. Beta Cell Workshop 2013 Kyoto, April 23-26, 京都国際会館 (京都府京都市)

Orime K, Shirakawa J, Togashi Y, Tajima K, Terauchi Y. Trefoil factor 2 promotes cell proliferation in pancreatic  $\beta$  cells. Beta Cell Workshop 2013 Kyoto, April 23-26, 京都国際会館 (京都府京都市).

Inoue H, Shirakawa J, Orime K, Togashi Y, Terauchi Y. Macrophages and free fatty acids coordinately induced inflammatory gene expression in pancreatic islet. Beta Cell Workshop 2013 Kyoto, April 23-26, 2013, 京都国際会館 (京都府京都市).

寺内康夫: Recent progress in blood glucose control. The 30th Annual Meeting of the International Society of Blood Purification. 2012年9月7日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Tajima K, Shirakawa J, Orime K, Togashi Y, Terauchi Y. The regulatory mechanism of incretin receptor expressions by dephosphorylation of AMPK in islet. 第72回米国糖尿病学会, 2012年6月10日, フィラデルフィア(米国)

Togashi Y, Shirakawa J, Nakamura A, Terauchi Y. Signaling pathway of  $\beta$  cell proliferation after partial pancreatectomy is distinct from that on a high-fat diet in mice. 第72回米国糖尿病学会, 2012年6月10日, フィラデルフィア(米国)

Orime K, Shirakawa J, Togashi Y, Tajima K, Terauchi Y. Trefoil factor 2 promotes cell proliferation in pancreatic  $\beta$  cells through A CXCR4-mediated ERK1/2 pathway. 第72回米国糖尿病学会, 2012年6月10日, フィラデルフィア(米国)

Shirakawa J, Terauchi Y. Glucokinase activator ameliorates  $\beta$  cell ER stress and apoptosis by both IRS-2-dependent and -independent pathways. 第72回米国糖尿病学会, 2012年6月10日, フィラデルフィア(米国)

白川 純、寺内康夫: Effects of

glucokinase activator (GKA) on the regulation of  $\beta$  cell ER stress and incretin receptor expressions. 第55回日本糖尿病学会, 2012年5月17日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~nai3naib/wp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

寺内 康夫 (TERAUCHI, Yasuo)  
横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・  
教授  
研究者番号: 40359609

### (2) 研究分担者

白川 純 (SHIRAKAWA, Jun)  
横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・  
客員研究員  
研究者番号: 70625532