

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 9 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19521

研究課題名(和文)メトホルミンによる膵 細胞保護作用の分子機構の解明

研究課題名(英文)Effect of metformin on pancreatic beta cells

研究代表者

田島 一樹(TAJIMA, Kazuki)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：00725236

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)：インスリン抵抗性改善薬であるメトホルミンによる膵 細胞保護作用を検討した。メトホルミンは、インスリン抵抗性とは独立して、高脂肪食負荷や小胞体ストレスに伴う膵 細胞への過負荷を直接作用により軽減することを明らかにした。また、膵島移植の生着率に寄与する膵島中心壊死を抑制した。以上より、メトホルミンは、膵 細胞に保護作用を有していることが示唆され、膵島移植治療の応用としても期待できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：I investigated the effect of metformin on pancreatic beta cells. Metformin directly suppressed overload of beta cells induced by High-fat diet feeding or endoplasmic reticulum stress. Furthermore, metformin suppressed central necrosis of beta cells. Therefore, the results suggested that metformin has a protective effect on beta cells. It is possible that metformin is useful drug for islet transplantation.

研究分野：糖尿病学

キーワード：メトホルミン 膵 細胞 増殖 インスリン抵抗性 小胞体ストレス

## 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型糖尿病において、食習慣の欧米化から肥満の進行とともにインスリン抵抗性の関与が大きい患者が増加しており、インスリン抵抗性に対する膵細胞の代償性過形成が不十分となることが糖尿病発症に重要である。欧米をはじめ、日本においても、2型糖尿病治療に対するインスリン抵抗性改善薬として、ビッグアミド薬であるメトホルミンが多用されている。メトホルミンは抗糖尿病作用のみならず、悪性腫瘍、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)など、高インスリン血症との関連が深い疾患に関する有効性も示唆され、糖尿病領域のみならず、多くの領域で注目されている。このような背景のもと、私は、これまでに、高脂肪食負荷モデルマウスにおいて、メトホルミンがNASH、肝腫瘍の発症を有意に抑制したことを報告した(Tajima et al. Am J Physiol Endocrinol Metab 2013)。また、私は、メトホルミンが、マウス膵島において、何らかの間接的な機序でインクレチン受容体の発現を上昇させる可能性について示した(Tajima et al. PLoS One 2013)。また、高脂肪食負荷マウスを用いた検討で、メトホルミンは、インスリン抵抗性存在下で、膵細胞に対して代償性反応を抑制し、インスリン分泌を節約することにより、膵細胞機能を保護している可能性が示唆された(未発表)。さらに、メトホルミンの膵細胞保護作用の一つとして、単離膵島において、高グルコース誘導性の膵細胞中心性壊死を抑制することを見出した(未発表)。以上から、メトホルミンは、膵細胞保護作用を有することが示唆されたが、現時点では、メトホルミンによるインクレチン受容体の発現制御機構をはじめ、膵細胞

に対する作用に関しても、一定の見解は得られていない。

## 2. 研究の目的

(研究開始当初)

メトホルミンのインクレチン受容体発現の制御機構、さらにメトホルミンが臓器間連関の観点から、膵細胞の機能および量の制御機構を解明する。また、メトホルミンによる単離膵島の細胞中心壊死の制御機構を解明し、膵島移植への治療応用を目指す。

### 膵細胞におけるメトホルミンのインクレチン受容体発現の制御機構の同定

- ・メトホルミンの in vivo および in vitro での投与におけるインクレチン受容体発現の制御および受容体の膜移行制御機構を解明する
- ・メトホルミンによる肥満・糖尿病モデルマウスにおけるインクレチン受容体の発現変化を解析する

### メトホルミンによる膵細胞の保護作用機構の同定

- ・メトホルミンが、膵細胞機能や量に与える影響を解析する
- ・臓器間連関を介したメトホルミンの膵細胞機能や量に及ぼす影響を解析する
- ・膵細胞機能および量制御におけるメトホルミンの新規標的遺伝子の単離とその機能解析をおこなう

### メトホルミンによる膵島細胞中心壊死の制御機構の同定と膵島移植への治療応用

- ・メトホルミンによる膵島細胞中心壊死の抑制機構を解明し、そのシグナルを解析する
- ・糖尿病モデルマウスに、メトホルミンを添加した膵島を移植し、耐糖能に及

ばす影響を解析する

### 3. 研究の方法

(研究開始当初)

本研究では、インスリン抵抗性改善薬であるメトホルミンが、インクレチン受容体発現、臓器間連関を含めた膵細胞における機能や量の制御を明らかにし、病態に応じた適切な治療法を開発することにある。下記のように研究計画をすすめる。メトホルミンによる膵細胞におけるインクレチン受容体の発現について、転写レベルによる発現変化を検討し、また翻訳後の受容体の細胞膜上への移行機構も検討する。また、メトホルミンによる膵細胞の機能および量の制御機構を、臓器連関を介した経路を含めて解析する。メトホルミンの新規標的遺伝子の単離および機能解析により、膵細胞機能および量の制御の新たな分子機構を提唱する。さらには、メトホルミンによる膵島細胞中心壊死の制御機構を同定し、生着率向上および耐糖能改善につながる膵島移植への治療応用を目指す。

(研究開始後)

メトホルミンの膵細胞保護作用の検討の中で、高脂肪食下において、インスリン抵抗性とは独立した膵細胞増殖の抑制効果および小胞体ストレス軽減効果を見出した。そのため、上記項目による解析を優先し、本研究では主に、(1) 高脂肪食誘導性の膵細胞増殖および(2) 小胞体ストレス下における膵細胞に及ぼす影響を解析した。

・メトホルミンの膵細胞保護作用の検討

(1) 高脂肪食誘導性の膵細胞増殖に及ぼす影響

(2) 小胞体ストレス下における膵細胞に及ぼす影響

### 4. 研究成果

・メトホルミンの膵細胞保護作用の検討

(1) 高脂肪食誘導性の膵細胞増殖に及ぼす影響

既報において、高脂肪食を1週間負荷したマウスでは、インスリン抵抗性が惹起されないが、膵細胞の代償性増殖をみとめることが報告されている。私は、この条件下で、メトホルミンを投与すると、膵細胞の代償性増殖が抑制されたことを明らかにした (Tajima et al. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2017) (図1)。これにより、メトホルミンがインスリン抵抗性改善とは独立して、膵細胞の代償性増殖を抑制し、過負荷を軽減している可能性が示唆された。

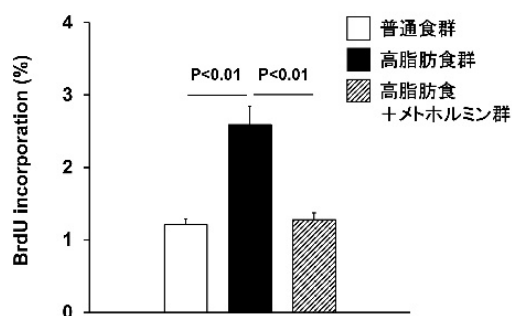
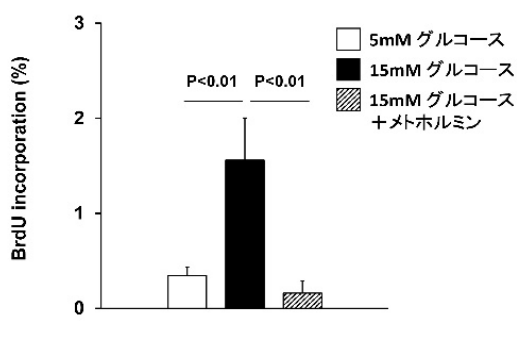


図1 メトホルミンは、高脂肪食負荷(1週間)マウスの膵β細胞増殖を抑制したマウスを普通食群、高脂肪食群、高脂肪食 + メトホルミン投与群の3群に分け、膵組織のBrdU染色を行い、増殖能を評価した。

次に、メトホルミンによる膵細胞への直接的な増殖制御機構を検討するために、マウス単離膵島および膵細胞株の INS-1 細胞を用いて、高血糖下における膵細胞の増殖制御機構を解析した。これまでに、マウス単離膵島において、グルコース誘導性の膵細胞増殖を抑制したことを明らかにした (図 2)。また、INS-1 細胞においても同様にグルコース誘導性の膵細胞増殖を抑制したが、その機序として、AMPK リン酸化による mTOR/rS6P シグナル抑制が寄与している可能性が示唆された (Tajima et al. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2017)。

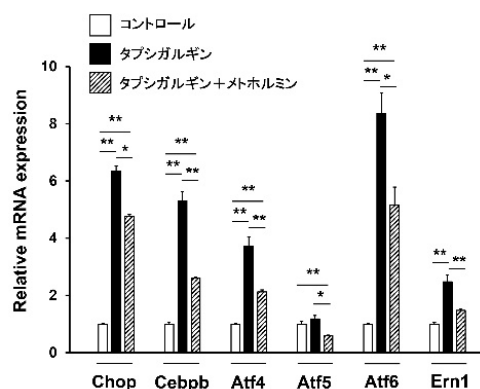


**図 2** メトホルミンは、高血糖下において、マウス単離膵島の膵β細胞増殖を抑制した  
単離膵島を正常血糖または高血糖下 (+メトホルミン) で培養後、BrdU 染色により、膵β細胞の増殖能を評価した。

(2) 小胞体ストレス下における膵細胞に及ぼす影響

これまでに、マウス単離膵島および膵細胞株 MIN6 細胞に、タプシガルギンを添加し、小胞体ストレスを惹起させた条件下で、メ

トホルミンを添加すると、膵細胞アポトーシスの抑制がみられたことを明らかにした。その際の遺伝子発現変化で、メトホルミンにより、小胞体ストレス関連遺伝子の発現は有意に抑制された(図 3)(未発表)。また、タンパク発現評価では、メトホルミンによる 4EBP-1 の誘導が確認された(未発表)。以上より、メトホルミンが、4EBP1 を介して、翻訳開始を抑制している可能性が示唆された。実際に shRNA により 4EBP1 を knockdown した MIN6 細胞を用いた検討では、タプシガルギン添加時のメトホルミンにアポトーシス抑制効果は認められなかった(未発表)。今後更なる機序について検討をすすめていく。



**図 3** メトホルミンは、タプシガルギン誘導性小胞体ストレス下で、小胞体ストレス関連遺伝子の発現を抑制した

単離膵島を正常血糖下でタプシガルギンを添加 (+メトホルミン) し、培養後、遺伝子発現を評価した。\*P<0.05, \*\*P<0.01

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Tajima K, Shirakawa J, Okuyama T, Kyohara M, Yamazaki S, Togashi Y, Terauchi Y. Effects of metformin on compensatory pancreatic  $\beta$ -cell hyperplasia in mice fed a high-fat diet. Am J Physiol Endocrinol Metab. 査読有、doi: 10.1152/ajpendo.00447. [Epub ahead of print] 2017.

[学会発表] (計 4 件)

田島一樹、白川純、富樫優、折目和基、寺内康夫：メトホルミンはインスリン抵抗性改善とは独立して膵  $\beta$  細胞を保護する。第 31 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会，はまぎんホール ヴィアマール(神奈川県横浜市)，2017，2。

田島一樹、白川純、富樫優、折目和基、寺内康夫：メトホルミンによる膵  $\beta$  細胞保護作用の検討。第 59 回日本糖尿病学会年次学術総会，国立京都国際会館(京都府京都市)，2016，5。

田島一樹、白川純、富樫優、寺内康夫：Effects of metformin on pancreatic beta cells. 第 59 回日本糖尿病学会年次学術総会，国立京都国際会館(京都府京都市)，2016，5。

田島一樹、白川純、富樫優、折目和基、寺内康夫：メトホルミンによる膵  $\beta$  細胞保護作用の検討。第 53 回日本臨床分子医学会学術総会，東京国際フォーラム(東京都千代田区)，2016，4。

## 6. 研究組織

研究代表者

田島一樹 (TAJIMA, Kazuki)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：00725236