

令和元年9月3日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09770

研究課題名(和文) 膵細胞機能障害(高血糖毒性)の分子メカニズムに基づいた新規糖尿病治療薬剤の探索

研究課題名(英文) Investigation of novel diabetic medicine based on 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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：膵細胞が慢性高血糖に曝されると、インスリン生合成や分泌はさらに低下して、血糖コントロールが悪化するという悪循環に陥る。申請者らはこの分子機構にインスリン遺伝子の転写因子(MafA, PDX-1)の発現低下が関与することを報告している。そうした中で、本検討においては、これらの発現を直接的に増加させる薬剤を小分子化合物ライブラリーを用いた網羅的に検索を行った。その結果、膵細胞株MIN6において、MafAやPDX-1の発現を増加させる因子をいくつか同定した。既に同定された薬剤に関しては、単離膵島での検討、蛋白量の検討なども施行済みであり、現在さらなる検討を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らはインスリンの転写因子MafAやPDX-1の発現が糖尿病状態において低下すること、またそれがブドウ糖毒性と関連することを報告している。しかしながらこれらの転写因子の発現を増加させる因子がまだ報告されていないため、その検索は大変独創的と考えられる。また得られた結果は、膵細胞機能障害の分子メカニズムをさらに明らかとするとともに、膵細胞保護効果を有する薬剤の検索にも繋がり、基礎的研究としても、また臨床応用の観点からも極めて重要な検討であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic beta-cells secrete insulin when blood glucose levels become high, but when beta-cells are chronically exposed to hyperglycemia, beta-cell function gradually deteriorates which is known as beta-cell glucose toxicity. In the diabetic state, nuclear expression levels of pancreatic transcription factors MafA and PDX-1 are decreased. In addition, it is known that overexpression of such transcription factor expression preserves beta-cell function in diabetic mice. In this study, we searched factors which directly increase MafA and/or PDX-1 expression levels, and found several potential factors inducing such transcription factors. We hope that such findings would lead to the development of new medicine for type 2 diabetes based upon the molecular mechanism for beta-cell glucose toxicity.

研究分野：内科系臨床医学 代謝学

キーワード：膵細胞 ブドウ糖毒性 インスリン遺伝子 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病の特徴は、膵細胞におけるインスリンの生合成、分泌の低下およびインスリン標的臓器(肝臓、骨格筋、脂肪)でのインスリン抵抗性である。そして高血糖が持続すると、膵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、インスリン抵抗性はさらに増加するという悪循環に陥る。この現象は高血糖毒性として臨床的にも広く知られている。申請者らはこれまでにこの高血糖毒性の分子機構にインスリン遺伝子の極めて重要な転写因子 MafA および PDX-1 の発現の低下が深く関与すること、またその分子メカニズムなどに関して論文報告している。さらに、Cre-loxP システムを用いて膵細胞特異的に、またタモキシフェン誘導性に MafA を発現する肥満 2 型糖尿病モデルマウスを作成し検討した結果、MafA の発現を保持させておくと、インスリン生合成、グルコース応答性インスリン分泌が回復し、血糖コントロールが改善することも報告しており、MafA の発現低下が膵細胞機能障害に深く関与していることが明らかとなっている。

## 2. 研究の目的

糖尿病状態で膵細胞が慢性的に高血糖に曝されると、膵細胞におけるインスリン生合成や分泌はさらに低下し、血糖コントロールが悪化するという悪循環に陥る。この現象はブドウ糖毒性として臨床的にも広く知られている。申請者らはこれまで一貫してこのブドウ糖毒性の分子機構の研究に携わっており、インスリン遺伝子の転写因子(MafA, PDX-1)の発現低下が深く関与することを報告している。しかしながら、これまでには MafA や PDX-1 の発現を直接増加させる薬剤のスクリーニングは行われてない。そうした中で、本検討の目的は、種々の小分子化合物ライブラリーを用いてこれらの発現を直接的に増加させる薬剤や因子を網羅的に検索して、ブドウ糖毒性の分子機構に基づく新規糖尿病治療薬の検索をすることである。

## 3. 研究の方法

インスリン遺伝子の転写因子である MafA および PDX-1 は膵細胞において極めて重要な役割を果たしているも、それらの発現は糖尿病状態において低下し、これが臨床的にもしばしば認められるブドウ糖毒性に深く関連している。本検討においては、これらの転写因子の発現を増加させる因子を網羅的に検索する。具体的には G protein-coupled receptor (GPCR) に結合する小分子化合物ライブラリーをはじめとする各種の小分子ライブラリーを順次細胞株 MIN6 に投与して、RT-PCR にて MafA や PDX-1 の mRNA 発現を増やすことのできる因子を網羅的に検索する。その際にインスリンの mRNA の発現も増やしているかも同時に検討して総合的に評価する。MIN6 細胞にて変化を認めた薬剤に関しては単離膵島においても同じ結果が得られるかを確認する。また、mRNA を増やすことが確認できた因子に関しては、MafA や PDX-1 の蛋白量の変化を確認し、さらに単離膵島においても同じ結果が得られるか否かを確認する。さらに上記で選択された薬剤に関しては、糖尿病モデルマウスに投与し、MafA, PDX-1 の発現量の変化、インスリン生合成、分泌の変化、さらに血糖コントロールに変化を検討する。

#### 4 . 研究成果

申請者らは既に、膵 細胞株 MIN6 において小分子化合物ライブラリーを用いたスクリーニングを開始しており、MafA や PDX-1 の発現を増加させる因子をいくつか同定した。既に同定された薬剤に関しては、単離膵島での検討、また蛋白量の検討なども検討済みであり、現在さらなる検討を進めている。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 18 件)

1. Obata A, Kimura T, Obata Y, Shimoda M, Kinoshita T, Kohara K, Okauchi S, Hirukawa H, Kamei S, Nakanishi S, Mune T, Kaku K, and **Kaneto H**. Vascular endothelial PDK1 plays pivotal roles for maintenance of pancreatic beta-cell mass and function in adult male mice. *Diabetologia* (in press)
2. Kohara K, Obata A, Kimura T, Shimoda M, Moriuchi S, Okauchi S, Hirukawa H, Mune T, Kaku K, and **Kaneto H**. Suppression of free fatty acid receptor 1 expression in pancreatic  $\beta$ -cells in obese type 2 diabetic db/db mice: A potential role of pancreatic and duodenal homeobox factor 1. *Endocr. J.* 66, 43-50, 2019
3. Kimura T, Obata A, Shimoda M, Okauchi S, Kanda-Kimura Y, Nogami Y, Hirukawa H, Kohara K, Nakanishi S, Mune T, Kaku K, and **Kaneto H**. Protective effects of SGLT2 inhibitor luseoglitazone on pancreatic  $\beta$ -cells in obese diabetic db/db mice: The earlier and longer, the better. *Diabetes Obes. Metab.* 20, 2442-2457, 2018
4. Kimura T, Obata A, Shimoda M, Shimizu I, da Silva Xavier G, Okauchi S, Hirukawa H, Kohara K, Mune T, Moriuchi S, Hiraoka A, Tamura K, Chikazawa G, Ishida A, Yoshitaka H, Rutter GA, Kaku K, and **Kaneto H**. Down-regulation of vascular GLP-1 receptor expression in human subjects with obesity. *Scientific Rep.* 8, 10644, 2018
5. Kimura T, Obata A, Shimoda M, Hirukawa H, Kanda-Kimura Y, Nogami Y, Kohara K, Nakanishi S, Mune T, Kaku K, and **Kaneto H**. Durability of protective effect of dulaglutide on pancreatic  $\beta$ -cells in diabetic mice: GLP-1 receptor expression is not reduced at all even after long-term exposure to dulaglutide. *Diabetes Metab.* 44, 250-260, 2018
6. Nakashima K, **Kaneto H**, Shimoda M, Kimura T, and Kaku K. Pancreatic  $\alpha$ -cells in diabetic rats express active GLP-1 receptor: Evidence for GLP-1 signaling that regulates intra-islet paracrine mechanism. *Scientific Rep.* 8, 3725, 2018
7. **Kaneto H**, Obata A, Kimura T, Shimoda M, Okauchi S, Shimo N, Matsuoka T, and Kaku K. Beneficial effects of SGLT2 inhibitors for preservation of pancreatic  $\beta$ -cell function and reduction of insulin resistance. *J. Diabetes* 9, 219-225, 2017
8. Kimura T, Obata A, Shimoda M, Okauchi S, Hirukawa H, Kohara K, Kinoshita T, Nogami Y, Nakanishi S, Mune T, Kaku K, and **Kaneto H**. Decreased GLP-1 receptor expression in endothelial and smooth muscle cells in diabetic db/db mice: TCF7L2 is a possible regulator of vascular GLP-1 receptor. *Diabetes Vasc. Dis. Res.* 14, 540-548, 2017
9. Matsuoka T, Kawashima S, Miyatsuka T, Sasaki S, Shimo N, Katakami N, Kawamori D, Herrera PL, **Kaneto H**, Stein R, and Shimomura I. Mafa enables Pdx1 to effectively convert pancreatic islet progenitors and committed islet  $\alpha$ -cells into  $\beta$ -cells *in vivo*. *Diabetes* 66, 1293-1300, 2017
10. Yamamoto Y, Miyatsuka T, Sasaki S, Miyashita K, Kubo N, Shimo N, Takebe S, Watada H, **Kaneto H**, Matsuoka T, and Shimomura I. Recovered expression of Pdx1 improves  $\beta$ -cell failure in diabetic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 483, 418-424, 2017

11. **Kaneto H.**, Obata A, Shimoda M, Kimura T, Hirukawa H, Okauchi S, Matsuoka T, and Kaku K. Promising diabetes therapy based on the molecular mechanism for glucose toxicity: Usefulness of SGLT2 inhibitors as well as incretin-related drugs. *Curr. Med. Chem.* 23, 3044-3051, 2016
12. **Kaneto H.**, Matsuoka T, Kimura T, Obata A, Shimoda M, Kamei S, Mune T, and Kaku K. Appropriate therapy for type 2 diabetes in view of pancreatic  $\beta$ -cell glucose toxicity: "The earlier, the better". *J. Diabetes* 8, 183-189, 2016
13. Okauchi S, Shimoda M, Obata A, Kimura T, Hirukawa H, Kohara K, Mune T, Kaku K, and **Kaneto H.** Protective effects of SGLT2 inhibitor luseogliflozin on pancreatic  $\beta$ -cells in obese type 2 diabetic db/db mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 470, 772-782, 2016
14. **Kaneto H.**, and Matsuoka T. Role of pancreatic transcription factors in maintenance of mature  $\beta$ -cell function. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 6281-6297, 2015
15. **Kaneto H.** Pancreatic  $\beta$ -cell glucose toxicity in type 2 diabetes mellitus. *Curr. Diabetes Rev.* 11, 2-6, 2015
16. 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  $\beta$ -cells improves glycemic control in vivo. *J. Biol. Chem.* 290, 7647-7657, 2015
17. 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
18. Hirukawa H, **Kaneto H.**, Shimoda M, Kimura T, Okauchi S, Obata A, Kohara K, Hamamoto S, Tawaramoto K, Hashiramoto M, and Kaku K. Combination of DPP-4 inhibitor and PPAR $\gamma$  agonist exerts protective effects on pancreatic  $\beta$ -cells in diabetic db/db mice through the augmentation of IRS-2 expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* 413, 49-60, 2015

〔学会発表〕(計 13 件)

**金藤 秀明**

「2型糖尿病の病態および治療に関するトピックス」  
日本糖尿病学会中四国地方会第56回総会 10月26日(下関)(2018)

**金藤 秀明**

「糖尿病における早期治療の重要性」  
第36回 日本肥満症治療学会学術集会 教育講演 6月16日(東京)(2018)

**金藤 秀明**

「Lipotoxicity」  
第61回日本糖尿病学会年次学術集会 Controversy 5月25日(東京)(2018)

**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21回日本病態栄養学会年次学術集会 1月13日(京都)(2018)

**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55回 日本糖尿病学会中国四国地方会 ランチョンセミナー 11月10日(岡山)(2017)

**金藤 秀明**

「糖尿病における早期治療強化の重要性 ~GLP-1受容体作動薬を中心に~」  
第32回 日本糖尿病合併症学会 イブニングセミナー 10月28日(東京)(2017)

**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47回 日本腎臓学会西部学術大会 ランチョンセミナー 10月13日(岡山)(2017)

**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49回日本動脈硬化学会総会ランチョンセミナー 7月7日(広島)(2017)

**金藤 秀明**

「SGLT2阻害薬の有用性」  
第60回日本糖尿病学会年次学術集会 教育講演 5月20日(名古屋)(2017)

**金藤 秀明**

「2型糖尿病の病態と最近の薬物治療 ～早期治療介入の重要性～」

第81回日本循環器病学会学術集会ランチョンセミナー 3月17日(金沢)(2017)

**金藤 秀明**

「膵細胞から見たインクチン製剤の有用な使用法」

第51回 糖尿病学の進歩 ランチョンセミナー 2月18日(京都)(2017)

**金藤 秀明**

「膵細胞ブドウ糖毒性の分子機構」

第51回 糖尿病学の進歩 教育講演 2月18日(京都)(2017)

**金藤 秀明**

「膵細胞ブドウ糖毒性の観点からみたインスリン療法」

第51回 糖尿病学の進歩 ランチョンセミナー 2月17日(京都)(2017)

〔図書〕(計5件)

**金藤 秀明** 「糖毒性軽減および膵細胞保護作用」医学のあゆみ Vol.266, No.4, 257-259, 2018

**金藤 秀明** 「SGLT2阻害薬による膵細胞保護の可能性を探る」

SGLT2阻害薬のすべて 81-85, 2018

**金藤 秀明** 「SGLT2」Current Therapy Vol. 35, No.11, 78, 2017

**金藤 秀明** 「2型糖尿病の病態と治療に関するトピックス」おかやま DM ネットジャーナル

**金藤 秀明** 「病態改善とその機構」 教えて！SGLT2阻害薬の使い方 124-127, 2017

〔産業財産権〕なし

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：下田 将司

ローマ字氏名：Masashi Shimoda

所属研究機関名：川崎医科大学

部局名：糖尿病・代謝・内分泌内科

職名：講師

研究者番号(8桁)：60388957

研究分担者氏名：小畑 淳史

ローマ字氏名：Atsushi Obata

所属研究機関名：川崎医科大学

部局名：糖尿病・代謝・内分泌内科

職名：臨床助教

研究者番号(8桁)：10771298

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。