

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03707

研究課題名（和文）糖尿病におけるグルカゴン分泌異常メカニズムの解明

研究課題名（英文）The mechanism of impaired glucagon secretion in type 2 diabetes

研究代表者

北村 忠弘（KITAMURA, TADAHIRO）

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：20447262

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：2型糖尿病の原因として、インスリン分泌の異常に加えて、グルカゴン分泌の異常もあるが、分泌異常になるメカニズムは不明である。本研究結果より、2型糖尿病の膵細胞ではグルコース輸送体であるSGLT1とGLUT1の発現パターンが変化し、結果としてグルカゴン分泌異常が引き起こされることを明らかにした。今後、膵細胞のSGLT1とGLUT1を標的とした新しい糖尿病治療薬の開発につながる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、2型糖尿病の成因や病態解明についての研究はインスリン中心に行われてきた。本研究課題では、ほとんど注目されていなかったグルカゴンに注目して研究を行った点で学術的新規性や学術的意義が大きい。また、本研究の成果が新たな治療標的を明らかにしたことから、現在の糖尿病治療薬とは全く異なる作用機序を持つ新たな治療薬の開発につながる可能性もあり、社会的意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：In addition to abnormal insulin secretion, abnormal glucagon secretion is also a cause of type 2 diabetes, but the mechanism of abnormal secretion is still unknown. From the results of this study, it was clarified that the expression patterns of glucose transporters SGLT1 and GLUT1 are changed in pancreatic cells of type 2 diabetes, resulting in abnormal glucagon secretion. In the future, it may lead to the development of new diabetes treatment drugs targeting SGLT1 or GLUT1 in cells.

研究分野：代謝内分泌学

キーワード：グルカゴン

1. 研究開始当初の背景

膵臓のラ氏島に存在する α 細胞はグルカゴンを分泌し、血糖値を上昇させている。2型糖尿病患者では血中のグルカゴン濃度が上昇していることが知られており、そのことが高血糖の原因になると考えられている。しかしながら、糖尿病でなぜグルカゴンが過剰分泌になるのか？というメカニズムに関しては全く未解明であった。図1に申請者らが行った検証結果を示す。健康診断の目的で糖負荷試験を受けた被験者を正常耐糖能 (NGT)、境界型 (preDM)、2型糖尿病 (DM) の3群に分けると、preDM と DM 群では空腹時の血中グルカゴン濃度が有意に上昇しており、糖負荷後のグルカゴン分泌抑制が有意に阻害されていることが判明した。

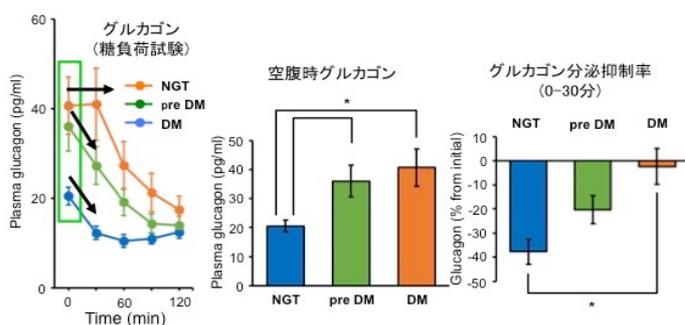


図1 糖尿病患者では空腹時グルカゴンの上昇と糖負荷後の分泌抑制の低下が認められる

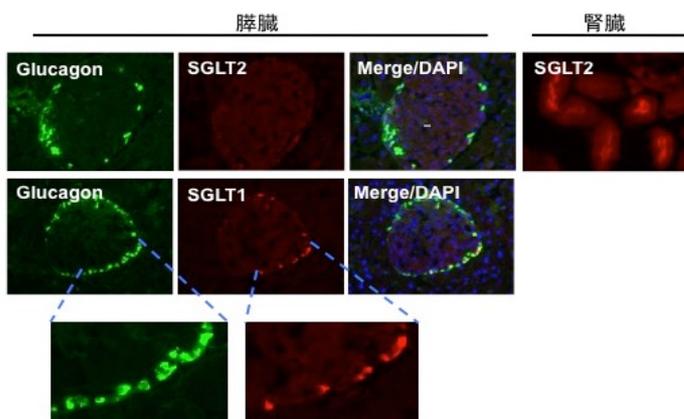


図2 膵臓においてSGLT2は発現しておらず、SGLT1は約半数の α 細胞に発現している

一方、糖はグルカゴン分泌を調節する重要な因子であるが、 α 細胞には糖の輸送体として GLUT1 が発現していることが知られていた。しかしながら、申請者の検討では Na⁺ と糖の共輸送体である SGLT1 も発現していた (図2)。

一方、2型糖尿病の高グルカゴン血症のメカニズムについて、高脂肪高シヨ糖食 (HFHSD) で8週間飼育したマウスと遺伝性糖尿病モデルである *db/db* マウスからラ氏島を単離し、遺伝子発現解析を行ったところ、両方の糖尿病モデルマウスで有意に SGLT1 の発現が増加し、逆に GLUT1 の発現が減少していた (図3)。これらの結果から、図4に示す仮説を提唱し、本研究ではこれを検証することを提案した。すなわち、糖尿病状態では α 細胞に発現する SGLT1 が増加し、逆に GLUT1 の発現が減少することで、グルカゴンの過剰分泌をきたし、高血糖を引き起こすという仮説であった。

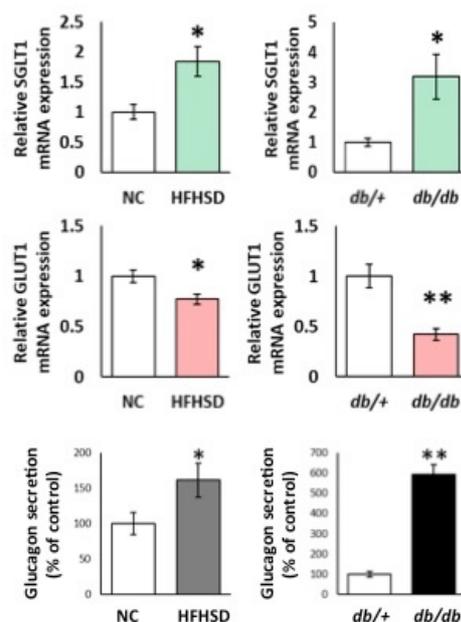


図3 糖尿病マウスのラ氏島におけるSGLT1とGLUT1の発現レベルとグルカゴン分泌の関係

2. 研究の目的

本研究の目的はこれまで未解明であった2型糖尿病においてグルカゴンが過剰分泌されるメカニズムを明らかにすることであった。グルカゴンは測定系が不正確で、血中濃度を正確に評価できていなかったが、本研究では全てのグルカゴン測定をサンドイッチELISA法かLC-MS/MSを用いて行ったため、学術的独自性が高い。また、本研究ではα細胞のみに蛍光標識したマウスからラ氏島を単離し、ラ氏島細胞を個々の細胞レベルに乖離させ、これらを回収することで真のα細胞を用いて解析を試みる点でも本研究の独自性と新規性は高かった。糖尿病研究領域では、従来あまり行われてこなかったα細胞（グルカゴン）研究に対し、幾つかの独自に開発した測定系と技術を用いて、長く未解明であった2型糖尿病における高グルカゴン血症のメカニズムを究明しようとする点で新規性と創造性に富んだ研究目的であった。

3. 研究の方法

本研究で行った研究方法は大きく以下の2つである。

- ① α細胞をSGLT1発現の有無で2種類に分類し、それぞれの細胞の特性を遺伝子発現プロファイルにより明らかにした上で、糖尿病の病態とはどちらの細胞がどのように関与しているかを解明する。
 - ② α細胞特異的にSGLT1をノックアウトしたマウスは糖尿病が改善するのか？、逆に、α細胞特異的にGLUT1をノックアウトしたマウスは糖尿病が悪化するのかを明らかにする。
- ① の目的のために、図5に示すtd-TomatoマウスをJackson社から購入し、Gittes研究室から供与頂いたグルカゴンCreマウス(Gcg-Cre)と交配した。交配して作製したマウスはα細胞のみで赤色蛍光を発した。これらのマウスからラ氏島を単離した後、申請者が開発した技術を用いて個々のラ氏島細胞を乖離させ、その中からα細胞のみをsingle cellで回収することを試みたが、single cellにする段階と、FACSによる回収の2つの段階でいくつかの課題が生じ、その解決法を現在も検討中である。
 - ② の目的のためには、申請者が所属する研究所のゲノムリソースセンターとの共同研究で、CRISPR/Cas9法を用いてSGLT1遺伝子のexon2を挟む形でFLOX配列を挿入した遺伝子改変マウス(SGLT1 FLOXマウス)を作製した(図

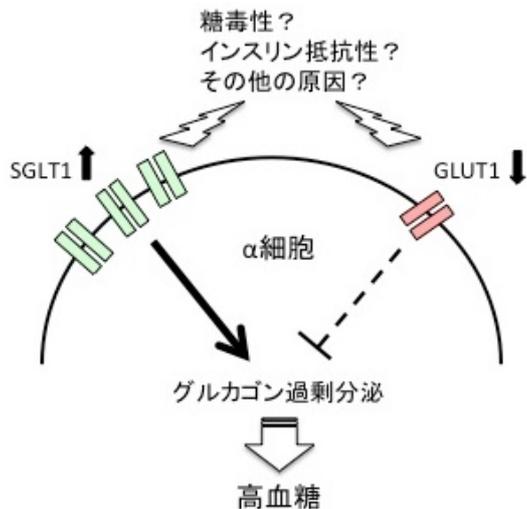


図4 糖尿病状態ではα細胞に発現するSGLT1が増加し、GLUT1が減少することで、グルカゴン過剰分泌が起きる(仮説)

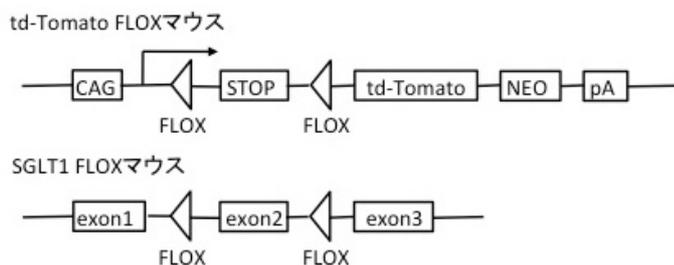


図5 グルカゴンCreマウスと交配するSGLT1 FLOXマウスとtd-Tomatoマウス

5)。このマウスを先述した Gcg-Cre マウスと交配することで α 細胞特異的 SGLT1 ノックアウトマウスを作製し、糖負荷試験やインスリン耐性試験を行った際の代謝パラメータの解析を行なった。次に、作製したマウスを高脂肪高シヨ糖食 (HFHSD) で 8 週間飼育した後、上記の代謝パラメータを解析した。さらに、*db/db* マウスと交配し、糖尿病の程度に改善が認められるかの検証を試みた。一方、Iowa 大学の Dale Abel 教授から GLUT1 FLOX マウスを供与して頂き、このマウスを Gcg-Cre マウスと交配させて、 α 細胞特異的 GLUT1 ノックアウトマウスも作製した。もし、申請者の仮説が正しければ、 α 細胞特異的 SGLT1 ノックアウトマウスはグルカゴンの過剰分泌が改善し、糖尿病病態は軽度にとどまるはずである。逆に、 α 細胞特異的 GLUT1 ノックアウトマウスの方はグルカゴン過剰分泌が増悪し、糖尿病状態も悪化すると予想された。本研究では、これらの仮説の検証を行った。これらの検証結果から、 α 細胞の SGLT1 の発現増加と GLUT1 の発現減少がグルカゴンの過剰分泌を引き起こし、2 型糖尿病の病態につながる事が明らかとなれば、今後は α 細胞の SGLT1 と GLUT1 が 2 型糖尿病の新たな治療標的となり、将来の糖尿病治療薬の開発につながる可能性が期待された。

4. 研究成果

SGLT1 FLOX マウス、あるいは GLUT1 FLOX マウスと Gcg-Cre マウスを交配し、 α 細胞特異的 SGLT1、あるいは GLUT1 ノックアウトマウスを作製し、代謝パラメータの解析を行った。まず、体重や空腹時、随時の血糖値や血中インスリン濃度にはコントロール群と差を認めなかった。一方、 α 細胞特異的 SGLT1 ノックアウト

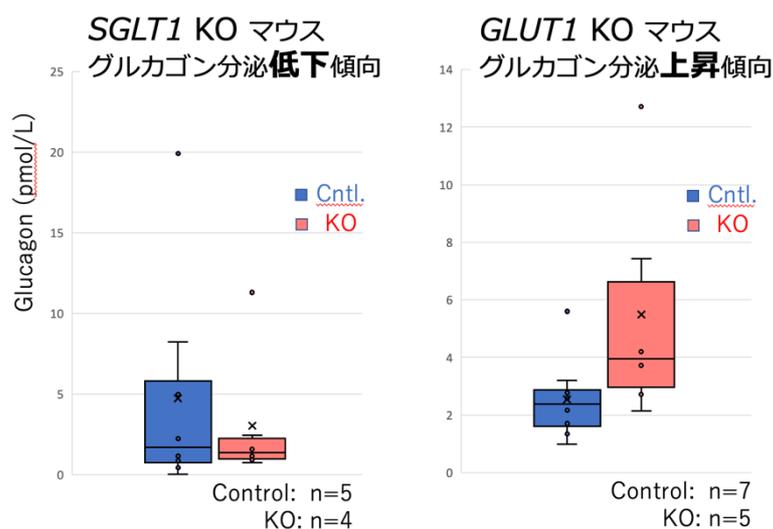


図6 α 細胞特異的 SGLT1 ノックアウトマウスは空腹時血中グルカゴン濃度は低下傾向、逆に α 細胞特異的 GLUT1 ノックアウトマウスは空腹時血中グルカゴン濃度は上昇傾向

マウスで空腹時の血中グルカゴン濃度がコントロール群に比べ低下傾向を示していた (図 6 左)。対照的に α 細胞特異的 GLUT1 ノックアウトマウスでは空腹時の血中グルカゴン濃度がコントロール群に比べ上昇傾向を示していた (図 6 右)。次に、これらのマウスに対し、糖負荷試験を行ったところ、 α 細胞特異的 SGLT1 ノックアウトマウスでむしろ有意に悪化しており (図 7 左)、反対に α 細胞特異的 GLUT1 ノックアウトマウスでは有意に改善していた (図 7 右)。そこで、これらのマウスのインスリン感受性を検討すべく、インスリン感受性試験を行ったところ、 α 細胞特異的 SGLT1 ノックアウトマウスで有意な感受性の低下を認めた (図 8 左)。しかしながら、 α 細胞特異的 GLUT1 ノックアウトマウスではコントロール群と比べて差がなかった (図 8 右)。本研究計画を立てた際に、 α 細胞特異的 SGLT1 ノックアウトマウスはグルカゴン分泌が低下し、逆に α 細胞特異的 GLUT1 ノックアウトマウスはグルカゴン分泌が亢進することを予想し

ており、本研究結果は仮説通りであった。しかしながら、耐糖能に関しては、 α 細胞特異的 SGLT1 ノックアウトマウスはグルカゴン分泌が低下により、糖負荷試験の際の耐糖能が改善し、逆に α 細胞特異的 GLUT1 ノックアウトマウスはグルカゴン分泌の亢進により、耐糖能が悪化することを予想していたが、本研究結果は全く逆で、 α 細胞特異的 SGLT1 ノックアウトマウス耐糖能が有意に悪化し、逆に α 細胞特異的 GLUT1 ノックアウトマウスは有意に改善していた。この理由として、グルカゴンには食欲抑制、基礎代謝亢進、脂肪分解促進など、インスリン感受性を上げる方向に作用する可能性があり、本研究成果で α 細胞特異的 SGLT1 ノックア

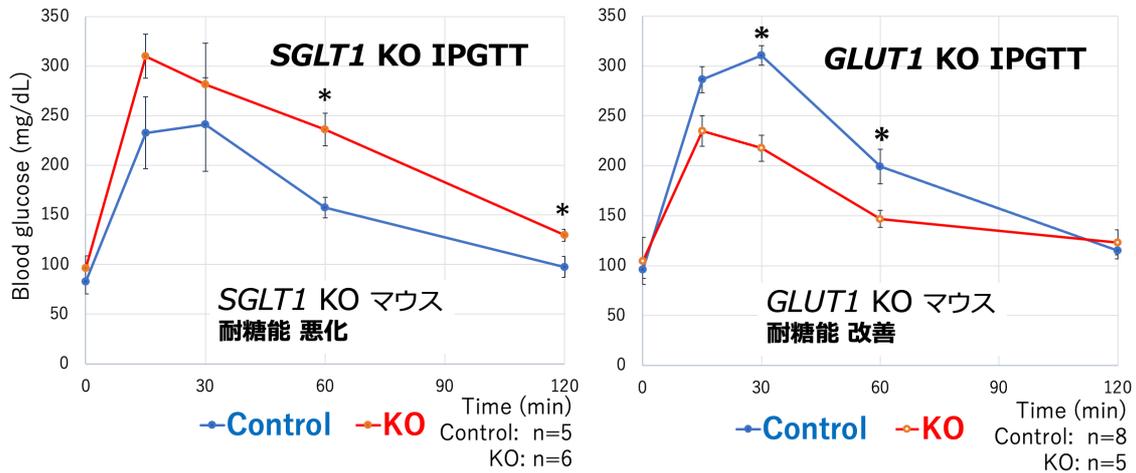


図7 α 細胞特異的SGLT1ノックアウトマウスは耐糖能が有意に悪化、逆に α 細胞特異的GLUT1ノックアウトマウスは耐糖能が有意に改善

ウトマウスも α 細胞特異的 GLUT1 ノックアウトマウスも体重にコントロールとの有意差は認めなかったものの、インスリン耐性試験においては予想通り、 α 細胞特異的 SGLT1 ノックアウトマウスではインスリン感受性が低下していた（ただし、 α 細胞

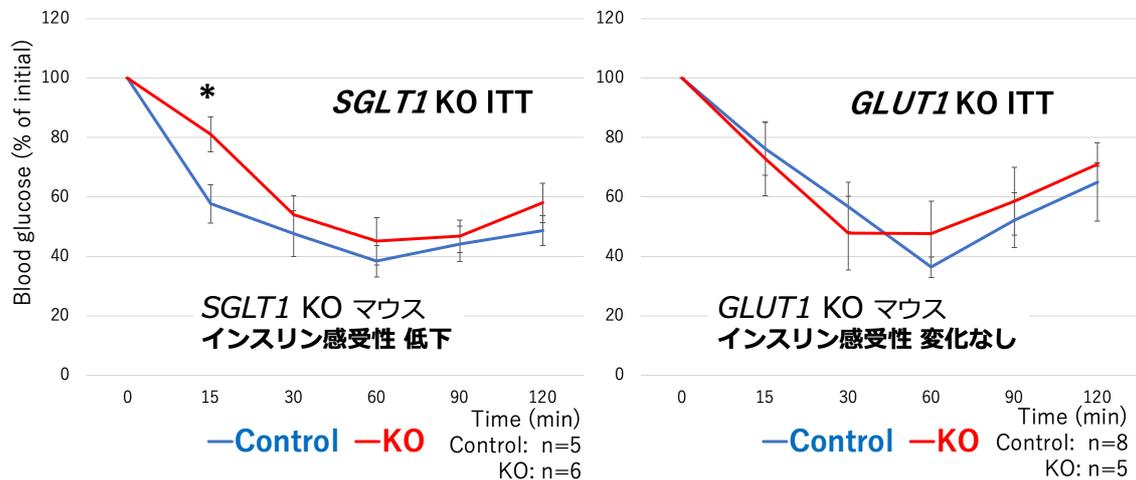


図8 α 細胞特異的SGLT1ノックアウトマウスはインスリン感受性が低下したが、 α 細胞特異的 GLUT1ノックアウトマウスは変化なし

胞特異的 GLUT1 ノックアウトマウスでは変化なし)。今後、基礎代謝や脂肪分解、合成に関わる酵素の発現レベルなど、インスリン感受性に影響を与えた理由の解析を行う予定である。

一方、td-Tomato マウスを Gcg-Cre マウスと交配し、ラ氏島から α 細胞のみを single cell で回収して、解析する予定であったが、技術的問題から現在も継続検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------