

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月15日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390282

研究課題名（和文） グルコキナーゼ依存性・非依存性の膵β細胞量調節機構の解明

研究課題名（英文） Regulation of pancreatic beta cell mass via glucokinase-dependent and -independent pathways

研究代表者

寺内 康夫（TERAUCHI YASUO）

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：40359609

研究成果の概要（和文）：グルコキナーゼ活性化薬(GKA)はCREBのリン酸化を介してIRS-2の発現を上昇させ、膵β細胞を増殖させた。また、酸化ストレスはGKAによる膵β細胞機能・増殖関連遺伝子変化に影響を与えた。GKAには小胞体ストレスに関連した膵β細胞アポトーシスを抑制する作用があり、その機序としてIRS-2依存経路と非依存経路の存在を同定した。一方、妊娠中・出産後の膵β細胞量増加、膵部分切除後の膵β細胞量増加はグルコキナーゼやIRS-2に依存しない。以上、グルコキナーゼ依存性・非依存性の膵β細胞量調節機構について研究した。

研究成果の概要（英文）：GKA-stimulated IRS2 production affected beta cell proliferation. Oxidative stress diminished the effects of GKA on the changes in expression of genes involved in beta cell function and proliferation. GKA was able to ameliorate ER stress-mediated apoptosis via both IRS-2-dependent pathway and IRS-2-independent regulation of the expressions of genes related to ER stress. Partial pancreatectomy is a good model for the evaluation of adaptive proliferation of β cells in rodents. We investigated the roles of glucokinase and IRS-2 in these mouse models and noted that neither glucokinase nor IRS-2 was required for β cell proliferation after partial pancreatectomy. Collectively, we investigated the regulation of pancreatic β cell mass via glucokinase-dependent and -independent pathways.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2010年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2011年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：グルコキナーゼ、インスリン抵抗性、膵β細胞、グルコキナーゼ活性化薬、IRS-2

1. 研究開始当初の背景

近年日本人で肥満に伴う2型糖尿病の急増が大きな医学的・社会的問題となっている。

日本人はもともとインスリン分泌能が低い民族であったが、肥満の進行に伴いインスリン抵抗性が増加した結果、低いインスリン分泌能力では十分にインスリン抵抗性を代償

できなくなり、糖尿病の発症・進展につながったと考えられているが、その分子機構は不明な点が多い。また、2型糖尿病において膵β細胞量低下が注目されるようになったが (Bonner-weir S. *Endocrinology* 141:1926, 2000; Terauchi Y, et al. *Endocr. J.* 49: 247, 2002; Rhodes CJ. *Science* 307: 380, 2005; Takamoto I, et al. *Diabetes, Obesity, Metabolism* 10 Suppl 4: 147, 2008)、その病態や機序は未だ不明な点が多い。

私は日本人の2型糖尿病モデルとして、膵β細胞型グルコキナーゼ欠損マウスを樹立した (Terauchi Y, et al. *J. Biol. Chem.*, 1995; Terauchi Y, et al., *J. Clin. Invest.*, 1997)。膵でのグルコース代謝の律速段階を担うグルコキナーゼの活性低下は、グルコース応答性インスリン分泌の低下を引き起こし、耐糖能障害を呈した。私たちはグルコキナーゼ欠損マウスが高脂肪食下では膵β細胞増殖障害を呈すること、グルコキナーゼとインスリン受容体基質 (IRS)-2 を解したシグナルが高脂肪食下での膵β細胞過形成に重要であり、糖尿病の発症・進展抑制の鍵を握っていることを見出した (Terauchi Y, et al. *J. Clin. Invest.*, 2007)。一方、グルコキナーゼ欠損マウスは妊娠に際しては正常に膵β細胞が増殖することも見出している。

2. 研究の目的

本研究では **第1に高脂肪食誘導性インスリン抵抗性下での膵β細胞代償性過形成 (グルコキナーゼ依存性) の分子機構の全体像の解明を、第2にグルコキナーゼ活性化を介した膵β細胞量増加の検討を、第3に妊娠誘導性インスリン抵抗性下での膵β細胞代償性過形成 (グルコキナーゼ非依存性) の分子機構の解明を、第4に膵β細胞量を増大させる糖尿病の新規治療法の開発** を目指した。

3. 研究の方法

(1) 高脂肪食誘導性インスリン抵抗性下での膵β細胞過形成の分子機構の解明

- ① DNA チップ成績より浮かび上がった候補分子の高脂肪食誘導性膵β細胞量増加への関与の検討
- ② 高脂肪食下での IRS-2 発現上昇のメカニズムの解明
- ③ 高脂肪食負荷 IRS-1 欠損マウスおよび IRS-1, グルコキナーゼダブル欠損マウスにおける耐糖能、膵β細胞機能・量の変化と IRS-2 の関与の検討

(2) グルコキナーゼ活性化を介した膵β細胞量増加の検討

- ① 低分子量グルコキナーゼ活性化薬の耐糖能・膵β細胞量への効果の検討
- ② GLP-1 注射剤、DPP-IV 阻害薬など GLP-1 活性を上昇させる薬剤と GKA の薬理作用の比較
- ③ SU 薬と GKA の比較検討

(3) 妊娠誘導性の膵β細胞代償性過形成の分子機構の解明

- ① グルコキナーゼ欠損マウス、IRS-2 欠損マウスの妊娠中・出産後の膵β細胞量変化の評価
- ② グルコキナーゼ欠損マウス、IRS-2 欠損マウスの妊娠中・出産後の膵β細胞での遺伝子発現変化の検討
- ③ 妊娠誘導性の膵β細胞代償性過形成の分子機構の全体像の解明

(4) 膵β細胞量を増大させる糖尿病の新規治療法の開発

課題1～3に基づき、グルコース代謝依存性、あるいはグルコース代謝とは独立に膵β細胞増殖を引き起こす情報伝達経路に立脚した膵β細胞増加薬の開発を目指す。

4. 研究成果

(1) 高脂肪食誘導性インスリン抵抗性下での膵β細胞過形成の分子機構の解明

マウスへのGKA投与実験より、グルコース代謝の活性化が膵β細胞増殖に至る経路を同定した。また、高脂肪食負荷IRS-1欠損マウス (雄・雌) における耐糖能の性差が存在することを明らかにした。膵β細胞機能・量の変化と IRS-2 との関与を検討した。

(2) グルコキナーゼ活性化を介した膵β細胞量増加の検討

グルコキナーゼ活性化薬 (GKA) による糖尿病治療の可能性に注目が集まっている中、私たちは GKA が糖代謝を改善するのに加え、膵β細胞増殖作用も有していることを明らかにしている。本研究では、GKA の膵β細胞増殖作用における IRS-2 の役割について検討した。INS1 細胞に低グルコース下で GKA を加えたところ、GKA 投与により濃度依存性に BrdU 取り込み率が増加し、BrdU 取り込み率と並行に IRS-2 発現量も増加した。野生型マウスの単離膵島においても、GKA 投与により CREB のリン酸化、IRS-2 発現、さらには PDK1、PDX-1、Cyclin D family の有意な発現上昇を認めた。次に IRS-2 欠損マウスに高脂肪食または高脂肪食に GKA を混合させた特別食を負荷したところ、高脂肪食に GKA を混合させた特別食群は高脂肪食群に対し、投与開始後すぐに随時

血糖の有意な低下を認め、負荷後 20 週の段階でも随時血糖の有意な低下が持続した。一方、体重、肝内中性脂肪含量、肝内グリコーゲン量には差を認めなかった。OGTTにおいても GKA 特別食群で耐糖能が改善しており、その際のインスリン血糖比も GKA 特別食群で有意に高値であった。さらに IRS-2 欠損マウス膵島において、GKA 投与群で有意にグルコース応答性インスリン分泌能が増強した。膵 β 細胞量は高脂肪食群と GKA 特別食群で差を認めなかったが、高脂肪食負荷後の GKA 短期投与では IRS-2 欠損マウスの膵 β 細胞で明らかな増殖能は認められなかった。GKA は CREB のリン酸化を介して IRS-2 の発現を上昇させ、細胞周期制御因子に作用して膵 β 細胞を増殖させることが示唆された。

GKA と DPP-IV 阻害薬や GLP-1 受容体作動薬などのインクレチン関連薬との組み合わせ効果を検証した。野生型マウス及び IRS-2 欠損マウス単離膵島において GKA 投与で有意にグルコース応答性インスリン分泌能と PDX-1 発現が上昇したが、IRS-2 欠損マウスでは GKA 短期投与による膵 β 細胞増殖能の増加を認めなかった。過酸化水素投与による酸化ストレス下では IRS-2、PDX-1 発現増加は抑制されたが、抗酸化剤の投与によりこれらの発現増加は回復した。GKA は IRS-2 の発現上昇を介して膵 β 細胞を増殖させること、IRS-2 非依存的に膵 β 細胞機能亢進作用を有することが示唆された。また酸化ストレスが GKA による膵 β 細胞機能・増殖関連遺伝子変化に影響を与える可能性が考えられた。

また、膵 β 細胞の細胞増殖作用に加え、GKA には小胞体ストレスに関連したアポトーシスを抑制する作用があることも証明し、その機序として IRS-2 依存的経路と非依存的経路の存在を明らかにした。

(3) 妊娠誘導性の膵 β 細胞代償性過形成の分子機構の解明

グルコキナーゼ (Gck) ヘテロ欠損マウス、IRS-2欠損マウスの妊娠中・出産後の膵 β 細胞量変化を評価し、膵 β 細胞過形成には糖代謝非依存性の経路が存在することを明らかにした。非妊娠時、妊娠17日の野生型マウス・Gckヘテロ欠損マウスより膵島を単離、RNA調製、DNAチップで遺伝子発現変化を解析した。妊娠時の膵 β 細胞においてGckおよびIRS-2シグナル非依存的に発現上昇している新規ペプチドを同定した。妊娠周期における免疫組織染色でこのペプチドは妊娠10-12日をピークとした発現上昇を認めた。MIN6細胞にて、プロラクチン、エストラジオール、デキサメサゾンによりmRNA発現上昇を認め、INS-1細胞にて、このペプチド過剰発現により細胞増殖能が亢

進した。

(4) 膵 β 細胞量を増大させる糖尿病の新規治療法の開発

膵部分切除マウスの膵 β 細胞増殖における Gck の役割を検討した。雄8週令の野生型マウス、Gckヘテロ欠損マウスに60%膵部分切除あるいは Sham ope を行い、糖代謝、β 細胞増殖について検討した。野生型マウスの糖代謝は Sham ope 群、膵切除群間で有意差を認めなかった。Gckヘテロ欠損マウスでは膵切除群で Sham ope 群に比べ随時血糖の上昇がみられた。膵切除6日後の β 細胞増殖能は野生型群、Gckヘテロ欠損群ではほぼ同等に増加傾向を示し、18日後の β 細胞量でも Gckヘテロ欠損群での低下は認めなかった。以上の成績より、膵切除後の代償性 β 細胞増殖は Gck に依存しないことを明らかにした。

以上の研究成果に基づき、高脂肪食下、妊娠、膵部分切除後における膵 β 細胞調節機構には、それぞれ特異的な情報伝達経路が存在することが明らかとなった。グルコース代謝経路の活性化、インクレチンシグナルの活性化、インスリンシグナルの活性化を組み合わせた糖尿病新規治療法開発の礎が築かれた。

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 14 件)

① Shirakawa J, Tanami R, Togashi Y, Tajima K, Orime K, Kubota N, Kadowaki T, Goshima Y, Terauchi T: Effects of liraglutide on β cell-specific glucokinase-deficient neonatal mice. *Endocrinology*, 査読あり, in press, 2012.

② Shirakawa J, Togashi Y, Tajima K, Orime K, Kikuchi K, Miyazaki T, Sato K, Kimura M, Goshima Y, Terauchi Y: Plasminogen activator inhibitor-1 is associated with renal dysfunction independent of BMI and serum lipid levels in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 査読あり, in press, 2012.

③ 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*, 査読あり, in press, 2012.

④ 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*, 査読あり, 153: 1093-102, 2012.

⑤ Shirakawa J, Amo K, Ohminami H, Orime K, Togashi Y, Ito Y, Tajima K, Koganei M, Sasaki H, Takeda E, Terauchi Y: Protective effect of a dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitor against increased β cell apoptosis induced by dietary sucrose and linoleic acid in mice with diabetes. *J Biol Chem*, 査読あり, 286(29): 25467-76, 2011.

⑥ Kubota T, Kubota N, Kumagai H, Yamaguchi S, Kozono H, Takahashi T, Inoue M, Itoh S, Takamoto I, Sasako T, Kumagai K, Kawai T, Hashimoto S, Kobayashi T, Sato M, Tokuyama K, Nishimura S, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Yamazaki T, Ezaki O, Kawamura K, Masuda H, Moroi M, Sugi K, Oike Y, Shimokawa H, Yanagihara N, Tsutsui M, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R, Kamata K, Inoue K, Kodama T, Ueki K, Kadowaki T: Impaired insulin signaling in endothelial cells reduces insulin-induced glucose uptake by skeletal muscle. *Cell Metab*, 査読あり, 13: 294-307, 2011.

⑦ Shirakawa J, Fujii H, Ohnuma K, Sato K, Ito Y, Kaji M, Sakamoto E, Koganei M, Sasaki H, Nagashima Y, Amo K, Aoki K, Morimoto C, Takeda E, Terauchi Y: Diet-induced adipose tissue inflammation and liver steatosis are prevented by DPP-4 inhibition in diabetic mice. *Diabetes*, 査読あり, 60: 1246-1257, 2011.

⑧ Nakamura A, Hiroko Shimazaki H, Ohyama S, Eiki J, Terauchi Y: Effect of long-term treatment with a small molecule glucokinase activator on glucose metabolism, lipid profiles, and hepatic function. *J. Diabetes Invest.*, 査読あり, 2: 276-279, 2011.

⑨ Muraoka T, Aoki K, Iwasaki T, Shinoda K, Nakamura A, Aburatani H, Mori S, Tokuyama K, Kubota N, Kadowaki T, Terauchi Y: Ezetimibe decreases SREBP-1c expression in liver and reverses hepatic insulin resistance in mice fed a high-fat diet. *Metabolism*, 査読あり, 60: 617-628, 2011

⑩ Aoki K, Masuda K, Miyazaki T, Togashi Y, Terauchi Y: Effects of miglitol, sitagliptin or their combination on plasma glucose, insulin and incretin levels in non-diabetic men. *Endocr J.*, 査読あり, 57: 667-672, 2010.

⑪ Okazaki Y, Eto K, Yamashita T, Okamoto M, Ohsugi M, Noda M, Terauchi Y, Kadowaki T: Decreased insulin secretion and accumulation of triglyceride in β -cells overexpressing a dominant-negative form of AMP-activated protein kinase. *Endocr J.*, 査読あり, 57(2): 141-152, 2010.

⑫ Nozaki Y, Fujita K, Yoneda M, Wada K, Shinohara Y, Takahashi H, Kirikoshi H, Inamori M, Kubota K, Saito S, Mizoue T, Masaki N, Nagashima Y, Terauchi Y, Nakajima A: Long-term combination therapy of ezetimibe and acarbose for non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.*, 査読あり, 51(3): 548-56, 2009.

⑬ Aoki K, Matsui J, Kubota N, Nakajima H, Iwamoto K, Takamoto I, Tsuji Y, Ohno A, Mori S, Tokuyama K, Murakami K, Asano T, Aizawa S, Tobe K, Kadowaki T, Terauchi Y: The role of the liver in glucose homeostasis in *PI 3-kinase p85*-deficient mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 査読あり, 296: E842-853, 2009.

⑭ Nakamura A, Terauchi Y, Ohyama S, Kubota J, Shimazaki H, Nambu T, Takamoto I, Kubota N, Eiki J, Yoshioka N, Kadowaki T, Koike T: Impact of small molecule glucokinase activator on glucose metabolism, β cell function and mass. *Endocrinology*, 査読あり, 150: 1147-1154, 2009.

[学会発表] (計 23 件)

① Nakamura A, et al. Beta Cell Function and Proliferation in Response to Small Molecule Glucokinase Activator under Various Conditions. 第 71 回米国糖尿病学会. 2011 年 6 月 24 日. サンディエゴ(米国).

② Shirakawa J, et al. Protective effects of glucokinase activator on the onset of diabetes and β cell apoptosis in Akita (*Ins2*) mice. 第 71 回米国糖尿病学会. 2011 年 6 月 24 日. サンディエゴ(米国).

③ Sato K, et al. Impact of vildagliptin on glucose tolerance, and beta cell mass in insulin receptor substrate-2-knockout mice. 第 71 回米国糖尿病学会. 2011 年 6 月 24 日. サンディエゴ(米国).

④ Orime K, et al. Trefoil factor 2 (TFF2) induces proliferation of pancreatic β cells. 第 71 回米国糖尿病学会. 2011 年 6 月 24 日. サンディエゴ(米国).

⑤ Togashi Y, et al. β cell proliferation and expansion of β cell mass were independent of glucokinase in 60% partial pancreatectomized mice. 第 71 回米国糖尿病学会. 2011 年 6 月 24 日. サンディエゴ(米

国).

⑥Shirakawa J. The regulation of beta cell ER stress and apoptosis by glucokinase mediated signals. 日本-デンマーク「分子糖尿病学」ワークショップ (招待講演). 2011年10月21日. コペンハーゲン (デンマーク).

⑦Nakamura A, et al. The role of IRS-2 in the regulation of pancreatic beta cell mass in response to glucokinase activator. 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会 (招待講演). 2011年5月19日. 札幌 (日本).

⑧寺内康夫: “糖尿病-最新の進歩” 第 14 回日本病態栄養学会年次学術集会. 2011年1月16日. パシフィコ横浜 (神奈川) (招待講演)

⑨寺内康夫: “インクレチン系の機序とその糖尿病治療への応用 GLP-1 受容体作動薬” 第 45 回糖尿病学の進歩. 2011年2月19日. 福岡国際会議場 (福岡) (招待講演)

⑩Nakamura A, et al.: “Proliferation of Beta Cells Stimulated by Small Molecule Glucokinase Activator.” 第 70 回米国糖尿病学会. (20100625). オランダ(米国)

⑪Shirakawa J, et al.: “Increased β cell apoptosis with multiorgan glucolipototoxicity by a combination of dietary sugar and fatty acid and protective effects of DPP-4 inhibitor des-fluoro-sitagliptin against them.” 第 70 回米国糖尿病学会. (20100625). オランダ(米国)

⑫Shirakawa J, et al.: “Protective effects of DPP-4 inhibitor against increased β cell apoptosis with multiorgan glucolipototoxicity by a combination of dietary sugar and fatty acid.” 第 46 回欧州糖尿病学会. (20100921). ストックホルム (スウェーデン)

⑬Terauchi Y.: “Impact of small molecule glucokinase activator on the regulation of beta cell function and mass under various conditions” 日本-デンマーク「分子糖尿病学」ワークショップ. (20110308). 臨床研究情報センター(兵庫) (招待講演)

⑭白川純, 他: “食事摂取により誘導される多臓器における glucolipototoxicity に対する DPP-4 阻害薬 des-fluoro-sitagliptin による抑制効果” 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会. (20100527). 岡山コンベンションセンター(岡山)

⑮中村昭伸, 他: “グルコキナーゼ活性化薬の膵 β 細胞増殖作用の分子機構” 第 47 回日本臨床分子医学会学術集会. (20100411). 東京国際フォーラム(東京)

⑯中村昭伸, 寺内康夫: “ β 細胞の発生から細胞死 The role of glucokinase in the regulation of beta cell proliferation” 第

53 回日本糖尿病学会年次学術集会. (20100527). 岡山コンベンションセンター(岡山) (招待講演)

⑰中村昭伸, 他: “グルコキナーゼ活性化薬の膵 β 細胞増殖作用における IRS-2 の役割” 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会. (20100527). 岡山コンベンションセンター(岡山)

⑱中村昭伸: “グルコキナーゼ依存性・非依存性膵 β 細胞量調節機構の解明と膵 β 細胞量増加法の開発” 日本内分泌学会. (20090423). 前橋

⑲寺内康夫: “2 型糖尿病における膵 β 細胞異常 (機能・量)” 日本糖尿病学会. (20090522). 大阪

⑳中村昭伸: “グルコキナーゼ活性化薬による膵 β 細胞増殖メカニズムの解析” 日本糖尿病・肥満動物学会. (20100122). 大阪

㉑白川純: “食事摂取により誘導される多臓器の glucolipo toxicity に対する DPP-4 阻害薬 des-fluoro-sitagliptin による改善効果” 日本糖尿病・肥満動物学会. (20100122). 大阪

㉒寺内康夫: “薬物治療の選択と治療の進め方” 糖尿病学の進歩. (20100306). 大阪

㉓寺内康夫: “Roles of glucose metabolism and insulin signaling in β cell function and mass” デンマーク「分子糖尿病学」ワークショップ. (20100323). コペンハーゲン

[図書] (計 3 件)

①寺内康夫 編: “2 型糖尿病の薬物療法ハンドブック” 南江堂. 170 ページ (2011)

②寺内康夫、鯉渕則之、後藤英司編: “Principles and Practice 内分泌・代謝” 文光堂. 343 ページ (2011)

③寺内康夫 編: “EBM 糖尿病ハンドブック” 中外医学社. 544 ページ (2010)

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺内 康夫 (TERAUCHI YASUO)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号: 40359609

(2) 研究分担者

木村 真理 (KIMURA MARI)
横浜市立大学・附属病院・准教授
研究者番号: 40363840
青木 一孝 (AOKI KAZUTAKA)
横浜市立大学・医学部・助教

(3)連携研究者
なし ()

研究者番号：