

機関番号：22701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21890213

研究課題名（和文） 膵β細胞量に着目した2型糖尿病の新しい治療戦略

研究課題名（英文） Novel treatment strategy of type 2 diabetes focused on beta cell mass

研究代表者

中村 昭伸 (NAKAMURA AKINOBU)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：70552420

研究成果の概要（和文）：グルコキナーゼ活性化薬（GKA）が膵β細胞機能・増殖に与える影響およびその分子機構を検討した。GKAによるグルコキナーゼの活性化はIRS-2と細胞周期制御因子の発現を増加させること、GKAはインスリン分泌とは独立した経路で膵β細胞を増殖させ、IRS-2非依存的に膵β細胞機能を亢進させることを明らかにした。また酸化ストレス亢進下における膵β細胞においては、GKAの有効性が認められない可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effect of glucokinase activator (GKA) on beta cell function and proliferation. Glucokinase activation by GKA increased expression levels of IRS-2 and cell cycle signaling molecules. GKA was able to stimulate beta cell proliferation independently of insulin stimulation and stimulate beta cell function independently of IRS-2. Also, our results raise the possibility that GKA do not work well under excessive oxidative stress in beta cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：糖尿病・代謝・内分泌内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：膵β細胞量、グルコキナーゼ、妊娠

## 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。2型糖尿病において、剖検例で膵β細胞量が低下していると国内外で報告されており（Butlur AE, et al. Diabetes 52: 2003; Sakuraba H, et al. Diabetologia 45: 2002）、2型糖尿病の病因を考える上で、膵β細胞の機能のみならず、膵β細胞量の調節機構を解

明することが重要であると考えられるようになった。その中でわれわれ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, Nakamura A, et al. J Clin Invest, 2007）。

それゆえ、グルコキナーゼ活性化という治療戦略が高脂肪食に伴うインスリン抵抗性下では重要であると考えられた。2003年にグルコキナーゼのアロステリック部位に結合してそれを活性化する化合物が報告されて以来 (Grimsby J, et al. Science, 2003)、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おり、実際グルコキナーゼ活性化薬では膵β細胞でのインスリン分泌能増強作用と肝での糖利用亢進作用が示されている (Efanov AM, et al. Endocrinology, 2005; Futamura M, et al. J Biol Chem, 2006)。私は GKA の糖代謝および膵β細胞量に及ぼす影響を検討したところ、グルコキナーゼ活性化薬は膵β細胞でのインスリン分泌能増強作用と肝での糖利用亢進作用により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た (Nakamura A, et al. Endocrinology, 2009)。同様に以前よりインクレチンがグルコース応答性にインスリンを分泌させるのみならず、膵β細胞の分化・増殖にも関わっていることが明らかとなっており、GLP-1 製剤や DPP-IV 阻害薬の膵β細胞増殖作用も報告されている (Drucker DJ, et al. Lancet, 2006)。

## 2. 研究の目的

(1) GKA による膵β細胞量調節の分子機構の全体像を解明する。

(2) 膵β細胞量増加薬という糖尿病の新規治療法を開発する。

## 3. 研究の方法

(1) グルコキナーゼの活性化、即ちグルコースシグナルの増強により、膵β細胞量調節メカニズムとして重要な役割を果たしていると考えられる IRS-2 の発現が上昇し、インスリンシグナルが活性化することで膵β細胞が増殖する、という仮説に基づき、野生型マウス単離膵島に GKA を投与することで膵β細胞機能関連因子、増殖関連因子の発現がどのように変動するかを検討した。また IRS-2 欠損マウスを用いて同様の検討を行うのと同時に、IRS-2 欠損マウスに高脂肪食または GKA 混合特別食を負荷し、糖代謝ならびに膵β細胞量を比較検討した。

(2) 上記より GKA が新たな膵β細胞量増加薬として位置づけられることが期待させるが、今後の臨床応用に向けての問題点も明らかになりつつある。まず肝におけるグルコキナーゼ過剰発現マウスの解析で、肝内中性脂肪含量や血清中性脂肪の高値が認められたという報告 (Ferre T, et al. Diabetologia, 2003) から、GKA の問題点として脂肪肝や脂質代謝異常が惹起される可能性がまず考えられた。そのため長期高脂肪食負荷マウスを

用いて、GKA の脂質代謝や肝機能に及ぼす影響を検討した。さらにグルコキナーゼの活性化という糖代謝を亢進させる状態では、過剰なグルコース代謝による酸化ストレスの亢進が惹起され耐糖能改善を保持できない可能性も考えられる。そこで野生型単離膵島および db/db マウスを用いて酸化ストレス亢進下における GKA の効果を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 細胞株 (INS1) に GKA を加えたところ、濃度依存性に細胞が増殖し、IRS-2 の発現上昇を認めた (Nakamura A, et al. Endocrinology, 2009)。同様に野生型マウスから単離膵島を取り出し同様の検討を行ったところ、CREB のリン酸化亢進、IRS-2 の発現上昇を認めた。さらにこの IRS-2 の発現増加は SU 薬では認められず、2-deoxyglucose でも発現増加がみられないこと、nifedipine と tacrolimus の投与では、IRS-2 発現増加は部分的に抑制されたことから、GKA による IRS-2 発現上昇にはグルコース代謝と一部 Ca シグナルが重要であると考えられた。次に膵β細胞機能、増殖のシグナルを明らかにするために、GKA 刺激による野生型マウス単離膵島の mRNA の発現変化を検討したところ、GKA 投与により PDX-1、またその下流に位置すると考えられる GLUT2、グルコキナーゼ、Ins-1、Ins-2 の発現が有意に上昇したが、SU 薬ではこのような上昇を認めなかった。一方、膵β細胞増殖関連因子に対しては、GKA 投与により PDK1 の有意な上昇を認め、Cyclin D2 に関しては、蛋白レベルにおいても有意な上昇を認めた。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て、糖、脂質代謝、膵β細胞機能、膵β細胞量を比較検討したところ、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。また体重に差を認めず、経口ブドウ糖負荷試験の結果でも 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 欠損マウスから膵島を取り出しグルコース応答性インスリン分泌能を比較したところ、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。一方、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、GKA 短期投与での膵β細胞増殖能を検討したところ、野生型マウスでは GKA 特別食群で BrdU 取り込み率が増加傾向であったのに対し、IRS-2 欠損マウスでは両群で差を認めなかった。以上の成績より、GKA は CREB のリン酸化、IRS-2 の発現上昇を亢進させ、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。さらに IRS-2 欠損マウス単離膵島における膵  $\beta$  細胞機能関連因子に対する GKA の効果を検討したところ、野生型マウス同様に、GKA 投与により PDX-1、またその下流に位置すると考えられる GLUT2、グルコキナーゼ Ins-1、Ins-2 の発現が有意に上昇したことから、GKA の膵  $\beta$  細胞機能亢進作用には IRS-2 が関与しないことが示唆された (Nakamura A, et al. Unpublished data)。

(2) 20 週、40 週の高脂肪食負荷マウスにおいて、GKA 投与による脂肪肝や脂質代謝異常を認めなかった (Nakamura A, et al. Endocrinology, 2009; Nakamura A, et al. J Diabetes Invest, in press)。また、最近糖尿病または糖尿病治療薬と癌との関連が注目されつつある中 (Giovannucci E, et al. Diabetes Care, 2010)、われわれは野生型マウスに 60 週という超長期にわたり高脂肪食を負荷することで、NASH 様病変及び約半数に肝結節性病変を生じることを明らかにした (Nakamura A, Tajima K, et al. Unpublished data)。そのマウスに GKA を 60 週投与したところ、血糖低下作用は保持され、脂肪肝や脂質代謝異常、NASH 様病変、肝結節性病変は投与なし群と比較し差を認めなかった。この結果から少なくとも高脂肪食誘導性 NASH、肝腫瘍形成においては、GKA は明らかな悪影響を及ぼさないことが示唆された。一方、酸化ストレスの影響に関しては、野生型マウス単離膵島において、 $H_2O_2$  投与により酸化ストレスを誘導した状態で、GKA 投与による IRS-2、PDX-1 発現増加は抑制されたが、抗酸化剤 ( $\alpha$ -tocopherol plus ascorbate) の前投与により IRS-2、PDX-1 発現増加は回復したことを明らかにした。そこで 8 週齢 db/db マウスの単離膵島を用いて IRS-2、PDX-1 の発現を検討した。8 週齢 db/db マウスでは NADPH オキシダーゼのサブユニットである p22phox、gp91phox、p47phox が野生型マウスに比し有意に上昇しており、野生型マウスでみられる GKA 刺激による IRS-2、PDX-1 の発現増加が db/db マウスでは認められなかった。以上より酸化ストレス亢進下における単離膵島においては、GKA の有効性が認められない可能性が示唆された。

#### 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 7 件)

① Nakamura A, 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. 査読有 in

press, 2011

② 中村昭伸, 寺内康夫 糖尿病治療最前線 2011 新しい糖尿病治療薬 9 グルコキナーゼ活性化薬の現状と展望 月刊糖尿病 査読無 3 2011 114-123

③ 中村昭伸, 寺内康夫 次世代の 2 型糖尿病薬物治療 開発中の次世代の治療薬 GK 活性化薬、GPR119 受容体アゴニスト 月刊 Mebio 査読無 28 2011 104-110

④ 中村昭伸, 寺内康夫 グルコキナーゼ活性化薬 Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌 2010 査読無 2010 49-59

⑤ 中村昭伸, 寺内康夫 糖尿病とその合併症の新薬の現状と未来 グルコキナーゼ活性化薬 内分泌・糖尿病・代謝内科 査読無 31 2010 13-21

⑥ 中村昭伸, 寺内康夫 糖尿病診療 2010 糖尿病の早期治療 早期治療の意義 膵  $\beta$  細胞の保護から 日本医師会雑誌 査読無 139 2010 S118-S121

⑦ 中村昭伸, 寺内康夫 糖尿病診療の将来展望 10 Topics 経口糖尿病治療薬はこうなる - 近未来における治療 - 糖尿病診療マスター 査読無 8 2010 581-584

[学会発表] (計 6 件)

① Akinobu Nakamura A Crucial Role of IRS-2 in the Proliferation of Beta Cells Stimulated by Small Molecule Glucokinase Activator 70<sup>th</sup> Scientific Sessions for American Diabetes Association 2010 年 6 月 25 日～29 日 Orlando, Florida, USA

② 中村昭伸  $\beta$  cell fate:  $\beta$  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 (招待講演) 2010 年 5 月 27 日～29 日 岡山 岡山コンベンションセンター

③ 中村昭伸 グルコキナーゼ活性化薬の膵  $\beta$  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 2010 年 5 月 27 日～29 日 岡山 岡山コンベンションセンター

④ 中村昭伸 グルコキナーゼ活性化薬の膵  $\beta$  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 2010 年 4 月 10 日～11 日 東京 東京国際フォーラム

⑤ 中村昭伸 グルコキナーゼ活性化薬の膵  $\beta$  細胞増殖作用における IRS-2 の役割 第 83 回日本内分泌学会学術集会 2010 年 3 月 25 日～28 日 京都

⑥ 中村昭伸 グルコキナーゼ活性化薬による膵  $\beta$  細胞増殖メカニズムの解析 第 24 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会 2010 年 1 月 22 日～23 日 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 昭伸 (NAKAMURA AKINOBU)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：70552420

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：