

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 25 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590990

研究課題名（和文）PI3キナーゼ p85 α 欠損マウスにおける肝臓と血管インスリン抵抗性研究課題名（英文）Hepatic and vascular insulin resistance in PI3kinase p85 α deficient mice

研究代表者

青木一孝 (AOKI KAZUTAKA)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：60336542

研究成果の概要（和文）：インスリンシグナル伝達系の Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3キナーゼ) p85 α 欠損マウスでは、末梢（筋肉と脂肪細胞）でのインスリン感受性の亢進が認められ、低血糖を起こす。私達は、以前、p85 α 欠損マウスの肝臓における糖代謝を検討した。その結果、末梢組織とは異なり、肝臓のインスリン感受性は亢進していなかった。今回、初代培養細胞を用いた検討を行った。その結果、p85 α 欠損マウスの肝糖新生は、野生型マウスと比較し、抑制されていないことが判明した。

研究成果の概要（英文）：Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) p85alpha-deficient mice exhibit hypoglycemia as a result of increased insulin sensitivity and glucose uptake in peripheral tissues. We previously investigated hepatic glucose homeostasis in p85alpha-deficient and wild-type mice. Gluconeogenesis was rather elevated in p85alpha-deficient mice, compared with in wild-type mice. In this study, we evaluated the hepatic glucose production of primary hepatocyte in p85alpha-deficient and wild-type mice. Hepatic glucose production of primary hepatocyte in p85alpha-deficient mice was not decreased compared to that in wild type mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：糖尿病内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：PI3キナーゼ p85 α ・肝臓インスリン感受性

1. 研究開始当初の背景

近年2型糖尿病患者数は、生活習慣の欧米化等により増加の一途であり、この対策をとることは急務である。インスリンのシグナル伝達系の Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3キナーゼ) p85 α 欠損マウスでは、末梢（筋肉と脂肪細胞）でのインスリン感受性の亢進が認められ、低血糖を起こす (Terauchi Y et al.

Nat Genet. 21:230-235. 1999)。また、肝臓特異的に p85 α を欠損させたマウスでは肝臓と末梢のインスリン感受性が亢進していた (Taniguchi CM et al. Proc Natl Acad Sci USA. 103: 12093-12097, 2006)。私達は PI3キナーゼ p85 α 欠損マウスの肝臓における糖代謝を検討し、報告した (Aoki K et al. Am J Physiol Endocrinol Metab. 296:E842-853.

2009)。末梢組織とは異なり、肝のインスリン感受性は亢進せず、糖新生遺伝子発現が亢進していた。

2. 研究の目的

p85 α 欠損マウスでは、肝のインスリン感受性は亢進せず、低血糖を予防するために、血中のカテコラミンとグルカゴン濃度が上昇しており、このため、Taniguchiらの結果と異なっていた可能性がある。しかし、その詳細は不明であるため、これらの影響を除外した、初代培養肝細胞でp85 α 抑制の意義を解明する。最近、インスリン抵抗性と血管内皮機能の関連性が注目されつつある。実際、IRS-2欠損マウスは野生型マウスに比して血管内皮機能が障害されることが報告されている(Kubota T et al. *Circulation*. 24:3073-3080, 2003, Kubota T et al. *Cell Metab*. 13:294-307, 2011)。本研究で、私達は末梢組織でインスリン感受性が亢進しているp85 α 欠損と野生型マウスの血管内皮機能をin vivoでまず比較し、血管におけるp85 α の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)初代培養肝細胞の肝糖放出の評価：我々は、以前より肝臓の糖代謝について検討し、測定系を確立し報告してきた。(Aoki K et al. *Diabetes*. 48:1579-85, 1999, Aoki K et al. *Endocr J*. 47:799-804, 2000, Aoki K et al. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 85:469-472, 2003, Aoki K et al. *Life Sciences* 74:3075-3084, 2004)。そこで、p85 α 欠損と野生型マウスを生産し、この2群のマウスの初代培養肝細胞を用いて、上記の方法にて以下の測定を行う。低血糖時に分泌されるカテコラミンやグルカゴンの影響を除外するため、初代培養細胞を作成翌日に基質無しバッファーとfructose入りバッファーをそれぞれ添加し、30分後のglucoseの濃度を測定(in vitroでの測定)する。

(2)培地のブドウ糖濃度変化によるアポトーシス評価：初代血管内皮細胞を作製する。その後、正常血糖(グルコース100mg/dL)と高血糖(グルコース300mg/dL)の条件設定のもと、高血糖維持・一過性高血糖反復・正常血糖維持の3群に分けて培養する。24時間毎に培地交換を行い、一過性高血糖反復群については、24時間ごとに正常血糖と高血糖を反復させることとする。ウエスタンブロット法にてアポトーシスのマーカーを比較する。

4. 研究成果

p85 α 欠損マウスと野生型マウスから初代培養肝細胞を作成し、糖新生を測定した。その結果、初代培養肝細胞において両群での糖新生に有意差は認められなかった。PI3キナー

ゼ p85 α 欠損マウスでは、in vivo と in vitro とも肝臓のインスリン感受性は亢進していないことが判明した。

慢性的な高血糖状態だけではなく、食後の一過性高血糖がすでに心血管イベントのリスクであることが判明している。Rissoらは細胞株(HUVEC)を用い、高血糖条件の培地を維持した細胞に比較して、一過性の高血糖を反復させた細胞の方が、多くのアポトーシスが誘導されたと報告している(Risso A et al. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001)。そこで我々は、マウスの血管内皮初代培養細胞を作成し、食後の一過性高血糖状態をシャーレの中で作り、アポトーシスの発生を検討した。野生型マウスの血管内皮細胞を小林の方法(Kobayashi M et al. *J Atheroscler Thromb*. 2005)によってマウスの大動脈から血管内皮細胞を単離・培養した。そして、培地のグルコース濃度を、①100mg/dL、②300mg/dL、③100と300mg/dL交互の3群に分けて2週間培養し、caspase-3, bax, Bcl-2, Bad, Aktをウエスタンブロット法にて解析した。その結果、①②③群間で蛋白発現の有意差を認めなかった。

また、窪田らの報告に基づき、PI3キナーゼの上流に存在するIRS2を全身で欠損させた(IRS2欠損)マウスより作成した血管内皮細胞で上記と同様の検討を行った。その結果、①②③群間でcaspase-3, bax, Bcl-2, Bad, Akt蛋白発現の有意差を認めなかった。現在、p85 α 欠損マウスの血管内皮細胞を作成し、①②③群間で同様の検討を行っている。

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16件)

- ① Orime K, Shirakawa J, Togashi Y, Tajima K, Inoue H, Ito Y, Sato K, Nakamura A, Aoki K, Goshima Y, Terauchi Y. Trefoil Factor 2 Promotes Cell Proliferation in Pancreatic β -Cells through CXCR-4-Mediated ERK1/2 Phosphorylation. *Endocrinology*. (査読有) 154(1):54-64, 2013
- ② Aoki K, Kamiyama H, Masuda K, Togashi Y, Terauchi Y. Mosapride citrate, a 5-HT4 receptor agonist, increased the plasma active and total glucagon-like peptide-1 levels in non-diabetic men. *Endocr J*. (査読有) 60(4):493-499. 2013
- ③ Aoki K, Kamiyama H, Yoshimura K, Shibuya M, Masuda K, Terauchi Y. Miglitol administered before breakfast increased plasma active

- glucagon-like peptide-1 (GLP-1) levels after lunch in patients with type 2 diabetes treated with sitagliptin. *Acta Diabetol.* ((査読有) 49(3):225-230, 2012
- ④ Masuda K, Aoki K, Terauchi Y. Comparison of plasma active glucagon-like peptide-1 (GLP-1) levels assayed with or without plasma extraction in non-diabetic men. *Endocr J.* (査読有) 59(5):435-438, 2012
- ⑤ Aoki K, Terauchi Y. Effect of acarbose therapy once or twice a day on blood glucose in Japanese patients with type 2 diabetes. *Jpn J Clin Pharmacol Ther* (査読有) 43:17-20, 2012
- ⑥ 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.* (査読有) 60(4):1246-57, 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.* (査読有) 60(4):1246-57, 2011
- ⑧ 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.* (査読有) 60(5):617-628, 2011
- ⑨ Masuda K, Aoki K, Terauchi Y. Effects of miglitol taken just before or after breakfast on plasma glucose, serum insulin, glucagon and incretin levels after lunch in men with normal glucose tolerance, impaired fasting glucose or impaired glucose tolerance. *J Diabetes Invest.* (査読有) 3(6):435-440, 2011
- ⑩ Aoki K, Miyazaki T, Nagakura J, Orime K, Togashi Y, Terauchi Y. Effects of pre-meal versus post-meal administration of miglitol on plasma glucagon-like peptide-1 and glucosedependent insulinotropic polypeptide levels in healthy men. *Endocr J.* (査読有) 57(8):673-677, 2010
- ⑪ 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.* ((査読有) 57(8):667-672, 2010
- ⑫ Aoki K, Muraoka T, Ito Y, Togashi Y, Terauchi Y. Comparison of adverse gastrointestinal effects of acarbose and miglitol in healthy men: A crossover study. *Intern Med.* (査読有) 49(12):1085-1087, 2010
- ⑬ Masuda K, Aoki K, Kikuchi K, Nezu U, Muraoka T, Shinoda K, Nakamura A, Shibuya M, Takahashi M, Kimura M, Terauchi Y. Self-Injection of Insulin Using Appropriate Supportive Devices in Handicapped Subjects with Diabetes. *Diabetes Technol Ther.* (査読有) 12(6):483-490, 2010
- ⑭ Nezu U, Tsunoda S, Yoshimura H, Kuwabara T, Tomura S, Seki Y, Kaneshiro M, Kamiyama H, Harada Y, Shigematsu E, Aoki K, Yamakawa T, Ohshige K, Natsumeda Y, Terauchi Y. Pravastatin potentiates increases in serum adiponectin concentration in dyslipidemic patients receiving thiazolidinedione: the DOLPHIN study. *J Atheroscler Thromb.* (査読有) 17(10):1063-1069, 2010
- ⑮ Kikuchi K, Nezu U, Shirakawa J, Sato K, Togashi Y, Kikuchi T, Aoki K, Ito Y, Kimura M, Terauchi Y. Correlations of Fasting and Postprandial Blood Glucose Increments to the Overall Diurnal Hyperglycemic Status in Type 2 Diabetic Patients: Variations with Levels of HbA1c. *Endocr J.* (査読有) 57(3):259-266, 2010
- ⑯ Nakamura A, Shimizu C, Nagai S, Yoshida M, Aoki K, Kondo T, Miyoshi H, Wada N, Tajima T, Terauchi Y, Yoshioka N, Koike T. Problems in diagnosing atypical Gitelman's syndrome presenting with normomagnesaemia. *Clin Endocrinol (Oxf).* (査読有) 72(2):272-276, 2010

[学会発表] (計4件)

- ① 青木一孝、寺内康夫。「糖尿病の診断・治療の最新情報」教育講演 日本臨床検

横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：40359609

- 査自動化学会第 44 回大会 2012 年 10 月 13 日 パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ② 青木一孝, 増田清美, 神山博史, 寺内康夫 モサプリドがインクレチン分泌に与える効果 第 55 回日本糖尿病学会学術総会 2012 年 5 月 17 日 パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ③ 青木一孝, 神山博史, 吉村公一郎, 増田清美, 寺内康夫 日本人 2 型糖尿病患者におけるアカルボースの 1 日 1~2 回投与による血糖改善効果 第 54 回日本糖尿病学会学術総会 2011 年 5 月 19 日 さっぽろ芸術文化の館 (北海道)
- ④ 青木一孝, 宮崎岳之, 永倉穰, 折目和基, 富樫優, 寺内康夫 ミグリトールの内服方法がインクレチン分泌に与える影響 第 53 回日本糖尿病学会学術総会 2010 年 5 月 27 日 ホテルグランヴィア岡山 (岡山県)

[図書] (計 7 件)

- ① 青木一孝・寺内康夫. 経口血糖降下薬. 内分泌代謝専門医ガイドブック科 改訂第 3 版 337-341 診断と治療社、2012 年
- ② 青木一孝・寺内康夫. 循環器から寄せられる「糖尿病と血管合併症」に関する 100 の質問 106-107 メディカルレビュー社、2012 年
- ③ 青木一孝・寺内康夫. 糖尿病の血糖管理. Principles and Practice 内分泌代謝(寺内康夫、鯉淵典行、後藤英司編) 272-273 文光堂、2011 年
- ④ 青木一孝・寺内康夫. 糖尿病の血糖管理. Principles and Practice 内分泌代謝(寺内康夫、鯉淵典行、後藤英司編) 266-271 文光堂、2011 年
- ⑤ 青木一孝・寺内康夫. 経口血糖薬の使い分け. 寺内康夫編 EBM 糖尿病ハンドブック 227-236、中外医学社、2010 年
- ⑥ 青木一孝・寺内康夫. 結果の記載方法. コメディカルのための論文の書き方の基礎知識 73-76 メディカルレビュー社、2010 年
- ⑦ 青木一孝・寺内康夫. 方法と対象の記載方法. コメディカルのための論文の書き方の基礎知識 67-72 を担当 メディカルレビュー社、2010 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木一孝 (AOKI KAZUTAKA)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：60336542

(2) 研究分担者

寺内康夫 (TERAUCHI YASUO)