

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791040

研究課題名（和文） 臨床応用へ向けたグルコキナーゼ活性化薬の展望と問題点

研究課題名（英文） For clinical application of glucokinase activator

## 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が膵β細胞機能・増殖に与える分子機構を明らかにし、グルコキナーゼ活性化薬がより効果的に作用する治療戦略を検討した。グルコキナーゼ活性化薬による IRS-2 発現増加は、膵β細胞機能には関与しないが、膵β細胞増殖に影響を与えることを明らかにした。酸化ストレスはグルコキナーゼ活性化薬による膵β細胞機能・増殖関連因子の発現増加作用を減弱させた。グルコキナーゼ活性化薬とインクレチン関連薬との併用は効果的である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We investigated the mechanisms by which glucokinase activator (GKA) stimulates beta cell function and proliferation and we then explored therapeutic strategy by which GKA worked more effectively. GKA-stimulated Irs2 expression affected beta cell proliferation, but not beta cell function. Oxidative stress could diminish the effects of GKA on the changes in expression of genes involved in beta cell function and proliferation. A combination of GKA and an incretin-related agent might be effective.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：グルコキナーゼ、膵β細胞量

## 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（Butler 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細胞の機能とともに、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を介したシグナ

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)。私はグルコキナーゼ活性化薬の糖代謝および膵  $\beta$  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  $\beta$  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  $\beta$  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)。同様の報告が最近なされており (Porat S, et al. Cell Metab, 2011)、ヒトでのグルコキナーゼ遺伝子異常による活性亢進で膵  $\beta$  細胞量が増加しているとの報告も認められる (Kassem S, et al. N Engl J Med, 2010)。さら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  $\beta$  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  $\beta$  細胞増殖作用も報告されている (Drucker DJ, et al. Lancet, 2006)。以上よりグルコキナーゼ活性化薬やインクレチン製剤が 2 型糖尿病治療薬における膵  $\beta$  細胞増加薬として位置付けられることが期待される。

## 2. 研究の目的

- (1) グルコキナーゼ活性化薬による膵  $\beta$  細胞機能・量調節の分子機構の全体像を解明する。
- (2) 作用メカニズムから見たグルコキナーゼ活性化薬の臨床応用へ向けた課題の抽出を目指す。

## 3. 研究の方法

- (1) グルコキナーゼ活性化薬による IRS-2 発現上昇のメカニズムおよび IRS-2 発現上昇による膵  $\beta$  細胞増殖のメカニズムについて解析する。具体的には、IRS-2 発現上昇のメカニズムとして考えられる CREB のリン酸化やその過程におけるグルコース代謝や Ca シグナルの重要性について野生型マウスの単離膵島を用いて検討する。また膵  $\beta$  細胞機能関連因子と考えられる PDX-1 や GLUT2、Glucokinase の発現、さらには膵  $\beta$  細胞増殖関連因子として細胞周期シグナルの発現についても検討する。さらに IRS-2 欠損マウスを用いた検討を行い、グルコキナーゼ活性化薬による膵  $\beta$  細胞増殖の分子機構における IRS-2 の役割を明らかにする。
- (2) 最近の臨床治験の結果から、グルコキナーゼ活性化により糖代謝 (解糖系) を亢進させても、ミトコンドリア機能が低下している状態では、過剰なグルコース代謝によって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た。そこで、酸化ストレスを誘導した状態でのグルコキ

ナーゼ活性化薬の効果を  $H_2O_2$  や抗酸化薬を用いて検討するとともに、酸化ストレス亢進下でのモデルとして db/db マウスを用いた検討を行った。さらにその結果を踏まえ、あらかじめインクレチン製剤の Exendin-4 を db/db マウスに前投与することによるグルコキナーゼ活性化薬の効果も検討する。

## 4. 研究成果

- (1) 細胞株 (INS1) にグルコキナーゼ活性化薬を加えたところ、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、グルコキナーゼ活性化薬による 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  $\beta$  細胞機能、増殖のシグナルを明らかにするために、グルコキナーゼ活性化薬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、グルコキナーゼ活性化薬投与により 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  $\beta$  細胞増殖関連因子に対しては、グルコキナーゼ活性化薬投与により 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グルコキナーゼ活性化薬を混合させた特別食を負荷して、糖代謝、膵  $\beta$  細胞機能、膵  $\beta$  細胞量を比較検討したところ、高脂肪食にグルコキナーゼ活性化薬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グルコキナーゼ活性化薬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グルコキナーゼ活性化薬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、グルコキナーゼ活性化薬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  $\beta$  細胞量は高脂肪食群とグルコキナーゼ活性化薬特別食群で差を認めなかったが、グルコキナーゼ活性化薬短期投与での膵  $\beta$  細胞増殖能を検討したところ、野生型マウスではグルコキナーゼ活性化薬特別食群で BrdU

取り込み率が増加していたのに対し、IRS-2 欠損マウスでは両群で差を認めなかった。以上より、グルコキナーゼ活性化薬は CREB のリン酸化、IRS-2 の発現を増加させ、細胞周期制御因子に作用して膵  $\beta$  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、グルコキナーゼ活性化薬投与により 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、グルコキナーゼ活性化薬の膵  $\beta$  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. Diabetologia, 2012)。

(2) 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、グルコキナーゼ活性化薬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。しかし 20 週、40 週の高脂肪食負荷マウスにおいて、グルコキナーゼ活性化薬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, 2011)。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. Diabetologia, 2012)。そのマウスにグルコキナーゼ活性化薬を 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、グルコキナーゼ活性化薬は明らかな悪影響を及ぼさないことが示唆された。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。われわれは、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、グルコキナーゼ活性化薬投与による 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。そこで酸化ストレス亢進下におけるグルコキナーゼ活性化薬の有効性を検証する目的で、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グルコキナーゼ活性化薬刺激による 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。最近、GLP-1 受容体作動薬が GK ラット単離膵島の reactive oxygen species (ROS) の産生を抑制し、ATP 含量を増加させることや、db/db マウス単離膵島の抗酸化ストレス遺伝子の発現を増加させることが報告されている (Mukai E, et al. Diabetes, 2011; Shimoda M, et al. Diabetologia, 2011)。そこで、6 週齢 db/db マウスに 2 週間 Exendin-4 またはプラセボを腹腔注射し、単離膵島にグルコキナーゼ活性化薬刺激を行い、IRS-2、PDX-1 の発現を比較したところ、プラセボ群ではこれらの発現は上昇しなかったのに対し、Exendin-4 注射群では有意に発現が上昇した。また両群で p22phox、gp91phox、p47phox の発現に差を認めなかったことから、Exendin-4 前処置下でのグルコキナーゼ活性化薬刺激による IRS-2、PDX-1 の発現増加は酸化ストレスとは独立した経路を介する可能性が示唆された (Nakamura A, et al. Diabetologia, 2012)。

## 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 8 件)

- ① 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. 55: 1745-1754, 2012 査読有  
DOI: 10.1007/s00125-012-2521-5
- ② Nakamura A, Tajima K, Zolzaya K, Sato K, Inoue R, Yoneda M, Fujita K, Nozaki Y, Kubota KC, Haga H, Kubota N, Nagashima Y, Nakajima A, Maeda S, Kadowaki T, Terauchi Y. Protection from non-alcoholic steatohepatitis and liver tumorigenesis in high fat-fed insulin receptor substrate-1-knockout mice despite insulin resistance. Diabetologia. 55: 3382-3391, 2012 査読有 DOI: 10.1007/s00125-012-2703-1
- ③ 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*. 153: 1093-102, 2012 査読有 DOI: 10.1210/en.2011-1712

- ④中村昭伸、寺内康夫 糖尿病の薬物療法 - 最新の治療と将来展望 グルコキナーゼ活性化薬 カレントセラピー 査読無 30: 85-90, 2012
- ⑤Nakamura 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*. 2: 276-279, 2011 査読有 DOI: 10.1111/j.2040-1124.2011.00104.x, 2011
- ⑥中村昭伸、寺内康夫 膵β細胞の分化、増殖制御と糖尿病治療 糖代謝を介した膵β細胞増殖促進薬 細胞 査読無 43: 469-472, 2011
- ⑦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
- ⑧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

[学会発表] (計3件)

- ①Akinobu Nakamura Beta Cell Function and Proliferation in Response to Small Molecule Glucokinase Activator under Various Conditions, 71<sup>th</sup> Scientific Sessions for American Diabetes Association 2011年6月24日~28日 San Diego, California, USA
- ②中村昭伸 膵β細胞の再生を目指して The role of IRS-2 in the regulation of pancreatic beta cell mass in response to small molecule 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19-21日 ロイトン札幌(北海道)
- ③中村昭伸 グルコキナーゼ活性化薬が膵β細胞機能・増殖に与える影響 第54回日本糖尿病学会年次学術集会 2011年5月19-21日 札幌プリンスホテル(北海道)

## 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

研究者番号：

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：