

学位論文題名

Impact of Small Molecule Glucokinase Activator on Glucose Metabolism and Beta Cell Mass

(グルコキナーゼ活性化薬が糖代謝と膵 β 細胞量に及ぼす影響)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

2型糖尿病の病因としては、末梢組織でのグルコース摂取の低下、肝臓におけるグルコースの過剰産生と肝糖放出の増加、インスリン分泌の低下、膵 β 細胞量の減少が考えられる。近年、日本人を含めた2型糖尿病剖検例において膵 β 細胞量が低下していると報告され、膵 β 細胞量が重要であることが注目されつつある。われわれは膵 β 細胞量調節メカニズムの鍵分子としてグルコキナーゼに着目した。グルコキナーゼは膵 β 細胞や肝でグルコースのリン酸化を触媒することにより、全身のグルコース恒常性を保つ上で重要な役割を果たしている。高脂肪食下でグルコキナーゼヘテロ欠損マウスは野生型と同程度の肥満・インスリン抵抗性を呈したが、野生型では正常血糖を保っていたのに対し、グルコキナーゼヘテロ欠損マウスは早期から耐糖能が悪化し、野生型でみられた膵 β 細胞代償性過形成と insulin receptor substrate (IRS)-2 発現上昇が欠如していた。このことより、高脂肪食誘導性インスリン抵抗性に対する膵 β 細胞量調節メカニズムにおいては、グルコキナーゼと IRS-2 が重要な役割を果たしていると考えられた。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。グルコキナーゼ活性化薬 (GKA) 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を有しており、新しいタイプの糖尿病治療薬として期待されている。しかし GKA の膵 β 細胞量に対する影響については不明である。そこで膵 β 細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損マウスを用いて GKA の糖代謝や膵 β 細胞量に及ぼす影響を検討した。

【方法と結果】

1. GKA のグルコース応答性インスリン分泌能に対する効果の検討

野生型マウスから膵島を取り出し、0 μ M、0.3 μ M、3 μ M の GKA を添加し、グルコース応答性インスリン分泌能を比較したところ、2.8mM、8.3mM グルコース条件下において GKA は dose dependent にグルコース応答性インスリン分泌能を増強する作用を認めた。続いて個体レベルで十分な血糖降下作用が期待される 3 μ M の GKA を用いて野生型マウス、グルコキナーゼヘテロ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、8.3mM、22.2mM グルコース条件下において、グルコキナーゼヘテロ欠損マウスの膵島は、野生型マウスに比べ、グルコース応答性インスリン分泌能は低下傾向を認めた。さらに両マウスともに 2.8mM、8.3mM グルコース条件下において 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。

2. in vivo における GKA の糖代謝および膵 β 細胞量に対する効果の検討

野生型マウスに高脂肪食を負荷した群、および高脂肪食に GKA を混合させた特別食を負荷した群、グルコキナーゼヘテロ欠損マウスに高脂肪食を負荷した群、および高脂肪食に GKA を混合させた特別食を負荷した群の4群において、20週間投与後の体重、脂質代謝、耐糖能、膵 β 細胞量について比較検討を行った。体重は4群間で差を認めず、野生型マウス、

グルコキナーゼヘテロ欠損マウスともに GKA 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 GKA 特別食群での随時血糖の有意な低下が持続していた。また 4 群間で脂質代謝や脂肪組織重量、トランスアミナーゼ、肝重量、肝内中性脂肪含量に差を認めなかった。負荷後 20 週での経口ブドウ糖負荷試験では GKA 特別食群で耐糖能の明らかな改善を認めた。GKA の膵 β 細胞機能や肝に与える影響を評価するために、絶食時及び絶食後 2 時間再摂食の血糖、インスリン、肝内グリコーゲン含量を測定したところ、両マウスともに GKA 特別食群では再摂食後血糖は低下したにもかかわらず、インスリン、肝内グリコーゲン含量は上昇した。負荷後 20 週での膵組織全体に占める β 細胞の割合は、グルコキナーゼヘテロ欠損マウスは既報のとおり野生型マウスに比し有意に低値であったが、両マウスとも高脂肪食群と GKA 特別食群で差を認めなかった。

3. in vitro において GKA が膵 β 細胞量に与える影響についての検討

INS1 細胞に low glucose 下で $0\mu\text{M}$ 、 $0.3\mu\text{M}$ 、 $3\mu\text{M}$ GKA、または high glucose を加えたところ、high glucose 下では low glucose 下に比し、有意に 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) 取り込み率が増加し、また low glucose 下においては、GKA 投与により濃度依存性に BrdU 取り込み率が増加した。さらに BrdU 取り込み率と並行に IRS-2 発現量が増加し、この現象は単離膵島における検討でも認められた。

4. GKA 短期投与での in vivo における GKA の膵 β 細胞増殖能に対する検討

野生型マウスならびにグルコキナーゼヘテロ欠損マウスに普通食または高脂肪食を 20 週間負荷した後、さらに高脂肪食マウスを 3 日間だけ継続する群と GKA 特別食群に分け、膵 β 細胞の BrdU 取り込み率を解析したところ、両マウスとも GKA 特別食群において、BrdU 取り込み率が明らかに増加している個体を認めた。

【考察と結論】

GKA 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させること、膵 β 細胞増殖作用を有することが確認された。本研究の問題点としては、第 1 に GKA が膵 β 細胞量調節メカニズムにおいてどのような役割を果たしているかという点である。高脂肪食誘導性インスリン抵抗性に対する膵 β 細胞量調節機序においては、グルコキナーゼを介したグルコースシグナルにより cAMP-responsive element-binding protein (CREB) がリン酸化され、IRS-2 の発現が上昇することでインスリンシグナルが活性化されて膵 β 細胞の増殖が促進されると考えられる。GKA による膵 β 細胞増殖メカニズムについては IRS-2 の発現上昇以外に関しては明らかではなく、今後詳細な検討が必要である。

第 2 の問題点として、GKA 投与により、in vitro では膵 β 細胞の増殖を認めたのに対し、in vivo では膵 β 細胞量の増加を認めなかったという点である。この乖離を考察する上で、glucagon-like peptide-1 (GLP-1) に着目した。GKA と GLP-1 との共通点として、in vitro での膵 β 細胞量増加作用、インスリン分泌増強作用が挙げられる。in vivo での GLP-1 の膵 β 細胞量増加作用に関しては、一定の見解が得られていない。その理由として耐糖能の状態が膵 β 細胞量に影響を与える可能性が想定される。実際、本研究においても GKA の投与により耐糖能がすみやかに改善しており、持続的な血糖降下が GKA によるグルコキナーゼ活性化をキャンセルし、そのことが膵 β 細胞量の代償性増加を抑制している可能性が考えられる。

以上、GKA 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。膵 β 細胞量の保持あるいは増加が求められる病態においては、GKA の膵 β 細胞量増殖作用を期待した治療応用なども考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 畠 山 鎮 次

副 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 筒 井 裕 之

学 位 論 文 題 名

Impact of Small Molecule Glucokinase Activator on Glucose Metabolism and Beta Cell Mass

(グルコキナーゼ活性化薬が糖代謝と膵β細胞量に及ぼす影響)

近年、日本人を含めた2型糖尿病剖検例において膵β細胞量が低下していると報告され、膵β細胞量が重要であることが注目されつつある。高脂肪食誘導性インスリン抵抗性に対する膵β細胞量調節メカニズムにおいては、グルコキナーゼと insulin receptor substrate (IRS)-2 が重要な役割を果たしていると報告されている。グルコキナーゼ活性化薬 (GKA) 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を有しており、新しいタイプの糖尿病治療薬として期待されている。しかし、GKA の膵β細胞量に対する影響については不明である。そこで本学位論文では膵β細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損マウスを用いて GKA の糖代謝や膵β細胞量に及ぼす影響を検討した。

まず GKA のグルコース応答性インスリン分泌能に対する効果を報告した。次に *in vivo* における GKA の糖代謝および膵β細胞量に対する効果を報告した。野生型マウスに高脂肪食を負荷した群、および高脂肪食に GKA を混合させた特別食を負荷した群、グルコキナーゼヘテロ欠損マウスに高脂肪食を負荷した群、および高脂肪食に GKA を混合させた特別食を負荷した群の4群において、20週間投与後の体重、耐糖能、膵β細胞量について比較検討を行った。体重は4群間で差を認めず、野生型マウス、グルコキナーゼヘテロ欠損マウスともに GKA 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 GKA 特別食群での随時血糖の有意な低下が持続していた。負荷後20週での経口ブドウ糖負荷試験では GKA 特別食群で耐糖能の明らかな改善を認めた。そして *in vitro* において GKA が膵β細胞量に与える影響について報告した。INS1細胞に low glucose 下で 0 μ M、0.3 μ M、3 μ M の GKA、または high glucose を加えたところ、high glucose 下では low glucose 下に比し、有意に 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) 取り込み率が増加し、また low glucose 下においては、GKA 投与により濃度依存性に BrdU 取

り込み率が増加していた。さらに BrdU 取り込み率と並行に IRS-2 発現量が増加し、この現象は単離膵島における検討でも認められた。最後に GKA 短期投与での *in vivo* における GKA の膵β細胞増殖能に対する検討を報告した。野生型マウスならびにグルコキナーゼヘテロ欠損マウスに高脂肪食を 20 週間負荷した後、さらに高脂肪食マウスを 3 日間だけ継続する群と GKA 特別食群に分け、膵β細胞の BrdU 取り込み率を解析したところ、両マウスとも GKA 特別食群において、BrdU 取り込み率が明らかに増加している個体を認めた。以上、GKA 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。膵β細胞量の保持あるいは増加が求められる病態においては、GKA の膵β細胞量増殖作用を期待した治療応用なども考えられた。

質疑応答では、副査筒井教授から、GKA の膵β細胞増殖作用における *in vivo* と *in vitro* の差異について、GKA の膵外作用についての質問があったが、実験結果とこれまでの知見を踏まえ適切な回答をしていた。次いで副査小池教授から、GKA の発癌の可能性について、臨床応用される上での GKA の位置づけについての質問があり、今後臨床の現場における使用において、危険性を踏まえた上での更なる検討が必要であることを述べていた。次いで主査畠山教授からグルコキナーゼヘテロ欠損マウス、ホモ欠損マウスにおけるグルコキナーゼの活性について、及びグルコキナーゼの酵素特性からみた GKA の臨床応用についての質問があり、これまでのノックアウトマウスに関する知見と酵素学的見地からの考察を適切に回答していた。

この論文は、GKA が膵β細胞増殖作用を有することを明らかにした点で高く評価され、今後の 2 型糖尿病への臨床応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。