



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	高炭水化物誘導性膵 β 細胞量増加におけるグルコキナーゼの役割 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	土田, 和久
Description	配架番号 : 2615
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14516号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81548
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuhisa_Tsuchida_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 土 田 和 久

学 位 論 文 題 名

高炭水化物誘導性膵β細胞量増加におけるグルコキナーゼの役割
(The role of glucokinase in high-starch diet-induced beta-cell mass expansion)

【背景と目的】糖尿病の大部分を占める2型糖尿病患者数は、2019年時点で世界において4億6,300万人であり今後もさらに増加すると予測されており、有効な治療法が求められる。糖尿病はインスリンの効果の不足によりもたらされる血糖上昇の状態を主徴とする疾患であり、糖尿病による慢性的な高血糖は、種々の合併症を結果として引き起こす。インスリンの作用不足は、インスリンの分泌低下およびインスリン抵抗性の増大によって引き起こされる。これらのうちインスリン分泌低下は、膵β細胞機能の低下および膵β細胞量の低下により引き起こされることが示されており、これらの低下を抑制、改善する治療は、2型糖尿病の根本的な治療戦略となりうる。長期高脂肪食負荷をおこなうと膵β細胞増殖が起こるが、そのメカニズムにおいて、膵β細胞の解糖系の律速段階であるグルコキナーゼが重要な役割を果たしている。一方で、高炭水化物食は消化産物として、グルコキナーゼの基質であるグルコースを多く供給するが、マウスにおいて長期の高炭水化物食の摂取は高脂肪食摂取と同様に膵β細胞量の増加をきたすことが報告されている。しかし、その際のグルコキナーゼの役割は明らかではなく、そのメカニズムを解明することを本研究の目的とした。

【方法と対象】膵β細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損マウス($Gck^{+/-}$)雄性8週齢および対照として野生型マウス($Gck^{+/+}$)雄性8週齢をそれぞれ普通食飼育群(NC群)と、高炭水化物食投与群(HSTD群)に群別し飼育した。餌のカロリー比率は、NCが炭水化物61.5%、タンパク質25.7%、脂質12.8%に対して、HSTDが炭水化物71.3%、タンパク質14.0%、脂質14.8%であった。飼育中は自由摂餌下の体重・血糖・摂餌量を測定した。14週目にインスリン負荷試験(ITT)によるインスリン抵抗性の評価および経口ブドウ糖負荷試験(OGTT)による耐糖能および同時採血によるグルコース応答性インスリン分泌能の評価を行った。15週間の飼育後に5-bromo-2-deoxyuridine(BrdU)を投与したうえで各臓器を摘出し、膵臓の組織切片を作成した。免疫組織学的手法を用いて膵組織面積に対する膵β細胞面積の比と、膵重量より膵β細胞量を求め、定量的に比較検討した。さらに、得られた膵組織について、インスリン染色陽性細胞中のKi67陽性細胞率、BrdU陽性細胞率をそれぞれ求め、膵β細胞の増殖能を比較した。同様の方法で別途飼育したマウスから単離された膵島の遺伝子発現について、リアルタイムPCR法、DNAマイクロアレイ法を用いて評価を行った。

【結果】 $Gck^{+/+}$ 、 $Gck^{+/-}$ ともに、体重の増加率はNC群に比しHSTD群で有意に大きかったが、随時

血糖は NC 群と HSTD 群で差はなかった。ITT では $Gck^{+/+}$ 、 $Gck^{+/-}$ ともに SC 群と HSTD 群で各測定点における血糖値および前値を基準とした血糖変化率に差はなく、インスリン感受性に餌による差はみられなかった。OGTT でも各測定点の血糖および試験中の血糖における Area Under the Curve については $Gck^{+/+}$ 、 $Gck^{+/-}$ ともに SC 群と HSTD 群で差はなく、耐糖能の餌による変化はみられなかった。しかし負荷後 15 分の血清インスリン値が、 $Gck^{+/-}$ NC 群に比し、 $Gck^{+/-}$ HSTD 群で有意に高値であったにもかかわらず、 $Gck^{+/-}$ では差を認めなかった。膵切片の検討では、膵 β 細胞量は $Gck^{+/-}$ NC 群に比し $Gck^{+/-}$ HSTD 群で有意な増加を認めたが、 $Gck^{+/-}$ SC 群と $Gck^{+/-}$ HSTD 群では差を認めなかった。
($Gck^{+/-}$ NC 群: 1.57 ± 0.66 mg, $Gck^{+/-}$ HSTD 群: 2.61 ± 1.22 mg, $Gck^{+/+}$ NC 群: 1.88 ± 0.76 mg, $Gck^{+/+}$ HSTD 群: 1.85 ± 0.77 mg; $Gck^{+/-}$ SC 群 vs. $Gck^{+/-}$ HSTD 群: $p = 0.032$)。Ki67 陽性細胞率、BrdU 陽性細胞率は各群での変化は見られなかった。単離膵島の遺伝子発現を比較したところリアルタイム PCR 法での検討では *Irs2* と *Ki67* の発現量に差を認めなかった。DNA マイクロアレイ法による解析では 22203 遺伝子について評価を行い、遺伝子発現について 2 群間の差を $p < 0.05$ かつ Fold change > 2 を有意として比較を行った結果、 $Gck^{+/-}$ HSTD 群を $Gck^{+/-}$ NC 群と比較すると、62 遺伝子が増加し、222 遺伝子が減少していた。 $Gck^{+/-}$ HSTD を $Gck^{+/-}$ NC と比較すると、284 遺伝子が増加し、135 遺伝子が減少していた。4 群間の比較で $Gck^{+/-}$ HSTD 群と他の 3 群との比較で有意差があった遺伝子を確認したところ、 $Gck^{+/-}$ HSTD は他の 3 群と比較して *Aldh1a3*、*Slc17a9*、*Cthrc1*、*Pde10a* において増加、*Sult1c2*、*Vsnl1*、*Mt2*、*Mt1* において減少が認められた。

【考察】 $Gck^{+/-}$ マウスにおいて HSTD 長期摂取によりグルコース応答性インスリン分泌の増加と膵 β 細胞量の増加が認められたが、 $Gck^{+/-}$ ではそのような変化は起こらないことが示され、長期 HSTD 摂取による膵 β 細胞量とグルコキナーゼとの関連があることが示された。高脂肪食による膵 β 細胞量に関して検討をおこなった既報では Insulin receptor substrate (IRS)2 がグルコキナーゼと関連した膵 β 細胞増殖に関連することが示されていたが、本研究では *Irs2* や *Ki67* の発現増加といった膵 β 細胞の増殖に関連した変化は示されなかった。負荷後 15 週時点での遺伝子発現の変化を網羅的に解析するために DNA マイクロアレイ法による解析を行ったところ、グルコース応答性インスリン分泌や膵 β 細胞量の増加と同様に $Gck^{+/-}$ HSTD において変化している遺伝子が、8 つ同定された。それらの遺伝子について、インスリン分泌能や膵 β 細胞量との関係を示す既報について文献検索を行ったところ、*Mt1*、*Mt2* の抑制とインスリン分泌亢進の関連を示す報告はあったが、膵 β 細胞量との関連を示した報告はなかった。一方グルコキナーゼ活性化薬で得られている知見では、短期のグルコキナーゼ作用の増強は膵 β 細胞の増殖を亢進させるが、長期では増殖を認めないことが示されており、本検討の結果について、高炭水化物食投与の初期の増殖により増加した膵 β 細胞量が見られ、検討を行った 15 週時点では増殖やそれに関連した変化は終了しているため見られないという可能性が考えられた。本検討で増加がみられた *Aldh1a3* は発現亢進と膵 β 細胞の脱分化との関連が示されており、HSTD の長期摂取は 2 型糖尿病における膵 β 細胞機能低下の病態に対して促進的に働く可能性も考えられた。

【結論】長期高炭水化物食の摂取による膵 β 細胞量の増加作用において、膵 β 細胞のグルコキナーゼが関与することやその変化の一部に 2 型糖尿病の病態の進行を示唆するものを含むことを、個体レベルで明らかにした。今後臨床において膵 β 細胞量の観点からの高炭水化物摂取に相当する食事療法の意義の検討や、グルコキナーゼの活性調節を行う治療の臨床応用に向けて、さらなる詳細な検討が必要である。