



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14516
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/84593
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuhiisa_Tsuchida.pdf



学 位 論 文

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)

2021年3月

北海道大学

土田 和久

Kazuhisa Tsuchida

学 位 論 文

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)

2021年3月

北海道大学

土田 和久

Kazuhisa Tsuchida

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
1. 要旨	2 頁
2. 略語表	5 頁
3. 緒言	6 頁
4. 目的	8 頁
5. 対象と方法	9 頁
5.1 研究デザイン	9 頁
5.2 対象	9 頁
5.3 評価項目	10 頁
5.4 体重・摂餌量の測定	10 頁
5.5 随時血糖の測定	11 頁
5.6 インスリン感受性の評価	11 頁
5.7 経口ブドウ糖負荷試験	11 頁
5.8 血漿インスリンの測定	12 頁
5.9 膵の組織学的評価	12 頁

5.10	免疫組織染色（酵素抗体法）	12 頁
5.11	免疫組織染色（蛍光抗体法）	13 頁
5.12	遺伝子発現解析	13 頁
5.13	DNA マイクロアレイ解析	14 頁
5.14	統計解析	15 頁
6.	結果	16 頁
6.1	随時血糖と体重の推移、摂餌量、臓器重量	16 頁
6.2	HSTD による耐糖能変化の検討	22 頁
6.3	膵 β 細胞の形態と膵 β 細胞量の比較	28 頁
6.4	膵 β 細胞増殖能の検討	31 頁
6.5	膵島における膵 β 細胞増殖関連因子の遺伝子発現量の検討	34 頁
6.6	DNA マイクロアレイによる発現遺伝子変化の検索	37 頁
7.	考察	41 頁
8.	結論	44 頁
9.	謝辞	45 頁
10.	利益相反	46 頁
11.	参考文献	47 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は下記の論文として投稿中である。

Kazuhisa Tsuchida, Akinobu Nakamura, Hideaki Miyoshi, Kelaier Yang, Yuki Yamauchi, Shinichiro Kawata, Kazuno Omori, Kiyohiko Takahashi, Naoyuki Kitao, Hiroshi Nomoto, Hiraku Kameda, Kyu Yong Cho, Yusuke Seino, Yasuo Terauchi, Tatsuya Atsumi. “Glucokinase is required for high-starch diet-induced beta-cell mass expansion in mice” *Journal of Diabetes investigation, submitted*

本研究の一部は下記の学会で発表した

Kazuhisa Tsuchida, Akinobu Nakamura, Hideaki Miyoshi, Shinichiro Kawata, Kazuno Omori, Kiyohiko Takahashi, Hiraku Kameda, Kyu Yong Cho, Yusuke Seino, Yasuo Terauchi, Tatsuya Atsumi. “A long-term high-starch diet induces glucokinase-dependent expansion of pancreatic beta-cell mass” The 10th Scientific Meeting of AASD in (AASD 2018), 22-25 November 2018, Kuala Lumpur, Malesia

土田和久、中村昭伸、三好秀明、川田晋一郎、大森一乃、亀田啓、清野祐介、寺内康夫、渥美達也「高炭水化物食長期摂取による膵β細胞量増加作用におけるグルコキナーゼの役割」第22回日本病態栄養学会年次学術集会、2019年1月11-13日、横浜

土田和久、中村昭伸、三好秀明、Kelaier Yang、関崎知紀、山内 裕貴、川田晋一郎、柴山惟、大森一乃、野本博司、亀田啓、曹圭龍、清野祐介、寺内康夫、渥美達也「高炭水化物食長期摂取による膵β細胞量増加作用におけるグルコキナーゼの役割」第63回日本糖尿病学会年次学術集会、2020年10月5-16日

1. 要旨

【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 NC 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 NC 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、 $Gck^{+/-}$ NC 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; $Gck^{+/+}$ NC 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 *Aldehyde dehydrogenase 3* (*Aldehyde dehydrogenase 3*), *Solute carrier family 17 member 9* (*Solute carrier family 17 member 9*), *Cytochrome b5 domain containing 1* (*Cytochrome b5 domain containing 1*), *Pantoic acid decarboxylase 1* (*Pantoic acid decarboxylase 1*), *Protein deacetylase 10a* (*Protein deacetylase 10a*) において増加、*Sulfotransferase 1c2* (*Sulfotransferase 1c2*), *Vesicle trafficking protein 11* (*Vesicle trafficking protein 11*), *Mitochondrial transcription factor 2* (*Mitochondrial transcription factor 2*), *Mitochondrial transcription factor 1* (*Mitochondrial transcription factor 1*) 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、少数での検討

ではあったが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。

2. 略語表

本文中および図注で用いた略語は以下の通りである。

Aldh1a3	aldehyde dehydrogenase family 1 member A3
ANOVA	analysis of variance
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridine
Cthrc1	collagen triple-helix repeat-containing 1
FDR	false discovery rate
HSTD	high-starch diet
IRS2	insulin receptor substrate 2
ITT	insulin tolerance test
mRNA	messenger ribonucleic acid
Mt1	metallothionein 1
Mt2	metallothionein 2
OGTT	oral glucose tolerance test
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
Pde10a	phosphodiesterase 10A
PBS	phosphate buffered saline
SD	standard division
Slc17a9	solute carrier family 17 member 9
Sult1c2	sulfotransferase family 1C member 2
NC	normal chow
Vsnl1	visinin-like protein 1

3. 緒言

糖尿病はインスリンの効果の不足によって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結果として種々の合併症を引き起こす (Chatterjee et al., 2017)。世界の2型糖尿病患者数は、2019年時点で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いる (Saeedi et al., 2019)。そのため、糖尿病に対する有効な治療法の確立が求められる。

2型糖尿病の主徴である血糖上昇は、インスリンの分泌低下および、筋肉、肝臓や脂肪組織を含めたインスリンが作用する臓器におけるインスリン抵抗性の増加によって引き起こされる (Chatterjee et al., 2017)。インスリンの分泌低下は2型糖尿病の発症および病態の進行において極めて重要な役割を果たすことが示されている (Kendall et al., 2009; Morimoto A et al., 2013; Ohn et al., 2016; Prentki and Nolan et al, 2006)。インスリンの分泌低下は個々の膵β細胞の機能低下のみならず、膵β細胞の量の低下により引き起こされることが示されている (Rhodes 2005; Meier et al., 2013; Yagihashi et al., 2016)。したがって、膵β細胞の量の低下を抑えないしは量を増やすような治療は、2型糖尿病の根本的な治療となる可能性がある。

グルコキナーゼは、膵β細胞においてはグルコースを基質としてグルコース6リン酸を産生する酵素であり、その反応速度は生理的なレベルのグルコースの濃度においては濃度依存性に変化するため、グルコースセンサーとして機能すると考えられている (Matschinsky et al., 2006; Terauchi et al., 1995)。膵β細胞におけるグルコース応答性のインスリン分泌もグルコースのリン酸化を経る連鎖反応によって引き起こされるため、グルコキナーゼに律速されると考えられる (Matschinsky et al., 2006; Terauchi et al., 1995)。

実際に、膵β細胞特異的ヘテロ欠損 (*Gck^{+/−}*) マウスは、膵β細胞におけるグルコキナーゼ活性が50%程度まで低下し、膵β細胞の量には変化は見られないものの、インスリン分泌能の低下による高血糖を呈する表現型となる (Terauchi et al., 1995)。ヒトにおいては、若年発症成人型糖尿病2型がグルコキナーゼの不活化変異によるインスリン分泌不全を呈し、典型的には

空腹時高血糖をきたす病態として知られる (Chakera, et al., 2015)。反対に、グルコキナーゼ活性化薬は β 細胞内のグルコキナーゼを活性化することでインスリン分泌を増加させ、血糖を低下させる (Bonadonna et al., 2010; Nakamura et al.; 2009, Nakamura et al., 2015)。

さらに、グルコキナーゼは膵 β 細胞量の調節にかかわることが知られている (Terauchi et al., 2007; Porat et al., 2011; Weir et al., 2007)。その関与を示す報告の一つとして、野生型マウスにおいて 20 週間の高脂肪食負荷を行うとインスリン抵抗性の増大とともに膵 β 細胞量の増加がみられたが、*Gck*^{+/-}マウスにおいてはインスリン抵抗性の増大があったものの、膵 β 細胞量の変化が認められなかった (Terauchi et al., 2007)。即ち高脂肪食誘導性膵 β 細胞量調節メカニズムにおいては、グルコキナーゼが重要な役割を果たすと考えられる。

高炭水化物食 (HSTD) は消化産物として多くのグルコースを供給するが、高脂肪食と同様に体重増加をきたすことが示されており (Maekawa et al., 2017; Murase et al., 2019) さらに負荷により野生型マウスにおける膵 β 細胞量の増加を認めることも報告されている (Masuda et al., 2019; Murase et al., 2019)。このことから、HSTD も同様に、グルコキナーゼを介するメカニズムにより膵 β 細胞量が増加することが推測される。また、HSTD の特性として、摂餌における脂質の増加は少量でもインスリン抵抗性の増大を示す一方で、HSTD ではインスリン抵抗性の増大がないことも示されている (Maekawa et al., 2018)。特に東アジア人においては、インスリン分泌能は限られるためわずかなインスリン分泌能障害でも 2 型糖尿病発症に必要なインスリン抵抗性の増大の閾値が低くなる可能性も示唆されており (Kodama et al., 2013)、HSTD による検討はそういった耐糖能障害出現に際するインスリン抵抗性増大が比較的小さい傾向のある病態に、より近い状態を観察することができる可能性がある。

しかしながら、HSTD による膵 β 細胞増加作用においてグルコキナーゼが直接関与していることを示す報告はない。我々は HSTD による膵 β 細胞増殖作用が高脂肪食による膵 β 細胞増殖の作用と同様にグルコキナーゼを介していることを示すために、*Gck*^{+/-}マウスに HSTD を負荷して検討を行うこととした。

4. 目的

マウスにおいて長期の HSTD 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が、その際のグルコキナーゼの役割は明らかではないため、そのメカニズムを解明することを本研究の目的とした。

5. 対象と方法

5.1 研究デザイン

8週齢の雄性 $Gck^{+/+}$ マウスおよび雄性 $Gck^{+/-}$ マウスに対して、通常食 (NC) 負荷および HSTD 負荷の 2 群にわけ、 $Gck^{+/+}$ NC 群、 $Gck^{+/+}$ HSTD 群、 $Gck^{+/-}$ NC 群、 $Gck^{+/-}$ HSTD 群の合計 4 群に群別し 15 週間飼育した。

5.2 対象

8週齢の $Gck^{+/+}$ および $Gck^{+/-}$ マウスは、雄性 $Gck^{+/-}$ と、雌性 $Gck^{+/+}$ マウス、を交配させ、生まれてきた雄性 $Gck^{+/-}$ および雄性 $Gck^{+/+}$ を用いた。

膵 β 細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損マウスは以下のようにして作成された。1つのグルコキナーゼ遺伝子の代替スプライシングにより、膵 β 細胞で発現するグルコキナーゼと肝臓で発現するグルコキナーゼの 2つのアイソフォームが生成される。これら 2つのアイソフォームは 2つの異なるプロモーターによって転写され、エクソン 1 β とエクソン 1L の間にある下流のプロモーターが肝臓グルコキナーゼアイソフォームの転写を駆動する。エクソン 1 β の発現を破壊することで肝臓アイソフォームの発現に影響を与えることなく、グルコキナーゼの膵 β 細胞アイソフォームの発現を選択的に欠損した。ヘテロ欠損マウスは、変異グルコキナーゼ対立遺伝子を持つホモ欠損マウスを出産した。生後 3~4 日目の 335 匹の子孫において、野生型マウス、ヘテロ欠損マウス、ホモ欠損マウスの比率は 80 : 170 : 85 であり、メンデル遺伝と一致していた。逆転写酵素 PCR 分析により、ホモ欠損マウスでは膵 β 細胞におけるグルコキナーゼ発現が完全に欠失していることが明らかになった。ホモ欠損マウスの新生児の膵島では、グルコキナーゼ活性は完全に欠失していたが、ヘキソキナーゼ活性は野生型と同様であった。成体ヘテロ欠損マウスからの膵島では、グルコキナーゼ活性は野生型マウスの 48% であった。膵 β 細胞とは対照的に、肝臓におけるグルコキナーゼおよびヘキソキナーゼ活性の両方は、各遺伝子型において変化しなかった。

(Terauchi et al., 1995)

すべての実験において1ケージあたり1匹から5匹のマウスを飼育した。マウスの飼育環境は、室温25℃の空調のもと、7時～19時までを明期とした明暗サイクルで自由運動および水道水・餌の自由摂取のもとで飼育した。実験動物の取り扱いについては、国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定に従って行った。実験には雄性のマウスを用いた。負荷期間前および、通常食群の負荷期間にはNC (MF: Oriental Yeast Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いた。高炭水化物食群の負荷期間にはHSTDを用いた。HSTDは、CE-2(Oriental Yeast Co. Ltd, Tokyo, Japan) にカロリー当たりの炭水化物の割合を10%程度高く脂質を通常食と同率なるように、コーンスターチおよび植物油を添加し、形態を通常食と同様にペレット状に固めたものを用いた (Maekawa et al., 2017)。実際の餌の炭水化物、タンパク質、脂質のカロリーあたりの比率で表した組成はTable 1の通りである。

Table 1 餌のエネルギー比率

	タンパク質 (%)	脂質 (%)	炭水化物 (%)
NC	25.70	12.77	61.53
HSTD	13.98	14.74	71.29

5.3 評価項目

主要評価項目は負荷15週後の膵β細胞量とした。負荷期間中の体重、随時血糖、摂餌量の測定をおこなった。

5.4 体重・摂餌量の測定

5.2の条件で飼育した4群のマウスを毎週同一の時間において体重を測定し群間の比較を行った。5.2の条件で別途飼育したマウスについてケージ交換の前後48時間給餌器を設置し、給餌器の重量の変化を計測することで摂餌量を測定し、群間の比較をおこなった。

5.5 随時血糖の測定

5.4 で体重測定したものと同一個体の 4 群のマウスに対して、負荷 0 週時点から毎週自由摂食下での血糖値を測定した。採血は尾静脈から行い、血糖測定には Glutestmint portable glucose meter (Sanwa Chemical, Nagoya, Japan) を用いて添付文書の通りに測定した。

5.6 インスリン感受性の評価

5.4 で体重測定したもの、5.5 と同一個体の 4 群のマウスに対して負荷後 14 週目に自由摂食下において速効型インスリン (Humulin®R; Eli Lilly, USA) を 0.75 U/kg で腹腔内投与を行い、投与前 (0 分)・30 分・60 分・90 分・120 分における血糖値を測定した。各測定時間における血糖値を投与前 (0 分) の血糖値で除して得た値を percentage of basal blood glucose としてインスリン感受性の評価を行った。

5.7 経口ブドウ糖負荷試験

5.4 で体重測定したもの、5.5, 5.6 と同一個体の 4 群のマウスに対して経口ブドウ糖負荷試験 (Oral blood glucose test: OGTT) として負荷後 14 週目に 16 時間の絶食下において 1.5 mg/g のブドウ糖水溶液をゾンデを用いて経口投与し、投与前 (0 分)・15 分・30 分・60 分・90 分・120 分後に眼窩ないしは尾静脈から採血を行い、血糖値を測定した。各測定値を、縦軸を測定した血糖値 (mg g/dl)、横軸を測定した時間 (min) としてグラフにプロットして直線をつなぎ、0mM 縦軸の底として台形の面積の算出法を用いて 0 分~120 分までの各曲線下面積の総和を AUC (mg/dL × min) として算出し、各群の比較を行った。

5.8 血漿インスリンの測定

5.7 で眼窩採血を行い得られた全血の検体について、4°C、6000rpm、10 分にて遠心分離し血漿を分離した。得られた血漿に対して enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法のキットである超高感度マウスインスリン測定キット (Morinaga Institute of Biological Science, Yokohama, Japan) を用いて添付文書に従い測定を行った。

5.9 膵の組織学的評価

5.4 で体重測定したもの、5.5, 5.6, 5.7, 5.8 と同一個体の 4 群のマウスを負荷後 15 週の時点で屠殺し、膵臓を切離した。切離した膵臓は 4% paraformaldehyde / phosphate buffered saline pH 7.4 にて速やかに固定し、パラフィン包埋した。膵臓を 10 片以上の切片に分割し、下記に示す染色を実施した。

5.10 免疫組織染色 (酵素抗体法)

パラフィン切片を脱パラフィンし、水洗後、0.3%過酸化水素加メタノールにて内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止し、ヤギ血清 (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan) をもちいて 30 分ブロッキングを行った後、PBS で希釈した一次抗体 (下記) で 4°C overnight でインキュベートした。その後、PBS で洗浄し、二次抗体 (ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体 (Nichirei))、HRP 標識ストレプトアビジン (Nichirei) を各々 1 時間で反応させ、洗浄後に検鏡しながら 3,3'-diaminobenzidine で発色させ、ヘマトキシリンで対比染色を行った。インスリン染色には、一次抗体として抗インスリン抗体 (anti-insulin monoclonal antibody, Proteintec, USA, 15848-1-AP) を 1000 倍希釈にて用いた。光学顕微鏡 BIOREVO BZ-9000 (Keyence Japan, Osaka, Japan) にて BZ-II 観察アプリケーション ver. 1.40 (Keyence) を用いて標本の写真を撮影・取り込みを行い、BZ-II analyzer ver. 1.41 (Keyence) を用いて写真の解析を行った。BZ-II analyzer 上にて手動的にヘマトキシリンで染色された膵組織を囲んで膵切片全体の面積 (A) を計測し、次に同一切片のインスリン陽性細胞を BZ-II

analyzer 上で色調・濃度の選択を用いて抽出し、その面積 (B) を測定した。膵 β 細胞面積比ならびに膵 β 細胞量の算出は Bouwens らの方法に従い、前者は (B) を (A) で除して 100 を乗じ、%単位として算出した。また後者は切離した膵の総重量 (mg) にこの膵 β 細胞面積比 (%) を乗じ、膵 β 細胞量 (mg) とした。

式：膵 β 細胞量 (mg) = 膵 β 細胞面積比 (%) \times 膵重量 (mg)

膵 β 細胞の増殖の評価として、酵素抗体免疫染色法にて Bromodeoxyuridine (BrdU) 染色を行った。同時に上述のインスリン抗体を用いてインスリン陽性細胞の免疫染色も施行し、各膵島における BrdU 陽性細胞数/膵 β 細胞数を%比として算出し、その平均値を BrdU 陽性率 (%) とした。BrdU 染色には BrdU In-Situ Detection Kit (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) を添付文書の通りに使用した。

5.11 免疫組織染色 (蛍光抗体法)

パラフィン切片を脱パラフィンし、水洗後、抗原賦活化液としてクエン酸ナトリウムを用いた。ヤギ血清 (Nichirei) をもちいて 30 分ブロッキングを行った後、PBS で希釈した一次抗体 (Ki67, Rabbit, Cell Signaling Technology, MA, USA) を 200 倍希釈し、4°C overnight でインキュベートした。その後、PBS で洗浄し、二次抗体 (Anti guinea pig IgG,

Goat, Alexa Fluor 488, Life technologies, MA, USA) を 40 分間反応させた。洗浄後にインスリン抗体 (Insulin, Guinea pig, Dako, CA, USA) を 2 倍希釈し室温で 60 分反応させた後、PBS で洗浄し対応する二次抗体 (Rabbit IgG, Goat, Alexa Fluor 594, Life technologies, MA, USA) を 40 分間反応させた。PBS で洗浄し、4',6-diamidino-2-phenylindole (Vector Laboratory, Burlingame, USA) で対比染色を行った。

5.12 遺伝子発現解析

5.4 で体重測定したもの、5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9 での個体とは別途に 5.2 の条件で飼育した 4 群のマウスから単離膵島を採取し、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Tokyo, Japan) を添付文書の通りに用いて total RNA を抽出した。抽出した RNA は濃度を調節後に random primer、10mM dNTP (以上

Promega, WI, USA)、Superscript® III、RNaseOUT、5x Fast Standard Buffer (以上 Life Technologies) を用いて cDNA を作製し、power SYBR Green (Applied Biosystems, Massachusetts, USA) を用いた定量的 Realtime-PCR 法で各種遺伝子発現量を定量した。使用したプライマー配列は、Table 2 に記載した。
内因性コントロールとして、*Beta actin* を用いた。

Table 2 定量的リアルタイム PCR に用いたプライマーの配列

Gene (Forward/Reverse)	Sequence
<i>Beta actin</i> forward	ATATCGCTGCGCTGGTCTGTC
<i>Beta actin</i> reverse	AGCACAGCCTGGATGGCTAC
<i>Ki67</i> forward	CTGCCTGCGAAGAGAGCATC
<i>Ki67</i> reverse	AGCTCCACTTCGCCTTTTGG
<i>Irs2</i> forward	AACCTGAAACCTAAGGGACTGG
<i>Irs2</i> reverse	CGGCGAATGTTTCATAAGCTGC

5.13 DNA マイクロアレイ解析

5.4 で体重測定したもの、5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 5.12 での個体とは別途に 5.2 の条件で飼育した 4 群のマウスから単離腓島を採取し、単離腓島からの全 RNA を RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出し、Clariom S Mouse Gene 2.0 ST array (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) を使用した。

遺伝子データの解析には Thermo Fisher 社の提供する Transcriptome Analysis Console (version 4.0.2.15) を用い、4 群間の比較として経験的ベイズ法による結果について False discovery rate (FDR) による補正を行い、 $P < 0.05$ である遺伝子を抽出した。抽出された遺伝子について、インスリン分泌能や膵 β 細胞の形態学的な変化を説明し得る遺伝子を抽出する目的で、*Gek^{+/+}*HSTD 群とその他 3 群についての 2 群間比較で $P < 0.05$ かつ Fold change > 2.0 ないしは Fold change < -2.0 である遺伝子を抽出した。

5.14 統計解析

データは平均±標準偏差 (SD) で要約した。マイクロアレイ解析の結果については前項の方法を用い、それ以外のデータについては2つ以上のグループ間の個別比較は、一元配置分散分析 (ANOVA) に続いて、ポストホック解析としてボンフェローニ法を用いて評価した。すべての p 値は 0.05 未満を統計学的有意とした。統計解析は Bellcurve for Excel (Social Survey Research Information, Tokyo, Japan) を用いて行った。

6. 結果

6.1 随時血糖と体重の推移、摂餌量、臓器重量

随時血糖と体重の推移について、Figure 1、2、3に記載した。また摂餌量について Figure 4 に記載した。臓器重量について Figure 5 に記載した。血糖は餌による群間差は認められなかった。4群間で摂餌量には差がなく、体重も各測定点では差がなかったが、負荷開始から15週間での体重変化を比較すると、 $Gck^{+/+}$ HSTD群は $Gck^{+/+}$ NC群と比べて、 $Gck^{+/-}$ HSTD群は $Gck^{+/-}$ NCと比較して有意に大きかった。臓器重量については、皮下脂肪、内臓脂肪それぞれにおいて $Gck^{+/+}$ HSTD群は $Gck^{+/+}$ NC群と比べて、 $Gck^{+/-}$ HSTD群は $Gck^{+/-}$ NCと比較して有意に大きかった。

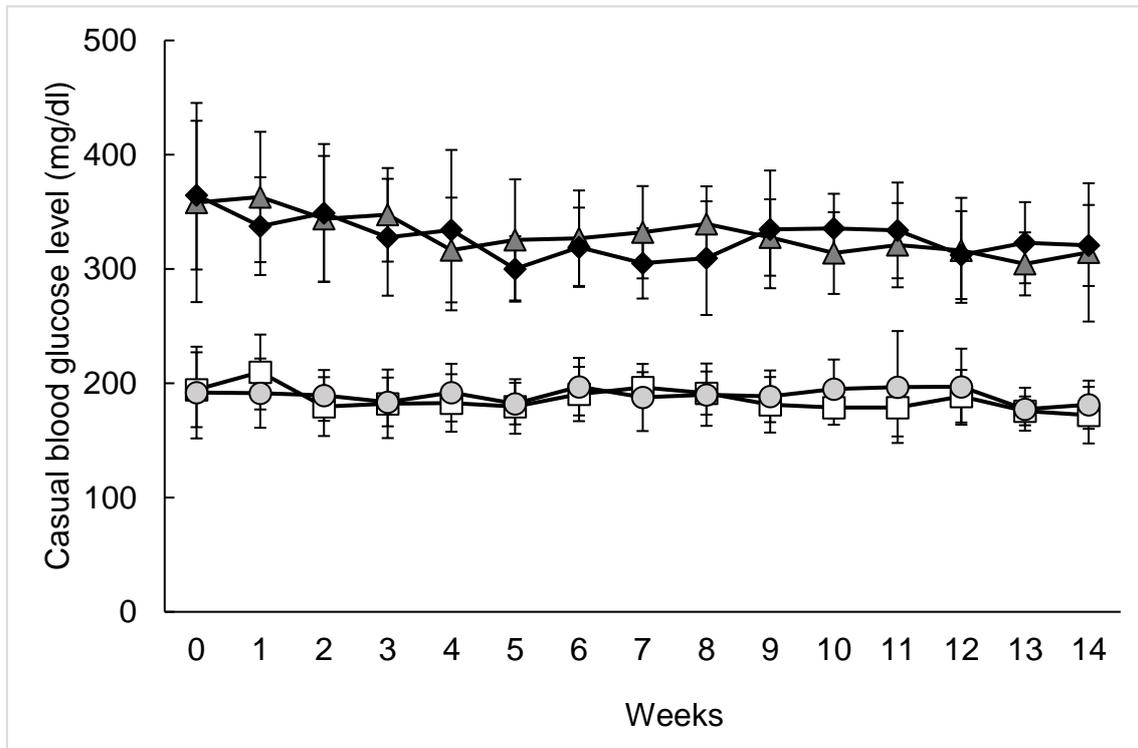


Figure 1 HSTD 投与下における随時血糖の推移

8 週齢まで通常食で摂餌し、 $Gck^{+/+}$ 、 $Gck^{+/-}$ マウスそれぞれに、HSTD を負荷した。負荷開始時点より毎週同一の摂餌状態の条件下で各マウスの血糖を測定した。

$Gck^{+/+}$ NC 群 (n = 12) (□)、 $Gck^{+/+}$ HSTD 群 (n = 14) (●)、

$Gck^{+/-}$ NC 群 (n = 13) (▲)、 $Gck^{+/-}$ HSTD 群 (n = 12) (◆) (平均 ± SD)。

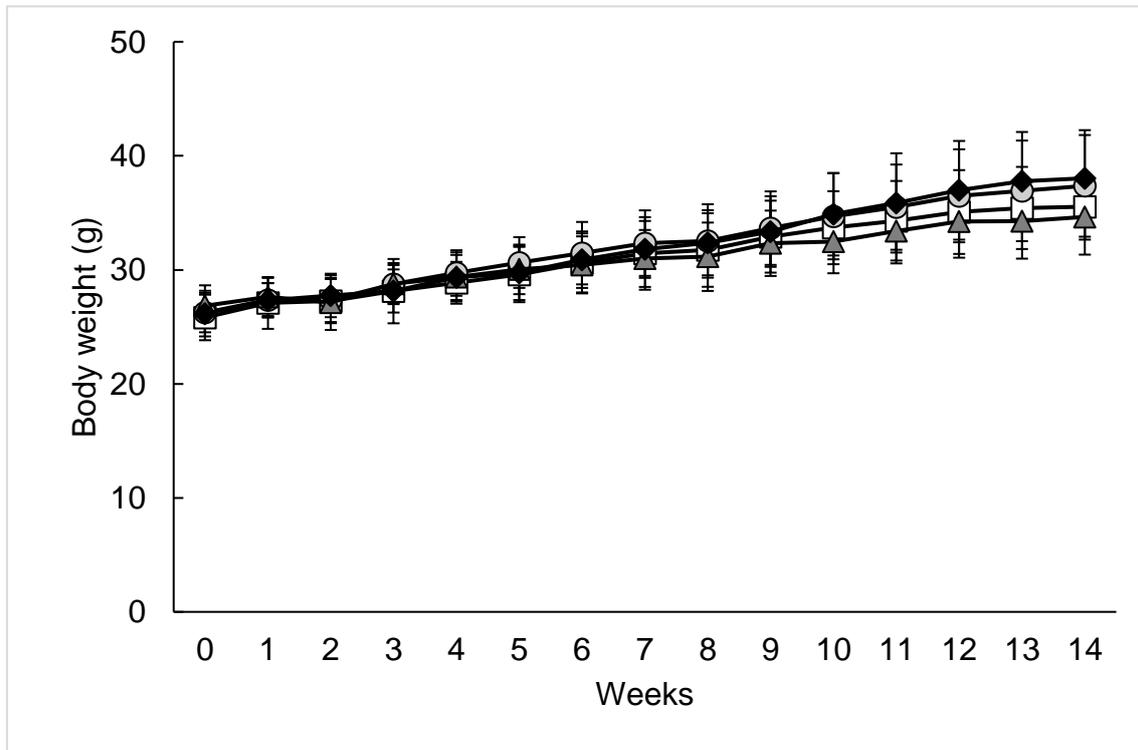


Figure 2 HSTDによる体重の推移

8週齢まで通常食で摂餌し、 $Gck^{+/+}$ 、 $Gck^{+/-}$ マウスそれぞれに、通常食およびHSTDを負荷した。負荷開始時点より毎週同一条件下で各マウスの体重を測定した。

$Gck^{+/+}$ NC群 (n = 12) (□)、 $Gck^{+/+}$ HSTD群 (n = 14) (○)、

$Gck^{+/-}$ NC群 (n = 13) (▲)、 $Gck^{+/-}$ HSTD群 (n = 12) (◆) (平均 ± SD)。

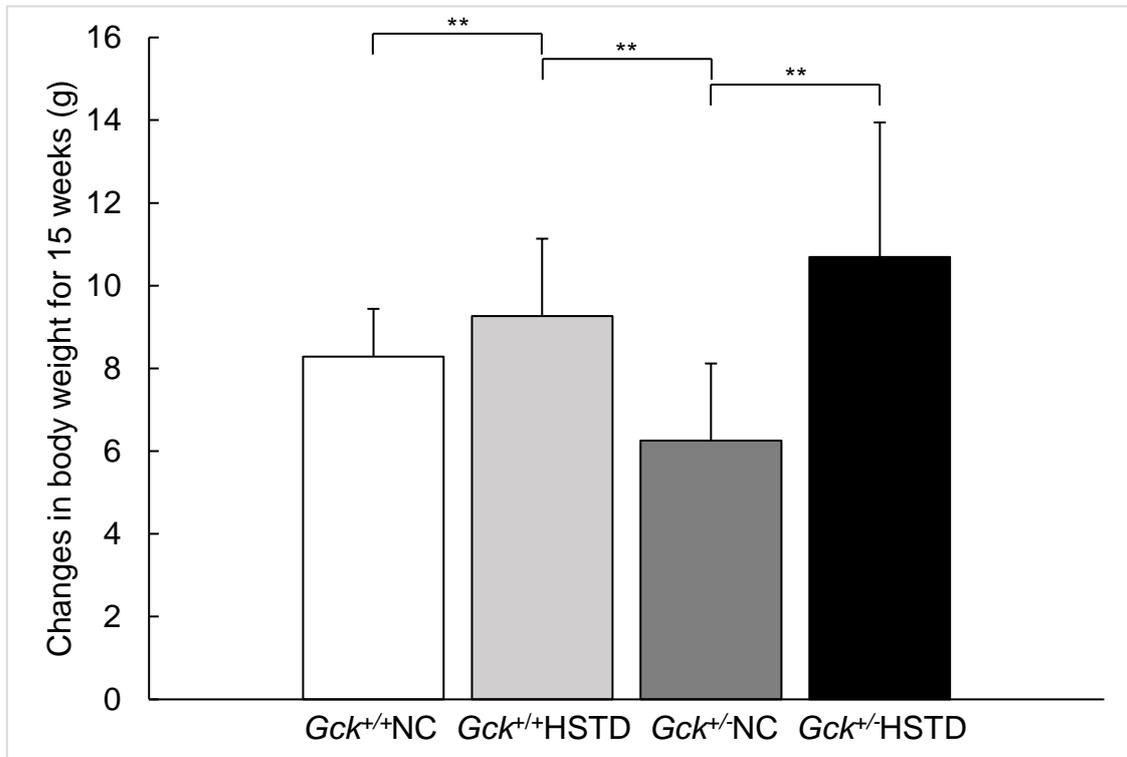


Figure 3 HSTDによる体重変化

Figure 2と同様の測定方法による各マウスの体重について、負荷開始時点から負荷15週間までの体重の変化を比較した。

Gck^{+/+}NC群(n = 12) (□)、*Gck*^{+/+}HSTD群(n = 14) (▤)、

Gck^{+/-}NC群(n = 13) (▥)、*Gck*^{+/-}HSTD群(n = 13) (■) (平均 ± SD)。

統計には分散分析を用い、事後比較としてボンフェローニ法を用いた。

(**p < 0.01)

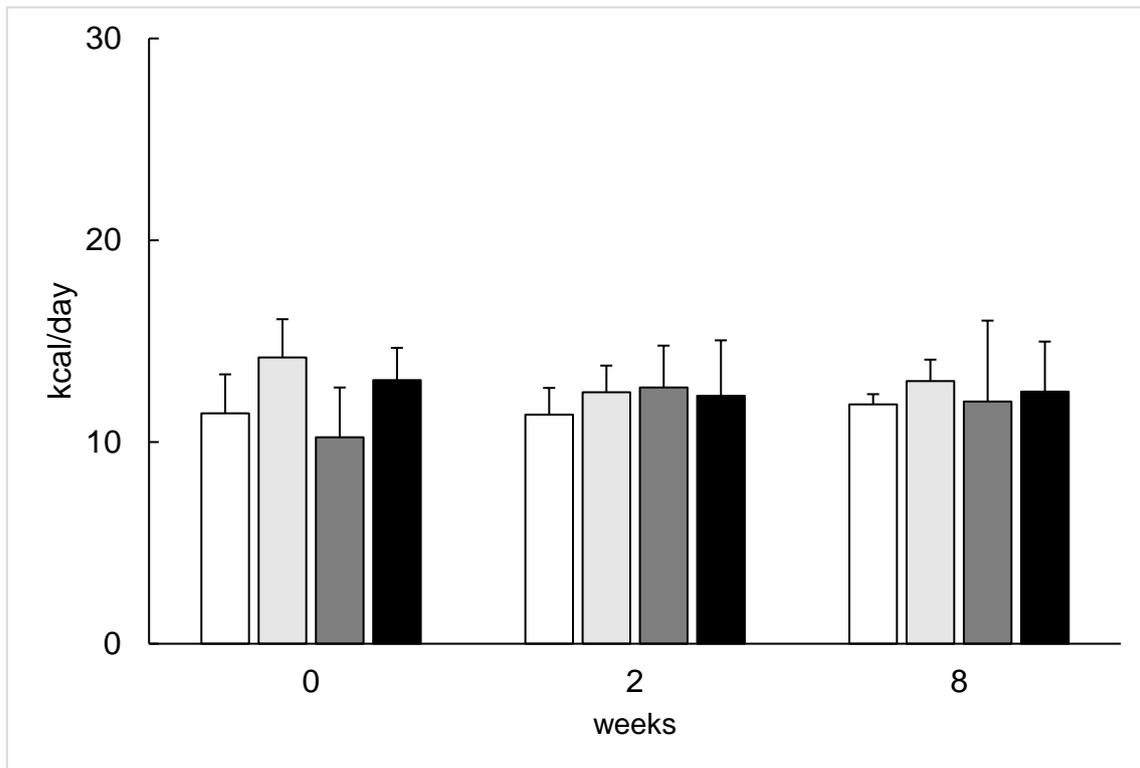


Figure 4 HSTD における摂餌量の推移

HSTD の負荷を開始した 8 週齢時より、ケージ交換時より配置した給餌器内の餌について設置前と設置後 48 時間の餌の量を測定し、1 日ごとの各マウスの摂餌量を測定した。

Gck^{+/+}NC 群 (n = 8) (□)、*Gck*^{+/+}HSTD 群 (n = 8) (◻)、

Gck^{+/-}NC 群 (n = 8) (◼)、*Gck*^{+/-}HSTD 群 (n = 8) (■) (平均 ± SD)。

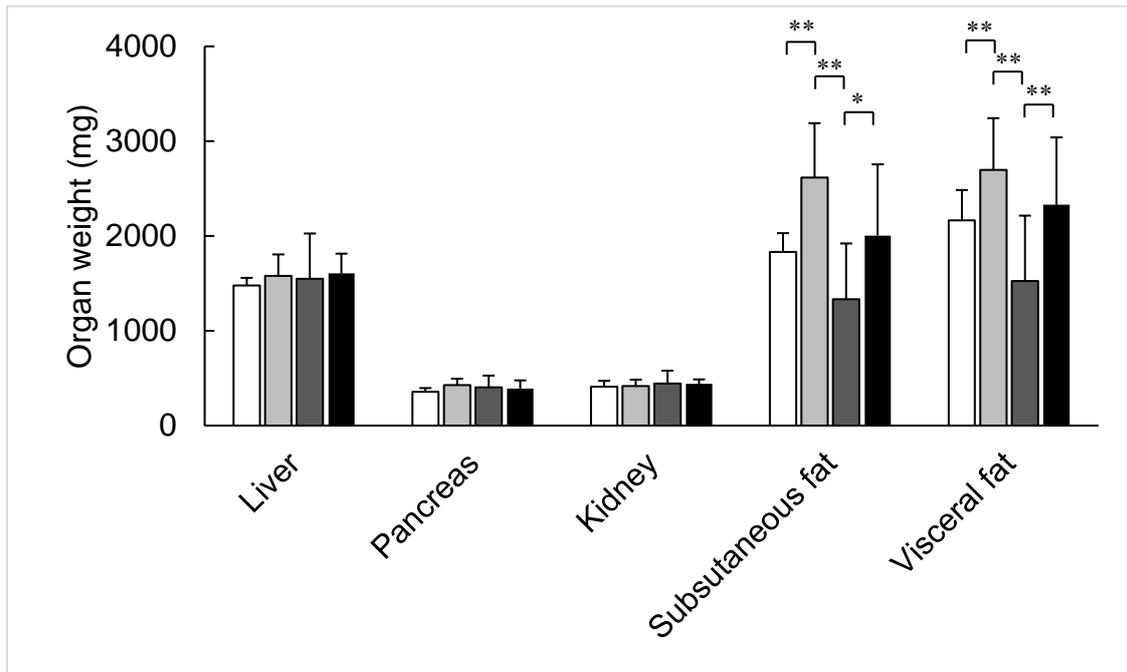


Figure 5 HSTDによる組織重量の変化

負荷後15週の解剖時に組織重量を測定した。

Gck^{+/+}NC群 (n = 12) (□)、*Gck*^{+/+}HSTD群 (n = 14) (▨)、

Gck^{-/-}NC群 (n = 13) (■)、*Gck*^{-/-}HSTD群 (n = 13) (■) (平均 ± SD)。

統計には分散分析を用い、事後比較としてボンフェローニ法を用いた。(*p < 0.05, **p < 0.01)

6.2 HSTD による耐糖能変化の検討

各群のマウスに対して、ITT の結果を Figure 6、7 に、OGTT の結果を Figure 8、9 に記載した。OGTT の際の血清インスリン値を Figure 10 に記載した。ITT、OGTT の結果では、餌によるインスリン感受性、耐糖能の差はなかった。血清インスリン値については、空腹時の比較では差は認められなかったが、糖負荷後 15 分後の比較では、 $Gck^{+/+}$ HSTD 群は $Gck^{+/+}$ NC 群、 $Gck^{+/-}$ HSTD 群と比較して有意に高値であった。

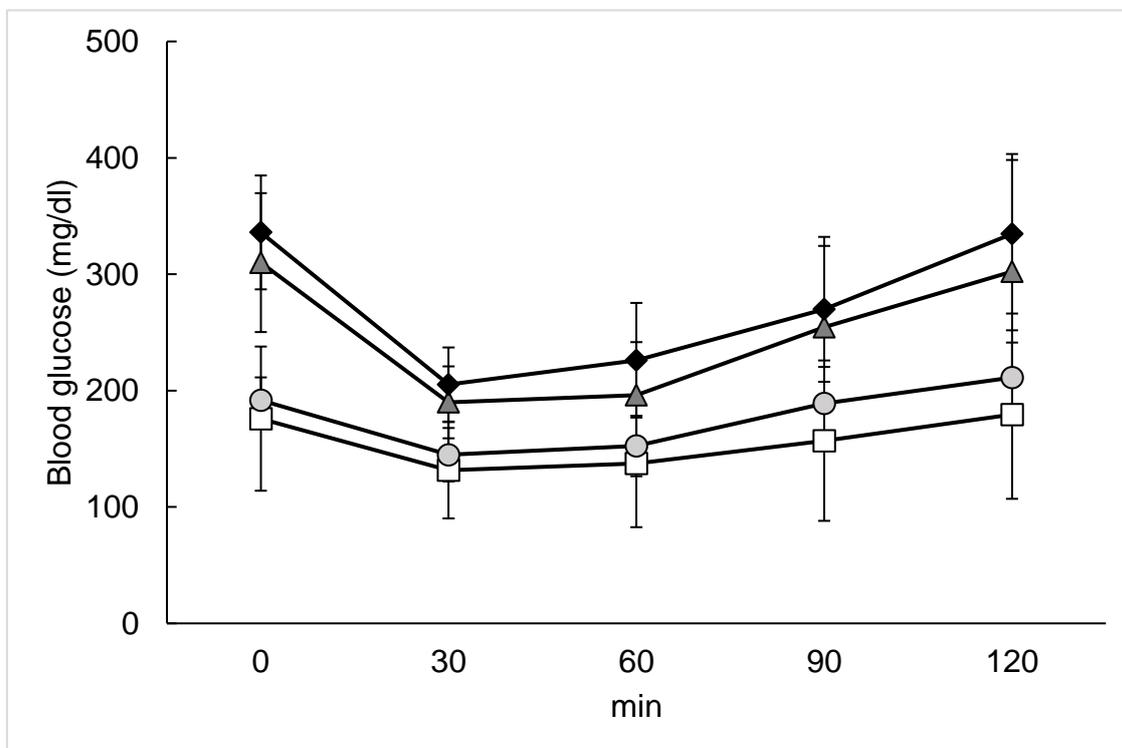


Figure 6 ITT 施行時の血糖の変化

負荷 14 週目の自由摂食下でのインスリン負荷 (0.75 U/kg) による血糖の絶対値の推移を記載した。

Gck^{+/+}NC 群 (n = 12) (□)、*Gck*^{+/+}HSTD 群 (n = 14) (○)、

Gck^{-/-}NC 群 (n = 13) (△)、*Gck*^{-/-}HSTD 群 (n = 12) (◆) (平均 ± SD)。

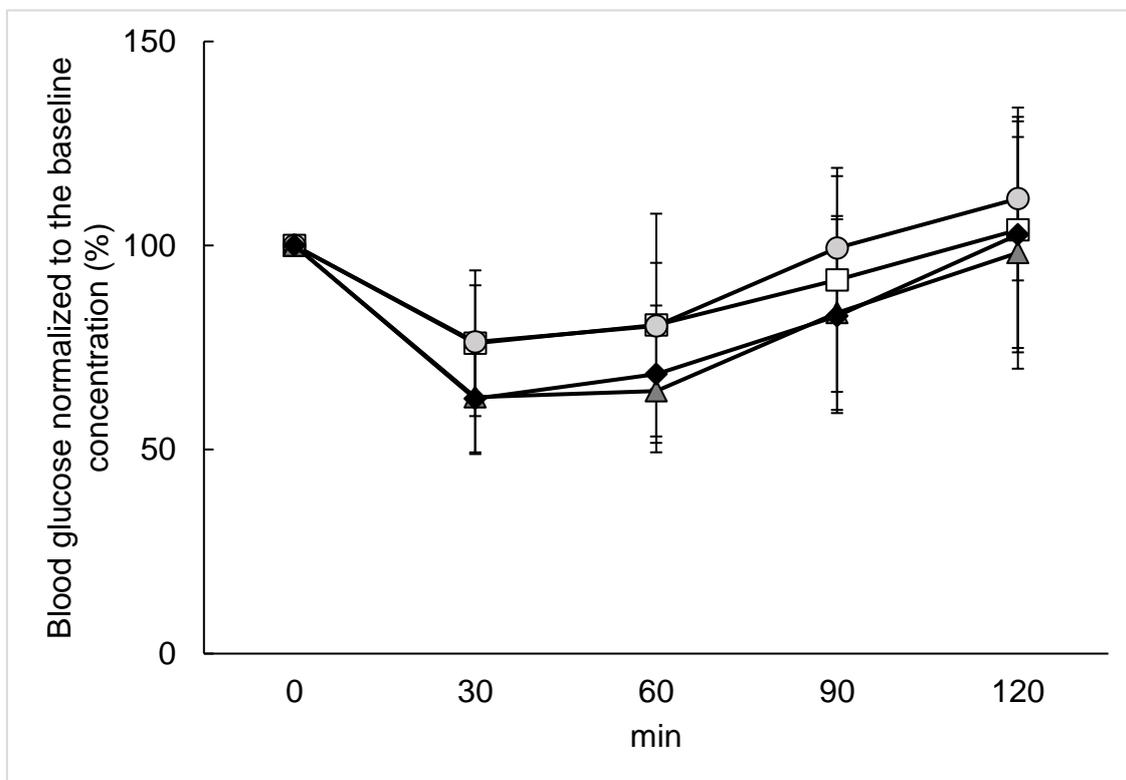


Figure 7 ITT 施行時の血糖の相対的な変化

負荷 14 週目の自由摂食下でのインスリン負荷 (0.75 U/kg) による血糖の推移を負荷前値の血糖を 100%として算出した。

Gck^{+/+}NC 群 (n = 12) (□)、*Gck*^{+/+}HSTD 群 (n = 14) (○)、

Gck^{+/-}NC 群 (n = 13) (△)、*Gck*^{+/-}HSTD 群 (n = 12) (◆) (平均 ± SD)。

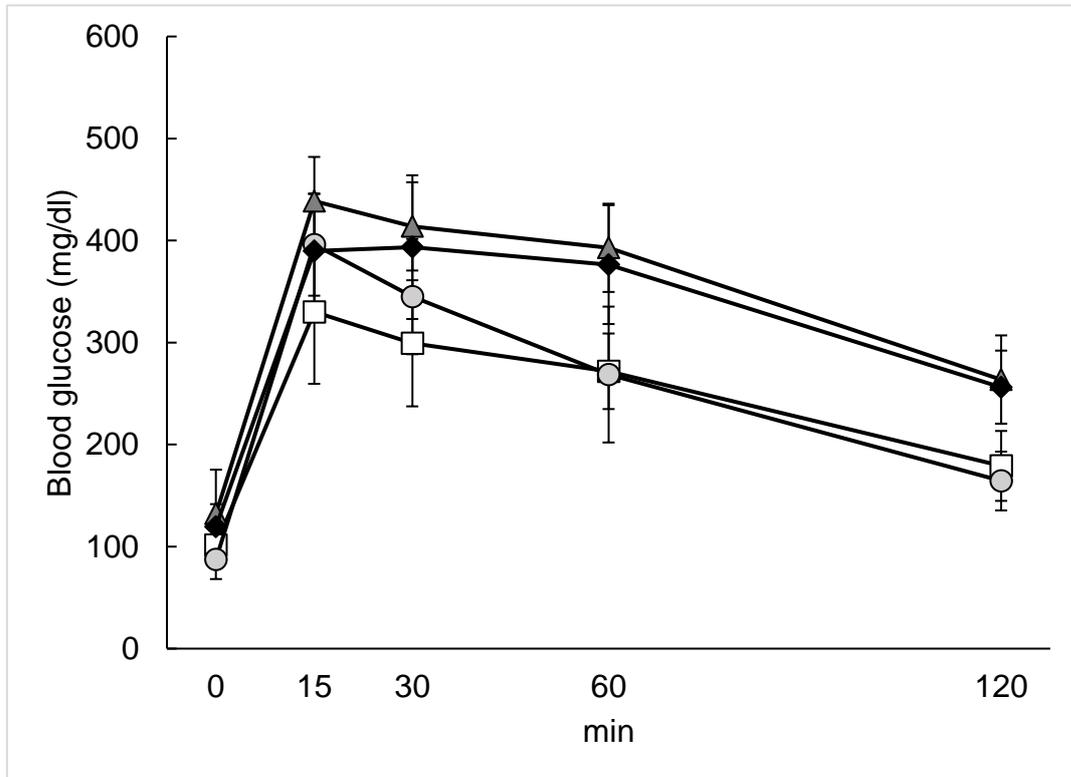


Figure 8. 経口ブドウ糖負荷試験(OGTT)時の血糖値の推移
 負荷 14 週目の 16 時間絶食下の経口ブドウ糖負荷 (1.5 mg/g) による血糖の
 絶対値の推移を記載した。

Gck^{+/+}NC 群 (n = 12) (□)、*Gck*^{+/+}HSTD 群 (n = 14) (○)、
Gck^{+/-}NC 群 (n = 13) (△)、*Gck*^{+/-}HSTD 群 (n = 12) (◆) (平均 ± SD)。

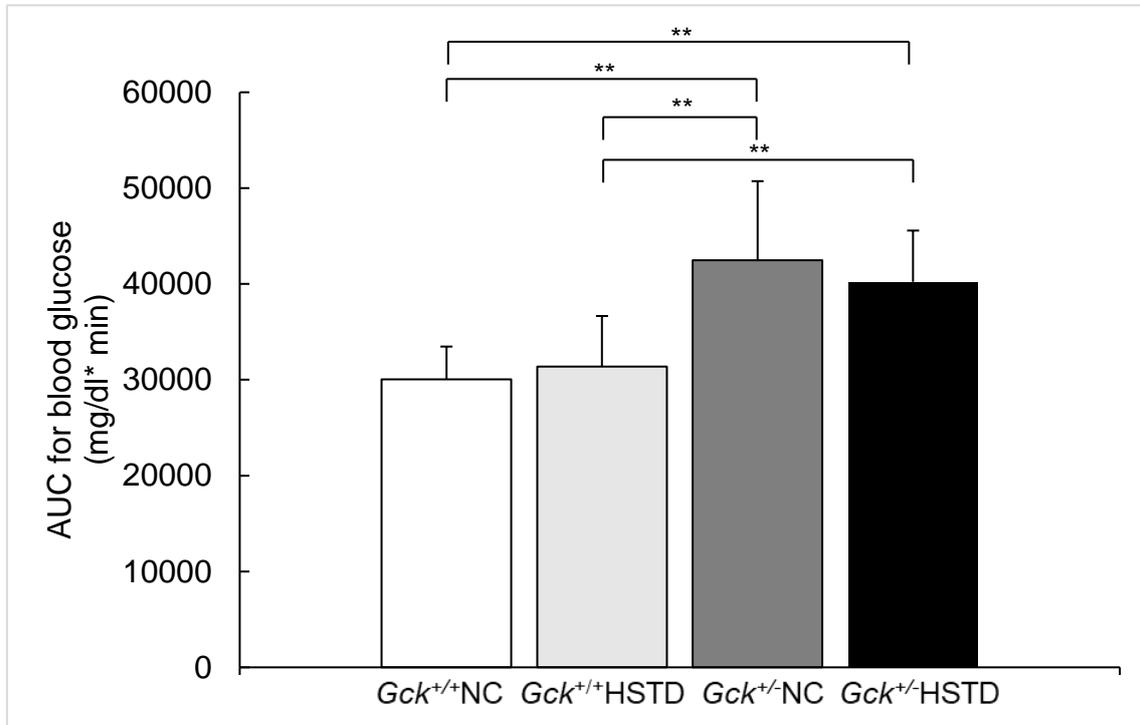


Figure 9. 経口ブドウ糖負荷試験(OGTT)時の血糖曲線下面積
負荷 14 週目の 16 時間絶食下の経口ブドウ糖負荷 (1.5 mg/g) による血糖下
面積を算出した。

Gck^{+/+}NC 群 (n = 12) (□)、*Gck*^{+/+}HSTD 群 (n = 14) (▒)、

Gck^{+/-}NC 群 (n = 13) (■)、*Gck*^{+/-}HSTD 群 (n = 12) (■) (平均 ± SD)。

統計には分散分析を用い、事後比較としてボンフェローニ法を用いた。

(**p < 0.01)

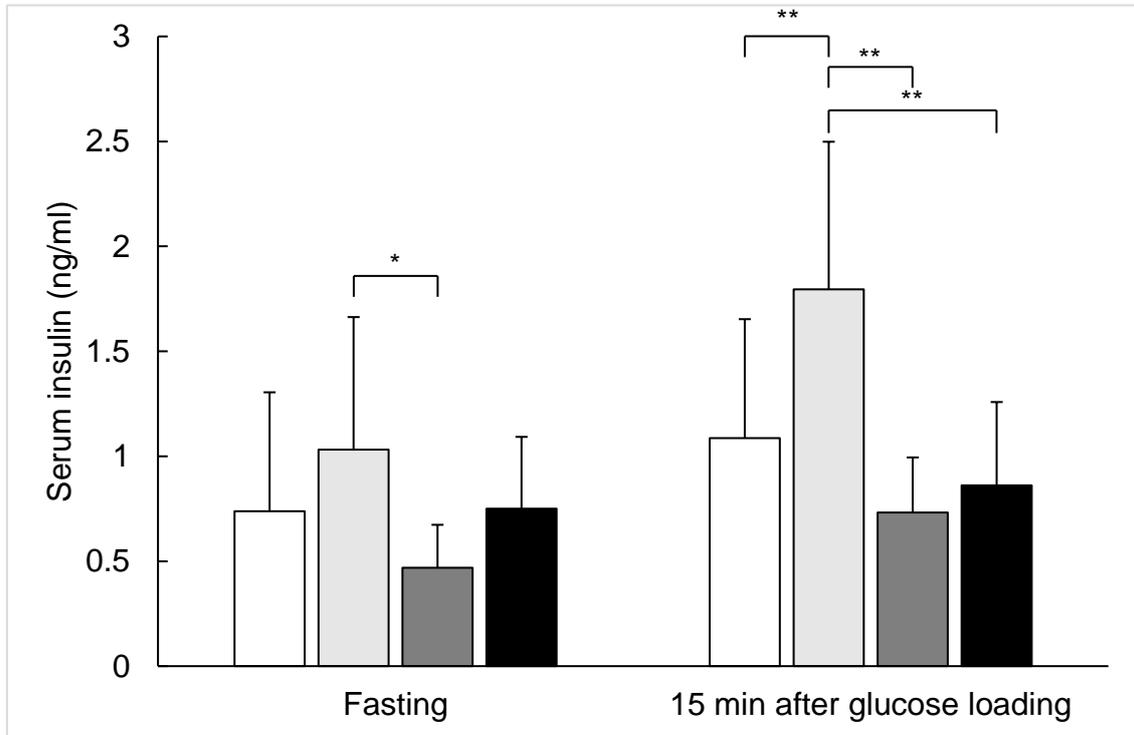


Figure 10. ブドウ糖負荷時の血清インスリン濃度

負荷 14 週目の 16 時間絶食下の経口ブドウ糖負荷 (1.5 mg/g) 施行前後の血清インスリン濃度を比較した

Gck^{+/+}NC 群 (n = 12) (□)、*Gck*^{+/+}HSTD 群 (n = 14) (◻)、

Gck^{-/-}NC 群 (n = 13) (◼)、*Gck*^{-/-}HSTD 群 (n = 13) (■) (平均 ± SD)。

統計には分散分析を用い、事後比較としてボンフェローニ法を用いた。

(*p < 0.05, **p < 0.01)

6.3 膵β細胞の形態と膵β細胞量の比較

負荷 15 週後の膵β細胞の形態、細胞量を比較した。*Gck*^{+/+}HSTD 群は、*Gck*^{+/+}NC 群と比較して有意に膵β細胞量は増大していた (Figure 11、12)。

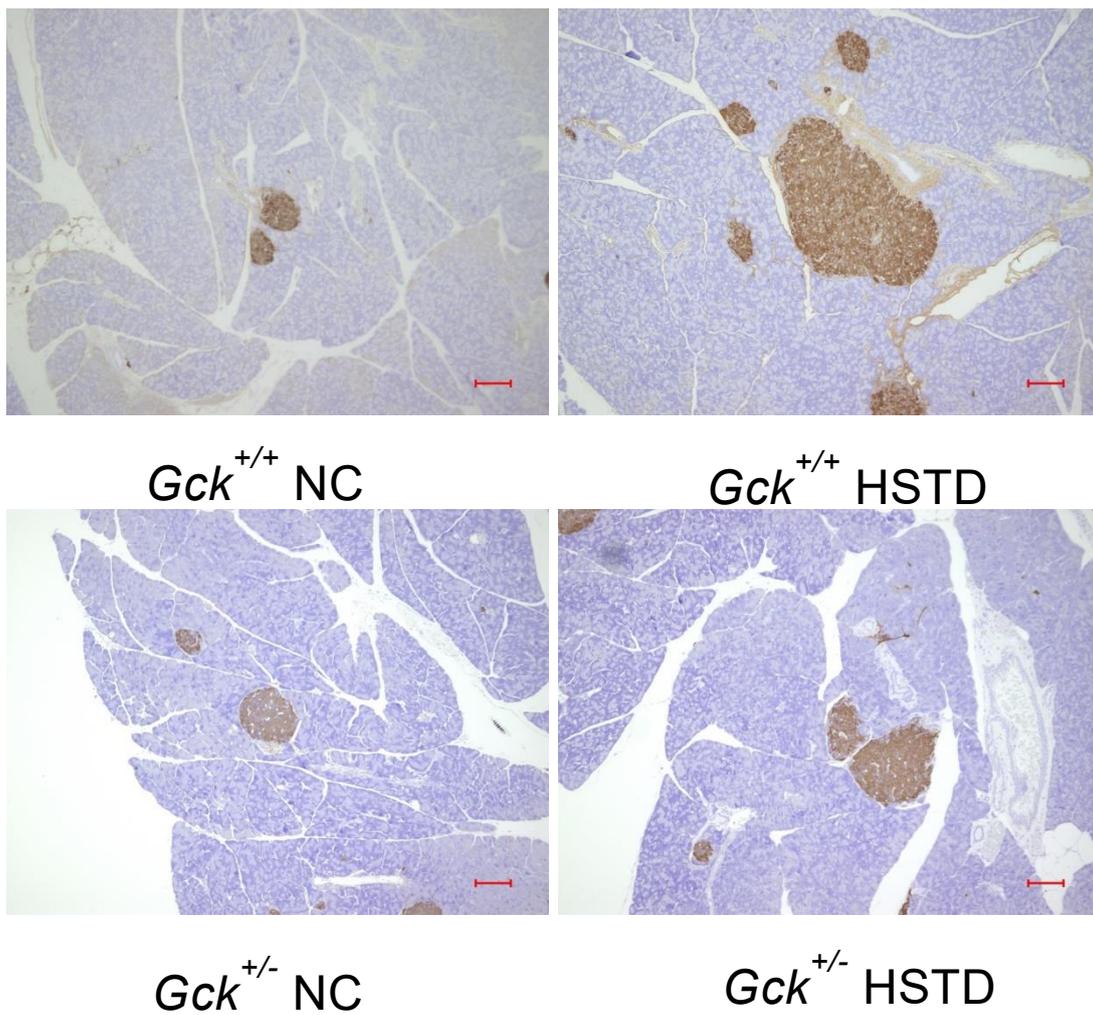


Figure 11. 膵β細胞の免疫組織学的染色

負荷後 15 週の各群のマウスの膵組織切片をインスリン抗体にて酵素抗体法で染色し、ヘマトキシリンで対比染色を行った。赤色の線は 100 μ m を示している。

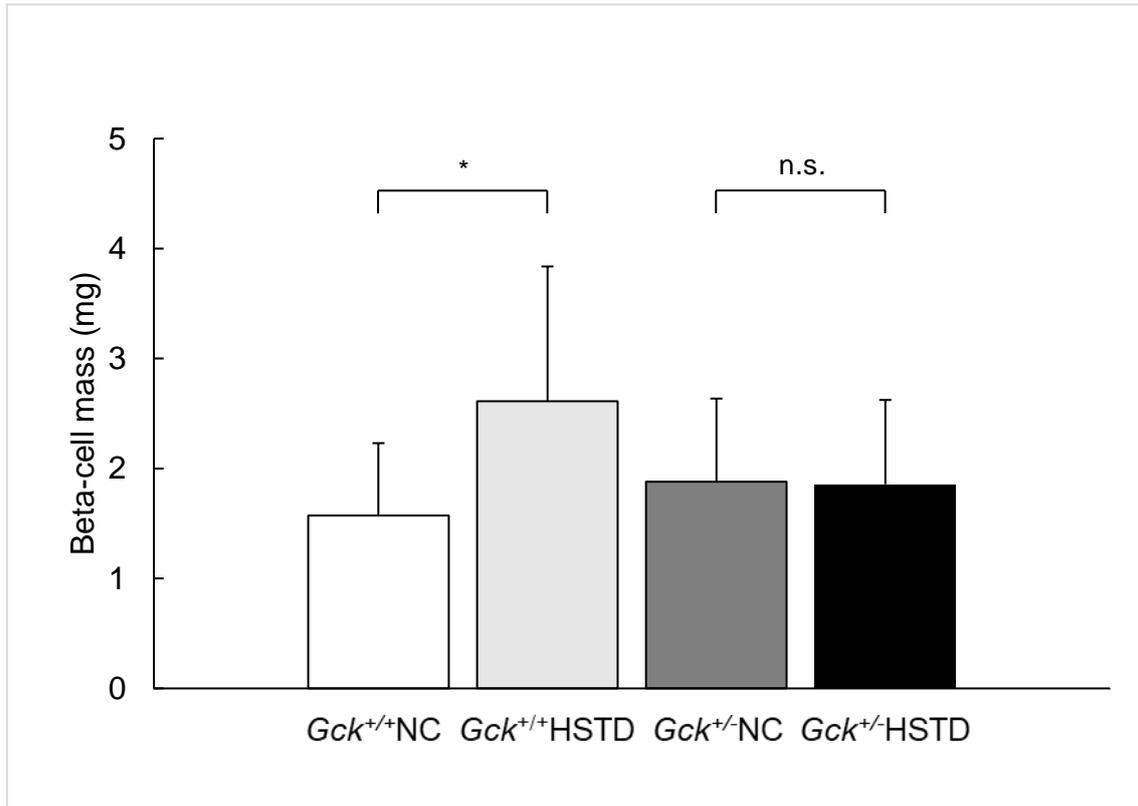


Figure 12. 膵β細胞量

負荷後 15 週の各群のマウスの膵組織の免疫組織学的染色を定量化した。

$Gck^{+/+}NC$ 群 (n = 12) (□)、 $Gck^{+/+}HSTD$ 群 (n = 14) (◻)、

$Gck^{+/-}NC$ 群 (n = 13) (■)、 $Gck^{+/-}HSTD$ 群 (n = 13) (■) (平均 ± SD)。

統計には分散分析を用い、事後比較としてボンフェローニ法を用いた。

(*p < 0.05)

6.4 膵 β 細胞増殖能の検討

膵 β 細胞量の増加が確認されたため、次に膵 β 細胞の増殖能について検討を行った。免疫組織学的に、Ki67、BrdUの陽性細胞率を確認したが、いずれも有意な差を認めなかった(Figure 13、14)。

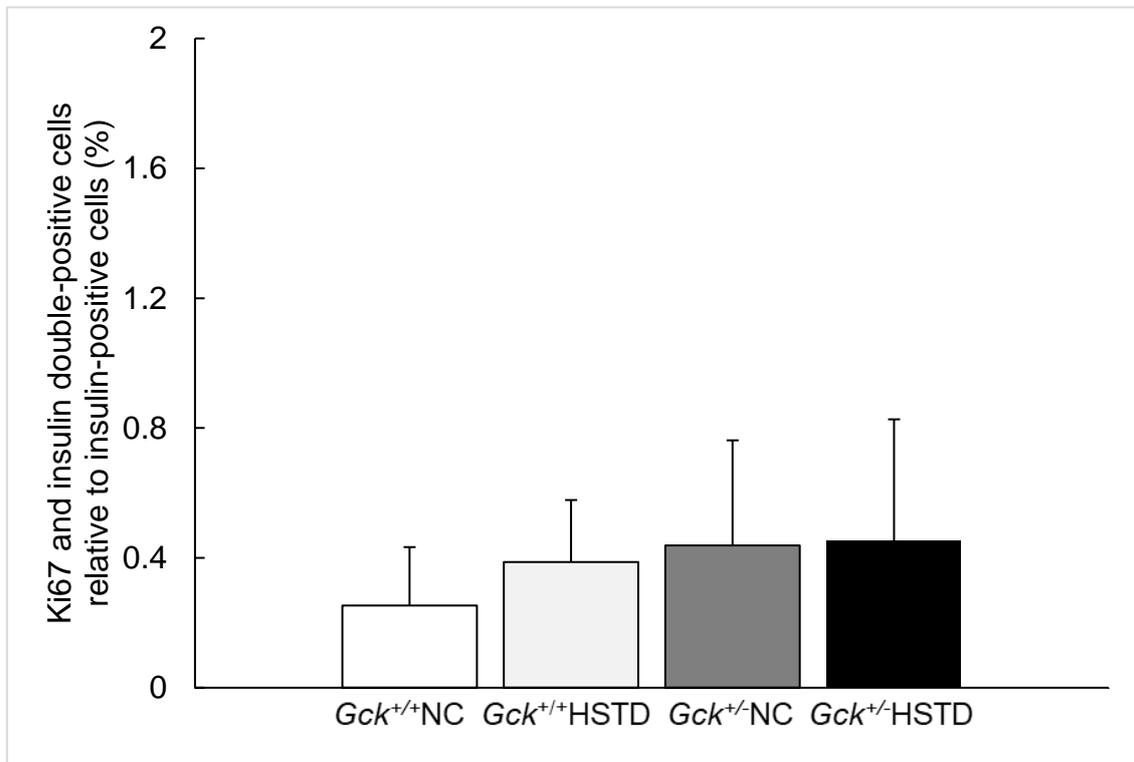


Figure 13. 膵β細胞におけるKi67陽性細胞率

膵β細胞におけるKi67陽性細胞率を計算した。

$Gck^{+/+}NC$ 群(n = 9) (□)、 $Gck^{+/+}HSTD$ 群(n = 10) (◻)、

$Gck^{+/-}NC$ 群(n = 10) (■)、 $Gck^{+/-}HSTD$ 群(n = 9) (■) (平均 ± SD)。

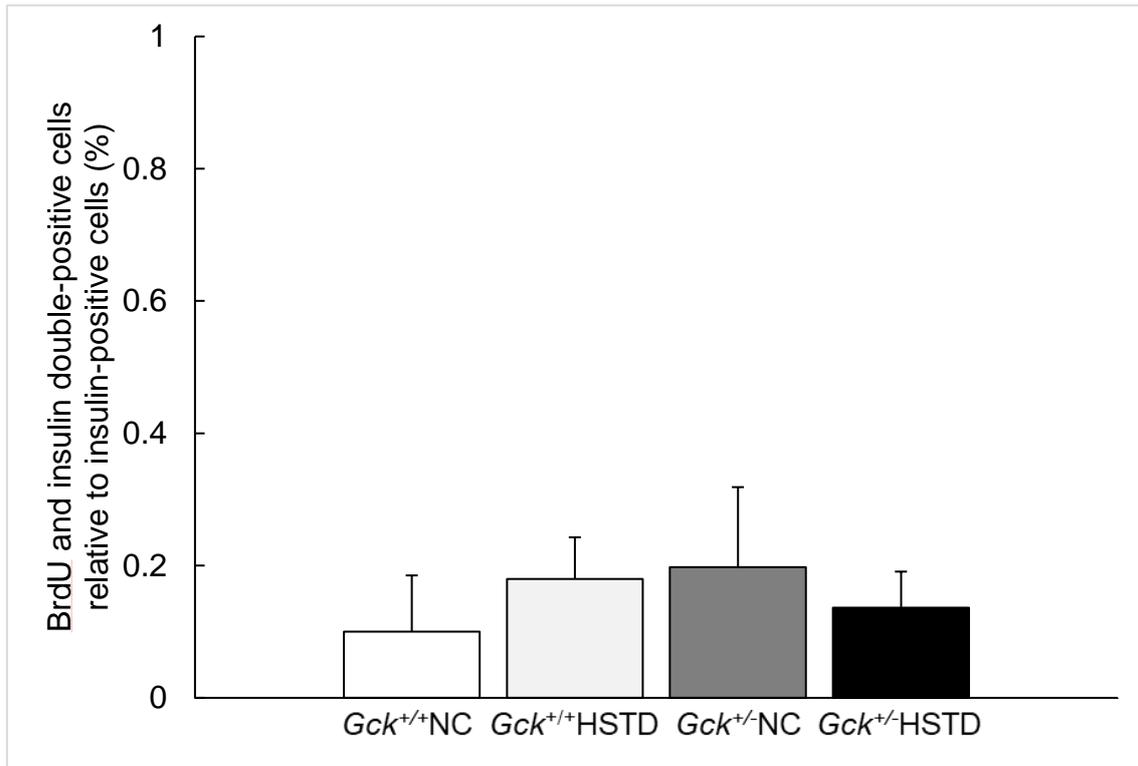


Figure 14. 膵β細胞における BrdU 陽性細胞率

膵β細胞における BrdU 陽性細胞率を計算した。

$Gck^{+/+}NC$ 群 (n = 12) (□)、 $Gck^{+/+}HSTD$ 群 (n = 14) (◻)、

$Gck^{+/-}NC$ 群 (n = 13) (■)、 $Gck^{+/-}HSTD$ 群 (n = 12) (■) (平均 ± SD)。

6.5 膝島における膝 β 細胞増殖関連因子の遺伝子発現量の検討

リアルタイム PCR 法を用いて、単離膝島における膝 β 細胞増殖関連因子の遺伝子発現の比較検討を行った。*Ki67*および *Irs2*の遺伝子発現は各群で有意な差を認めなかった (Figure 15、16)

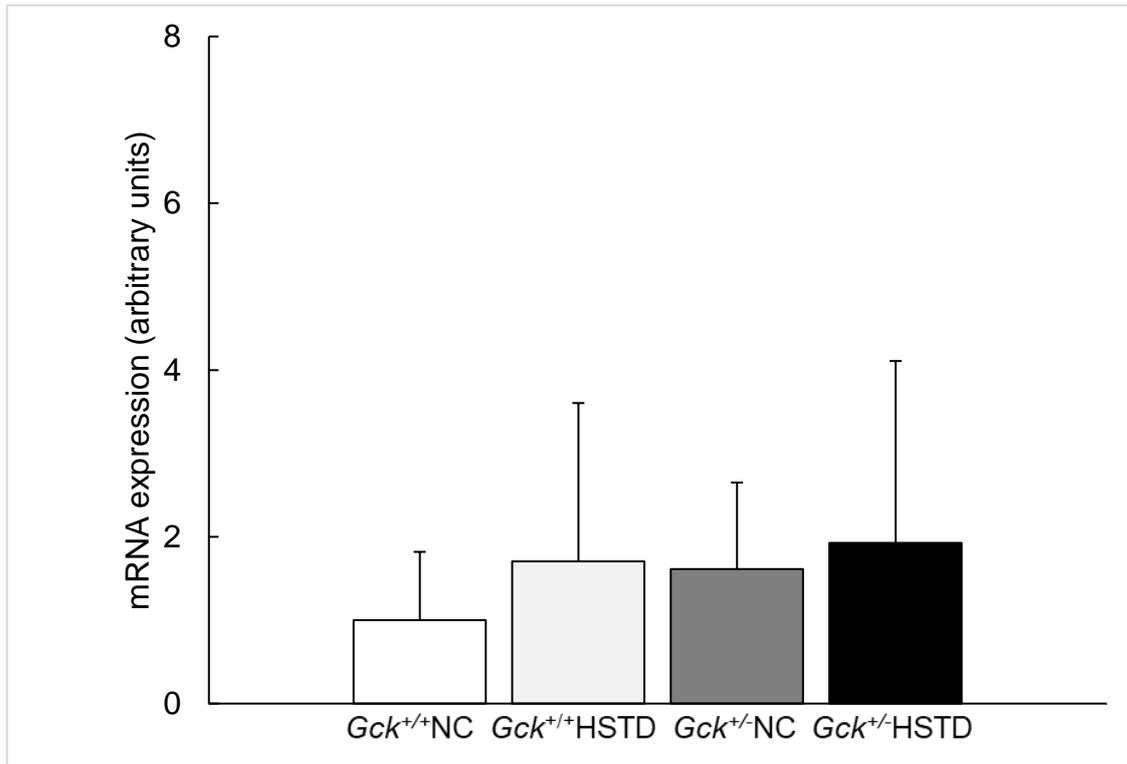


Figure 15. リアルタイム PCR 法を用いて単離膵島における *Ki67* mRNA の発現量を比較した。

$Gck^{+/+}NC$ 群 (n = 6) (□)、 $Gck^{+/+}HSTD$ 群 (n = 6) (◻)、 $Gck^{+/-}NC$ 群 (n = 6) (◼)、 $Gck^{+/-}HSTD$ 群 (n = 6) (■) (平均 ± SD)。

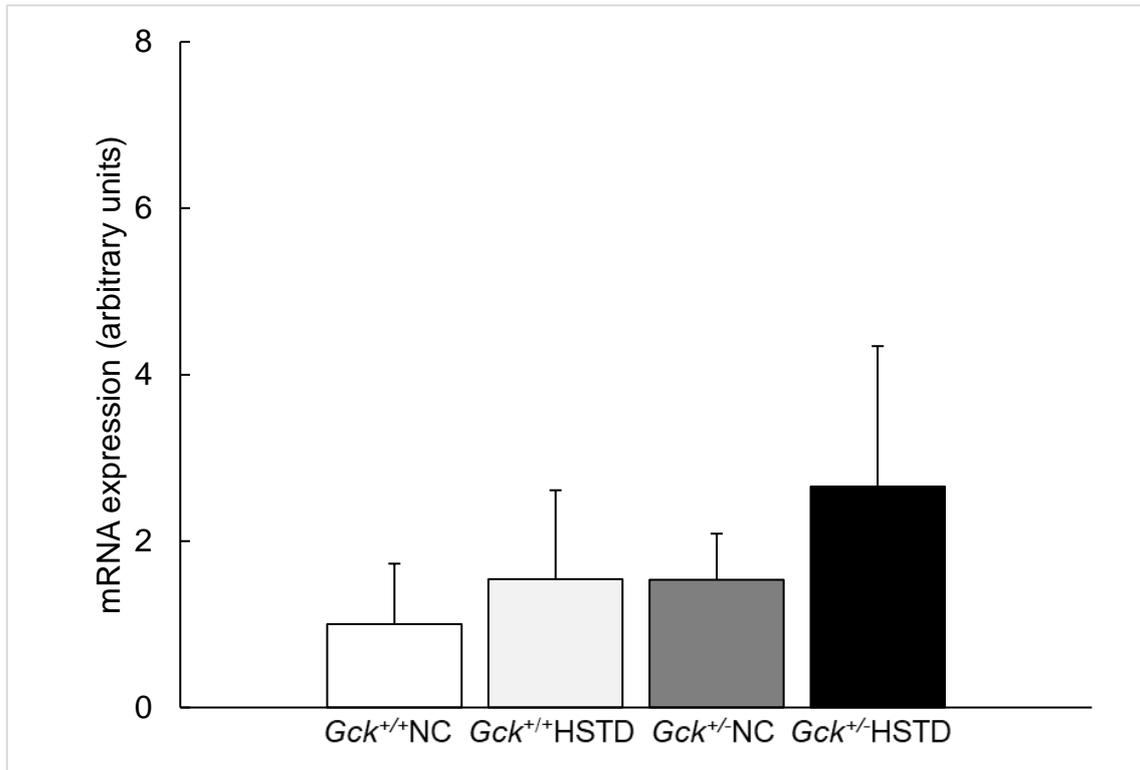


Figure 16. リアルタイム PCR 法を用いて単離膵島における *Irs2* mRNA の発現量を比較した。

$Gck^{+/+}NC$ 群 (n = 6) (□)、 $Gck^{+/+}HSTD$ 群 (n = 6) (◻)、 $Gck^{+/-}NC$ 群 (n = 6) (◼)、 $Gck^{+/-}HSTD$ 群 (n = 6) (■) (平均 ± SD)。

6.6 膵島における DNA マイクロアレイによる発現遺伝子変化の検索

膵β細胞量の調節に関与していると考えられる遺伝子発現に差がなかったため、負荷 15 週時点での遺伝子発現の変化を網羅的に確認するために DNA マイクロアレイを行った。22203 遺伝子について評価が行われた。2 群間の差を $p < 0.05$ かつ $\text{Fold change} > 2$ を有意として比較を行った。*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 (Figure 17、18)。4 群間で有意な変化が見られた遺伝子は 216 遺伝子であった。グルコース応答性インスリン分泌および膵β細胞量が *Gck*^{+/+}HSTD で増加したことを説明し得る変化を求めるため、4 群間での差がみられた 216 遺伝子の中で *Gck*^{+/+}HSTD とその他の 3 群との間で有意差を認める遺伝子群を抽出すると、*Gck*^{+/+}HSTD は他の 3 群に比し、*Aldh1a3*、*Slc17a9*、*Cthrc1*、*Pde10a* が増加しており、*Sult1c2*、*Vsn11*、*Mt2*、*Mt1* が減少していることが明らかになった (Figure 19)。

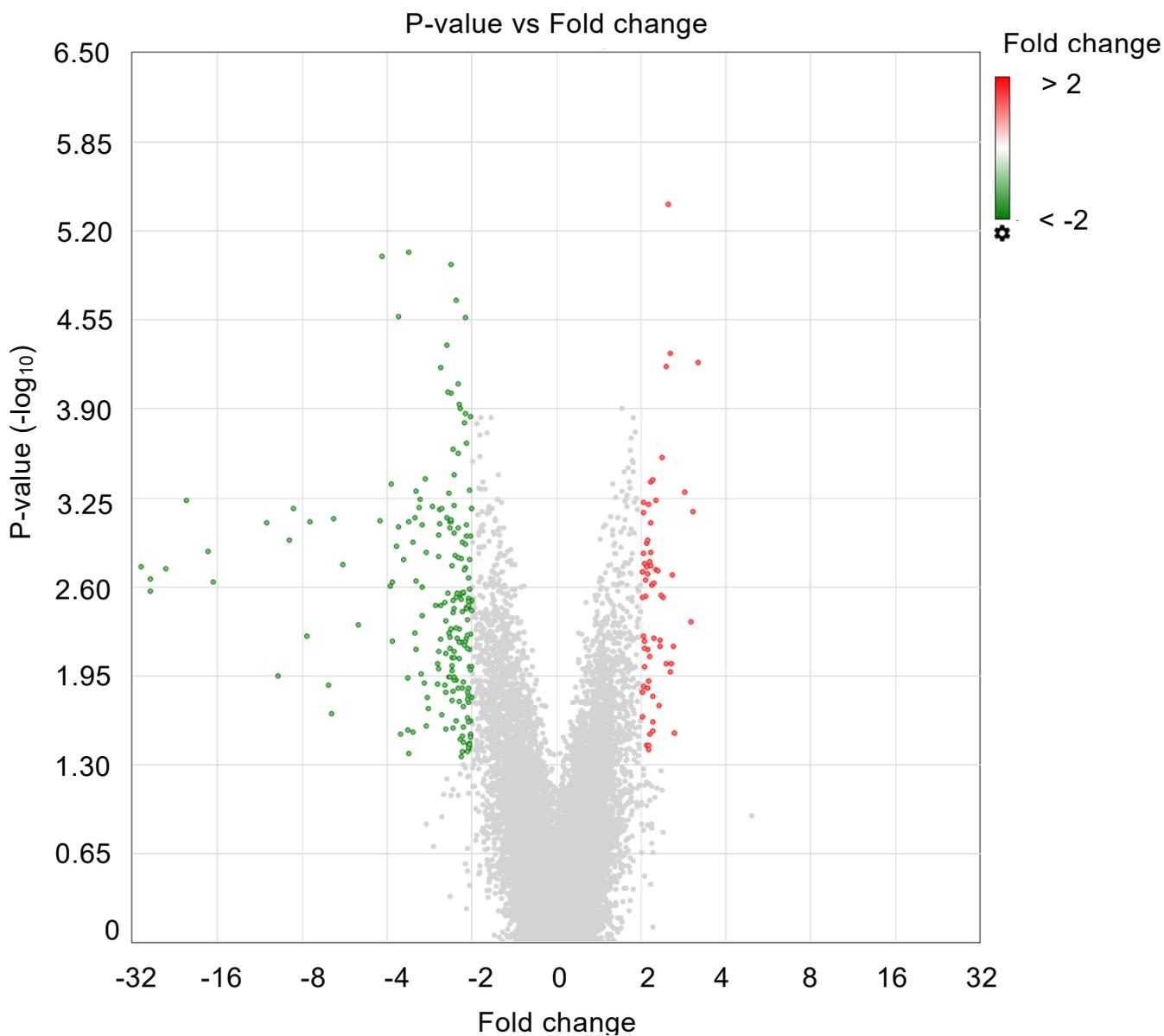


Figure 17. DNA マイクロアレイ法を用いて、 $Gck^{+/+}$ HSTD 群 (n = 3) と $Gck^{+/+}$ NC 群 (n = 3) との遺伝子発現を比較した

縦軸を P 値の自然対数の絶対値、横軸を Fold change としたグラフに各遺伝子をプロットした。62 遺伝子が有意に増加し、222 遺伝子が有意に減少していた。

0.05 \doteq $-\log_{10}1.30$ 、 $P < 0.05$ かつ Fold change > 2 (赤)、 $P < 0.05$ かつ Fold change < -2 (緑)

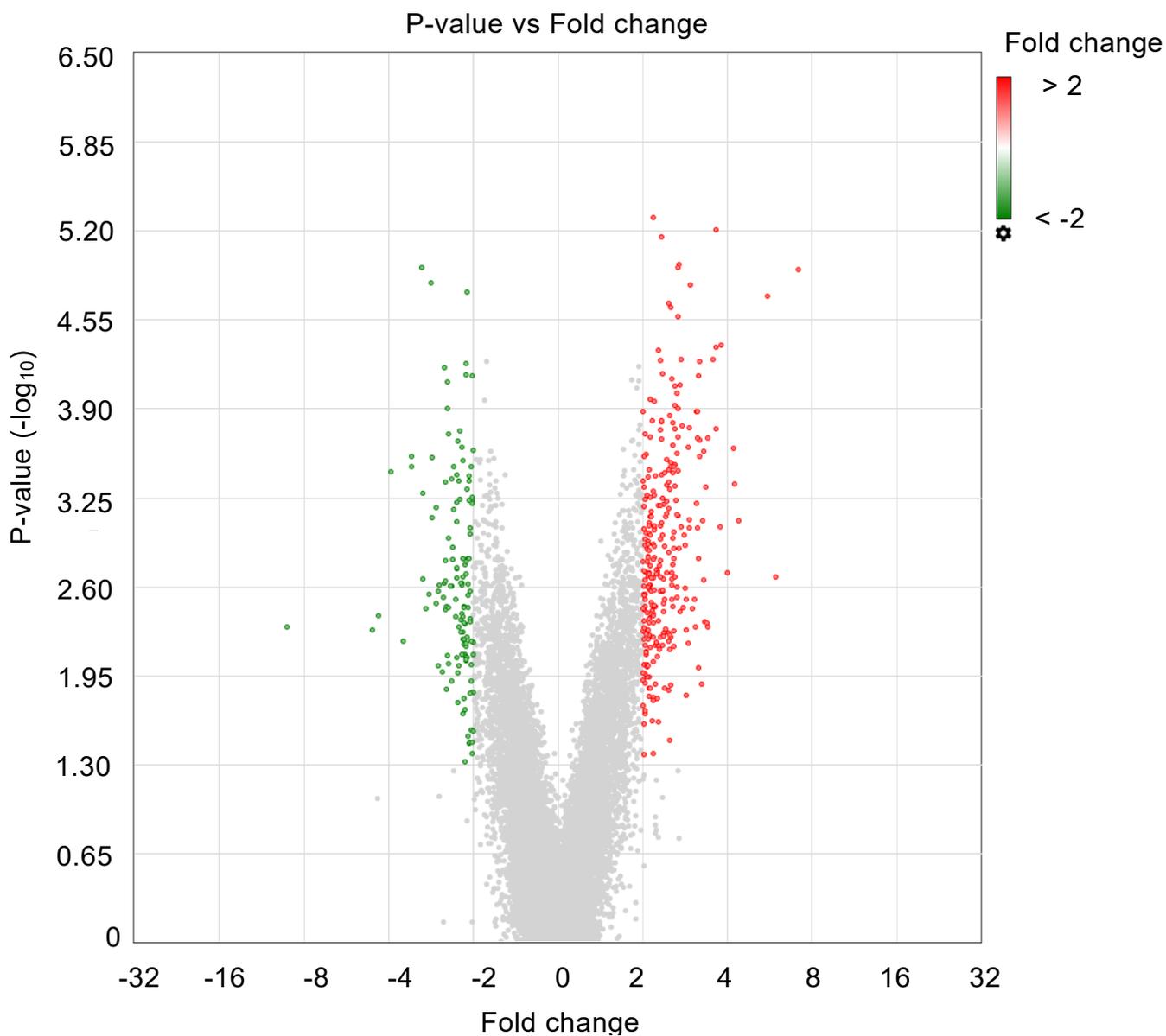


Figure 18. DNA マイクロアレイ法を用いて、 $Gck^{+/HSTD}$ 群 (n = 3) と $Gck^{+/NC}$ 群 (n = 3) との遺伝子発現を比較した。縦軸を P 値の自然対数の絶対値、横軸を Fold change としたグラフに各遺伝子をプロットした。284 遺伝子が有意に増加し、135 遺伝子が有意に減少していた。
 $0.05 \doteq -\log_{10}1.30$ 、 $P < 0.05$ かつ Fold change > 2 (赤)、 $P < 0.05$ かつ Fold change < -2 (緑)

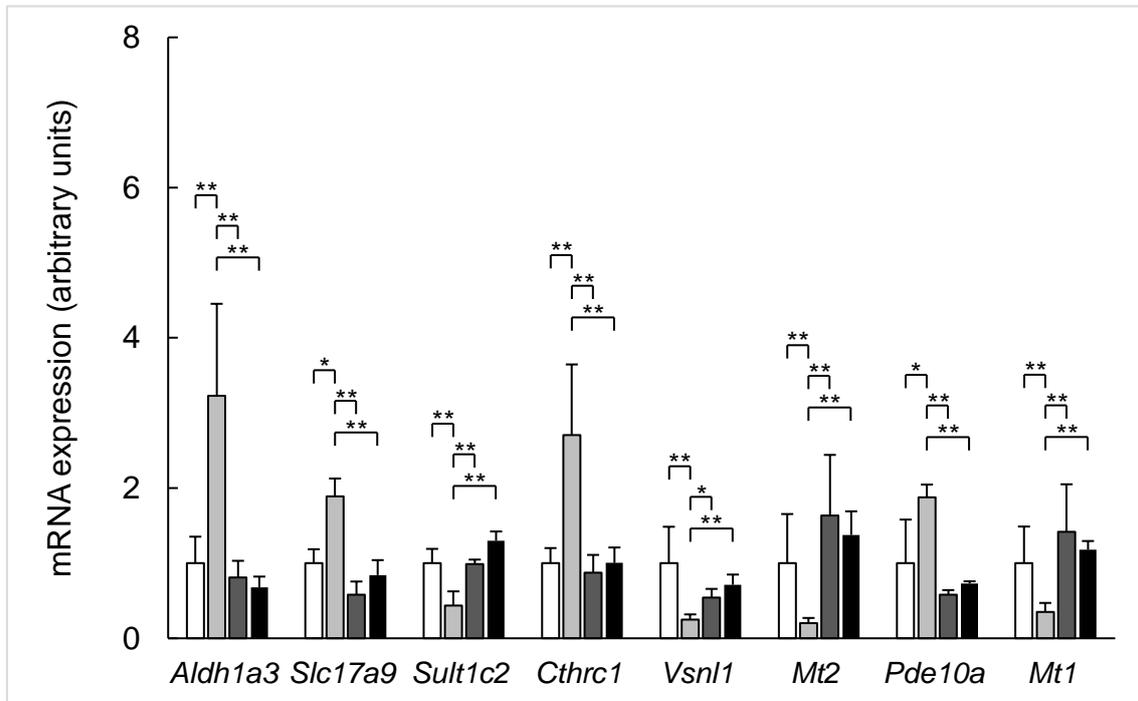


Figure 19. $Gck^{+/+}HSTD$ 群で有意な変化のあった遺伝子

FDR 補正後にも 4 群間で等分散性が棄却された遺伝子について、 $Gck^{+/+}HSTD$ 群と他の各 3 群と間で有意差があった遺伝子を抽出し列挙した。

$Gck^{+/+}NC$ 群 (n = 3) (□)、 $Gck^{+/+}HSTD$ 群 (n = 3) (◻)、

$Gck^{-/-}NC$ 群 (n = 3) (◼)、 $Gck^{-/-}HSTD$ 群 (n = 3) (◼) (平均 ± SD)。

統計には経験的ベイズ法を用い FDR 補正を行い、事後比較としてボンフェローニ法を用いた。(*p < 0.05, **p < 0.01)

7. 考察

既報では HSTD による膵 β 細胞増殖が示されており (Masuda et al., 2019; Murase et al., 2019)、その変化が KATP チャンネルの構成因子である Kir6.2 の欠損マウスでは消失することが示されている (Murase et al., 2019)。この結果は、膵 β 細胞における HSTD によりもたらされたグルコースシグナルの増強が Kir6.2 を介して膵 β 細胞増殖をきたすことを示唆するものと考えられる。グルコースシグナルはグルコキナーゼを介して解糖系を亢進させ、細胞内の ATP を増加させることで KATP チャンネルを閉鎖させる (Ferrer et al., 2011)。この仕組みは HSTD による膵 β 細胞増殖機構の一部であると推定される。20 週の高脂肪食負荷により野生型マウスでは通常食との比較で膵 β 細胞量が有意に増加し、同時に IRS2 の発現も有意に増加するが、*Gck*^{+/-}マウスではそれらの変化が認められず、加えて IRS2 欠損マウスで同様な検討を行っても、膵 β 細胞量の増加がみられなかったことや、*Gck*^{+/-}マウスに IRS2 を膵 β 細胞で過剰発現したマウスでは膵 β 細胞量の増加が認められたという報告 (Terauchi et al., 2007) がある。

IRS2 は、インスリンレセプターやインスリン様成長因子レセプターにおけるチロシンキナーゼを構成する主要な分子であるが、膵 β 細胞の増加や維持に必須であることも別な報告 (Kubota et al., 2000; Withers et al., 1998) で示されており、これらの知見から IRS2 はグルコキナーゼと同様に高脂肪食による膵 β 細胞増殖に重要な働きを示すと考えられる。

しかしながら、本研究では HSTD による膵 β 細胞の増殖や *Irs2* の発現量の変化は認められなかった (Figure 13、14、15、16)。これらのデータは、野生型マウスに HSTD を 22 週負荷した群において、野生型マウスに NC を同様に負荷した群との比較で膵 β 細胞の増殖や *Irs2* に差を認めなかった既報 (Murase et al., 2019) と一致した結果であった。

ゆえに、*Gck*^{+/+}において HSTD 投与で膵 β 細胞量が増加し、*Gck*^{+/-}で増加しなかった理由として IRS2 を介した膵 β 細胞増殖とは独立した機序が存在する可能性が考えられた。

DNA マイクロアレイの解析では、標本数が少ないという点でその結果の解釈には慎重になるべきではあるが、*Mt1* と *Mt2* の発現レベルがほかの 3 群と比較して、*Gck*^{+/-}HSTD 群で有意に低かったことが示された (Figure 19)。

メタロチオネイン (MTs) は主に金属イオンの恒常性に関与する分子として知られている。その膵β細胞における役割について Bensellam らは、Mt1 および Mt2 の発現が高脂肪食や ob/ob マウスなどの膵β細胞の代償性過形成のモデルでは抑制され、ノックアウトマウスおよびトランスジェニックマウスでの検討から MT1 が膵β細胞においてはインスリン分泌の負の調節因子である (Bensellam et al., 2019) ことが示されている。これらの知見から、*Gck^{+/+}*では HSTD 群でインスリン分泌の増加し、*Gck^{+/-}*ではそういった変化が起きなかったという本研究の結果の機序として説明可能な仮説となりうる。しかし Mt1-Mt2 ダブルノックアウトマウスにおいても膵β細胞量の変化は確認されず (Bensellam et al., 2019)、膵β細胞量の変化について説明するにはいたらなかった。

もう一つの仮説としては、膵β細胞増殖が本検討で比較を行った時期よりも早期におこり、本研究の観察時点では HSTD による膵β細胞増殖を認めなかったという可能性が考えられる。Masuda らは 5 週という短期間の HSTD 負荷で同期間の NC 負荷と比較して、単離膵島での *Irs2* の遺伝子発現が増加した (Masuda et al., 2019) ことを示している。グルコキナーゼ活性化薬の投与が、IRS2 の発現を亢進させる (Nakamura et al. 2009) ことが示されているが、グルコキナーゼ活性化薬の投与はその初期に膵β細胞の増殖亢進作用があるものの、その作用は長期間持続しないことが示されている

(Nakamura et al. 2009; Nakamura et al., 2012; Nakamura et al., 2015; Tornovsky-Babeay et al., 2014)。これらの事象は、本研究の膵β細胞の増殖は *Gck^{+/+}*においては HSTD によるグルコース刺激の初期に限っておこり、観察時点では増殖時の変化が認められず、*Gck^{+/-}*ではそのような膵β細胞量増加の作用そのものが消失していると推定することができる。

本研究のマイクロアレイ解析の結果では、あくまでこの点も標本数の少ないマイクロアレイ法の結果に基づくが、*Aldehyde dehydrogenase 1 family class A3* は *Aldehyde dehydrogenase 1 family class A3* にコードされ、同遺伝子は、β細胞の脱分化の指標としてみなされている (Cinti et al., 2016; Kim-Muller et al., 2016) ことから、HSTD は膵β細胞量を増やす一方、膵β細胞機能低下を進行させてしまう側面もあるかもしれない。

本研究では *Gck^{+/+}*においては高炭水化物食が膵β細胞量の増加をもたらし、*Gck^{+/-}*ではそのような変化が消失したことを示した。このことは、高炭水化物による膵β細胞量の増加は高脂肪食による膵β細胞量の増加と同様に

グルコキナーゼを介したグルコース代謝が関与しているという仮説を支持するものである。

この結果はインスリン抵抗性や血糖の変化に関係しない範囲でも生体に取り込まれた炭水化物が膵β細胞内での糖代謝を介して膵β細胞の量の調整に影響することを示すものである。本研究はマウスでの実験であり種差は考慮すべきではあるが、血糖・インスリン抵抗性に影響しないレベルの炭水化物摂取量の増加でも2型糖尿病発症後ないし発症前における膵β細胞の自然史に影響を与える可能性を示唆する。即ち、消化産物としてのブドウ糖摂取量を増やした食事療法や、グルコキナーゼの作用を調整する薬剤は、血糖に関連しない範囲でも糖尿病の膵β細胞における病態進行に関連する可能性を支持するものであり、さらなる検討は、そういった介入が2型糖尿病の自然史にどういった影響を与えるかをより詳細に解明し、新規の治療方法や食事療法の概念となる可能性がある。

8. 結論

長期高炭水化物食による膵β細胞量増加作用において、グルコキナーゼが重要な役割を果たすことを個体レベルで初めて明らかにした。本研究において明らかとなった知見は以下の通りである。

雄性8週齢 $Gck^{+/+}$ マウスおよび雄性8週齢 $Gck^{+/-}$ マウス雄性8週齢に対し、それぞれにNCおよびHSTDを負荷した4群に群別し15週間飼育したところ、

1. 両マウスにおいてNC群に比べ、HSTD群で体重は有意に増加した
2. $Gck^{+/+}$ マウスにおいて、HSTD群は有意に糖負荷後の血漿インスリン値が高値であったが、 $Gck^{+/-}$ ではそのような差はみられなかった。
3. $Gck^{+/+}$ マウスにおいて、HSTD群は有意な膵β細胞量の増加を示したが、 $Gck^{+/-}$ マウスではそのような差はみられなかった。
4. マイクロアレイでは、 $Gck^{+/+}$ HSTD群においてほかの3群と比べ *Mt1*, *Mt2*等が有意に減少し、*Aldh1a3*等が有意に増加した。

これらの結果から、高炭水化物負荷がグルコキナーゼを介して膵β細胞量に影響を与え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が示された。

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。

9. 謝辞

本論文は筆者が北海道大学大学院医学院 免疫・代謝内科学教室博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものです。同教室、渥美達也教授には指導教官として本研究の機会を与えていただき、その遂行にあたって終始、御指導をいただきました。ここに深謝の意を表します。また同教室の中村昭伸先生には研究の立ち上げから論文作成に至るまで終始、丁寧かつ熱心に御指導、適切な御助言をいただきました。ここに心より深く感謝の意を表します。

また Olga Amengual 講師には英語の学会発表をはじめとするプレゼンテーションに関して有益な御討論、御助言を頂きました。ここに深く感謝の意を表します。北海道大学大学院医学研究院 糖尿病・肥満病態治療学分野特任教授三好秀明先生、北海道大学大学院医学研究院 免疫・代謝内科学教室の曹圭龍先生、亀田啓先生、野本博司先生、山本浩平先生、北尾直之先生、高橋清彦先生、大森一乃先生には研究カンファレンスで有益な御討論、御助言を頂きました。ここに深く感謝の意を表します。

また川田晋一郎先生、山内裕貴先生、重沢郁美先生には大学院の仲間として、研究遂行にあたり日頃より有益な御討論、御助言をいただき、心より深く感謝を申し上げます。当科実験助手の藤森なつみさん、渡邊真理華さん、竹田羽衣子さんの御協力なしに実験を遂行することは不可能でした。心より感謝を申し上げます。この他にもこの論文作成にあたり、ここに書ききれないくらい多くの御協力、御助言、御支援をいただきました。重ねまして心より感謝を申し上げます。最後に研究活動を支えてくれました家族に心から感謝致します。

10. 利益相反

本研究に開示すべき利益相反状態はない。

11. 参考文献

Bensellam, M., Shi, Y. C., Chan, J. Y., Laybutt, D. R., Chae, H., Abou-Samra, M., Pappas, E. G., Thomas, H. E., Gilon, P., and Jonas, J. C. (2019). Metallothionein 1 negatively regulates glucose-stimulated insulin secretion and is differentially expressed in conditions of beta cell compensation and failure in mice and humans. *Diabetologia* *62*, 2273-2286.

Bonadonna, R. C., Heise, T., Arbet-Engels, C., Kapitza, C., Avogaro, A., Grimsby, J., Zhi, J., Grippo, J. F., and Balena, R. (2010). Piragliatin (R04389620), a novel glucokinase activator, lowers plasma glucose both in the postabsorptive state and after a glucose challenge in patients with type 2 diabetes mellitus: a mechanistic study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *95*, 5028-5036.

Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A., and Butler, P.C. (2003). Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* *52*, 102-110.

Chakera, A. J., Steele, A. M., Gloyn, A. L., Shepherd, M. H., Shields, B., Ellard, S., and Hattersley, A. T. (2015). Recognition and Management of Individuals With Hyperglycemia Because of a Heterozygous Glucokinase Mutation. *Diabetes care* *38*, 1383-1392.

Chatterjee, S., Khunti, K., and Davies, M. J., (2017). Type 2 diabetes. *Lancet* *389*, 2239-2251.

Cinti, F., Bouchi, R., Kim-Muller, J. Y., Ohmura, Y., Sandoval, P. R., Masini, M., Marselli, L., Suleiman, M., Ratner, L. E., and Marchetti, et al., (2016). Evidence of β -Cell Dedifferentiation in Human Type 2 Diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *101*(3), 1044-1054.

Ferrer J. (2011). Glucose as a mitogenic hormone. *Cell metab.* *13*, 357-358.

Kendall, D.M., Cuddihy, R.M., and Bergenstal, R.M. (2009). Clinical application of incretin-based therapy: therapeutic potential, patient selection and clinical use. *Am. J. Med.* *122*, S37-50.

Kodama, K., Tojjar, D., Yamada, S., Toda, K., Patel, C. J., & Butte, A. J., (2013). Ethnic differences in the relationship between insulin sensitivity and insulin response: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes care*, *36*, 1789-1796.

Kubota, N., Tobe, K., Terauchi, Y., Eto, K., Yamauchi, T., Suzuki, R., Tsubamoto, Y., Komeda, K., Nakano, R., Miki, H., et al., (2000). Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes* *49*, 1880-1889.

Maekawa, R., Seino, Y., Ogata, H., Murase, M., Iida, A., Hosokawa, K., Joo, E., Harada, N., Tsunekawa, S., Hamada, Y., et al., (2017). Chronic high-sucrose diet increases fibroblast growth factor 21 production and energy expenditure in mice. *J. Nutr. Biochem.* *49*, 71-79.

Maekawa, R., Ogata, H., Murase, M., Harada, N., Suzuki, K., Joo, E., Sankoda, A., Iida, A., Izumoto, T., Tsunekawa, S., et al., (2018). Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is required for moderate high-fat diet- but not high-carbohydrate diet-induced weight gain. *American journal of physiology.* *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *314*, E572-E583.

Masuda, A., Seino, Y., Murase, M., Hidaka, S., Shibata, M., Takayanagi, T., Sugimura, Y., Hayashi, Y., and Suzuki, A. (2019). Short-Term High-Starch, Low-Protein Diet Induces Reversible Increase in β -cell Mass Independent of Body Weight Gain in Mice. *Nutrients* *11*, 1045.

Matschinsky, F. M., Magnuson, M. A., Zelent, D., Jetton, T. L., Doliba, N., Han, Y., Taub, R., and Grimsby, J. (2006). The network of glucokinase-expressing cells in glucose homeostasis and the potential of glucokinase activators for diabetes therapy. *Diabetes* *55*, 1-12.

Meier, J. J., and Bonadonna, R. C. (2013). Role of reduced β -cell mass versus impaired β -cell function in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes care*, *36 Suppl 2*, S113-S119.

Morimoto, A., Tatsumi, Y., Deura, K., Mizuno, S., Ohno, Y., Miyamatsu, N., and Watanabe, S. (2013). Impact of impaired insulin secretion and insulin resistance on the incidence of type 2 diabetes mellitus in a Japanese population: the Saku study. *Diabetologia* *56*, 1671-1679.

Murase, M., Seino, Y., Maekawa, R., Iida, A., Hosokawa, K., Hayami, T., Tsunekawa, S., Hamada, Y., Yokoi, N., Seino, S., *et al.* (2019). Functional adenosine triphosphate-sensitive potassium channel is required in high-carbohydrate diet-induced increase in β -cell mass. *J. Diabetes Invest.* *10*, 238-250.

Kim-Muller, J. Y., Fan, J., Kim, Y. J., Lee, S. A., Ishida, E., Blaner, W. S., and Accili, D. (2016). Aldehyde dehydrogenase 1a3 defines a subset of failing pancreatic β cells in diabetic mice. *Nat. Commun.* *7*, 12631.

Nakamura, A., and Terauchi, Y. (2015). Present status of clinical deployment of glucokinase activators. *J. Diabetes invest.* *6*, 124-132.

Nakamura, A., Terauchi, Y., Ohyama, S., Kubota, J., Shimazaki, H., Nambu, T., Takamoto, I., Kubota, N., Eiki, J., Yoshioka, N., *et al.*, (2009). Impact of small-molecule glucokinase activator on glucose metabolism and beta-cell mass. *Endocrinology*, *150*, 1147-1154.

Nakamura, A., Togashi, Y., Orime, K., Sato, K., Shirakawa, J., Ohsugi, M., Kubota, N., Kadowaki, T., and Terauchi, Y. (2012). Control of beta cell function and proliferation in mice stimulated by small-molecule glucokinase activator under various conditions. *Diabetologia* *55*, 1745-1754.

Ohn, J. H., Kwak, S. H., Cho, Y. M., Lim, S., Jang, H. C., Park, K. S., and Cho, N. H. (2016). 10-year trajectory of β -cell function and insulin sensitivity in the development of type 2 diabetes: a community-based prospective cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* *4*, 27-34.

Porat, S., Weinberg-Corem, N., Tornovsky-Babaey, S., Schyr-Ben-Haroush, R., Hija, A., Stolovich-Rain, M., Dadon, D., Granot, Z., Ben-Hur, V., White, P. et al., (2011). Control of pancreatic β cell regeneration by glucose metabolism. *Cell Metab.* *13*, 440-449.

Prentki, M., and Nolan, C.J. (2006). Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* *116*, 1802-1812.

Rhodes C. J. (2005). Type 2 diabetes—a matter of beta-cell life and death?. *Science* *307*, 380-384.

Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., Karuranga, S., Unwin, N., Colagiuri, S., Guariguata, L., Motala, A.A., Ogurtsova, K., et al. (2019). Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition. *Diabetes Res. Clin. Pract.* *157*, 107843.

Terauchi, Y., Sakura, H., Yasuda, K., Iwamoto, K., Takahashi, N., Ito, K., Kasai, H., Suzuki, H., Ueda, O., and Kamada, N. (1995). Pancreatic beta-cell-specific targeted disruption of glucokinase gene. Diabetes mellitus due to defective insulin secretion to glucose. *J. Biol. Chem.* *270*, 30253-30256.

Terauchi, Y., Takamoto, I., Kubota, N., Matsui, J., Suzuki, R., Komeda, K., Hara, A., Toyoda, Y., Miwa, I., Aizawa, S., et al. (2007). Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, *117*, 246-257.

Tornovsky-Babeay, S., Dadon, D., Ziv, O., Tzipilevich, E., Kadosh, T., Schyr-Ben Haroush, R., Hija, A., Stolovich-Rain, M., Furth-Lavi, J., Granot, Z., et al., (2014). Type 2 diabetes and congenital hyperinsulinism cause DNA double-strand breaks and p53 activity in β cells. *Cell metabo.* *19*, 109-121.

Weir, G. C., and Bonner-Weir, S. (2007). A dominant role for glucose in beta cell compensation of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* *117*, 81-83.

Withers, D. J., Gutierrez, J. S., Towery, H., Burks, D. J., Ren, J. M., Previs, S., Zhang, Y., Bernal, D., Pons, S., Shulman, G. I., et al. (1998). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* *391*, 900-904.

Yagihashi, S., Inaba, W., and Mizukami, H. (2016). Dynamic pathology of islet endocrine cells in type 2 diabetes: β -Cell growth, death, regeneration and their clinical implications. *J. Diabetes Invest.* *7*, 155-165.