



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	グルコキナーゼ活性化薬による血糖降下作用の持続性消失機序の解明 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	川田, 晋一郎
Description	配架番号 : 2665
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14942号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/85750">https://hdl.handle.net/2115/85750</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	KAWATA_Shinichiro_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 川田 晋一朗

### 学位論文題名

グルコキナーゼ活性化薬による血糖降下作用の持続性消失機序の解明  
(Elucidation of the mechanism underlying the lack of sustainable hypoglycemic effect of glucokinase activator)

【背景と目的】糖尿病の患者数はここ数十年増加の一途をたどり、2019年時点で世界において4億6,300万人と推定されている。今後もその増加は加速し、2045年には世界において糖尿病患者数が7億人に達すると予測されている。糖尿病患者数の増加を抑制するため、糖尿病の病態の解明や新規薬剤の開発が喫緊の課題となっている。また、糖尿病患者の病態やライフスタイル、民族差や医療環境など、糖尿病治療背景は多様性に富み、糖尿病治療戦略も多様化が求められている。

グルコキナーゼ活性化薬 (glucokinase activator : GKA) は2003年に初めて報告された糖尿病治療薬である。GKAはグルコキナーゼのアロステリック部位に結合し、それを活性化することで、膵β細胞ではグルコース応答性インスリン分泌が亢進し、肝ではグルコースの取り込みが増加してグリコーゲン合成や解糖が促進し、血糖降下作用を示す。しかしながら、GKAを用いた臨床試験において、長期投与による血糖降下作用が認められなかったという報告が相次いでなされ、一部は開発中止になっている。2型糖尿病の病態と今後の治療戦略を考える上で、GKA投与による長期有効性を見出すことができなかった機序を個体レベルで改めて検証することが重要である。そこで本研究では、肥満2型糖尿病モデル動物である *db/db* マウスを用いて、GKAの血糖降下作用の消失機序を解明することを目的とした。

【対象と方法】肥満2型糖尿病モデルマウスである *db/db* マウス雄6週齢を普通食飼育群 (Untreated: UT群) と0.04% GKA混合食群 (G群)、sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) 阻害薬の一つである0.005% Ipragliflozin 混合食群 (S群) に群別して飼育した。また同週齢の正常血糖モデルマウスである *db/m* を正常コントロール (normal control: NC) 群として用いた。1、6、14、および28日間の複数の飼育期間に分け、体重、随時血糖の測定に加え、インスリン負荷試験、経口ブドウ糖負荷試験の評価を行った。また、各飼育期間後に各臓器を摘出した上で膵臓・肝臓を用いて組織学的分析や遺伝子発現分析、蛋白発現分析を行った。

【結果】体重は3群間で明らかな差はなかった。随時血糖はUT群に比し、G群では投与6日目まで低下したが、以後は上昇し差は消失した。一方、S群では全期間を通して随時血糖が低下した (投与6日目: UT群 454 ± 84 mg/dl、G群 257 ± 85 mg/dl、S群 224 ± 55 mg/dl、投与28日目: UT群 588 ± 102 mg/dl、G群 508 ± 129 mg/dl、S群 217 ± 30 mg/dl)。

経口ブドウ糖負荷試験で評価した耐糖能は、UT群に比しG群では投与4、11日目でのみ改善し、投与25日目にはUT群、G群間の差は消失した。一方、S群では投与4、11、25日目とも耐糖能が改善した。インスリン負荷試験で評価したインスリン感受性は、3群間で差はなかった。また、空腹時インスリン血糖比や膵β細胞量、膵β細胞増殖能はいずれ

も、投与1週目には3群間で差はなかったが、投与4週目においてはUT群に対し、G群では差はなく、S群では増加した。さらに、投与6日目に単離した膵島を用いて、膵β細胞の増殖や機能に関わる遺伝子群の発現をリアルタイムPCR法で比較検討したが、UT群とG群の比較においては有意な変化を示す遺伝子は認めなかった。また、UT群とS群の比較においては、S群で膵β細胞の機能や成熟に関わる *pancreatic and duodenal homeobox 1* や *v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein A*、*NK6 homeobox 1* の上昇を認めた。インスリン分泌や膵β細胞の検討では、GKA治療による効果はみられなかったため、GKAのもう一つの作用器官である肝臓の検討を行った。解剖時の肝重量は、UT群に比してG群で増加、S群で減少した。肝組織を用いたヘマトキシリン・エオジン染色やオイルレッドO染色での評価では、投与6日目にUT群と比べてG群で顕著な脂肪蓄積がみられ、S群では脂肪蓄積が抑制された。肝内中性脂肪含量は、投与6日目にUT群と比較し、G群で増加し、S群で低下した (UT群 130 ± 18 mg/g liver、G群 226 ± 20 mg/g liver、S群 39 ± 7 mg/g liver)。投与1日目の肝遺伝子発現解析では、UT群に比し、G群では脂肪合成関連遺伝子である *carbohydrate response element-binding protein beta* (*Chrebp-b*) が上昇し、糖新生促進に関与する遺伝子である *phosphoenolpyruvate carboxykinase* (*Pepck*) が低下した。さらに投与6日目の検討では、G群ではさらに下流の脂肪合成関連遺伝子である *acetyl-CoA carboxylase* (*Acc*)、*fatty acid synthase* (*Fas*)、*elongation of very long chain fatty acid-like family member 6* (*Elovl6*) が上昇し、投与1日目にみられた *Chrebp-b* や *Pepck* の変化は消失した。S群では投与1、6日目とも、*Chrebp-b*、*Acc*、*Fas*、*Elovl6* の発現が低下した。また、投与0、1、6、14日目の肝組織を用いたインスリンシグナルに関連する蛋白である AKT、forkhead box protein O1、extracellular signal-regulated kinases のリン酸化の評価では、G群、S群とも経時的な変化を認めなかった。

【考察】*db/db* マウスへの GKA 投与により、第II相臨床試験と同様の一過性の血糖降下作用が再現されたと考えた。*db/db* マウスへの GKA の投与により、膵β細胞量やインスリン分泌が増加しないこと、また肝臓の脂肪蓄積が亢進することが明らかとなった。特に肝において、GKA 投与初期からの *Chrebp* やその下流の脂肪合成関連遺伝子の増加と、糖新生促進関連遺伝子である *Pepck* の抑制がみられた。すなわち、GKA 投与初期から肝での糖利用として脂肪合成が亢進したと同時に、肝からの糖新生が抑えられることで、血糖低下作用を示したと考えられる。さらに GKA による *Chrebp* や *Pepck* の発現の一過性的な変化は、GKA による血糖降下作用と同様に経時的に消失することが分かった。一方で SGLT2i 投与では、既報と同様に膵β細胞やインスリン分泌能は増加し、肝の脂肪化は抑制されていた。これらは、腎からの尿糖排泄作用により過剰なグルコース負荷が抑えられることで、膵β細胞が保護され、肝臓の脂肪化が抑制されたと考えられる。

【結論】*db/db* マウスへの GKA 投与により、第II相臨床試験と同様の一過性の血糖降下作用が再現され、その表現型は、膵β細胞の量や機能への影響は認めず、投与初期からの肝脂肪蓄積が亢進した。肝の脂肪合成関連遺伝子や糖新生関連遺伝子の経時的な変化が、GKA の血糖降下作用の経時的変化と一致した。これらの結果が、*db/db* マウスへの GKA 投与における、血糖降下作用の消失へ影響したと考えられた。本研究では、GKA による血糖降下作用が消失する経過について、分子機序を交えて解明することができた。このような経時的な分子変化に着目した GKA 化合物の開発が、持続的に血糖降下作用を示す GKA の臨床応用に向けて重要と考える。