



Title	グルコキナーゼヘテロ欠損が長期高脂肪高スクロース食負荷マウスにおける膵 β 細胞量・機能に与える影響
Author(s)	重沢, 郁美
Description	配架番号 : 2906
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16414号
Issue Date	2025-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16414
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95949
Type	doctoral thesis
File Information	SHIGESAWA_Ikumi.pdf



学位論文

グルコキナーゼヘテロ欠損が長期高脂肪高スクロース食
負荷マウスにおける膵 β 細胞量・機能に与える影響

(Effects of glucokinase haploinsufficiency on the pancreatic β -cell mass
and function in long-term high-fat, high-sucrose diet-fed mice)

2025 年 3 月

北海道大学

重沢 郁美

Ikumi Shigesawa

学位論文

グルコキナーゼヘテロ欠損が長期高脂肪高スクロース食
負荷マウスにおける膵 β 細胞量・機能に与える影響

(Effects of glucokinase haploinsufficiency on the pancreatic β -cell mass
and function in long-term high-fat, high-sucrose diet-fed mice)

2025 年 3 月

北海道大学

重沢 郁美

Ikumi Shigesawa

目次

発表論文目録及び学会発表目録.....	1
1. 要旨	2
2. 略語表.....	4
3. 緒言	6
4. 方法	8
4.1 研究デザイン	8
4.2 動物.....	8
4.3 飼料.....	10
4.4 体重・随時血糖の測定	12
4.5 経口ブドウ糖負荷試験	12
4.6 免疫組織染色による膵 β 細胞量の評価	12
4.7 膵島単離.....	13
4.8 DNA マイクロアレイ法による解析	13
4.9 リアルタイム PCR 法による解析	14
4.10 統計解析	16
5. 結果	17
5.1 体重と随時血糖の推移	17
5.2 経口糖負荷試験における耐糖能の評価	20
5.3 グルコース応答性インスリン分泌	23
5.4 膵 β 細胞量の評価	25
5.5 DNA マイクロアレイ法による膵島の遺伝子発現の解析	28
5.6 リアルタイム PCR 法による膵島の遺伝子発現の解析	33
6. 考察	35
7. 結論	38
8. 謝辞	40
9. 利益相反.....	41
10. 引用文献.....	42

発表論文目録及び学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Ikumi Shigesawa, Akinobu Nakamura, Yuki Yamauchi, Shinichiro Kawata, Asuka Miyazaki, Hiroshi Nomoto, Hiraku Kameda, Yasuo Terauchi, Tatsuya Atsumi. Effects of glucokinase haploinsufficiency on the pancreatic β -cell mass and function of long-term high-fat, high-sucrose diet-fed mice. *Journal of Diabetes Investigation*. 2024 Sep 21. doi: 10.1111/jdi.14307. Online ahead of print.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Ikumi Shigesawa, Akinobu Nakamura, Yuki Yamauchi, Shinichiro Kawata, Asuka Miyazaki, Hiroshi Nomoto, Hiraku Kameda, Hideaki Miyoshi, Yasuo Terauchi, Tatsuya Atsumi. Effect of glucokinase haploinsufficiency on pancreatic beta-cell function and mass in high-fat, high-sucrose diet-fed mice. *American Diabetic Association's 83rd Scientific Sessions (ADA 2023)*. 23-26 June 2023, San Diego, USA
2. 重沢郁美、中村昭伸、山内裕貴、川田晋一郎、宮崎あすか、野本博司、亀田啓、三好秀明、寺内康夫、渥美達也。「食餌誘導性肥満・糖尿病モデルマウスにおけるグルコキナーゼ抑制が膵 β 細胞機能・量に与える影響」。第66回日本糖尿病学会年次学術集会、2023年5月11-13日、鹿児島
3. 重沢郁美、中村昭伸、宮崎あすか、山内裕貴、川田晋一郎、野本博司、亀田啓、寺内康夫、渥美達也。「グルコキナーゼヘテロ欠損が食餌誘導性肥満・糖尿病モデルマウスにおける膵 β 細胞機能・量の経時的変化に与える影響」。第67回日本糖尿病学会年次学術集会、2024年5月17-19日、東京

1. 要旨

【背景と目的】現代社会の人類に最も多くみられる疾患の一つが 2 型糖尿病である。その病態生理は複雑であるが、膵 β 細胞量・機能の低下がその中心にあるとされている。我々は以前、*db/db* マウスにおいて、グルコキナーゼ (glucokinase: *Gck*) の抑制は膵 β 細胞量・機能を維持し、耐糖能を改善させることを示した。本研究では、高脂肪高スクロース食 (high-fat, high-sucrose: HFHS) 負荷による食餌誘導性肥満・糖尿病モデルマウスにおいて、グルコキナーゼの抑制が膵 β 細胞機能・量に与える影響を検討することを目的とした。

【対象と方法】グルコキナーゼヘテロ欠損マウス (*Gck*^{+/-}) 雄 4 週齢および対照として野生型マウス (*Gck*^{+/+}) 雄 4 週齢をそれぞれ普通食 (normal chow: NC) 飼育群 (NC 群) と、高脂肪高スクロース食投与群 (HFHS 群) に群別し、それぞれ 16、40、60 週齢まで飼育した。体重・随時血糖、耐糖能、グルコース応答性インスリン分泌 (glucose-stimulated insulin secretion: GSIS)、膵 β 細胞量について経時的に比較検討した。さらに、40 週齢のマウスから膵島を単離し、膵島の遺伝子発現について DNA マイクロアレイ法及びリアルタイム PCR 法にて比較検討した。

【結果】野生型マウス、*Gck*^{+/-}マウスともに、12 週齢以降の体重は NC 群に比べ HFHS 群で有意に増加した。遺伝学的背景から *Gck*^{+/-}NC 群の随時血糖は *Gck*^{+/+}NC 群に比べ高値であった。*Gck*^{+/+}HFHS 群は、膵 β 細胞量および GSIS の明らかな増大を認め、60 週齢までの観察期間中、耐糖能の悪化を認めなかった。*Gck*^{+/-}HFHS 群は、*Gck*^{+/+}HFHS 群に比べ膵 β 細胞量 (40 週齢: 4.1 ± 0.5 mg vs 7.0 ± 1.2 mg, $P < 0.01$) や GSIS の代償性増大が少なく、16 週齢から 40 週齢にかけて耐糖能が悪化した。しかし、40 週齢から 60 週齢にかけて *Gck*^{+/-}HFHS 群の膵 β 細胞量 (60 週齢: 5.5 ± 1.5 mg) および GSIS は減少せず、むしろ増加傾向にあり、耐糖能の進行性の悪化は認めなかった。DNA マイクロアレイ法による膵島の遺伝子発現の解析では、20,206 遺伝子のうち 356 遺伝子の発現に $\text{ratio} > 1.5$ もしくは $\text{ratio} < 0.67$ 、および $p < 0.05$ の有意な差を認め、*Gck*^{+/+}HFHS 群に比べ *Gck*^{+/-}HFHS 群にて、128 遺伝子の発現が上昇し、228 遺伝子の発現が低下した。発現低下遺伝子の上位に、*Spp1*、*Fos*、*Aldh1a3*、*Nupr1* などの膵 β 細胞のストレスにより発現が上昇することが報告されている遺伝子が含まれた。発現上昇および発現低下遺伝子についてパスウェイ解析を行い、Novel Jun-Dmp1 パスウェイおよび TGF- β パスウェイを含む 6 つのパスウェイで有意な変動が確認された。リアルタイム PCR 法による膵島の遺伝子発現の評価では、膵 β 細胞機能関連転写因子である *Mafa*、*Nkx6.1*、*Pdx1* の発現は、野生型マウス、*Gck*^{+/-}マウスの両マウスとも、HFHS 群において NC 群と比べ低下はなかった。*Aldh1a3* の発現は、*Gck*^{+/+}HFHS 群は *Gck*^{+/+}NC 群に比べて上昇した一方で、*Gck*^{+/-}HFHS 群は *Gck*^{+/-}NC 群と比べ上昇を認めなかった。また、*Gck*^{+/+}HFHS 群における発現は、*Gck*^{+/-}HFHS 群に比べても上昇しており、マイクロアレイ解析の結果と一致した。

【考察】HFHS 食負荷において、*Gck*^{+/-}マウスは野生型マウスに比べて膵β細胞量やインスリン分泌の増大の表現型の出現が緩徐であることから耐糖能が悪化した、長期的には進行性の悪化は来さず、糖尿病の非代償期でみられる病態とは異なるものであった。膵島における *Aldh1a3* の発現は様々な糖尿病モデルで上昇し、膵β細胞の機能障害と関連するとされる。HFHS 食を摂餌した野生型マウスは膵β細胞量とインスリン分泌が著明に増大したが、膵島における *Aldh1a3* の発現上昇は、代謝ストレスの増大と膵β細胞機能を抑制する方向の状態も同時に存在することを示唆した。一方、HFHS 食を摂餌した *Gck*^{+/-}マウスは *Aldh1a3* の発現上昇を認めず、*Gck*^{+/-}マウスにおいては膵β細胞への糖負荷が増大しても、グルコキナーゼ以降の代謝シグナルが抑制されるために代謝ストレスが増大せず、膵β細胞量・機能の低下が防がれたと考えられた。マイクロアレイ解析のパスウェイ解析における Novel Jun-Dmp1 パスウェイおよび TGF-β パスウェイの有意な変動や、マイクロアレイ解析およびリアルタイム PCR 法での *Gck*^{+/-}マウスにおける *Nupr1* の発現低下はこの考えを支持した。本研究は、*db/db* マウスと同様に、HFHS 食による食餌誘導性肥満・糖尿病モデルマウスにおいても、グルコキナーゼヘテロ欠損は膵β細胞量・機能の進行性の低下を防ぐことを示した。ただし、*db/db* マウスでは膵島における *Mafa*、*Nkx6.1*、*Pdx1* の発現が *Gck*^{+/-}*db/db* マウスに比べて低下したが、本研究においては野生型マウス、*Gck*^{+/-}マウスともに HFHS 負荷によるこれらの遺伝子の発現低下は認めず、HFHS 食の長期負荷による膵β細胞への糖負荷は *db/db* マウスのそれよりもはるかに低かった。野生型マウスで耐糖能が低下する別の食餌誘導性肥満・糖尿病モデルの確立により、グルコキナーゼの抑制による膵β細胞に対する保護効果をより明確に示すことが期待された。

【結論】高脂肪高スクロース食負荷による食餌誘導性肥満・糖尿病モデルマウスにおいて、グルコキナーゼの抑制は膵β細胞量・機能および耐糖能の進行性の低下を抑制した。本研究により得られた知見は、今後グルコキナーゼの抑制に着目した創薬などを通じ、2 型糖尿病の臨床医療へ還元されることが期待される。

2. 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである.

ANOVA	analysis of variance
AUC	area under the curve
Actb	actin beta
Aldh1a3	aldehyde dehydrogenase 1 family member A3
DAB	3, 3'-diaminobenzidine
Dmp1	dentin matrix acidic phosphoprotein 1
FBS	fetal bovine serum
Fos	Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit
GSIS	glucose-stimulated insulin secretion
Gck	glucokinase
Glut2	glucose transporter2
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HFHS	high-fat, high-sucrose
HOMA-IR	homeostasis model assessment–insulin resistance
Jun	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit
Ki67	marker of proliferation Ki-67
Mafa	v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene
NC	normal chow
Neurog3	neurogenin 3
Nkx6.1	NK6 homeobox 1
Nupr1	nuclear protein 1, transcriptional regulator
OGTT	oral glucose tolerance test
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
Pdx-1	pancreatic and duodenal homeobox 1
SD	standard deviation

Slc2a2	Solute carrier family 2 member 2
Spp1	secreted phosphoprotein 1
TGF- β	transforming growth factors-beta

3. 緒言

現在、世界の糖尿病人口は 5 億人以上に上り、その大多数は 2 型糖尿病である (Collaborators, 2023)。2 型糖尿病は依然として公衆衛生上の重要な問題であり、その病態をさらに解明し、より効果的な治療法を見つけることは急務である。2 型糖尿病の病態生理は複雑であり、まだ完全には解明されていないものの、膵 β 細胞量・機能の進行性の低下がその中心にある (Butler et al, 2003; Eizirik et al, 2020; Kendall et al, 2009; Weir et al, 2020; Yagihashi et al, 2016)。

グルコキナーゼ (Glucokinase: Gck) の活性化が膵 β 細胞量・機能を増大させることが、ヒトや動物の遺伝子変異モデルの研究により明らかにされている (Kassem et al, 2010; Nakamura, 2022; Porat et al, 2011; Terauchi et al, 2007)。グルコキナーゼは、解糖系の最初のステップであるグルコースからグルコース 6-リン酸への変換を触媒する酵素であり、膵臓、消化管、脳の神経内分泌細胞および肝細胞に発現している (Matschinsky et al, 2006; Matschinsky and Wilson, 2019)。特に、膵内分泌細胞と肝細胞のグルコキナーゼは、全身のグルコース代謝調節に重要な役割を果たしている。2003 年以降、多くのグルコキナーゼ活性化薬が開発され、そのいくつかは第 III 相試験において有効性と安全性が示された (Grimsby et al, 2003; Toulis et al, 2020; Vella et al, 2019; Yang et al, 2022; Zhu et al, 2018; Zhu et al, 2022)。さらに、臨床試験や我々のマウス実験において、グルコキナーゼ活性化薬は、膵 β 細胞量・機能を増大させることが示された (Nakamura et al, 2009; Nakamura et al, 2012; Zhu et al, 2018)。しかし一方で、グルコキナーゼ活性化薬の有効性は長期に渡っては維持されないことも報告されており (Kawata et al, 2022; Kiyosue et al, 2013; Meininger et al, 2011; Nakamura and Terauchi, 2015; Wilding et al, 2013)、グルコキナーゼの長期的な活性化はむしろ膵 β 細胞機能不全を引き起こす可能性が示唆された (Tornovsky-Babeay et al, 2014; Tornovsky-Babeay et al, 2021)。

以上のことから、膵 β 細胞量・機能の進行性の低下が病態生理の中心にある 2 型糖尿病において、グルコキナーゼの不活性化は、長期的には膵 β 細胞機能を維持する可能性があると考えられた (Nakamura et al, 2021)。この仮説を検証するために、我々は以前、肥満・糖尿病モデルマウスである *db/db* マウスを用いて、グルコキナーゼの抑制が膵 β 細胞量・機能に与える影響を検討した (Omori et al, 2021)。グルコキナーゼヘテロ欠損 *db/db* マウスおよび *db/db* マウスを 24 週

齢まで飼育した結果、グルコキナーゼヘテロ欠損 *db/db* マウスは、*db/db* マウスに比べ膵 β 細胞量およびインスリン分泌が増大し、耐糖能が改善した。さらに、DNA マイクロアレイ法、リアルタイム PCR 法、免疫組織化学染色およびメタボローム解析により、*db/db* マウスにおいて、グルコキナーゼヘテロ欠損は、ストレス関連遺伝子の発現を減少させ、MafA や Nkx6.1 などの膵 β 細胞機能関連転写因子の発現を増加し、ミトコンドリア障害を減少させ、細胞内代謝パターンを改善することが示された。しかしながら、このグルコキナーゼ抑制による膵 β 細胞の保護効果について、ヒトの 2 型糖尿病病態により近い、食事などの環境因子により誘発される肥満・糖尿病モデルマウスでの検討はなされていなかった。そこで本研究は、高脂肪高スクロース食 (high-fat, high-sucrose: HFHS) 負荷による食餌誘導性肥満・糖尿病モデルマウスにおいて、グルコキナーゼヘテロ欠損が膵 β 細胞量・機能に与える影響を明らかにすることを目的とした。

4. 方法

4.1 研究デザイン

グルコキナーゼヘテロ欠損マウス ($Gck^{+/-}$) 雄 4 週齢および対照として野生型マウス ($Gck^{+/+}$) 雄 4 週齢をそれぞれ普通食 (normal chow: NC) 飼育群 (NC 群) と、高脂肪高スクロース食投与群 (HFHS 群) に群別し、これら計 4 群をそれぞれ 16、40、60 週齢まで飼育した。体重・随時血糖を経時的に測定し、各々 16、40、60 週齢で経口ブドウ糖負荷試験 (oral glucose tolerance test: OGTT) を施行の上、膵組織を採取した。OGTT により耐糖能とグルコース応答性インスリン分泌 (glucose-stimulated insulin secretion: GSIS) を評価し、膵臓組織切片を用いて膵 β 細胞量を定量評価した。さらに、各群の 40 週齢における膵島を単離し、DNA マイクロアレイ法 ($Gck^{+/+}$ HFHS vs. $Gck^{+/-}$ HFHS) およびリアルタイム PCR 法を用いて膵島の遺伝子発現について比較検討した。

4.2 動物

$Gck^{+/-}$ マウスは、神経内分泌細胞のグルコキナーゼに特異的なエクソン領域を阻害することで作製され、膵 β 細胞を含む神経内分泌細胞のグルコキナーゼの発現は低下するが、肝細胞におけるグルコキナーゼの発現には影響しない (Terauchi et al, 1995)。実際に、単離膵島におけるグルコキナーゼ遺伝子の mRNA の発現は、 $Gck^{+/-}$ マウスは野生型マウスの約 50%であることを確認した (Figure 1)。また、グルコキナーゼ活性は、 $Gck^{+/-}$ マウスは野生型マウスの 48%であったと報告されている (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。マウスは、室温 25°C、7 時～19 時までを明期とした 12 時間毎の明暗サイクル、自由飲水・摂餌の環境下で飼育された。実験動物の取り扱いは、「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定」に従った。

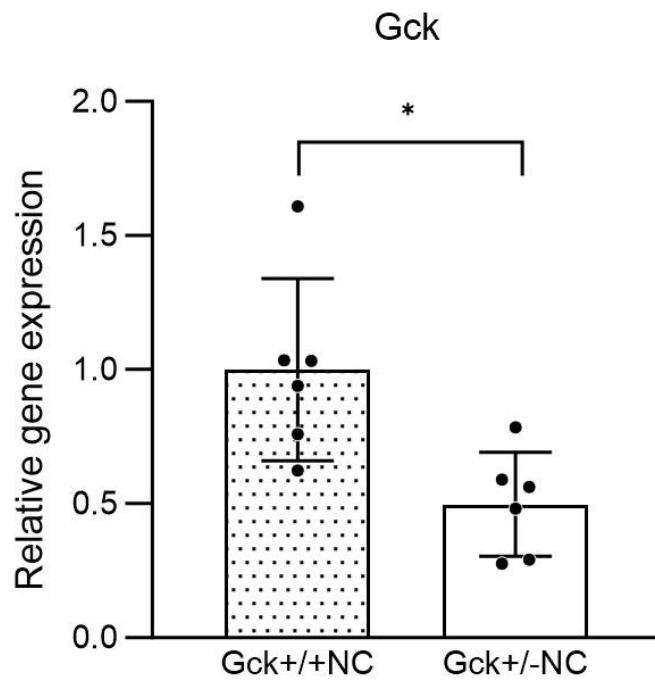


Figure 1. 野生型マウスおよび $Gck^{+/-}$ マウスにおける Gck 遺伝子の発現
 普通食で飼育した野生型マウス (黒点) および $Gck^{+/-}$ マウス (白) の単離脾島を用いて、 Gck 遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法により定量的に評価した。内因性コントロールとして $Actb$ を用いた。* $P < 0.05$

4.3 飼料

普通食 (NC) は MF (Oriental Yeast Co. Ltd., Tokyo, Japan)、高脂肪高スクロース食 (HFHS) は 58R3 (TestDiet, Richmond, VA, USA) を用いた。Table 1 に、餌のエネルギー組成を、飼料 100g あたりのエネルギー量で示した。

Table 1. 餌のエネルギー組成

	NC	HFHS
蛋白 (kcal)	92.4	81.0
脂質 (kcal)	45.9	322.6
炭水化物 (kcal)	221.2	139.9

4.4 体重・随時血糖の測定

各群のマウスの体重および随時血糖を、4 週齢から経時的に測定した。採血は尾静脈から行い、血糖測定には Glutestmint portable glucose meter (Sanwa Chemical, Nagoya, Japan)を用いた。

4.5 経口ブドウ糖負荷試験

経口ブドウ糖負荷試験 (Oral glucose tolerance test: OGTT) は 16 時間の絶食後に施行した。グルコース 3 g を生理食塩水 20 mL で溶解し、マウスの体重 1g あたり 0.01 mL のグルコース (1.5 mg/g 体重) を、ゾンデを用いて経口投与し、グルコース負荷前、負荷 15、30、60、120 分後に眼窩 (負荷前、負荷 15 分後) ないしは尾静脈 (負荷 30、60、120 分後) から採血し、血糖値を測定した。縦軸を血糖値 (mg/dL)、横軸を時間 (min) として血糖曲線を作成し、さらに、負荷前から負荷 120 分後までの血糖曲線下面積を area under the curve (AUC) (mg/dL × min) として算出し各群の比較を行った。

また、OGTT におけるグルコース負荷前と負荷 15 分後の血清インスリン濃度を測定し、グルコース応答性インスリン分泌 (GSIS) を評価した。インスリン濃度は、モリナガ超高感度マウス/ラットインスリン測定キット (Moringa Institute of Biological Science, Yokohama, Japan) を用いて測定した。

4.6 免疫組織染色による膵 β 細胞量の評価

単離した膵組織を、4°C、4%パラホルムアルデヒド中で一晩固定した。パラフィン包埋後、5 μ m の切片を切り出し、スライドガラスにマウントした。パラフィン切片を脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼの不活化のため、3% (vol/vol) の過酸化水素を含む phosphate-buffered saline (PBS)、次いで BLOXALL (Vector laboratories, Newark, NJ, USA) にそれぞれ 15 分間浸漬した。ヤギ血清 (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan) に 60 分間浸漬しブロッキングを行った後、

PBS で希釈した抗インスリン抗体 (1:1,000 希釈 ; Proteintech, Rosemont, IL, USA) を載せ 4°C で一晩反応させた。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))、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアヒジン (Nichirei) を各々 1 時間反応させ、洗浄後に DAB (3,3'-diaminobenzidine) で発色させ、ヘマトキシリンで対比染色を行った。

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 (Keyence) を用いて標本の写真を撮影した。膵面積および膵 β 細胞面積は、BZ-II analyzer ver. 1.42 (Keyence) を用いて計測し、膵 β 細胞量は以下のように評価した。

$$\text{膵 } \beta \text{ 細胞量 (mg)} = \text{膵 } \beta \text{ 細胞面積} / \text{膵面積} \times \text{膵重量 (mg)}$$

4.7 膵島単離

Clostridium histolyticum 由来のコラゲナーゼ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 0.9 mg/mL を含む Hanks' balanced salt solution (HBSS) (Sigma-Aldrich) を調製した (コラゲナーゼ添加 HBSS)。マウスの肝臓、十二指腸、総胆管を露出させ、十二指腸の Vater 乳頭部をクランプした上で、コラゲナーゼ添加 HBSS 2.5 mL を総胆管から膵管方向へ注入した。膨張した膵臓を取り出し、コラゲナーゼ添加 HBSS 7.5 mL を入れた 50 mL チューブに入れ、37°C で 24 時間インキュベートした。その後、複数回に分けて fetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL, Paisley, UK) を添加した HBSS を加え攪拌・上清の吸引を繰り返し、最終的に沈殿した膵組織を 10 cm dish に播種し、顕微鏡下でピペットを用いて膵島を回収した。

4.8 DNA マイクロアレイ法による解析

miRNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて単離膵島から RNA を抽出した。マイクロアレイは、Mouse Clariom S Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用い、 $Gck^{+/+}$ HFHS 群と $Gck^{+/-}$ HFHS 群の 2 群間での比較を行った。発現変動遺伝子は、1.5 倍以上の発現差を示す遺伝子と定義した。解

析には、Microarray Data Analysis Tool Ver.3.2 (Filgen, Nagoya, Japan) を用いた。

4.9 リアルタイム PCR 法による解析

RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて単離腓島から RNA を抽出し、SuperScript III (Invitrogen, Waltham, MA, USA) と Random primers (Promega, Madison, WI, USA) を用いて cDNA を合成した。7500 Fast Real Time PCR システムにて FAST SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて定量的リアルタイム PCR を行い、各々の遺伝子発現量を評価した。内因性コントロールとして actin beta (Actb) を用いた。使用したプライマー配列は、Table 2 に示した。

Table 2. 定量的リアルタイム PCR 法に用いたプライマー配列

Gene	Primer sequence (5'-3')
<i>Actb</i>	Forward: GCTCTTTTCCAGCCTTCCTT Reverse: CTTCTGCATCCTGTCAGCAA
<i>Gck</i>	Forward: CACCTGGTTGGAACAGAAGC Reverse: TTGGTGGCCTCCATCCTGGC
<i>Ki67</i>	Forward: CTGCCTGCGAAGAGAGCATC Reverse: AGCTCCACTTCGCCTTTTGG
<i>Mafa</i>	Forward: CTTCAGCAAGGAGGAGGTCATC Reverse: GCGTAGCCGCGGTTCTT
<i>Nkx6.1</i>	Forward: CTGCACAGTATGGCCGAGATG Reverse: CCGGGTTATGTGAGCCCAA
<i>Pdx1</i>	Forward: CTCCGGACATCTCCCCATAC Reverse: ACGGGTCCTCTTGTTTTCTT
<i>Slc2a2</i>	Forward: TGTGCTGCTGGATAAATTCGCCTG Reverse: AACCATGAACCAAGGGATTGGACC
<i>Spp1</i>	Forward: ATCTCACCATTTCGGATGAGTCT Reverse: TGTAGGGACGATTGGAGTGAAA
<i>Fos</i>	Forward: CGGGTTTCAACGCCGACTA Reverse: TGGCACTAGAGACGGACAGAT
<i>Aldh1a3</i>	Forward: ATCAACAACGACTGGCACGAA Reverse: CACATCGGGCTTATCTCCTTC
<i>Nupr1</i>	Forward: ACCCTTCCCAGCAACCTCTAA Reverse: TCTTGGTCCGACCTTTCCGA
<i>Neurog3</i>	Forward: CCAAGAGCGAGTTGGCACT Reverse: CGGGCCATAGAAGCTGTGG

4.10 統計解析

結果は平均値±標準偏差 (standard deviation: SD) で示した。2 群間の比較には対応のない Student's t-test を用いた。4 群間での統計解析には一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を用い、ポストホック解析としてボンフェローニ検定 (Bonferroni test) を行った。 P 値は 0.05 未満を統計学的有意とした。

5. 結果

5.1 体重と随時血糖の推移

野生型マウス、 $Gck^{+/-}$ マウスともに、12 週齢以降の体重は、NC 群に比べ HFHS 群で有意に増加した (Figure 2)。

遺伝的背景から、 $Gck^{+/-}$ NC 群の随時血糖は $Gck^{+/+}$ NC 群に比べ高くなり、これは既報と同様であった (Omori et al, 2021; Terauchi et al, 1997; Terauchi et al, 1995; Terauchi et al, 2007)。 $Gck^{+/+}$ HFHS 群は、60 週齢までの観察期間中、随時血糖の悪化は認めなかった。 $Gck^{+/-}$ HFHS 群は、 $Gck^{+/-}$ NC 群に比べて随時血糖が上昇したが、長期的には持続的な増悪傾向は認めなかった (Figure 3)。

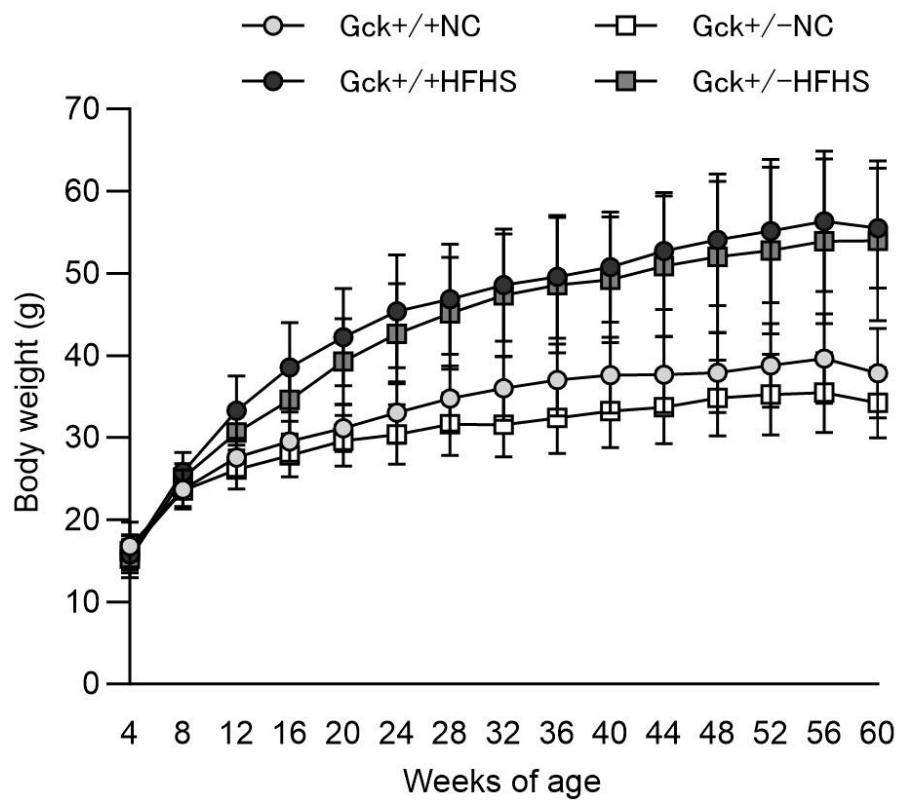


Figure 2. 各群のマウスの体重推移

$Gck^{+/+}NC$ 群 (薄灰色丸)、 $Gck^{+/+}HFHS$ 群 (黒丸)、 $Gck^{+/-}NC$ 群 (白四角)、 $Gck^{+/-}HFHS$ 群 (濃灰色四角) (平均 $\pm$ SD) (n = 11–20)

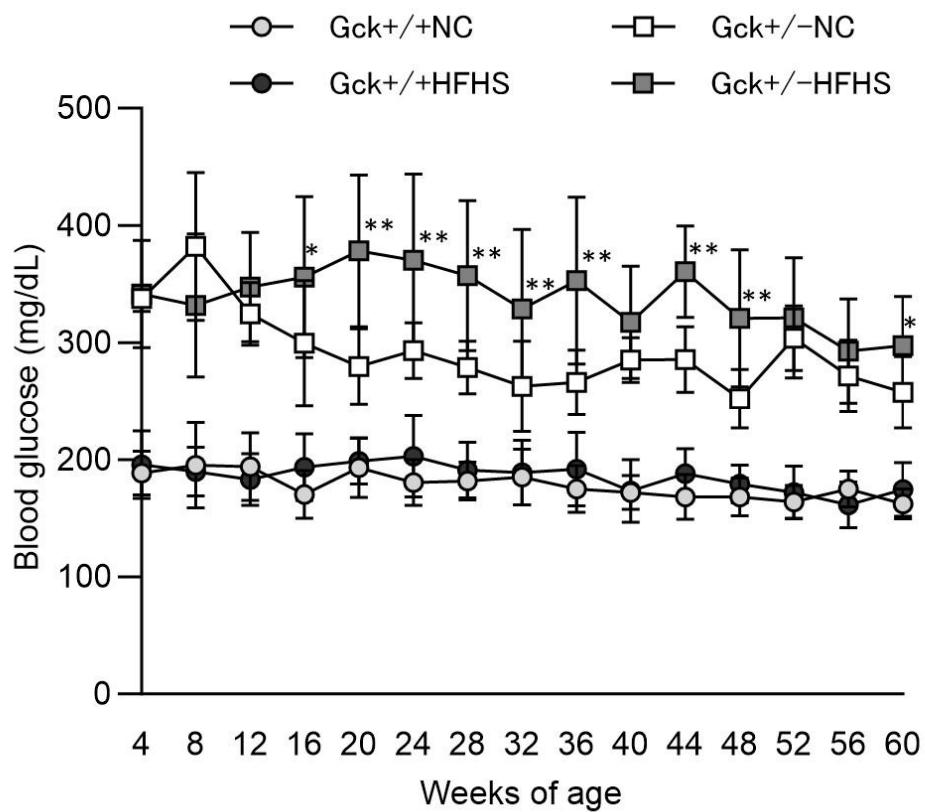


Figure 3. 各群のマウスの随時血糖の推移

$Gck^{+/+}$ NC 群 (薄灰色丸)、 $Gck^{+/+}$ HFHS 群 (黒丸)、 $Gck^{+/-}$ NC 群 (白四角)、 $Gck^{+/-}$ HFHS 群 (濃灰色四角) (平均 $\pm$ SD) (n = 11–20) ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. $Gck^{+/-}$ NC

5.2 経口糖負荷試験における耐糖能の評価

OGTT の結果、 $Gck^{+/+}$ HFHS 群の耐糖能は 60 週齢まで悪化しなかった (Figure 4)。 $Gck^{+/-}$ HFHS 群の耐糖能は、16 週齢の時点では $Gck^{+/-}$ NC 群と差がなかったが (Figure 4a, d)、40 週齢では悪化を認めた (Figure 4b, e)。しかしその後、 $Gck^{+/-}$ HFHS 群の 60 週齢における AUC は 40 週齢のそれと比べ大きくなることはなく、40 週齢から 60 週齢にかけては耐糖能の悪化は認めなかった (Figure 4e, f)。

また、homeostasis model assessment–insulin resistance (HOMA-IR) を用いて 40 週齢における各群のマウスのインスリン抵抗性を評価した。野生型マウス、 $Gck^{+/-}$ マウスともに、NC 群に比べ HFHS 群でインスリン抵抗性が増大した。 $Gck^{+/+}$ HFHS 群と $Gck^{+/-}$ HFHS 群では差がなかった (Figure 5)。

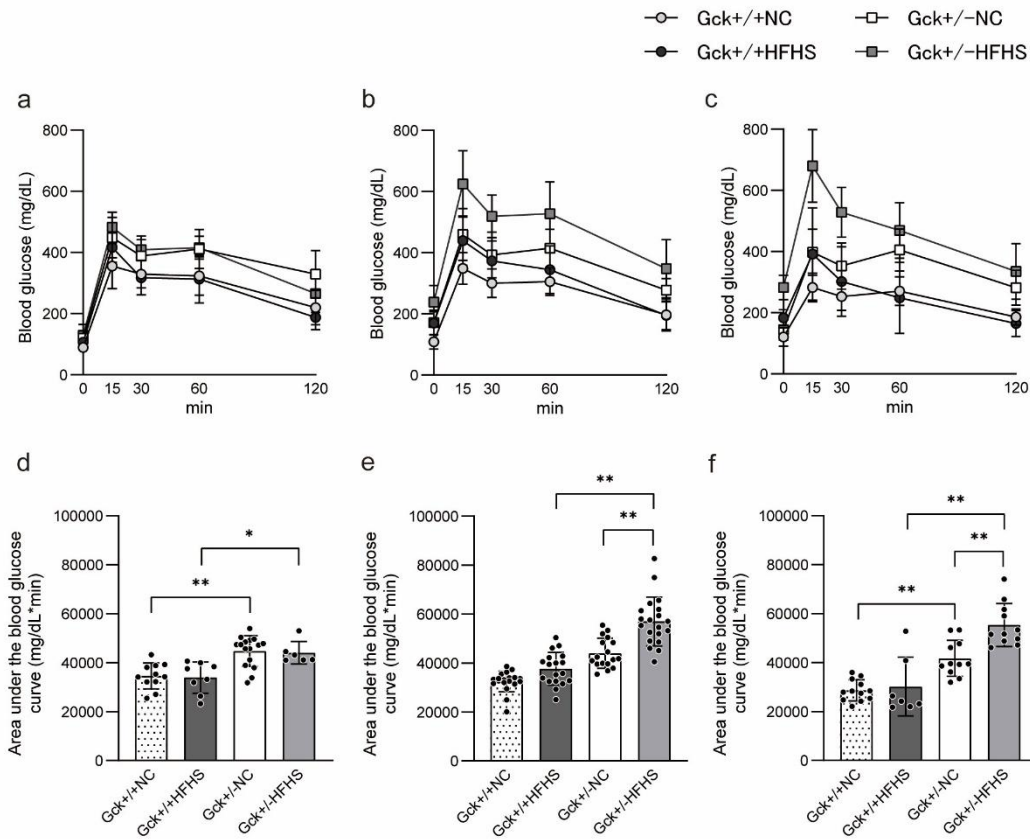


Figure 4. 各群のマウスの 16、40、60 週齢における耐糖能

a-c: $Gck^{+/+}NC$ 群 (薄灰色丸)、 $Gck^{+/+}HFHS$ 群 (黒丸)、 $Gck^{+/-}NC$ 群 (白四角) および $Gck^{+/-}HFHS$ 群 (濃灰色四角) における 16 週齢 (n=6-16) (a)、40 週齢 (n=17-27) (b)、60 週齢 (n=7-12) (c)での経口糖負荷試験時の血糖値の推移 (平均 $\pm$ SD)

d-f: $Gck^{+/+}NC$ 群 (黒点)、 $Gck^{+/+}HFHS$ 群 (濃灰色)、 $Gck^{+/-}NC$ 群 (白) および $Gck^{+/-}HFHS$ 群 (薄灰色) における 16 週齢 (d)、40 週齢 (e)、60 週齢 (f) での経口糖負荷試験時のグルコース曲線下面積 (平均 $\pm$ SD) ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

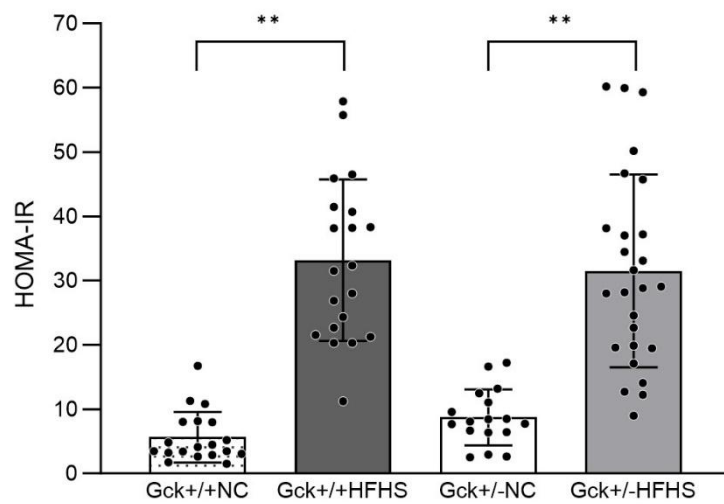


Figure 5. 40 週齢における各群のマウスの HOMA-IR

$Gck^{+/+}$ NC 群 (黒点)、 $Gck^{+/+}$ HFHS 群 (濃灰色)、 $Gck^{+/-}$ NC 群 (白)、 $Gck^{+/-}$ HFHS 群 (薄灰色) (平均 $\pm$ SD) (n=17-26) ** $P < 0.01$

HOMA-IR = Fasting glucose (mg/dL) $\times$ Fasting insulin (ng/mL) $\times$ 26/405.

5.3 グルコース応答性インスリン分泌

16 週齢において、 $Gck^{+/+}$ HFHS 群の GSIS は $Gck^{+/+}$ NC 群よりも高かったが、 $Gck^{+/-}$ HFHS 群の GSIS は $Gck^{+/-}$ NC 群と差がなかった (Figure 6a)。40 週齢の時点では、 $Gck^{+/+}$ HFHS 群の GSIS はさらに増大し、 $Gck^{+/-}$ HFHS 群においても $Gck^{+/-}$ NC 群に比べ GSIS の増大を認めた (Figure 6b)。その後 60 週齢においては、 $Gck^{+/+}$ HFHS 群、 $Gck^{+/-}$ HFHS 群ともに GSIS のさらなる増大を示し、特に $Gck^{+/+}$ HFHS 群にてより明らかな増大を認めた (Figure 6c)。すなわち、 $Gck^{+/+}$ HFHS 群、 $Gck^{+/-}$ HFHS 群とも GSIS の経時的な増大を認めるが、 $Gck^{+/+}$ HFHS 群における増大はより早く、より顕著であった。

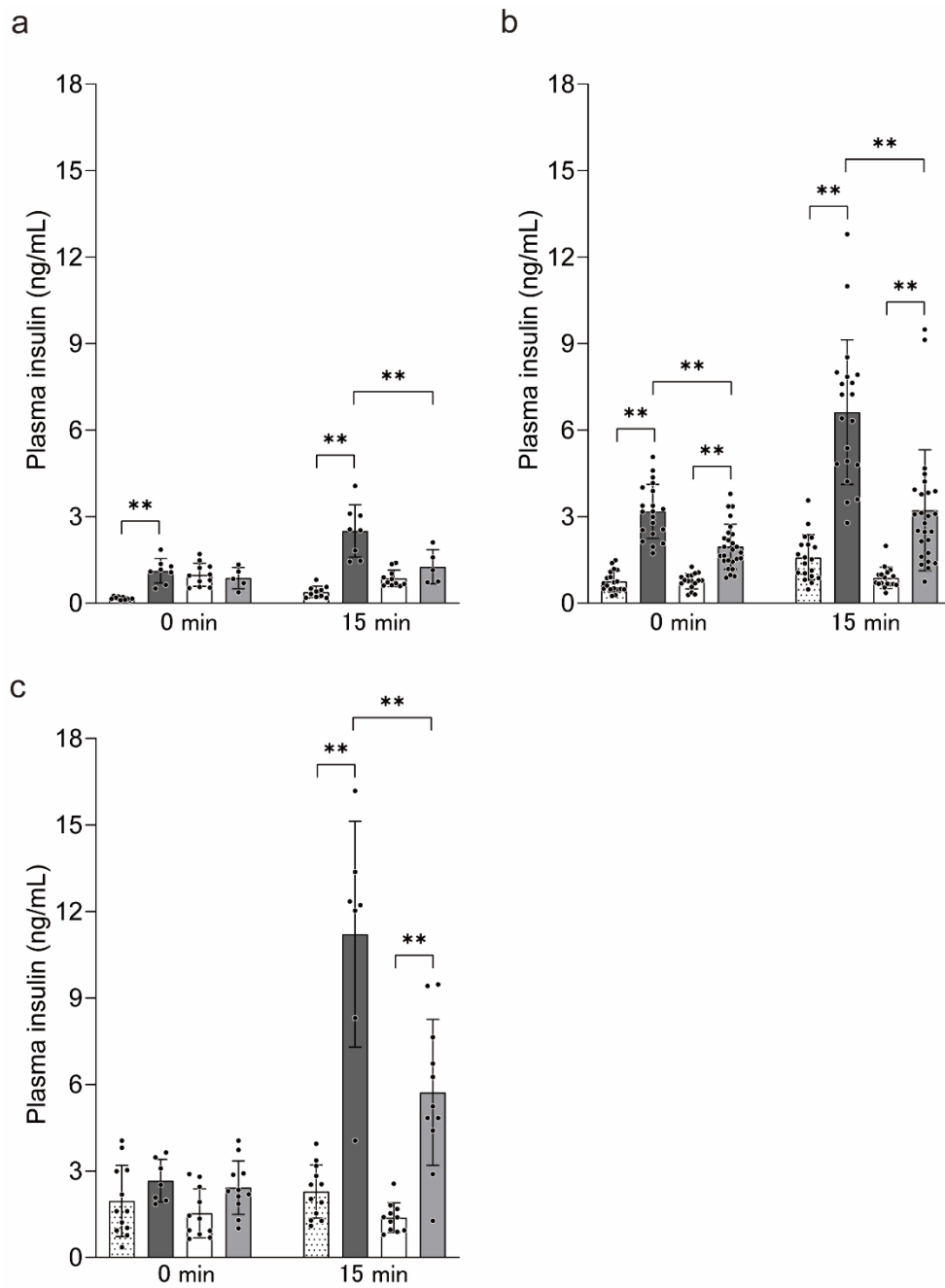


Figure 6. 各群のマウスの16、40、60週齢におけるGSIS

Gck^{+/+}NC 群 (黒点)、*Gck*^{+/+}HFHS 群 (濃灰色)、*Gck*^{+/-}NC 群 (白) および *Gck*^{+/-}HFHS 群 (薄灰色) における16週齢 (a) (n=5-11)、40週齢 (b) (n=17-26)、60週齢 (c) (n=7-12) での糖負荷前、負荷後15分における血清インスリン濃度 (平均 ± SD) ** *P* < 0.01

5.4 膵β細胞量の評価

Figure 7 に、各群のマウスの 16、40、60 週齢における膵組織切片の抗インスリン抗体による免疫組織染色の顕微鏡写真を示し、Figure 8 に、膵β細胞量を定量評価した結果を示した。16 週齢における膵β細胞量は、4 群間で有意差はなかった (Figure 8a)。40 週齢においては、 $Gck^{+/+}$ HFHS 群の膵β細胞量は $Gck^{+/+}$ NC 群に比べ増大したが、 $Gck^{+/-}$ HFHS 群と $Gck^{+/-}$ NC 群の膵β細胞量には差がなかった (Figure 8b)。その後 60 週齢においては、 $Gck^{+/+}$ HFHS 群の膵β細胞量はさらに増大し、 $Gck^{+/-}$ HFHS 群においても増大傾向を認めた (Figure 8c)。すなわち、膵β細胞量は $Gck^{+/+}$ HFHS 群で顕著に増大したが、 $Gck^{+/-}$ HFHS 群においても経時的な増大傾向を示した。

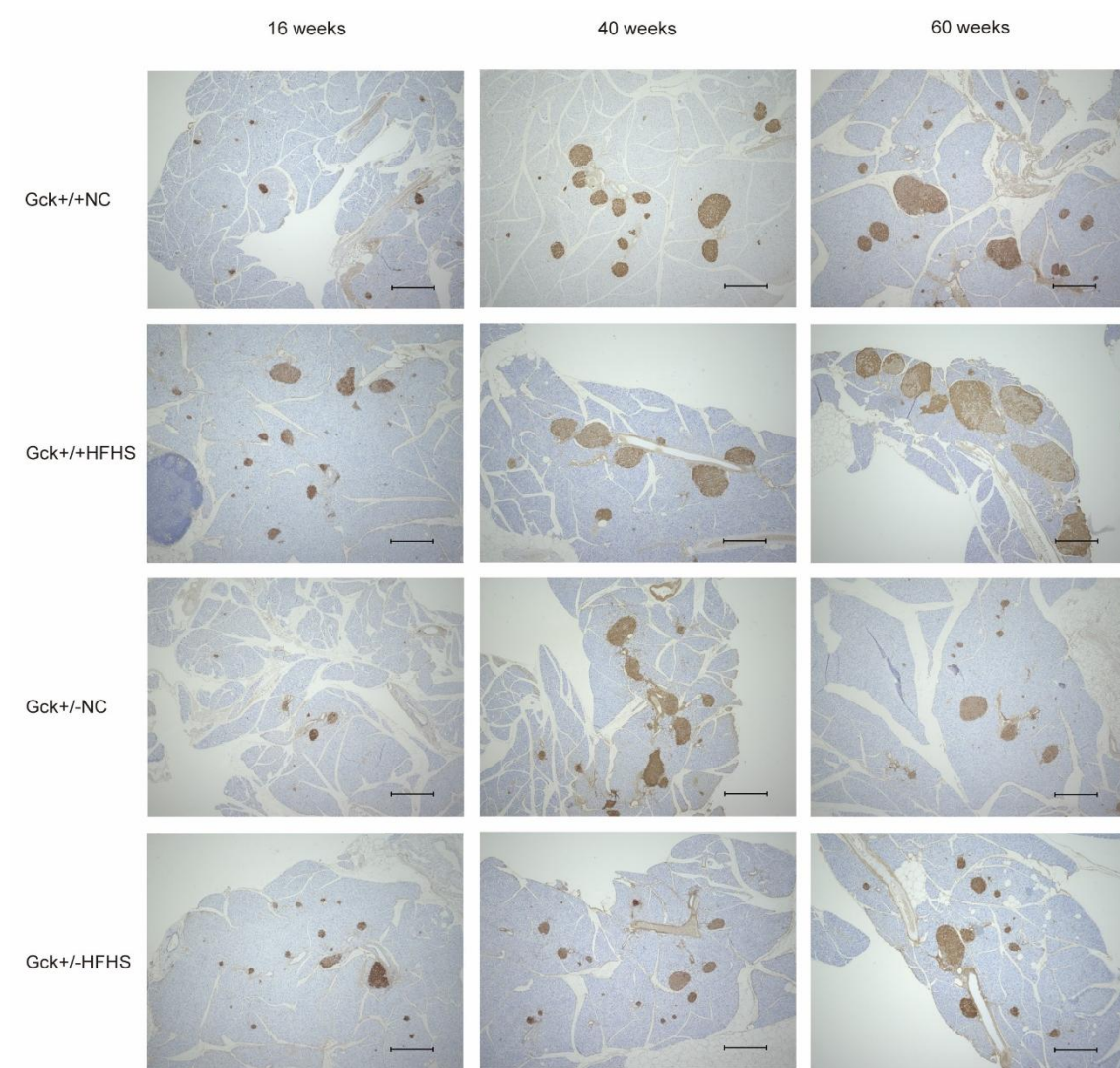


Figure 7. 各群のマウスの 16、40、60 週齢における膵組織切片に対する抗インスリン抗体による免疫組織染色
 膵 β 細胞 (インスリン): 茶褐色、スケール: 500 μm

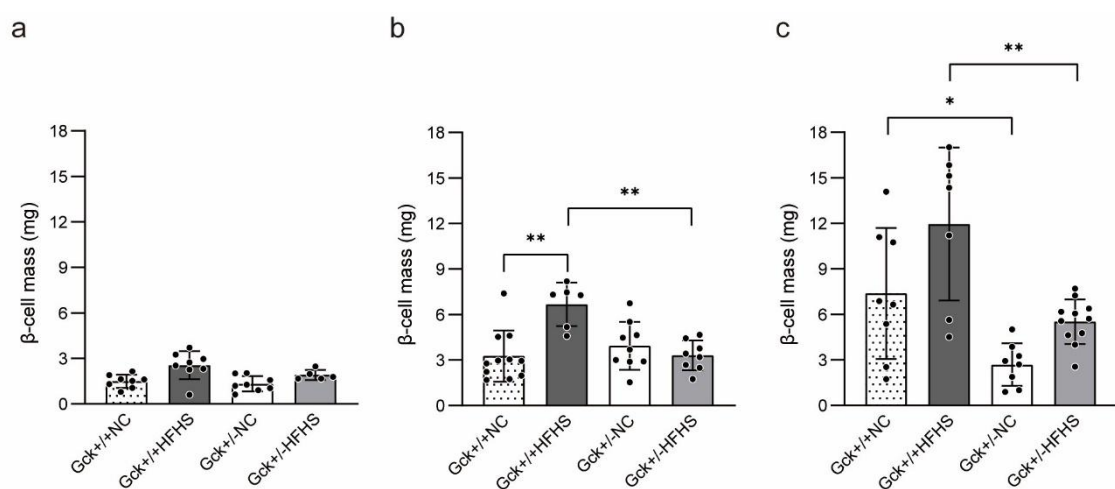


Figure 8. 各群のマウスの16、40、60週齢における膵 β 細胞量
 $Gck^{+/+}NC$ 群 (黒点)、 $Gck^{+/+}HFHS$ 群 (濃灰色)、 $Gck^{+/-}NC$ 群 (白) および
 $Gck^{+/-}HFHS$ 群 (薄灰色) における16週齢(a) (n=5-8)、40週齢(b) (n=6-11)、60週
 齢(c) (n=7-11) における膵 β 細胞量 (平均 $\pm$ SD) ** $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$

5.5 DNA マイクロアレイ法による膵島の遺伝子発現の解析

$Gck^{+/+}$ HFHS 群および $Gck^{+/-}$ HFHS 群の膵島の遺伝子発現を DNA マイクロアレイ法により解析した。22,206 遺伝子のうち 356 遺伝子の発現に $\text{ratio} > 1.5$ もしくは $\text{ratio} < 0.67$ 、および $P < 0.05$ の有意な差を認め、 $Gck^{+/+}$ HFHS 群に比べ $Gck^{+/-}$ HFHS 群にて、128 遺伝子の発現が上昇し、228 遺伝子の発現が低下した (Figure 9)。発現上昇および発現低下遺伝子の上位 20 個を Table 3 および Table 4 に示した。発現低下遺伝子の上位に *Spp1*、*Fos*、*Aldh1a3*、*Nupr1* が含まれ、これらの遺伝子は膵 β 細胞のストレスにより膵島での発現が上昇することが報告されている (Cai et al, 2018; Mallo et al, 1997; Path et al, 2020; Priya et al, 2020; Shimamura et al, 2010; Singh et al, 2013)。発現上昇および発現低下遺伝子についてパスウェイ解析を行い、Novel Jun-Dmp1 パスウェイおよび TGF- β パスウェイを含む 6 つのパスウェイで有意な変動を認めた (Table 5)。

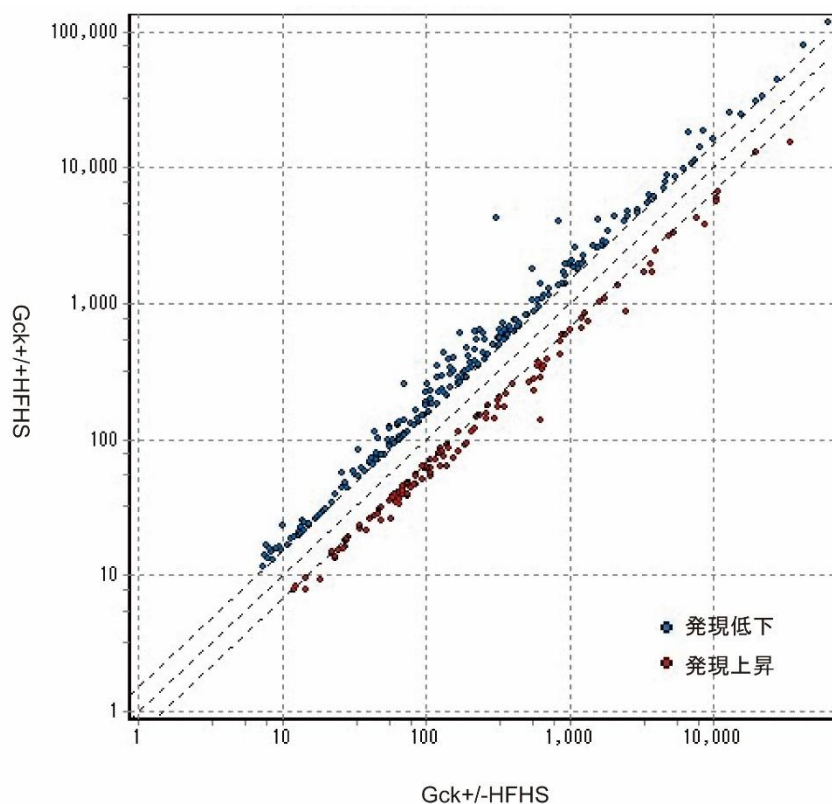


Figure 9. DNA マイクロアレイ解析 Scatter Plot

$Gck^{+/+}$ HFHS 群および $Gck^{+/-}$ HFHS 群 (各々 $n = 4$) の腓島の遺伝子発現を DNA マイクロアレイ法により解析した。 $Gck^{+/+}$ HFHS 群に対する $Gck^{+/-}$ HFHS 群のシグナル値が $\text{ratio} > 1.5$ かつ $P < 0.05$ の遺伝子を発現上昇遺伝子、 $\text{ratio} < 0.67$ かつ $P < 0.05$ の遺伝子を発現低下遺伝子と定義した。

Table 3. DNA マイクロアレイ解析における発現上昇上位 20 遺伝子

Gene Symbol	Gene Accession	P-value	Ratio
<i>Nrcam</i>	NM_001146031	0.02950	4.529
<i>Gria3</i>	NM_001281929	0.02421	2.853
<i>Pdk4</i>	NM_013743	0.00748	2.468
<i>Rbp4</i>	NM_001159487	0.02038	2.303
<i>Slc16a7</i>	NM_011391	0.04280	2.233
<i>Hrh3</i>	NM_133849	0.00395	2.204
<i>Rab3c</i>	NM_023852	0.02065	2.198
<i>1700086L19Rik</i>	NR_030733	0.04217	2.191
<i>Pcdh15</i>	NM_001142735	0.03069	2.181
<i>Myo3a</i>	NM_148413	0.00016	2.175
<i>Dpp10</i>	NM_199021	0.04415	2.154
<i>Fbxo47</i>	NM_001081435	0.03417	2.098
<i>Galnt13</i>	NM_173030	0.02984	2.078
<i>Scn3b</i>	NM_001083917	0.04781	2.075
<i>Ptprz1</i>	NM_001081306	0.03182	2.049
<i>Asic2</i>	NM_001034013	0.01799	2.027
<i>Epb41l4a</i>	NM_013512	0.00189	2.023
<i>Hcar1</i>	NM_175520	0.02590	2.022
<i>Ankrd34c</i>	NM_207260	0.00601	2.006
<i>Dpp6</i>	NM_001136060	0.03635	2.003

Table 4. DNA マイクロアレイ解析における発現低下上位 20 遺伝子

Gene Symbol	Gene Accession	P-value	Ratio
<i>Spp1</i>	NM_001204201	0.00355	0.071
<i>Gucy2c</i>	NM_001127318	0.01929	0.208
<i>Fos</i>	NM_010234	0.00940	0.283
<i>Necab2</i>	NM_054095	0.00305	0.290
<i>Dapl1</i>	NM_029723	0.00745	0.306
<i>Rasd2</i>	NM_029182	0.00259	0.312
<i>Gm3298</i>	ENSMUST00000165289	0.02709	0.342
<i>Aldh1a3</i>	NM_053080	0.01939	0.350
<i>Fabp4</i>	NM_024406	0.01750	0.360
<i>Serpina7</i>	NM_177920	0.00559	0.365
<i>Nupr1</i>	NM_019738	0.02311	0.374
<i>Cpne4</i>	NM_028719	0.00799	0.374
<i>Creld2</i>	NM_029720	0.04892	0.378
<i>Rasl10b</i>	NM_001013386	0.01203	0.387
<i>Jchain</i>	NM_152839	0.03197	0.393
<i>Apof</i>	NM_133997	0.00135	0.397
<i>Gm8281</i>	ENSMUST00000100893	0.03760	0.405
<i>Gabra4</i>	NM_010251	0.00058	0.411
<i>Pcp4</i>	NM_008791	0.04728	0.413
<i>Thbs1</i>	NM_011580	0.01510	0.419

Table 5. DNA マイクロアレイ解析におけるパスウェイ解析

Pathway	Total	Up	Down	P-value	Up List	Down List
Mm_Triacylglyceride_synthesis_WP386_117951	23	2	1	0.009607	<i>Lpl, Gk</i>	<i>Plpp1</i>
Mm_Novel_Jun-Dmp1_pathway_WP3654_116721	26	0	3	0.013013		<i>Jun, Fos, Myc</i>
Mm_TGF-beta_signaling_pathway_WP113_116497	52	0	4	0.015194		<i>Thbs1, Jun, Spp1, Fos</i>
Mm_Electron_transport_chain_WP295_117879	94	0	5	0.027087		<i>Cox6a1, Ndufs7, Atp5o, Ndufs8, Cox8a</i>
Mm_Retinol_metabolism_WP1259_106842	39	2	1	0.034876	<i>Lpl, Rbp4</i>	<i>Aldh1a3</i>
Mm_GPCRs_peptide_WP234_117936	69	3	1	0.036202	<i>Avpr1b, Cxcr6, Sstr2</i>	<i>Ednrb</i>

5.6 リアルタイム PCR 法による膵島の遺伝子発現の解析

次に、リアルタイム定量 PCR 法を用いて、細胞増殖に関与する *Ki67*、膵 β 細胞機能関連転写因子である *Mafa*、*Nkx6.1*、*Pdx1*、膵 β 細胞によるグルコースの取り込みに関与する *Slc2a2*、マイクロアレイ解析にて *Gck*^{+/-}HFHS 群で発現が低下し注目された *Spp1*、*Fos*、*Aldh1a3*、*Nupr1* の発現を評価した (Figure 10)。膵 β 細胞量の評価においては、*Gck*^{+/+}HFHS 群にて最も顕著な膵 β 細胞量の増大を認めたが、リアルタイム PCR 法による *Ki67* の発現は、*Gck*^{+/-}HFHS 群において *Gck*^{+/-}NC 群に比べて上昇した一方で、*Gck*^{+/+}HFHS 群と *Gck*^{+/+}NC 群の間には有意差はなかった (Figure 10a)。*Mafa*、*Nkx6.1*、*Pdx1* の発現は、野生型マウス、*Gck*^{+/-}マウスの両マウスとも、HFHS 群で NC 群に比べ低下することはなかった (Figure 10b-d)。むしろ、*Pdx1* の発現は *Gck*^{+/-}NC 群に比べ *Gck*^{+/-}HFHS 群で上昇しており、*Mafa* の発現においても同様の傾向が認められた (Figure 10b, d)。*Slc2a2* の発現は 4 群間で差はなかった (Figure 10e)。*Aldh1a3* の発現は、*Gck*^{+/+}HFHS 群は *Gck*^{+/+}NC 群に比べて上昇した一方で、*Gck*^{+/-}HFHS 群は *Gck*^{+/-}NC 群と比べ上昇を認めなかった。また、*Gck*^{+/+}HFHS 群における発現は、*Gck*^{+/-}HFHS 群に比べても上昇しており、マイクロアレイ解析の結果と一致した (Figure 10f)。*Aldh1a3* 以外のマイクロアレイ解析にて *Gck*^{+/-}HFHS 群で発現が低下し注目された遺伝子に関しては、*Nupr1* は *Gck*^{+/+}HFHS 群に比べ *Gck*^{+/-}HFHS 群で発現が低下したが、*Spp1* と *Fos* は *Gck*^{+/+}HFHS 群と *Gck*^{+/-}HFHS 群で発現に差はなかった (Figure 10g-i)。

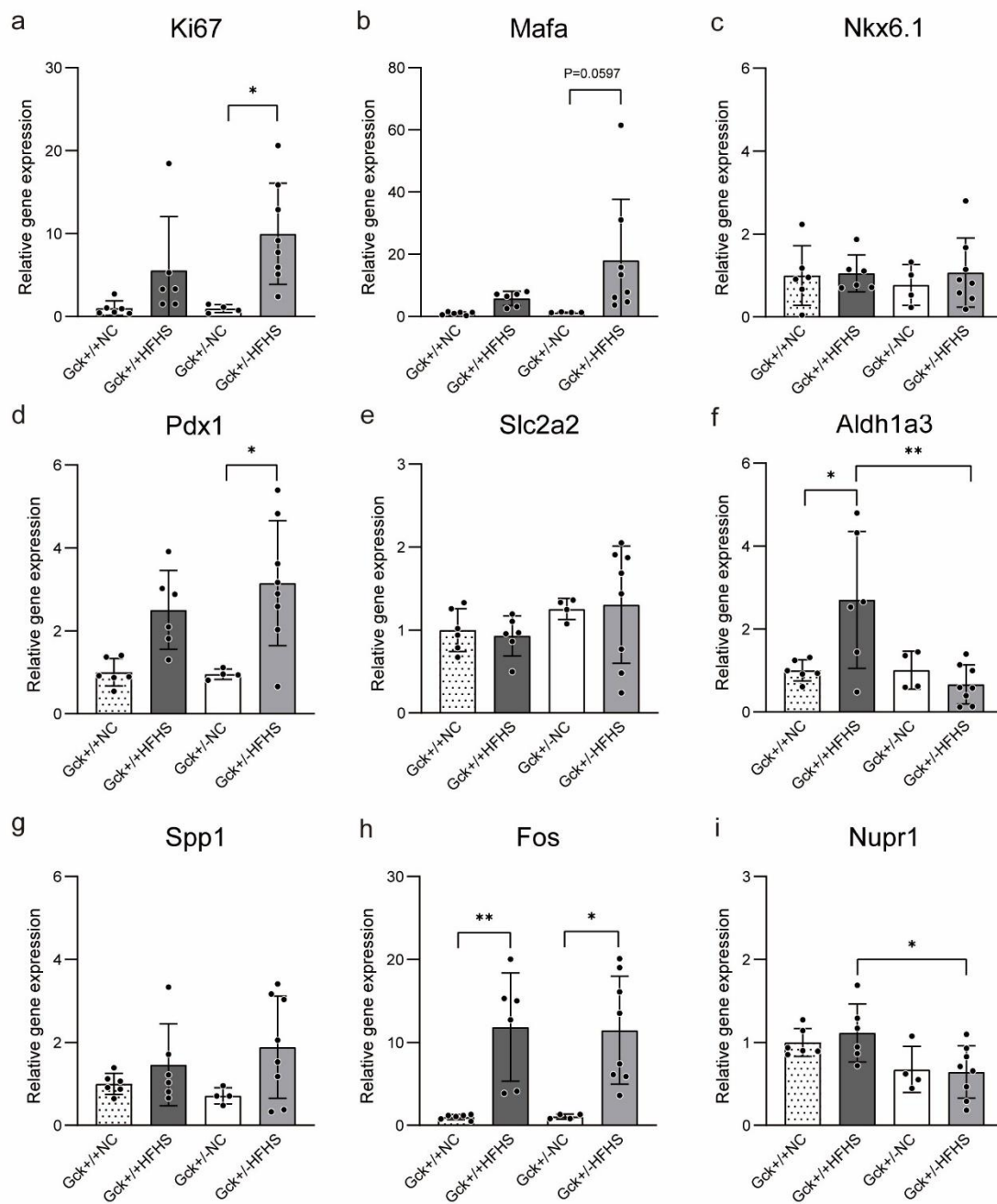


Figure 10. 注目される遺伝子について各群のマウスの40週齢での膵島における発現

$Gck^{+/+}$ NC 群 (黒丸)、 $Gck^{+/+}$ HFHS 群 (濃灰色)、 $Gck^{+/-}$ NC 群 (白)、 $Gck^{+/-}$ HFHS 群 (薄灰色) (平均 $\pm$ SD) (n=4-8) ** $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$
内因性コントロールとして *Actb* を用いた。

6. 考察

本研究において、 $Gck^{+/-}$ マウスは HFHS 負荷に対する膵 β 細胞量およびインスリン分泌の代償性増大が野生型マウスに比べて少なく耐糖能が悪化した。しかし、長期的には膵 β 細胞量やインスリン分泌能の低下はなく、むしろ増加傾向であり、耐糖能の進行性の悪化は認めなかった。寺内ら (Terauchi et al, 2007) は、野生型マウスおよび $Gck^{+/-}$ マウスに高脂肪食を 20 週間投与し、膵 β 細胞量の代償性増大にグルコキナーゼが重要であることを示した。この結果は、 $Gck^{+/-}$ マウスへの高脂肪食負荷は進行性の耐糖能悪化をもたらすことを想像させるかもしれない。しかし、本研究はより長期の経時的な観察により、食餌負荷による $Gck^{+/-}$ マウスの耐糖能の悪化は、膵 β 細胞量やインスリン分泌の増大の表現型の出現が野生型マウスに比べて緩徐であることに起因し、進行性の悪化は来さないことを明らかにした。 $Gck^{+/-}$ マウスにおける表現型の出現が緩徐となる原因について、インスリン抵抗性の違いに起因するものではないことが確認され、寺内らが示したようにグルコキナーゼの発現に関連するものと考えられた。

ところで、本研究は寺内らの検討とは異なり、HFHS 食を使用しており、異なる栄養素による膵 β 細胞増大のメカニズムが同じかどうかという問いが生じる。この点について、我々は以前野生型マウスおよび $Gck^{+/-}$ マウスに高炭水化物食を 15 週間投与し、高炭水化物食においてもグルコキナーゼが膵 β 細胞の代償性増大に重要であること、すなわち異なる栄養素においてもそのメカニズムは同様であることを報告している (Tsuchida et al, 2021)。

ここで改めて、本研究が上記 2 つの先行研究と異なる点は、用いた餌の種類と、より長期の経時的な観察を行った点である。本研究にて HFHS 食を用いた目的は、膵 β 細胞への負荷をより大きくすることにあった。本研究で用いた HFHS 食は、脂質に占める飽和脂肪酸の割合が高いが、飽和脂肪酸の一つであるパルミチン酸は膵 β 細胞の機能障害を誘発することが報告されている (Eguchi et al, 2012)。しかし、本研究は自由摂餌下で実施され、体重および血糖の増加は、高脂肪食負荷に比べ少なかった。そのため、HFHS 食を用いることによる膵 β 細胞へのストレスの増大は我々の期待に沿うものではなかった可能性がある。一方で、より長期の経時的な観察により新たに得られた知見は本研究の強みである。繰り返しとなるが、本研究はより長期の観察により、食餌負荷における $Gck^{+/-}$ マウスの耐糖能の悪化が、糖尿病の非代償期でみられるような進行

性のものではないことを明らかにした。

本研究におけるもう一つの重要な結果は、HFHS 食の負荷により、野生型マウスでは膵島における *Aldh1a3* の発現が上昇したが、*Gck*^{+/-}マウスでは上昇を認めなかったことである。アルデヒドデヒドロゲナーゼは、酸化ストレス、脂質過酸化の過程で生じるアルデヒドを代謝する。アルデヒドデヒドロゲナーゼの発現は一般的にストレス応答性に上昇し、酸化ストレスの軽減に役立つとされる (Singh et al, 2013)。膵島における *Aldh1a3* の発現が上昇するメカニズムは明らかにされていないが、島村ら (Shimamura et al, 2010) は、高脂肪食誘導性糖尿病モデルマウスや *db/db* マウスにおいて、耐糖能の悪化とともに膵島における *Aldh1a3* の発現が上昇したことを報告している。また、Kim-Muller ら (Kim-Muller et al, 2016) は、膵島における *Aldh1a3* の発現が様々な糖尿病モデルで上昇し、*Aldh1a3* の発現上昇は糖尿病の膵 β 細胞に共通する特徴であると報告している。さらに、Son ら (Son et al, 2023) は、膵 β 細胞特異的に *Aldh1a3* をノックアウトした *db/db* マウスにおいて、耐糖能とインスリン分泌が改善することを示した。これらは、*Aldh1a3* の発現が膵 β 細胞機能と関連していることを示唆している。

本研究において、HFHS 食を摂餌した野生型マウスは膵 β 細胞量とインスリン分泌が著明に増大したが、*Aldh1a3* の発現が上昇しており、代謝ストレスの増大と膵 β 細胞機能を抑制する方向の状態も同時に存在することが示唆された。一方、HFHS 食を摂餌した *Gck*^{+/-}マウスは *Aldh1a3* の発現上昇を認めなかった。この結果から、*Gck*^{+/-}マウスにおいては膵 β 細胞への糖負荷が増大しても、グルコキナーゼ以降の代謝シグナルが抑制されるため、代謝ストレスが増大せず、膵 β 細胞量・機能の低下が防がれたと考えられた。マイクロアレイ解析のパスウェイ解析における Novel Jun-Dmp1 パスウェイおよび TGF-β パスウェイの有意な変動 (関連遺伝子は野生型マウスに比べ *Gck*^{+/-}マウスにおいて発現が低下した) や、マイクロアレイ解析およびリアルタイム PCR 法での *Gck*^{+/-}マウスにおける *Nupr1* の発現低下はこの考えを支持した。

Aldh1a3 の発現は、膵 β 細胞の脱分化に関連して上昇することも知られている (Cinti et al, 2016)。HFHS 食を摂餌した野生型マウスにおいて *Aldh1a3* の発現が上昇することは、HFHS 食の負荷が膵 β 細胞の脱分化を誘導することを示唆しているのかもしれない。しかし、膵臓前駆細胞マーカーである *Neurog3* の発現は、マイクロアレイ解析 (Ratio 1.209, *P* = 0.40) にて、HFHS 食を摂餌した野生型マウスと *Gck*^{+/-}マウスの間で差は認めなかった。従って、HFHS 食の負荷が野生型マウスにおいて脱分化を誘導する可能性について議論するためにはさら

なる検討が必要である。

緒言で述べたように、我々は以前グルコキナーゼヘテロ欠損 *db/db* マウスを樹立し解析を行い、グルコキナーゼヘテロ欠損は *db/db* マウスの細胞内代謝パターンを改善させ、膵 β 細胞量・機能を保持することを報告した (Nakamura et al, 2021; Omori et al, 2021)。そして本研究は、*db/db* マウスと同様に HFHS 食による食餌誘導性肥満・糖尿病モデルマウスにおいても、グルコキナーゼヘテロ欠損は膵 β 細胞量・機能の進行性の低下を防ぐことを示した。一方で、本研究と *db/db* マウスを用いた研究とでいくつかの異なる点を認めた。まず、*db/db* マウスは耐糖能が著しく低下したが、HFHS 食を負荷した野生型マウスは 60 週齢まで耐糖能の低下を認めなかった。さらに、*db/db* マウスは、*Ki67*、*Mafa*、*Nkx6.1*、*Pdx1* 遺伝子の発現が、*Gck^{+/-}db/db* マウスに比べ低下したが、本研究ではこれらの遺伝子の発現について HFHS 食を摂餌した野生型マウスと *Gck^{+/-}* マウスの間に有意差は認めなかった。これは、HFHS 食の長期負荷による膵 β 細胞への糖負荷が、*db/db* マウスのそれよりもはるかに低いためと考えられた。したがって、膵 β 細胞への糖負荷がより強く、野生型マウスで耐糖能が低下するような別の食餌誘導性肥満・糖尿病モデルが確立されれば、表現型の差がより明らかとなり、グルコキナーゼの抑制による膵 β 細胞に対する保護効果がさらに明確に示されることが期待され、今後の検討課題である。

7. 結論

高脂肪高スクロース食負荷による食餌誘導性肥満・糖尿病モデルマウスにおいて、グルコキナーゼの抑制は膵 β 細胞量・機能および耐糖能の進行性の低下を抑制することを明らかとした。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。

グルコキナーゼヘテロ欠損マウス ($Gck^{+/-}$) 雄 4 週齢および対照として野生型マウス ($Gck^{+/+}$) 雄 4 週齢をそれぞれ普通食飼育群 (NC 群) と、高脂肪高スクロース食投与群 (HFHS 群) に群別し、その計 4 群をそれぞれ 16、40、60 週齢まで飼育し、耐糖能、グルコース応答性インスリン分泌、膵 β 細胞量について経時的に観察、さらに、40 週齢における膵島の遺伝子発現について DNA マイクロアレイ法 ($Gck^{+/-}$ HFHS vs. $Gck^{+/+}$ HFHS) 及びリアルタイム PCR 法にて比較検討したところ、

1. $Gck^{+/-}$ マウスは HFHS 負荷に対する膵 β 細胞量およびインスリン分泌の代償性増大が野生型マウスに比べて少なく耐糖能が悪化した。しかし、長期的には膵 β 細胞量やインスリン分泌能の低下はなく、むしろ増加傾向であり、耐糖能の進行性の悪化は認めなかった。
2. DNA マイクロアレイ法にて、 $Gck^{+/+}$ HFHS 群に比べ $Gck^{+/-}$ HFHS 群で発現が低下した遺伝子の上位に、*Spp1*、*Fos*、*Aldh1a3*、*Nupr1* などの膵 β 細胞のストレスにより発現が上昇することが報告されている遺伝子が含まれた。また、パスウェイ解析にて、Novel Jun-Dmp1 パスウェイおよび TGF- β パスウェイの変動が確認された。
3. リアルタイム PCR 法における解析においても、*Aldh1a3* の発現は $Gck^{+/+}$ HFHS 群で上昇した一方で、 $Gck^{+/-}$ HFHS 群では上昇を認めなかった。
4. *Ki67* および膵 β 細胞機能関連転写因子 (*Mafa*、*Nkx6.1*、*Pdx1*) の発現は $Gck^{+/+}$ HFHS 群、 $Gck^{+/-}$ HFHS 群のいずれにおいても低下はなかった。

本研究は、長期間の経時的な観察により、食餌負荷における $Gck^{+/-}$ マウスの耐糖能の悪化は、あくまでも膵 β 細胞量およびインスリン分泌の代償性増大が少ないことに起因するものであり、糖尿病の非代償期でみられるような進行性のものではないことを明らかにした。

さらに、HFHS 食を摂餌した野生型マウスで *Aldh1a3* の発現が上昇した一方で、HFHS を摂餌した *Gck*^{+/-}マウスでは *Aldh1a3* の発現上昇を認めなかったことや、その他上記 DNA マイクロアレイ法による結果からは、*Gck*^{+/-}マウスにおいては膵 β 細胞への糖負荷が増大しても、グルコキナーゼ以降の代謝シグナルが抑制されることにより、代謝ストレスが増大せず、膵 β 細胞量・機能の低下が防がれたと考えられた。

すなわち、本研究で得られた知見により、*db/db* マウスにおいてグルコキナーゼの抑制が膵 β 細胞量・機能を維持し、耐糖能を改善させたのと同様に、食餌誘導性肥満・糖尿病モデルマウスにおいても、グルコキナーゼの抑制は膵 β 細胞量・機能および耐糖能の進行性の低下を抑制することが明らかとなった。

一方、*db/db* マウスは、*Ki67*、*Mafa*、*Nkx6.1*、*Pdx1* 遺伝子の発現が、*Gck*^{+/-}*db/db* マウスに比べ低下したのに対し、本研究ではこれらの遺伝子の発現について HFHS 食を摂餌した野生型マウスと *Gck*^{+/-}マウスの間に有意差はなく、HFHS 食の長期負荷による膵 β 細胞への糖負荷は、*db/db* マウスのそれよりもはるかに低いと考えられた。膵 β 細胞への糖負荷がより強く、野生型マウスで耐糖能が低下するような別の食餌誘導性肥満・糖尿病モデルが確立されれば、表現型の差がより明らかとなり、グルコキナーゼの抑制による膵 β 細胞に対する保護効果がさらに明確に示されることが期待され、今後の検討課題である。

現在の糖尿病治療法の開発においては、膵 β 細胞の保護に注目がおかれている。本研究は *db/db* マウスでの研究による「グルコキナーゼの抑制が膵 β 細胞に対して保護的に働く」という知見にさらに一步を積み上げるものであるが、今後グルコキナーゼの抑制に着目した創薬などを通じた、臨床医療への還元が期待される。

8. 謝辞

本論文は筆者が北海道大学大学院医学院 内科学分野 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頂き、その遂行にあたって終始、御指導を頂きました。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、適切な御助言を頂きました。ここに心より深く感謝の意を表します。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院 内科学分野 免疫・代謝内科学教室 亀田啓先生、野本博司先生、川田晋一郎先生、山内裕貴先生、宮崎あすか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、当科実験助手の渡邊真理華さん、東真理さん、藤森なつみ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ほど多くの御協力、御助言、御支援を頂きました。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。

9. 利益相反

本研究に開示すべき利益相反状態はない。

10. 参考文献

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

Cai M, Bompada P, Salehi A, Acosta JR, Prasad RB, Atac D, Laakso M, Groop L and De Marinis Y (2018) Role of osteopontin and its regulation in pancreatic islet. *Biochem Biophys Res Commun* 495, 1426-1431.

Cinti F, Bouchi R, Kim-Muller JY, Ohmura Y, Sandoval PR, Masini M, Marselli L, Suleiman M, Ratner EL, Marchetti P, et al (2016) Evidence of beta-cell dedifferentiation in human type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 101, 1044-1054.

Collaborators GBDD (2023) Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet* 402, 203-234.

Eguchi K, Manabe I, Oishi-Tanaka Y, Ohsugi M, Kono N, Ogata F, Yagi N, Ohto U, Kimoto M, Miyake K, et al (2012) Saturated fatty acid and TLR signaling link beta cell dysfunction and islet inflammation. *Cell Metab* 15, 518-533.

Eizirik DL, Pasquali L and Cnop M (2020) Pancreatic beta-cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure. *Nat Rev Endocrinol* 16, 349-362.

Grimsby J, Sarabu R, Corbett WL, Haynes NE, Bizzarro FT, Coffey JW, Guertin KR, Hilliard DW, Kester RF, Mahaney PE, et al (2003) Allosteric activators of glucokinase: potential role in diabetes therapy. *Science* 301, 370-373.

Kassem S, Bhandari S, Rodriguez-Bada P, Motaghedi R, Heyman M, Garcia-Gimeno MA, Cobo-Vuilleumier N, Sanz P, Maclaren NK, Rahier J, et al (2010) Large islets, beta-cell proliferation, and a glucokinase mutation. *N Engl J Med* 362, 1348-1350.

Kawata S, Nakamura A, Miyoshi H, Yang K, Shigesawa I, Yamauchi Y, Tsuchida K, Omori K, Takahashi K, Nomoto H, et al (2022) Glucokinase activation leads to an unsustained hypoglycaemic effect with hepatic triglyceride accumulation in db/db mice. *Diabetes Obes Metab* 24, 391-401.

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

Kim-Muller JY, Fan J, Kim YJ, Lee SA, Ishida E, Blaner WS and Accili D (2016) Aldehyde dehydrogenase 1a3 defines a subset of failing pancreatic beta cells in diabetic mice. *Nat Commun* 7, 12631.

Kiyosue A, Hayashi N, Komori H, Leonsson-Zachrisson M and Johnsson E (2013) Dose-ranging study with the glucokinase activator AZD1656 as monotherapy in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab* 15, 923-930.

Mallo GV, Fiedler F, Calvo EL, Ortiz EM, Vasseur S, Keim V, Morisset J and Iovanna JL (1997) Cloning and expression of the rat p8 cDNA, a new gene activated in pancreas during the acute phase of pancreatitis, pancreatic development, and regeneration, and which promotes cellular growth. *J Biol Chem* 272, 32360-32369.

Matschinsky FM, Magnuson MA, Zelent D, Jetton TL, 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.

Matschinsky FM and Wilson DF (2019) The Central Role of Glucokinase in Glucose Homeostasis: A Perspective 50 Years After Demonstrating the Presence of the Enzyme in Islets of Langerhans. *Front Physiol* 10, 148.

Meininger GE, Scott R, Alba M, Shentu Y, Luo E, Amin H, Davies MJ, Kaufman KD and Goldstein BJ (2011) Effects of MK-0941, a novel glucokinase activator, on glycemic control in insulin-treated patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 34, 2560-2566.

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.

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

Nakamura A, Omori K and Terauchi Y (2021) Glucokinase activation or inactivation: Which will lead to the treatment of type 2 diabetes? *Diabetes Obes Metab* 23, 2199-2206.

Nakamura A (2022) Glucokinase as a therapeutic target based on findings from the analysis of mouse models. *Endocr J* 69, 479-485.

Omori K, Nakamura A, Miyoshi H, Yamauchi Y, Kawata S, Takahashi K, Kitao N, Nomoto H, Kameda H, Cho KY, et al (2021) Glucokinase Inactivation Paradoxically Ameliorates Glucose Intolerance by Increasing beta-Cell Mass in db/db Mice. *Diabetes* 70, 917-931.

Path G, Mehana AE, Pilz IH, Alt M, Baumann J, Sommerer I, Hoffmeister A and Seufert J (2020) NUPR1 preserves insulin secretion of pancreatic beta-cells during inflammatory stress by multiple low-dose streptozotocin and high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 319, E338-E344.

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 beta cell regeneration by glucose metabolism. *Cell Metab* 13, 440-449.

Priya Dharshini LC, Vishnupriya S, Sakthivel KM and Rasmi RR (2020) Oxidative stress responsive transcription factors in cellular signalling transduction mechanisms. *Cell*

Signal 72, 109670.

Shimamura M, Karasawa H, Sakakibara S and Shinagawa A (2010) Raldh3 expression in diabetic islets reciprocally regulates secretion of insulin and glucagon from pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 401, 79-84.

Singh S, Brocker C, Koppaka V, Chen Y, Jackson BC, Matsumoto A, Thompson DC and Vasiliou V (2013) Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress. *Free Radic Biol Med* 56, 89-101.

Son J, Du W, Esposito M, Shariati K, Ding H, Kang Y and Accili D (2023) Genetic and pharmacologic inhibition of ALDH1A3 as a treatment of beta-cell failure. *Nat Commun* 14, 558.

Terauchi Y, Sakura H, Yasuda K, Iwamoto K, Takahashi N, Ito K, Kasai H, Suzuki H, Ueda O, Kamada N, et al (1995) Pancreatic β -Cell-specific Targeted Disruption of Glucokinase Gene. *J Biol Chem* 270, 30253-30256.

Terauchi Y, Iwamoto K, Tamemoto H, Komeda K, Ishii C, Kanazawa Y, Asanuma N, Aizawa T, Akanuma Y, Yasuda K, et al (1997) Development of non-insulin-dependent diabetes mellitus in the double knockout mice with disruption of insulin receptor substrate-1 and beta cell glucokinase genes. Genetic reconstitution of diabetes as a polygenic disease. *J Clin Invest* 99, 861-866.

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 beta cells. *Cell Metab* 19, 109-121.

Tornovsky-Babeay S, Weinberg-Corem N, Ben-Haroush Schyr R, Avrahami D, Lavi J, Feleke E, Kaestner KH, Dor Y and Glaser B (2021) Biphasic dynamics of beta cell mass in a mouse model of congenital hyperinsulinism: implications for type 2 diabetes. *Diabetologia* 64, 1133-1143.

Toulis KA, Nirantharakumar K, Pourzitaki C, Barnett AH and Tahrani AA (2020) Glucokinase Activators for Type 2 Diabetes: Challenges and Future Developments. *Drugs* 80, 467-475.

Tsuchida K, Nakamura A, Miyoshi H, Yang K, Yamauchi Y, Kawata S, Omori K, Takahashi K, Kitao N, Nomoto H, et al (2021) Glucokinase is required for high-starch diet-induced beta-cell mass expansion in mice. *J Diabetes Investig* 12, 1545-1554.

Vella A, Freeman JLR, Dunn I, Keller K, Buse JB and Valcarce C (2019) Targeting hepatic glucokinase to treat diabetes with TTP399, a hepatoselective glucokinase activator. *Sci Transl Med* 11.

Weir GC, Gaglia J and Bonner-Weir S (2020) Inadequate beta-cell mass is essential for the pathogenesis of type 2 diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol* 8, 249-256.

Wilding JP, Leonsson-Zachrisson M, Wessman C and Johnsson E (2013) Dose-ranging study with the glucokinase activator AZD1656 in patients with type 2 diabetes mellitus on metformin. *Diabetes Obes Metab* 15, 750-759.

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

Yang W, Zhu D, Gan S, Dong X, Su J, Li W, Jiang H, Zhao W, Yao M, Song W, et al (2022) Dorzagliatin add-on therapy to metformin in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Nat Med* 28, 974-981.

Zhu D, Gan S, Liu Y, Ma J, Dong X, Song W, Zeng J, Wang G, Zhao W, Zhang Q, et al (2018) Dorzagliatin monotherapy in Chinese patients with type 2 diabetes: a dose-ranging,

randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 6, 627-636.

Zhu D, Li X, Ma J, Zeng J, Gan S, Dong X, Yang J, Lin X, Cai H, Song W, et al (2022) Dorzagliatin in drug-naïve patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Nat Med* 28, 965-973.

Zhu XX, Zhu DL, Li XY, Li YL, Jin XW, Hu TX, Zhao Y, Li YG, Zhao GY, Ren S, et al. (2018) Dorzagliatin (HMS5552), a novel dual-acting glucokinase activator, improves glycaemic control and pancreatic beta-cell function in patients with type 2 diabetes: A 28-day treatment study using biomarker-guided patient selection. *Diabetes Obes Metab* 20, 2113-2120.