



Title	膵β細胞量増加を目指した新たな2型糖尿病治療法の確立
Author(s)	大森, 一乃; Omori, Kazuno
Description	配架番号 : 2579
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14264号
Issue Date	2020-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14264
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/96147
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuno_Omori.pdf



学位論文

膵 β 細胞量増加を目指した

新たな 2 型糖尿病治療法の確立

**(Establishment of novel therapeutic approach for type 2
diabetes aimed at increasing pancreatic beta-cell mass)**

2020 年 9 月

北海道大学

大森 一乃

Kazuno Omori

学位論文

膵 β 細胞量増加を目指した

新たな2型糖尿病治療法の確立

**(Establishment of novel therapeutic approach for type 2
diabetes aimed at increasing pancreatic beta-cell mass)**

2020 年 9 月

北海道大学

大森 一乃

Kazuno Omori

目次

1. 発表論文目録及び学会発表目録.....	1 頁
2. 要旨	3 頁
3. 略語表	5 頁
4. 緒言	7 頁
5. 第一章 SGLT2 阻害薬またはインスリンによる血糖降下作用が膵 β 細胞量と肝脂肪化に与える影響.....	9 頁
5.1 緒言	10 頁
5.2 目的	12 頁
5.3 対象と方法.....	13 頁
5.3.1 研究デザイン.....	13 頁
5.3.2 対象.....	14 頁
5.3.3 評価項目	14 頁
5.3.4 体重・摂餌量の測定	14 頁
5.3.5 随時血糖の測定	15 頁
5.3.6 経口ブドウ糖負荷試験	15 頁
5.3.7 インスリン感受性の評価.....	15 頁
5.3.8 膵島単離.....	16 頁
5.3.9 膵島インスリン含量の測定.....	16 頁
5.3.10 膵の組織学的評価	17 頁
5.3.11 免疫組織染色（酵素抗体法）	17 頁
5.3.12 免疫組織染色（蛍光抗体法）	18 頁
5.3.13 遺伝子発現解析	20 頁
5.3.14 肝臓のオイルレッド O 染色と TG 含有量.....	22 頁
5.3.15 マイクロアレイ解析	22 頁
5.3.16 統計分析.....	23 頁
5.4 結果.....	24 頁
5.4.1 <i>db/db</i> マウスの代謝変化および耐糖能に及ぼすダパグリフロジンおよび/またはインスリングルルギンの効果	24 頁
5.4.2 <i>db/db</i> マウスの膵 β 細胞量に及ぼすダパグリフロジンおよび/またはインスリングルルギンの効果.....	40 頁
5.4.3 <i>db/db</i> マウスの肝脂肪化に対するダパグリフロジンおよび/またはインスリングルルギンの効果.....	50 頁
5.4.4 <i>db/db</i> マウスの肝臓における遺伝子発現に及ぼすダパグリフロジンおよび/	

またはインスリングラルギンの影響.....	72 頁
5.4.5 <i>db/db</i> マウスの血糖日内変動に及ぼすダパグリフロジンおよび/または インスリングラルギンの影響.....	79 頁
5.5 考察.....	82 頁
5.6 結語.....	85 頁
6. 第二章 膵β細胞特異的グルコキナーゼ抑制が膵β細胞量に与える影響...	86 頁
6.1 緒言.....	87 頁
6.2 目的.....	89 頁
6.3 対象と方法.....	90 頁
6.3.1 研究デザイン.....	90 頁
6.3.2 対象.....	90 頁
6.3.3 評価項目.....	91 頁
6.3.4 体重・摂餌量の測定.....	91 頁
6.3.5 随時血糖の測定.....	92 頁
6.3.6 経口ブドウ糖負荷試験.....	92 頁
6.3.7 インスリン感受性の評価.....	92 頁
6.3.8 膵島単離.....	93 頁
6.3.9 膵島インスリン含量の測定.....	93 頁
6.3.10 膵の組織学的評価.....	94 頁
6.3.11 免疫組織染色（酵素抗体法）.....	94 頁
6.3.12 免疫組織染色（蛍光抗体法）.....	95 頁
6.3.13 遺伝子発現解析.....	97 頁
6.3.14 メタボローム解析.....	100 頁
6.3.15 細胞培養実験.....	100 頁
6.3.16 統計分析.....	101 頁
6.4 結果.....	102 頁
6.4.1 膵β細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損 <i>db/db</i> マウスの樹立および表現型 の解析.....	102 頁
6.4.2 膵β細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損 <i>db/db</i> マウスの膵β細胞量...	120 頁
6.4.3 膵β細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損 <i>db/db</i> マウス単離膵島の遺伝子 発現の比較検討.....	123 頁
6.4.4 膵β細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損 <i>db/db</i> マウスの膵β細胞機能及び 増殖能.....	131 頁
6.4.5 膵β細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損 <i>db/db</i> マウスにおけるストレス マーカー及びブドウ糖代謝関連発現遺伝子.....	143 頁

6.4.6	膵 β 細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損 db/db マウスにおける膵島細胞内代謝パターンの変動	148 頁
6.4.7	高ブドウ糖状態下での膵 β 細胞関連転写因子に対するグルコキナーゼ阻害薬の効果	151 頁
6.5	考察	153 頁
6.6	結語	156 頁
7.	結論	157 頁
8.	謝辞	159 頁
9.	利益相反	160 頁
10.	引用文献	161 頁

1. 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として発表または投稿中である。

1. Kazuno Omori, Akinobu Nakamura, Hideaki Miyoshi, Kiyohiko Takahashi, Naoyuki Kitao, Hiroshi Nomoto, Hiraku Kameda, Kyu Yong Cho, Ryo Takagi, Kanako C. Hatanaka, Yasuo Terauchi, Tatsuya Atsumi. Effects of dapagliflozin and/or insulin glargine on beta cell mass and hepatic steatosis in db/db mice. *Metabolism*. 2019; 98: 27-36.
2. Kazuno Omori, Akinobu Nakamura, Hideaki Miyoshi, Shinichiro Kawata, Kiyohiko Takahashi, Naoyuki Kitao, Hiroshi Nomoto, Hiraku Kameda, Kyu Yong Cho, Yasuo Terauchi, Tatsuya Atsumi. Glucokinase inactivation paradoxically ameliorates glucose intolerance by increasing beta-cell mass. Submitted.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Omori K, Nakamura A, Miyoshi H, Takahashi K, Kitao N, Nomoto H, Kameda H, Cho KY, Terauchi Y, Atsumi T. Effects of dapagliflozin and/or insulin glargine on beta cell mass and hepatic steatosis in db/db mice: American Diabetic Association's 79th Scientific Sessions (ADA 2019), 7-11 June 2019, San Francisco, United States of America
2. Omori K, Nakamura A, Takahashi K, Kitao N, Nomoto H, Cho KY, Miyoshi H, Atsumi T. Difference in Hepatic Steatosis and Pancreatic Beta Cell Mass Between Dapagliflozin and Insulin Glargine Treatment at Comparable Levels of Glycemic Control : American Diabetic Association's 78th Scientific Sessions (ADA 2018) , 22-26 June 2018, Orland, Florida, United States of America
3. 大森一乃、中村昭伸、三好秀明、川田晋一郎、土田和久、高橋清彦、寺内康夫、渥美達也「SGLT2 阻害薬またはインスリンによる血糖降下作用が肝脂肪化に与える影響」第 62 回日本糖尿病学会年次学術集会、2019 年 5 月 23-25 日、仙台
4. 大森一乃、中村昭伸、三好秀明、川田晋一郎、土田和久、高橋清彦、寺内康夫、渥美達也「SGLT2 阻害薬またはインスリンによる血糖降下作用が膵 β 細胞量および肝脂肪化に与える影響」第 46 回日本臨床分子医学会年次学術集会、2019 年 4 月 26-27 日、名古屋
5. 大森一乃、中村昭伸、三好秀明、川田晋一郎、土田和久、高橋清彦、寺内康夫、渥美達也「SGLT2 阻害薬またはインスリンによる血糖降下作用が膵 β 細胞量および肝脂肪化に与える影響」第 33 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、2019 年 3 月 15-16 日、福岡
6. 大森一乃、中村昭伸、川田晋一郎、土田和久、高橋清彦、三好秀明、寺内康夫、渥美達也「SGLT2 阻害薬またはインスリンによる血糖降下作用が膵 β 細胞および肝に与える影響」第 33 回日本糖尿病合併症学会、2018 年 10 月 19-20 日、東京
7. 大森一乃、中村昭伸、土田和久、高橋清彦、北尾直之、三好秀明、寺内康夫、渥美達也「SGLT2 阻害薬によるブドウ糖毒性改善は膵 β 細胞量を増加させ、脂肪肝を誘発しない」第 91 回日本内分泌学会学術総会、2018 年 4 月 26-28 日、宮崎
8. 大森一乃、中村昭伸、土田和久、高橋清彦、北尾直之、三好秀明、寺内康夫、渥美達也「インスリン治療と比較し SGLT2 阻害薬は膵 β 細胞量を増やし脂肪肝を改善する」第 32 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、2018 年 2 月 23-24 日、名古屋

2. 要旨

【背景と目的】第一章では SGLT2 (Sodium-glucose cotransporter 2) 阻害薬が膵 β 細胞量保護作用や脂肪肝改善作用を有することは明らかにされつつあるが、その機序が血糖降下作用によるものか、他の特異的な機序が存在するかは明らかではない。そこで糖尿病モデルマウスにおいて SGLT2 阻害薬または SGLT2 阻害薬と同等に血糖を降下させるよう調整したインスリンの投与が膵 β 細胞量と肝脂肪化に与える影響を検証する。

第二章ではグルコキナーゼ活性化薬 (Glucokinase activator: GKA) が血糖コントロールを改善することを示す臨床試験があるが、その効果は短期的なものに限られている。有効性が失われた理由の一つとして、GKA の膵 β 細胞に対する毒性が考えられる。本研究では、糖尿病モデルマウスを用いて、膵 β 細胞におけるグルコキナーゼヘテロ欠損が膵 β 細胞の機能および量に及ぼす影響を検討する。

第一章：SGLT2 阻害薬またはインスリンによる血糖降下作用が膵 β 細胞量と肝脂肪化に与える影響

【対象と方法】肥満糖尿病モデルマウスである *db/db* マウス雄性 6 週齢を普通食飼育群 (Placebo 群) と SGLT2 阻害薬のダパグリフロジン投与群 (Dapa 群)、Dapa 群と同等に血糖を降下させたインスリングルアルギン群 (Gla 群)、ダパグリフロジンとインスリングルアルギンを併用した群 (Dapa+Gla 群) に群別し 8 週間飼育後、膵 β 細胞量、肝内中性脂肪含量、肝遺伝子発現を比較検討した。

【結果】Placebo 群に比し治療群 (Dapa 群、Gla 群、Dapa+Gla 群) で随時血糖が同等に低下した。膵 β 細胞量は Placebo 群に比し Dapa 群および Dapa+Gla 群で有意に保持された (Placebo 2.25 ± 1.44 、Dapa 5.01 ± 1.63 、Gla 3.79 ± 0.96 、Dapa+Gla 5.19 ± 1.78 mg)。肝内中性脂肪含量は他の 3 群に比し Gla 群で有意に増加した (Placebo 24.1 ± 11.5 、Dapa 30.6 ± 12.9 、Gla 128 ± 49.7 、Dapa+Gla 54.4 ± 14.1 mg/g liver)。肝組織のマイクロアレイ解析では Placebo 群に比し Gla 群で脂肪蓄積に関する *Cidea*、*Cidec*、*Mogat1* 等の遺伝子群の発現が有意に上昇していた。さらに定量的 Real-time PCR 法を用いて肝組織の mRNA 発現を比較検討したところ、*Fas*、*Elovl6*、*Scd1* や *Mogat1* などの脂肪酸合成に関わる遺伝子群と *Pparg2* およびその下流の *Mogat1* や *Cidec* といった脂肪蓄積に関わる遺伝子群が、Placebo 群に比し Gla 群で有意に上昇していた。

【考察】*db/db* マウスにおいて、インスリングルアルギンの単独の投与は肝の脂肪化を誘導した一方、ダパグリフロジンの単独投与またはインスリングルアルギンとダパグリフロジンの併用投与では、膵 β 細胞量は保持され、肝の脂肪化は促進されないことが示された。

第二章：膵 β 細胞特異的グルコキナーゼ抑制が膵 β 細胞量に与える影響

【対象と方法】 *Lepr^{db/+}* (*db/+*) マウスを、膵 β 細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損 ($\beta Gck^{+/-}$) マウスと交配し、 $\beta Gck^{+/-}db/+$ マウスを作製した。その後、マウスを交配して、膵 β 細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損 *db/db* ($\beta Gck^{+/-}db/db$) マウスを作製した。*db/db* ($\beta Gck^{+/+}db/db$) マウスを対照とし、耐糖能、膵 β 細胞量および生存時間を比較検討した。また、単離された膵島の遺伝子発現を DNA マイクロアレイ法および定量的リアルタイム PCR 法を用いて評価した。また、単離された膵島のメタボローム解析を行い、代謝産物を比較検討した。

【結果】 $\beta Gck^{+/-}db/db$ マウスでは、 $\beta Gck^{+/+}db/db$ マウスよりも随時血糖値が 13 週齢以降徐々に低下した。経口ブドウ糖負荷試験では、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ マウスは $\beta Gck^{+/+}db/db$ マウスと比較して有意に耐糖能が改善した。また、24 週齢の $\beta Gck^{+/-}db/db$ マウスでは、 $\beta Gck^{+/+}db/db$ マウスと比較して、膵 β 細胞量が有意に増加していた。さらに、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ マウスの生存期間は、 $\beta Gck^{+/+}db/db$ マウスの生存期間よりも有意に長かった。DNA マイクロアレイ法を用いて膵島の遺伝子発現を網羅的に解析したところ、 $\beta Gck^{+/+}db/db$ マウスと比較して $\beta Gck^{+/-}db/db$ マウスの膵島では、酸化ストレス関連遺伝子の発現が低下していることが明らかになった。定量的リアルタイム PCR を用いた遺伝子発現の比較検討の結果、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ マウスでは $\beta Gck^{+/+}db/db$ マウスと比較して、ブドウ糖代謝に関わるピルビン酸カルボキシラーゼ (*Pcx*)、膵 β 細胞機能や成熟に関わる転写因子である *Nkx6.1*、*Mafa*、*Pdx1*、増殖に関わる *Ki67*、*Ccnd2* の発現が増加していることが明らかになった。一方、酸化ストレスに関連する遺伝子である *Atf3* や *Cyba* は $\beta Gck^{+/-}db/db$ マウスで減少していた。メタボローム解析では、解糖系に属するフルクトース 6-リン酸、ピルビン酸、乳酸などの代謝物が減少し、TCA 回路や酸化的リン酸化に関連するイソクエン酸や ATP が増加していた。

【考察】これらの結果から、膵 β 細胞のグルコキナーゼを抑制することで、酸化ストレスが軽減し、膵 β 細胞関連転写因子の発現が上昇すると同時に、膵島の代謝パターンが糖尿病性膵島で観察されるような解糖系優位から、TCA サイクルと酸化的リン酸化優位へとシフトすることで、膵 β 細胞量が増大し、耐糖能が改善することが示唆された。

【結論】第一章では *db/db* マウスにインスリンを単独投与するのに対し、SGLT2 阻害薬を単独投与およびインスリンと SGLT2 阻害薬を併用投与する方が、肝の脂肪化を来さずに血糖を改善させ、膵 β 細胞量も保持できることを明らかにした。第二章では膵 β 細胞特異的グルコキナーゼの抑制が、過剰なグルコースシグナルを抑制（適正化）することにつながり、ブドウ糖毒性による膵 β 細胞不全を抑制し、膵 β 細胞機能ならびに膵 β 細胞量を保持することで耐糖能を改善するということを、個体レベルで明らかにした。

3. 略語表

本文中のおよび図中で使用した略語は以下の通りである.

Aldh1a3	aldehyde dehydrogenase 1a3
Aldob	AldolaseB
ALT	alanine aminotransferase
ANOVA	analysis of variance
Atf3	activating transcription factor 3
ATP	adenosine triphosphate
AUC	area under the curve
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridine
Ccna2	cyclin A2
Ccnb1	cyclin B1
Ccnd1	cyclin D1
Ccnd2	cyclin D2
Ccnd3	cyclin D3
Cidea	Cell death-inducing DFFA-like effector a
Cidec	Cell death-inducing DFFA-like effector c
Cyba	Cytochrome B-245 Alpha Chain
DAB	diaminobenzidine
Dapa	Dapagliflozin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
eGFR	estimated glomerular filtration rate
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Elovl6	Elongation of very long chain fatty acids protein 6
F1,6P	Fructose 1,6-diphosphate
F6P	Fructose 6-phosphate
Fas	Fatty acid synthase
FBS	fetal bovine serum
G6P	Glucose 6-phosphate
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Gck	glucokinase
GKA	glucokinase activator

Gla	Glargine
Glut2	glucose transporter2
Hmox1	heme oxygenase 1
ITT	Insulin tolerance test
Irs2	Insulin receptor substrate 2
KRBH	Krebs-Ringer's solution bicarbonate / Hepes
Mafa	v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene
Mogat1	monoacylglycerol O-Acyltransferase 1
NAFLD	nonalcoholic fatty liver disease
NASH	nonalcoholic steatohepatitis
Ncf1	neutrophil cytosolic factor 1
Neurog3	neurogenin3
NKX6.1	NK6 Homeobox 1
OGTT	oral glucose tolerance test
PBS	phosphate-buffered saline
Pcx	pyruvate carboxylase
Pdx-1	pancreatic and duodenal homeobox 1
PFA	paraformaldehyde
Pfkfb3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3
2-PG	2-Phosphoglyceric acid
3-PG	3-Phosphoglyceric acid
Pparg	peroxisome proliferator-activated receptor γ
ROS	reactive oxygen spieces
Scd1	stearoyl-CoA desaturase
SGLT2	sodium–glucose cotransporter 2
Slc2a2	Solute carrier family 2 member 2
Srebp1c	Sterol regulatory element-binding protein
TCA	tricarboxylic acid cycle
T-Cho	total cholesterol
TG	triglyceride
Tom20	translocase of outer mitochondrial membrane 20
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling

4. 緒言

日本を含めた世界における糖尿病患者の増加が大きな医学的・社会的問題となっている(Saeedi et al., 2019)。糖尿病とはインスリン作用不足による慢性の高血糖状態を主徴とする代謝症候群と定義され、血糖値の調節は、膵 β 細胞からのインスリン分泌動態と、肝、筋、脂肪細胞などの糖の取り込みや代謝に関わる器官におけるインスリン感受性との精妙なバランスのうえに成り立っている。インスリン感受性が低下し、血中インスリンレベルに見合ったインスリン作用が得られない病態をインスリン抵抗性と呼び、糖尿病の 9 割以上を占める 2 型糖尿病の病態の中心であると理解されてきた。しかし、2 型糖尿病においても常に膵 β 細胞の障害が認められることが明らかになってきた。肥満などによって生じるインスリン抵抗性に対する正常な膵 β 細胞の反応は、血糖値を維持するため代償性にインスリンをより多く分泌することであり、膵 β 細胞の代償反応が破綻すると 2 型糖尿病を発症する(Prentki and Nolan, 2006)。この膵 β 細胞の障害は膵 β 細胞の機能障害に加え、膵 β 細胞量の低下とも関係していることが明らかになっている(Butler et al., 2003; Rhodes, 2005; Sakuraba et al., 2002)。そのため、進行性に低下する膵 β 細胞量を保持することが 2 型糖尿病の病態に即した治療として考えられる(Vetere et al., 2014)。

本邦において実臨床で近年使用可能となった SGLT2 (sodium-glucose cotransporter 2) 阻害薬は、インスリン分泌に依存することなく近位尿細管より尿糖の再吸収を抑制させて尿糖排出を亢進し、持続的に血糖を低下させる薬剤である。また、内臓脂肪減少による体重の減少、脂肪肝の改善、脂質異常や高血圧などの種々の代謝障害の改善効果、さらに、心血管イベントの二次予防や腎臓への保護的作用といった、これまでの経口血糖降下薬には認めなかった多面的な効果を有することが明らかになってきた(Chen et al., 2012; Neal et al., 2017; Takase et al., 2017; Thomas et al., 2012; Vallon, 2015; Washburn, 2009; Yamamoto et al., 2016; Zinman et al., 2015)。また、SGLT2 受容体は膵 β 細胞には発現しておらず(Bonner et al., 2015)、SGLT2 阻害薬は膵 β 細胞に直接作用することはないが、ブドウ糖毒性解除によるインスリン分泌の改善をもたらすと考えられている。実際われわれは肥満糖尿病モデルマウスを用いた検討で、SGLT2 阻害薬の膵 β 細胞量保持効果を明らかにしている(Takahashi et al., 2018)。しかし、インスリンのような他の血糖降下薬を用いて、薬剤間での血糖を同等に低下させた際の膵 β 細胞量への効果の違いは明らかでない。そこで第一章では肥満糖尿病モデルマウスにお

いて SGLT2 阻害薬または SGLT2 阻害薬と同等に血糖を降下させるよう調整したインスリンの投与が膵 β 細胞量と肝脂肪化に与える影響を検証する。

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、肝、中枢、消化管などの代謝に関与する組織に発現が限局しており、特に膵 β 細胞におけるグルコースセンサーとしての役割は全身の糖代謝を調節する上で重要である(Matschinsky et al., 2006)。われわれは膵 β 細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損マウスを用いた検討により、長期の高脂肪食負荷誘導性インスリン抵抗性に対する代償性膵 β 細胞増殖メカニズムにおいてグルコキナーゼが重要な役割を果たすことを明らかにし(Terauchi et al., 2007)、膵 β 細胞量を増加させる治療法としてグルコキナーゼの活性化を介した治療戦略が有用であることを唱えてきた(Grimsby et al., 2003; Nakamura and Terauchi, 2015; Nakamura et al., 2009)。2003 年にグルコキナーゼのアロステリック部位に結合してそれを活性化する化合物としてグルコキナーゼ活性化薬が初めて報告され(Grimsby et al., 2003)、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という二面性を有する新しいタイプの糖尿病治療薬として期待された(Nakamura and Terauchi, 2015)。しかしながら、ここ数年来で報告された複数の無作為化二重盲検プラセボ対照比較試験の結果において、グルコキナーゼ活性化薬の長期投与による有効性は認められなかった(Kiyosue et al., 2013; Meininger et al., 2011; Wilding et al., 2013)。その理由として、グルコキナーゼの活性化によるグルコースシグナルの増強は、初期にはインスリン分泌や膵 β 細胞増殖を促すが、後にブドウ糖毒性を起こし、膵 β 細胞不全が生じると考えられた(Tornovsky-Babeay et al., 2014)。以上のことより、逆にグルコキナーゼを抑制することで、過剰なグルコースシグナルを抑制（適正化）することにより、ブドウ糖毒性による膵 β 細胞不全を抑制し、長期的には進行性の膵 β 細胞機能ならびに量の低下を予防し得る可能性が考えられる。そこで第二章では、膵 β 細胞グルコキナーゼの抑制が膵 β 細胞量に与える影響を検討し、グルコキナーゼの制御による膵 β 細胞量調節メカニズムの解明をすすめ、グルコキナーゼを標的とした 2 型糖尿病に対する新たな予防法・治療法の確立を目指す。

5. 第一章

SGLT2 阻害薬またはインスリンによる
血糖降下作用が膵 β 細胞量と肝脂肪化に与える
影響

5.1 緒言

肝臓、骨格筋、脂肪組織などの組織におけるインスリン抵抗性、膵 β 細胞におけるインスリン分泌不全は、2型糖尿病の病態生理の主要因である(Taylor, 1999)。2型糖尿病の自然史を考えた場合、インスリン抵抗性を十分に補うことができないことで血糖が上昇するため、インスリン分泌不全は2型糖尿病の病態において中心的な役割を果たしていると考えられる。この段階では、インスリン分泌はインスリン抵抗性の程度に対して不十分であり、したがって軽度の高血糖をきたす。時間の経過とともに、膵 β 細胞が進行性に減弱する結果、分泌機能の継続的な損失および膵 β 細胞量のさらなる減少が生じ、重度の高血糖をきたす(Butler et al., 2003; Ferrannini et al., 2005; Kendall et al., 2009; Prentki and Nolan, 2006; Rhodes, 2005; Salunkhe et al., 2018)。さらに、慢性的な高血糖状態は、それ自体がグルコース代謝に関連する多くの組織に悪影響を及ぼす。膵 β 細胞においても、高血糖そのものがインスリン分泌の低下と膵 β 細胞量の減少を引き起こし、糖毒性と呼ばれる現象が生じる(Kaneto et al., 2016; Poitout and Robertson, 2008)。したがって、血糖降下薬による治療により高血糖状態を改善して糖毒性を解除することは、膵 β 細胞の機能不全と膵 β 細胞量の減少の両方を予防するために極めて重要である。最近の研究では、より早期に血糖値を低下させる治療が膵 β 細胞量減少を防ぐために重要であることが明らかにされている(Kaneto et al., 2016; Kimura et al., 2015; Kimura et al., 2018; Shao et al., 2014; Takahashi et al., 2018)。

臨床的にインスリン治療の1つの目的としては糖毒性を解除するために使用される。実際に2型糖尿病患者における膵 β 細胞機能の維持に良好な結果が得られている(Weng et al., 2008)。さらに、インスリン投与を受けた db/db マウスでは、単離膵島の膵島質量とインスリン含量が維持されていた(Kawashima et al., 2011)。一方、ナトリウムグルコース共輸送体2 (SGLT2) 阻害薬は、膵 β 細胞への直接的な薬理作用を伴わずに、腎でのグルコース再吸収を抑制することで耐糖能を改善する。そのため、SGLT2 阻害薬は、尿糖排泄を促進することで糖毒性を解除し、その結果進行性の膵 β 細胞機能障害および膵 β 細胞量減少を予防することができるかと推測される。実際 db/db マウスにおいて、SGLT2 阻害薬の投与により、膵 β 細胞機能および膵 β 細胞量の減少を保護することが報告されている(Kimura et al., 2018; Nagata et al., 2013; Okauchi et al., 2016; Takahashi et al., 2018; Terami et al., 2014)。また、2型糖尿病患者においても、SGLT2 阻害薬投与により膵 β 細胞機能を改善することがグルコースクランプなどを用いた臨床研究で示されている(Ferrannini et al., 2014; Polidori et al., 2014)。しかし、SGLT2 阻害薬と

インスリン治療の β 細胞機能および量に与える影響を直接比較した検討はない。一方、SGLT2 阻害薬が脂肪肝を改善することは前臨床試験および臨床試験で示されている(Komiya et al., 2016; Kuchay et al., 2018; Obata et al., 2016; Takase et al., 2017)が、SGLT2 阻害薬とインスリン治療の肝脂肪化に与える影響を直接比較した検討も存在しない。

5.2 目的

本研究では、SGLT2 阻害薬の一つであるダパグリフロジンおよびインスリン グラルギンの膵 β 細胞機能および量への影響を *db/db* マウスを用いて比較検討する。さらに、これら 2 剤の肝脂肪化に対する効果も比較検討する。

5.3 対象と方法

5.3.1 研究デザイン

6 週齢の雄性 *BKS.Cg-Dock7m +/+ Leprdb/J (db/db)* マウスを、無処置 (Placebo) 群、ダパグリフロジン (1.0mg/kg/日) (Dapa) 群、インスリングルルギン (Sanofi-Aventis, Paris, France) (Gla) 群、インスリングルルギンとダパグリフロジン併用 (ダパグリフロジン ; 0.5mg/kg/日) (Dapa+Gla) 群の 4 群に分け、8 週間投与した。ダパグリフロジンの投与方法は薬剤を配合した飲料水を投与した。Gla 群および Dapa+Gla 群のマウスには、Dapa 群と同等の血糖コントロールが得られるように、調整された量のインスリングルルギンを皮下注射した。Placebo 群および Dapa 群のマウスには、Gla 群と同量の生理食塩水を皮下注射した。

5.3.2 対象

6 週齢の雄性 *BKS.Cg-Dock7m* *+/+ Leprdb/J* (*db/db*) マウスは、オリエンタル酵母株式会社から購入した。すべての実験において、1 ケージあたり 2 匹または 3 匹のマウスで飼育した。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。普通食 (MF: Oriental Yeast Co. Ltd., Tokyo, Japan) 摂餌し飼育した。

5.3.3 評価項目

主要評価項目は負荷 8 週後の膵 β 細胞量と肝中性脂肪含量とした。6 週から 14 週までの体重、随時血糖、尿糖排泄量、血清脂質、肝機能、膵組織の免疫組織学的染色、肝脂肪酸解析、肝組織のマイクロアレイ解析、定量的リアルタイム PCR 解析による遺伝子発現の検討を行った。

5.3.4 体重・摂餌量の測定

5.3.1 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。また、週に 1～2 回ケージ交換する際に各ケージの摂餌量を測定し、群間の比較を行った。

5.3.5 随時血糖の測定

5.3.1 の条件で飼育した 4 群のマウスを、6 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。

5.3.6 経口ブドウ糖負荷試験

5.3.1 と同様の条件で 4 群のマウスを飼育した。経口ブドウ糖負荷試験 (Oral blood glucose test: OGTT) として 13 週齢で 16 時間の絶食下において 1.0 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 (mM)、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でつなぎ、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 (mM×min) として算出し、各群の比較を行った。

5.3.7 インスリン感受性の評価

5.3.1 と同様の条件で両マウスを飼育した。13 週齢で自由摂食下において速効型インスリン (Humulin®R; Eli Lilly, USA) を 2.0 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血糖降下率 (%) としてインスリン感受性の評価を行った。縦軸を、血糖降下率 (%), 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でつなぎ、0mM を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 area under the curve (AUC) (mM × min) として算出し、各群の比較を行った。

5.3.8 膵島単離

5.3.1と同様の条件で飼育したマウスを屠殺し、開腹したのち総胆管を露出させた。十二指腸を鉗子でクランプしたのち、注射針を総胆管にカニューレーションし、超純水で33.3 mg/mlに希釈したcollagenase (Sigma-Aldrich) を注入した。膨張した膵臓を切離し上記のcollagenaseの入ったシリンジに移し、37°Cで24分間温振した。その後、複数回に分けて反応停止液 (Hanks' balanced salt solution :Sigma-Aldrich) にfetal bovine serum (FBS: Gibco BRL, Paisley, UK)を添加して使用を加え攪拌・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、実体顕微鏡下にて膵島を回収して各実験に使用した。

5.3.9 膵島インスリン含量の測定

上記の方法で採取した膵島を1.5mlのエッペンドルフチューブに10個ずつ分注し、2.8 mMのGlucoseを含有するKrebs-Ringer's solution bicarbonate/Hepes (KRBH) buffer (129 mM NaCl, 10 mM HEPES, 5.0 mM NaHCO₃, 4.7 mM KCl, 2.0 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, pH7.4) で5%CO₂、37度の条件下で30分間pre-incubationを行い、その後Glucose 5.6 mMを含むKRBH bufferに交換し、更に90分間培養した。その後上清を静かに採取し、チューブに残存した膵島は残存した上清を慎重に吸引した後に、500 µlのAcid ethanol (0.4 M HCl in 74 % ethanol) を加えて振盪・溶解し、ELISA法 (Morinaga Institute of Biological Science, Yokohama, Japan) を用いて膵島のインスリン含量を測定した。

5.3.10 膵の組織学的評価

5.3.1 と同様の条件で 4 群のマウスを飼育した。14 週齢で各マウスを屠殺し、膵臓を切離した。切離した膵臓は 4% PFA (paraformaldehyde) / PBS pH 7.4 にて速やかに固定し、パラフィン包埋した。膵臓に対し長軸方向に切片を作製し、下記に示す染色を実施した。

5.3.11 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 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。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, Santa Cruz Biotechnology）を 250 倍希釈にて用いた。

光学顕微鏡 BIOREVO BZ-9000、BZ-X710 (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)

5.3.12 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 (Table 1) を 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 (Table 1) を 40 分間反応させた。洗浄後にインスリン抗体 (Table 1) を用いて室温で 60 分反応させた後、PBS で洗浄し対応する二次抗体 (Table 1) を 40 分間反応させた。PBS で洗浄し、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Laboratory, Burlingame, USA) で対比染色を行った。膵β細胞のアポトーシスの評価として terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling (TUNEL) system (Deadend; Promega, Madison, WI) を用いた。

Table 1. 免疫組織学的染色に使用した抗体

Primary antibodies			
Antigen	Species	Manufacturer	Working dilution
Glucagon	Mouse	Sigma-Aldrich	1:1000
Insulin	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology	1:250
Insulin	Guinea pig	Dako	1:1
Ki67	Rabbit	Cell Signaling Technology	1:200
Secondary antibodies			
Antigen	Species	Fluorescent dye	Manufacturer
Guinea pig IgG	Goat	Alexa Fluor 488	Life Technologies
Rabbit IgG	Goat	Alexa Fluor 488	Life Technologies
Rabbit IgG	Goat	Alexa Fluor 594	Life Technologies
Mouse IgG	Goat	Alexa Fluor 594	Life Technologies
Goat IgG	Donkey	Alexa Fluor 594	Abcam

5.3.13 遺伝子発現解析

各マウスの肝臓から、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、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH) 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>Cd36</i> forward	CTGTCATTGGTGCTGTCCTG
<i>Cd36</i> reverse	CTCAGCGTCCTGGGTACAT
<i>Cpt1a</i> forward	AAACCCACCAGGCTACAGTG
<i>Cpt1a</i> reverse	TCCTTGTAATGTGCGAGCTG
<i>Ppara</i> forward	GAGGGTTGAGCTCAGTCA GG
<i>Ppara</i> reverse	GGTCACCTACGAGTGGCATT
<i>Pparg1</i> forward	CCACCAACTTCGGAATCAGCT
<i>Pparg1</i> reverse	TTTGTGGATCCGGCAGTTAAGA
<i>Pparg2</i> forward	ACGATCTGCCTGAGGTCTGT
<i>Pparg2</i> reverse	CATCGAGGACATCCAAGACA
<i>Plin2</i> forward	GATTGAATTCGCCAGGAAGA
<i>Plin2</i> reverse	TGGCATGTAGTCTGGAGCTG
<i>Cidea</i> forward	ATCACA ACTGGCCTGGTTACG
<i>Cidea</i> reverse	TACTACCCGGTGTCCATTTCT
<i>Cidec</i> forward	CTGGAGGAAGATGGCACAAT
<i>Cidec</i> reverse	GGGCCACATCGATCTTCTTA
<i>F4/80</i> forward	CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC
<i>F4/80</i> reverse	GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG
<i>Mcp1</i> forward	AGGTCCCTGTCATGCTTCTGG
<i>Mcp1</i> reverse	CTGCTGCTGGTGATCCTCTTG
<i>Tnfa</i> forward	AAGCCTGTAGCCACGTCGTA
<i>Tnfa</i> reverse	GGCACC ACTAGTTGGTTGTCTTTG
<i>Il6</i> forward	GGAAATCGTGGAATGAG
<i>Il6</i> reverse	GCTTAGGCATAACGCACT
<i>Fas</i> forward	AGAGACGTGTCACTCCTGGACTT
<i>Fas</i> reverse	GCTGCGGAAACTTCAGAAAAT
<i>Elovl6</i> forward	CCCGAACTAGGTGACACGAT
<i>Elovl6</i> reverse	TACTCAGCCTTCGTGGCTTT
<i>Scd1</i> forward	CATCGCCTGCTCTACCCTTT
<i>Scd1</i> reverse	GAAGTGCCTTGGAACCTG
<i>Mogat1</i> forward	CTGGTTCTGTTTCCCGTTGT
<i>Mogat1</i> reverse	TGGGTCAAGGCCATCTTAA
<i>Dgat2</i> forward	AGTGGCAATGCTATCATCATCGT
<i>Dgat2</i> reverse	AAGGAATAAGTGGGAACCAGATCA
<i>Srebp1c</i> forward	GGAGCCATGGATTGCACATT
<i>Srebp1c</i> reverse	GGCCCGGGAAGTCACTGT

5.3.14 肝臓のオイルレッド O 染色と TG 含有量

肝臓の脂肪組織はリン酸緩衝 4%パラホルムアルデヒドで固定した 10 μ m 凍結肝切片のオイルレッド O 染色によって評価した。肝臓標本は、H₂O で 1 分間 1 回洗浄した。60%イソプロパノールで 1 分間追加洗浄した後、肝臓切片を新鮮に希釈したオイルレッド O 溶液中で 37°C 10 分間染色した。NASH/NAFLD Clinical Research Network のスコアリングシステムの定義とスコアに基づいて、ヘマトキシリンおよびエオシン染色により肝組織を定量化し(Kleiner et al., 2005)、また、ポイントカウントシステム(Marinho et al., 2017)を用いてこれらの肝組織における脂肪化を評価した。肝臓の中性脂肪含量を評価するために、組織破碎液を 2 : 1 (vol/vol) クロロホルム/メタノールで抽出した。このホモジネートにクロロホルム/メタノールを加え、混合物を 15 分間振とうした。14,000rpm で 10 分間遠心分離した後、有機層を回収した。この操作を 3 回繰り返し、回収した試料を乾燥させ、1 %トリトン X-100/エタノールに再懸濁し、コレスト TG キット (積水メディカル株式会社、東京、日本) を用いて測定した。サンプルからの脂質抽出は、TissueLyser (Qiagen) を使用し、得られた上清を KOH でケン化した。ケン化した試料を 100 ng/mL の ¹⁸O₂ 含有メタノールに溶解した。LC システム、LC-20ADXR (島津製作所、京都、日本) を LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific、Waltham, MA, USA) を用い測定した。脂肪酸は、脱プロトン化イオン ([M-H]⁻) の抽出イオンクロマトグラムを 10ppm の質量公差で得ることにより検出した。Desaturation Index (脱飽和指数) は、一価不飽和脂肪酸 : オレイン酸 C_{18:1} / 飽和脂肪酸 : パルミチン酸 C₁₆ + ステアリン酸 C₁₈ (Mono unsaturated fatty acid / Saturated fatty acid) の比として算出した(Denechaud et al., 2016)

5.3.15 マイクロアレイ解析

肝臓組織からの全 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。差分発現遺伝子は、少なくとも 1.5 倍以上の変化を示した遺伝子と定義した。

5.3.16 統計分析

データは平均±標準偏差 (SD) で示された。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の検定を用いて評価した。正規性が Shapiro-Wilk 検定を用いて棄却された場合、分析は Kruskal-Wallis 検定を用いて行われ、その後にポストホック解析として Dunn の検定が行われた。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)、JMP Pro software (ver. 12.0; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) と GraphPad Prism software (ver. 7.02; GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA) を用いて行った。

5.4 結果

5.4.1 *db/db* マウスの代謝変化および耐糖能に及ぼすダパグリフロジンおよび/またはインスリングルルギンの効果

5.4.1.1 随時血糖と体重の推移、摂餌量

随時血糖と体重の推移について Figure 1、2 に示した。また摂餌量について Figure3 に示した。4 群間の食物摂餌量に差はなかったが、治療群（Dapa、Gla、及び Dapa+Gla）では、投与 8 週間後の体重が Placebo 群に比べて有意に増加していた。随時血糖値は、Placebo 群では時間の経過とともに上昇した。しかし、治療群では同程度に低下を認めた。

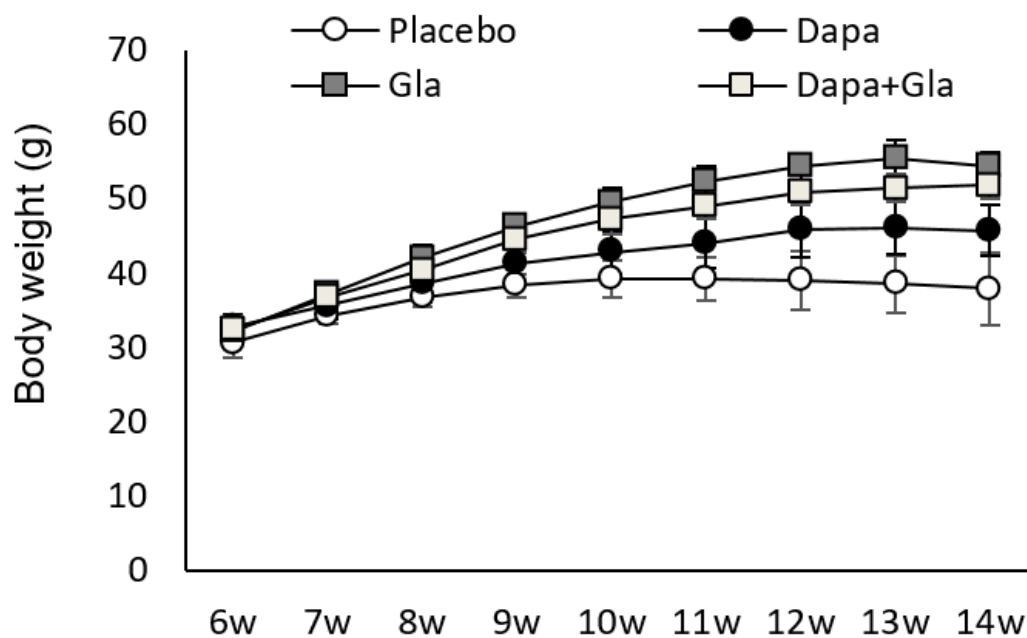


Figure 1. 体重の推移

8週間投与期間中の *db/db* マウスの体重を毎週測定し推移を検討した
 未治療 (Placebo 群 ; 白丸)、ダパグリフロジン (1.0 mg/kg/日 ; Dapa 群 ; 黒丸)、
 インスリングルアルギン (Gla 群 ; 灰色四角)、またはダパグリフロジンとインス
 リングルアルギン投与 (0.5 mg/kg/日 ; Dapa+Gla 群 ; 淡灰色四角) (平均 $\pm$ SD)
 (n = 9-10)

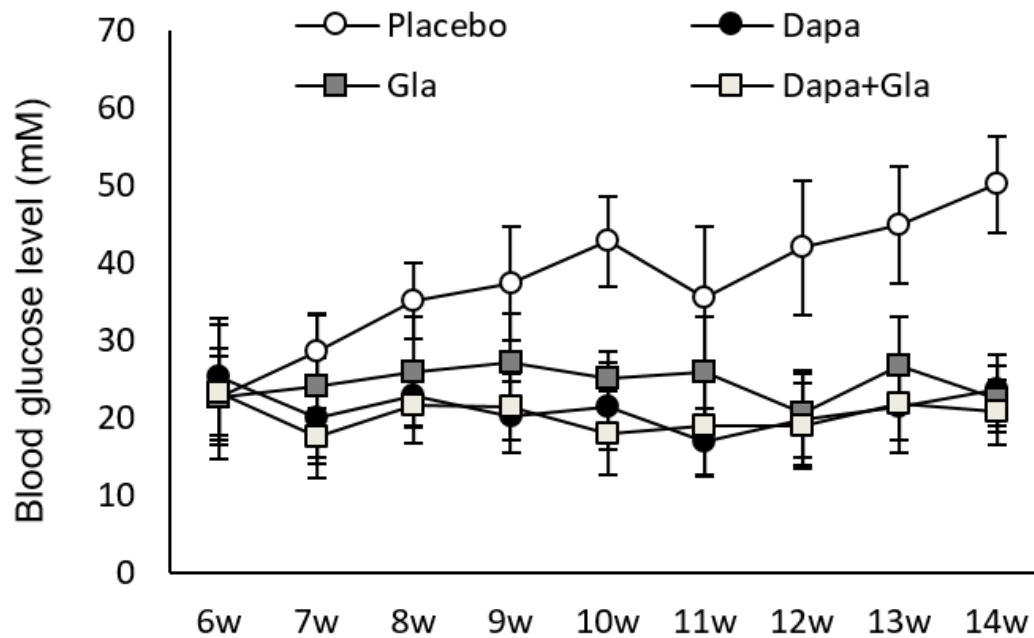


Figure 2. 随時血糖の推移

8週間投与期間中の *db/db* マウスの随時血糖を毎週測定した

未治療 (Placebo 群；白丸)、ダパグリフロジン (1.0 mg/kg/日；Dapa 群；黒丸)、インスリングラルギン (Gla 群；灰色四角)、またはダパグリフロジンとインスリングラルギン投与 (0.5 mg/kg/日；Dapa+Gla 群；薄灰色四角) (平均 $\pm$ SD) (n = 9-10)

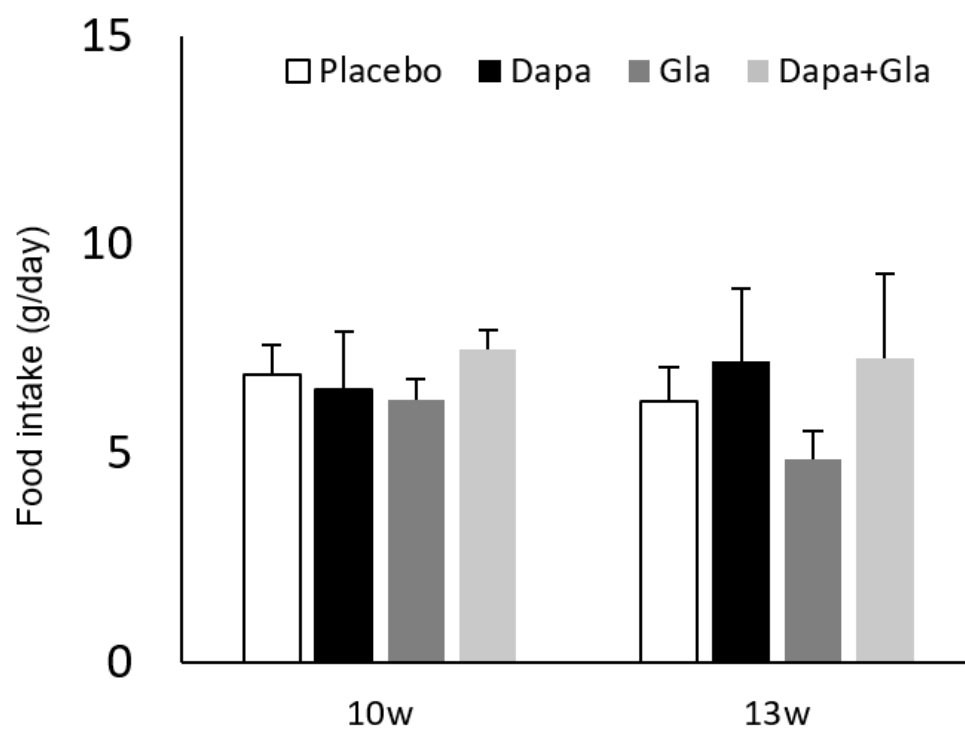


Figure 3. 摂餌量

10 週、13 週齢における *db/db* マウスの摂餌量を測定した

未治療 (Placebo 群 ; 白)、ダパグリフロジン (1.0 mg/kg/日 ; Dapa 群 ; 黒)、インスリングルルギン (Gla 群 ; 灰色)、またはダパグリフロジンとインスリングルルギン投与 (0.5 mg/kg/日 ; Dapa+Gla 群 ; 薄灰色) (平均 $\pm$ SD) (n = 9-10)

5.4.1.2 尿量、尿糖排泄量

Placebo 群では、著明な高血糖に伴い、尿量及び尿中糖排泄量が著しく増加した (Figure 4、5)。しかし、Gla 群では明らかに抑制されていた。Dapa 群および Dapa+Gla 群では、投与 1 週間後の尿糖排泄量は Placebo 群と同様であった。一方、投与 4 週間後および 8 週間後には、血糖低下に伴って減少した (Figure 5)。

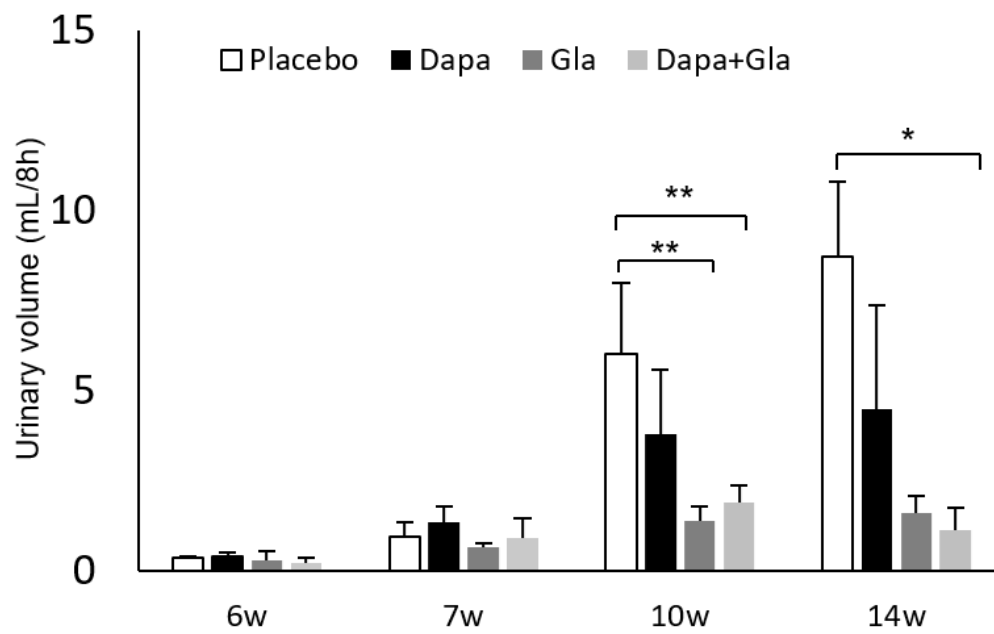


Figure 4. 尿量の推移

8週間投与期間中の *db/db* マウスの尿量を 6、7、10、14 週齢において測定した Placebo 群（白）、Dapa 群（黒）、Gla 群（灰色）、Dapa+Gla 群（薄灰色）における 6、7、10、14 週齢時の尿量（ $n=4$ ）（平均 $\pm$ SD）** $p < 0.01$ * $p < 0.05$ vs. Placebo 群

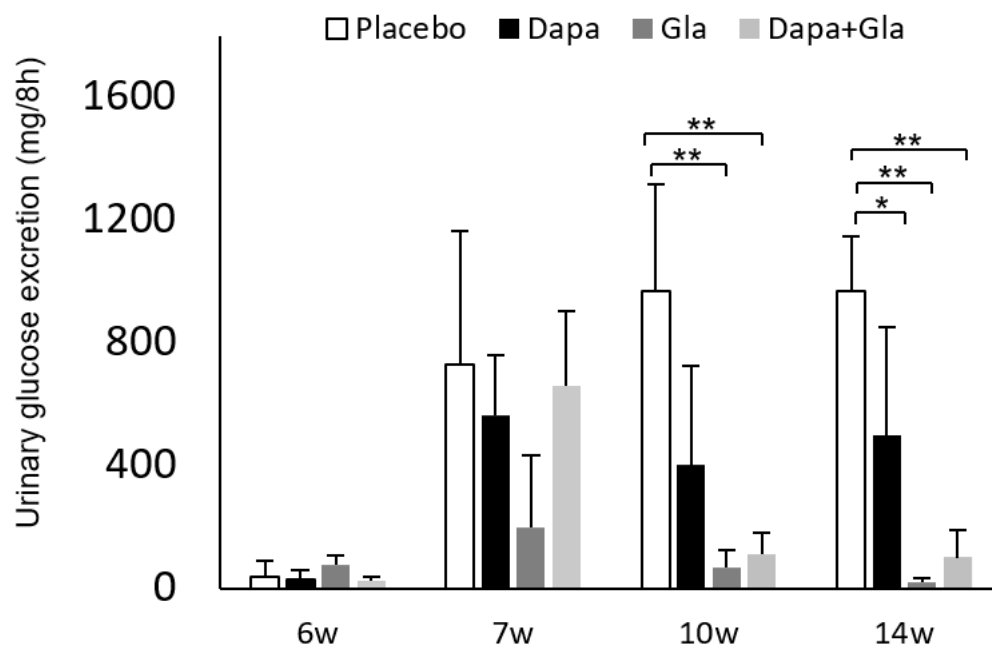


Figure 5. 尿糖排泄量の推移

8週間投与期間中の *db/db* マウスの尿量を6、7、10、14週齢において測定した Placebo 群（白）、Dapa 群（黒）、Gla 群（灰色）、Dapa+Gla 群（薄灰色）における6、7、10、14週齢時の尿糖排泄量（ $n=4$ ）（平均 $\pm$ SD）** $p < 0.01$ * $p < 0.05$ vs. Placebo 群

5.4.1.3 経口ブドウ糖負荷試験 (Oral glucose tolerance test) による耐糖能の評価

治療 7 週間後の OGTT による耐糖能を評価した。負荷 0～120 分後の血糖値の曲線下面積(Area under the curve: AUC 0-120min) で評価した耐糖能は、治療群 (Dapa、Gla、Dapa+Gla) では、Placebo 群に比べて有意に低かった (Figure 6、7)。

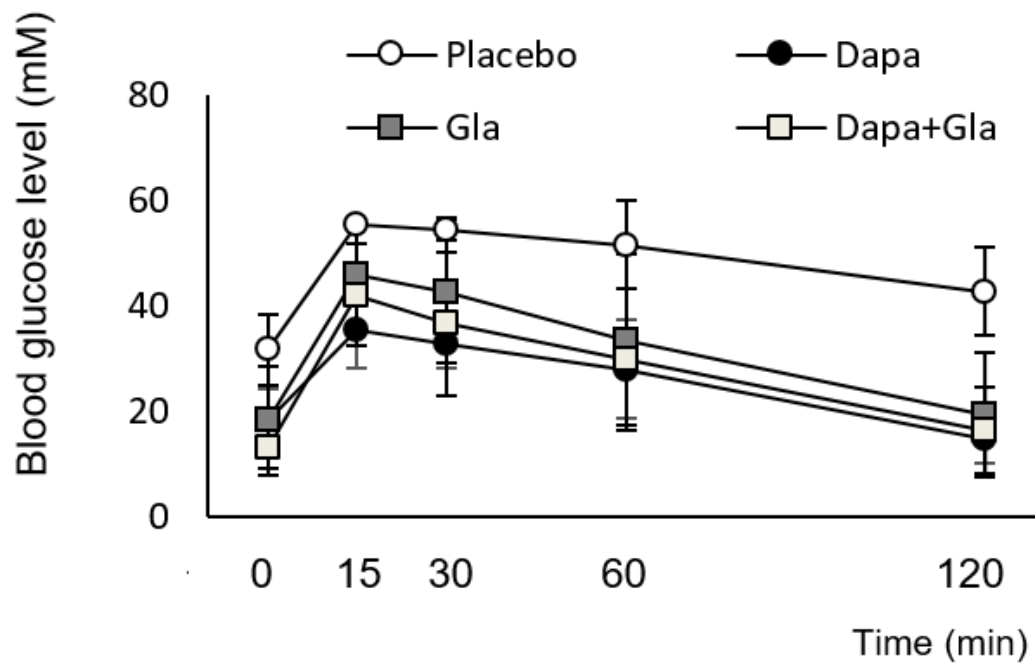


Figure 6. 経口ブドウ糖負荷試験（OGTT）時の血糖値の推移
 13 週齢のマウスに対し 16 時間絶食後の OGTT において 0 分、15 分、30 分、60 分、120 分後の血糖値を測定した
 血糖 Placebo 群（白丸）、Dapa 群（黒丸）、Gla 群（灰色四角）、Dapa+Gla 群（薄灰色四角）（平均 $\pm$ SD）（ $n = 9-10$ ）

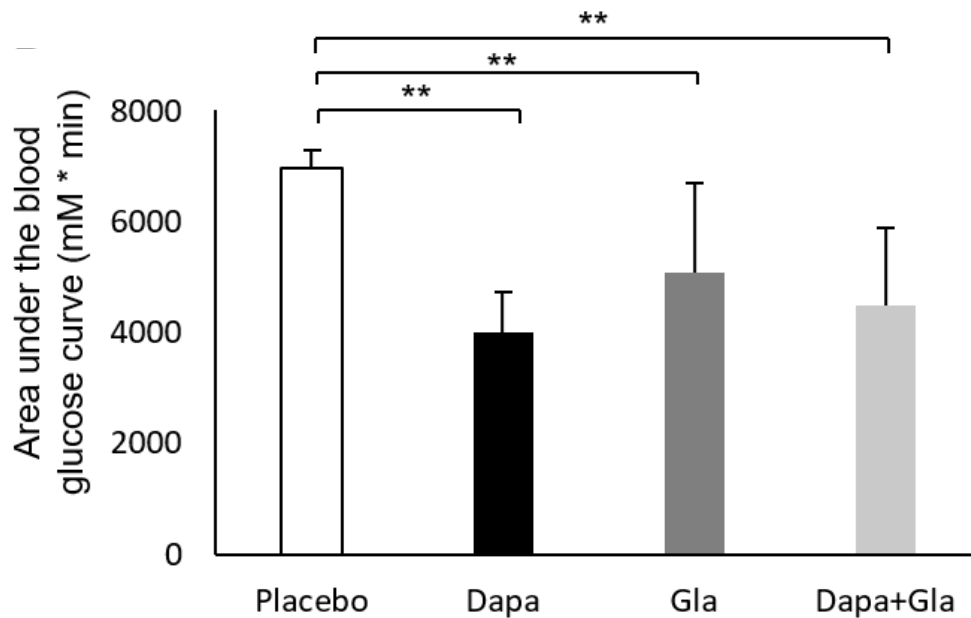


Figure 7. 経口ブドウ糖負荷試験（OGTT）時の血糖値の推移

13 週齢のマウスに対し 16 時間絶食後の OGTT において 0 分、15 分、30 分、60 分、120 分後の血糖値を測定し、Area under the curve を算出した。

13 週齢の 16 時間絶食後の Placebo 群（白丸）、Dapa 群（黒丸）、Gla 群（灰色四角）、Dapa+Gla 群（薄灰色四角）（ $n = 9-10$ ）（平均 $\pm$ SD）** $p < 0.01$

vs. Placebo 群

5.4.1.4 インスリン負荷試験 (Insulin tolerance test) によるインスリン感受性の評価

治療 7 週間後のインスリン感受性を ITT により評価した。血糖値及び負荷 0～120 分後の血糖値の曲線下面積(Area under the curve AUC 0-120min) で評価したところインスリン感受性は 4 群間で変化はなかった (Figure 8、9)。

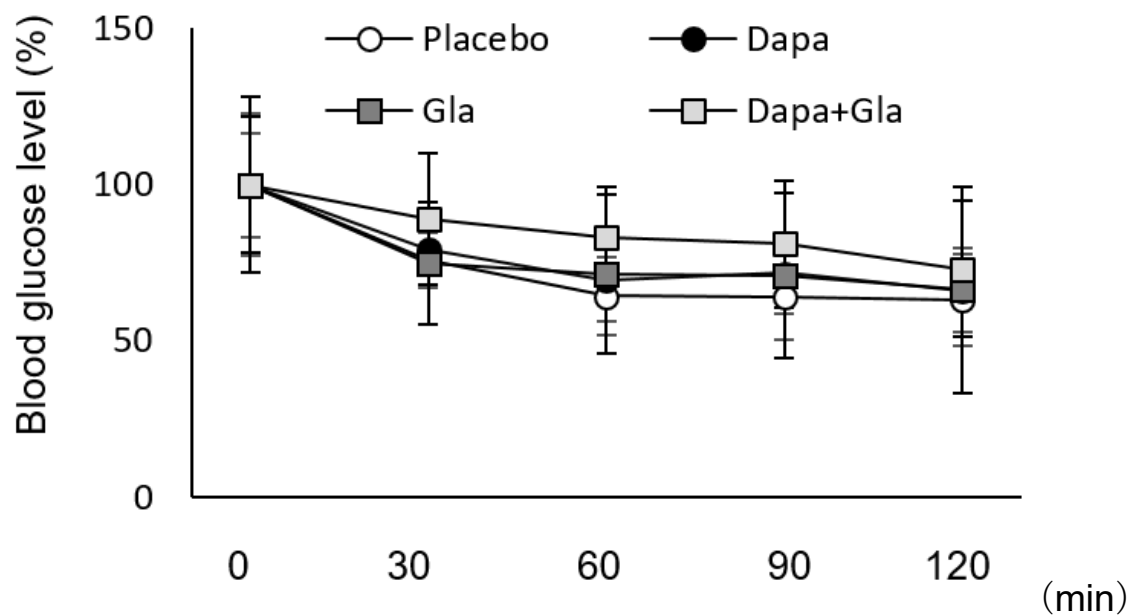


Figure 8. インスリン負荷試験 (ITT) 時の血糖値の推移

13 週齢の自由摂食下でのインスリン負荷 (2 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。

Placebo 群 (白丸)、Dapa 群 (黒丸)、Gla 群 (灰色四角)、Dapa+Gla 群 (薄灰色四角) (平均 $\pm$ SD) ($n = 9-10$)

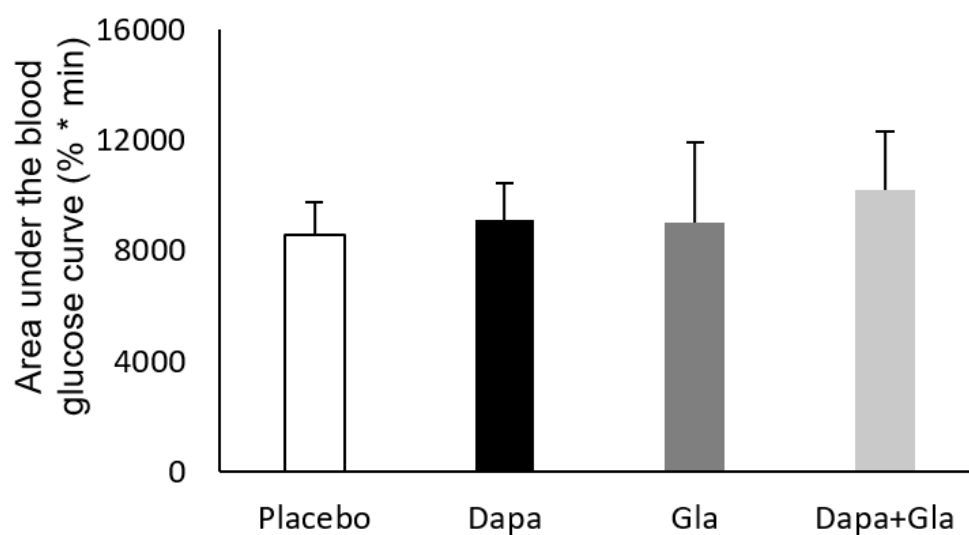


Figure 9. インスリン負荷試験 (ITT) 時の血糖曲線下面積

13 週齢の自由摂食下でのインスリン負荷 (2 U/kg) による血糖曲線下面積を算出した。

Placebo 群 (白丸)、Dapa 群 (黒)、Gla 群 (灰色)、Dapa+Gla 群 (薄灰色) (平均 $\pm$ SD) (n = 9-10)

5.4.1.5 ダパグリフロジンとインスリングラルギンのインスリン分泌への影響

ダパグリフロジンとインスリングラルギンのインスリン分泌への影響を評価するために、血漿 C-ペプチドと単離された膵島インスリン含量を測定した。その結果、Dapa 群および Dapa+Gla 群の血漿 C-ペプチド値および膵島インスリン含量はいずれも Placebo 群に比べて有意に高かった (Figure 10、11)。これらの結果から、ダパグリフロジンを 8 週間投与した場合、耐糖能が改善されただけでなく、*db/db* マウスの内因性インスリン分泌能も改善されたことが示唆された。

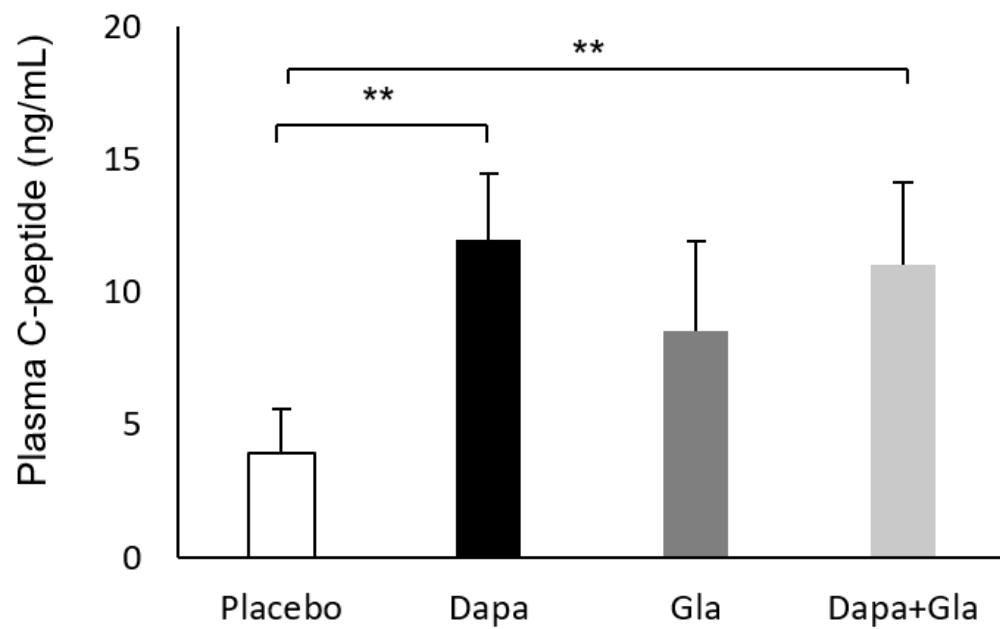


Figure 10. 随時血漿 C ペプチド値

13 週齡の随時血漿 C ペプチド値。Placebo 群（白）、Dapa 群（黒）、Gla 群（灰色）、Dapa+Gla 群（薄灰色）（ $n = 4$ ）（平均 $\pm$ SD）** $p < 0.01$ vs. Placebo 群

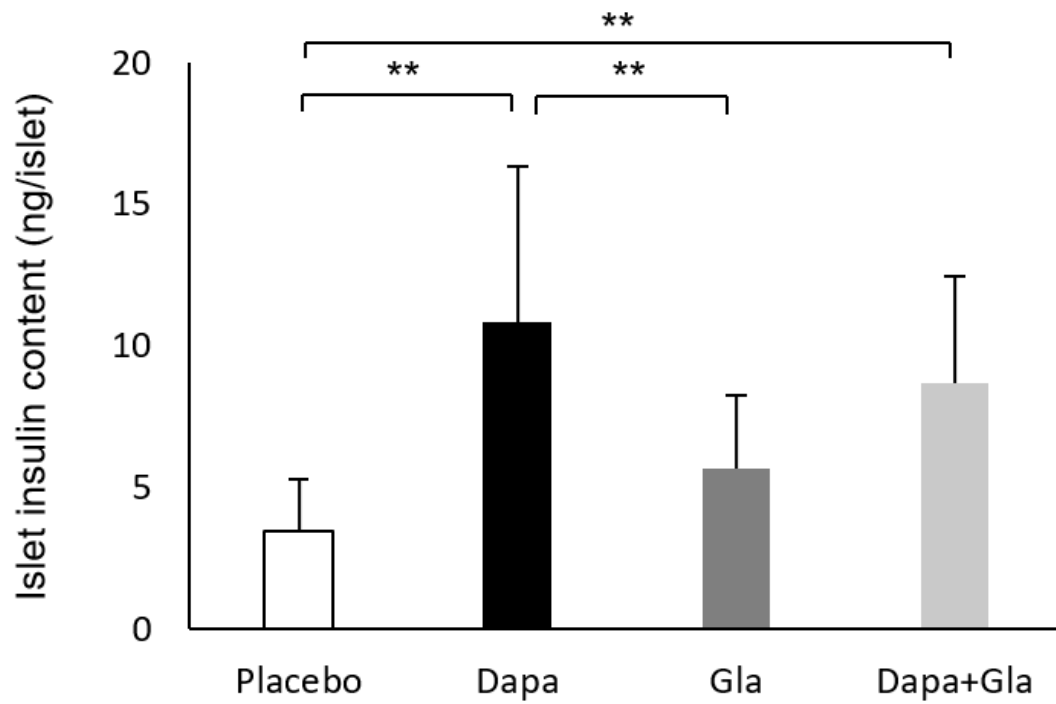


Figure 11. 14 週齢の単離膵島のインスリン含量

14 週齢の単離膵島インスリン含量。Placebo 群（白）、Dapa 群（黒）、Gla 群（灰色）、Dapa+Gla 群（薄灰色）（ $n = 4$ ）（平均 $\pm$ SD）** $p < 0.01$

5.4.2 db/db マウスの膵 β 細胞量に及ぼす ダパグリフロジンおよび/またはインスリングラルギンの 効果

5.4.2.1 膵 β 細胞形態と膵 β 細胞量

内因性インスリン分泌能の改善が示されたことから、治療 8 週間後の膵 β 細胞量に対するダパグリフロジンとインスリングラルギンの効果を検討することとした。Dapa 群および Dapa+Gla 群の膵 β 細胞量は、Placebo 群と比較して有意に保持されていた (Figure 12、13)。ポイントカウント法でも同様の結果が得られた。

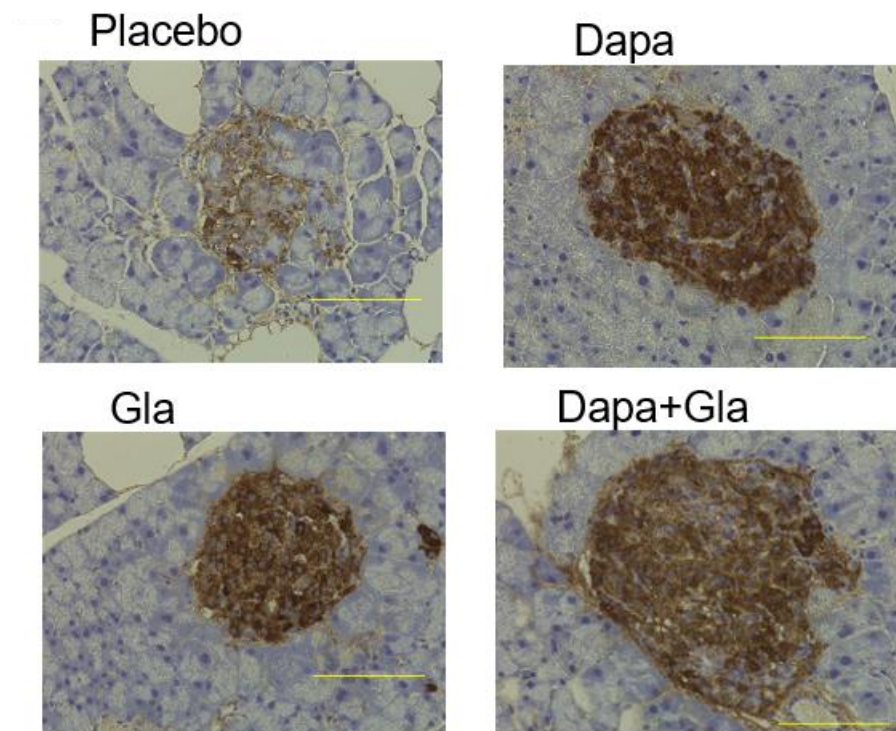


Figure 12. 膵β細胞の免疫組織学的染色

14 週齢の各群のマウスの膵組織切片を抗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。黄色の線は 100 μ m を示している。

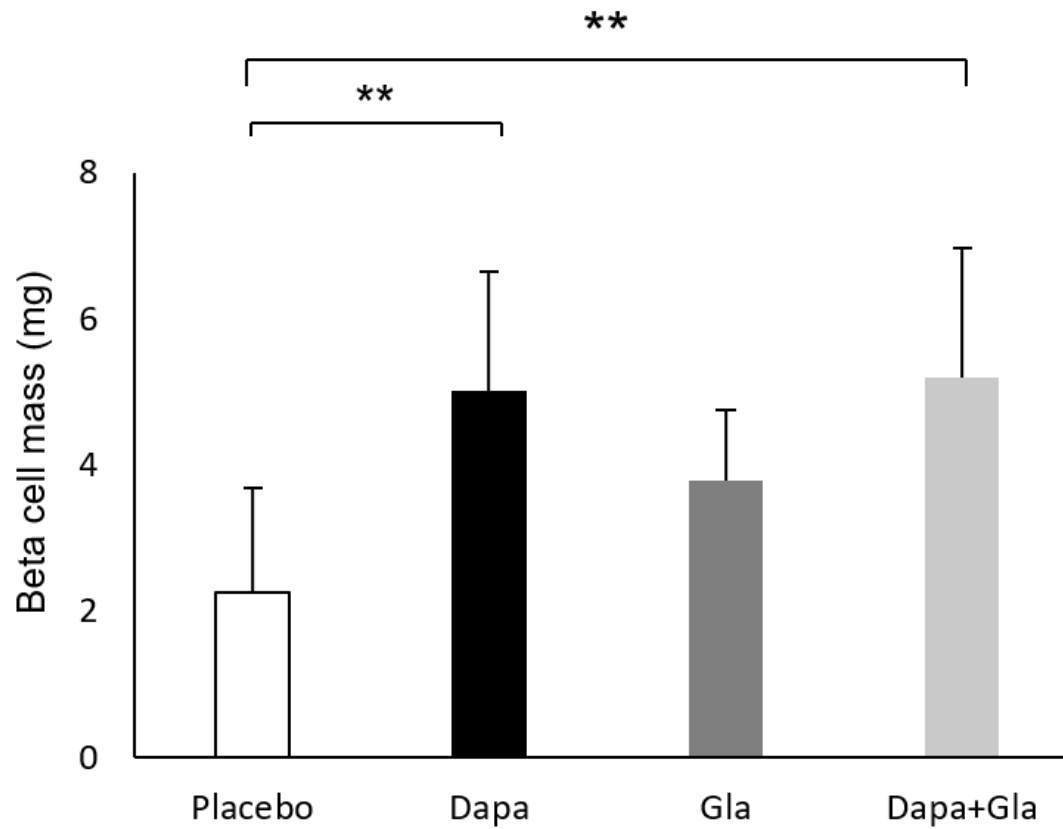


Figure 13. 膵β細胞量

14 週齢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

Placebo 群（白）、Dapa 群（黒）、Gla 群（灰色）、Dapa+Gla 群（薄灰色）($n = 9-10$)

（平均 $\pm$ SD）** $p < 0.01$

5.4.2.2 膵β細胞の増殖及びアポトーシス

Ki67 染色の免疫組織化学的染色を用いて膵β細胞の増殖を評価した。Dapa 群および Dapa+Gla 群の Ki67 染色陽性膵β細胞の割合は、Placebo 群と比較して有意に高かった (Figure 14)。さらに、TUNEL 染色によって分析された 3 つの治療群のアポトーシスを来した膵β細胞の割合は、有意差はなかったが、Placebo 群の約半分であった (Figure 15)。

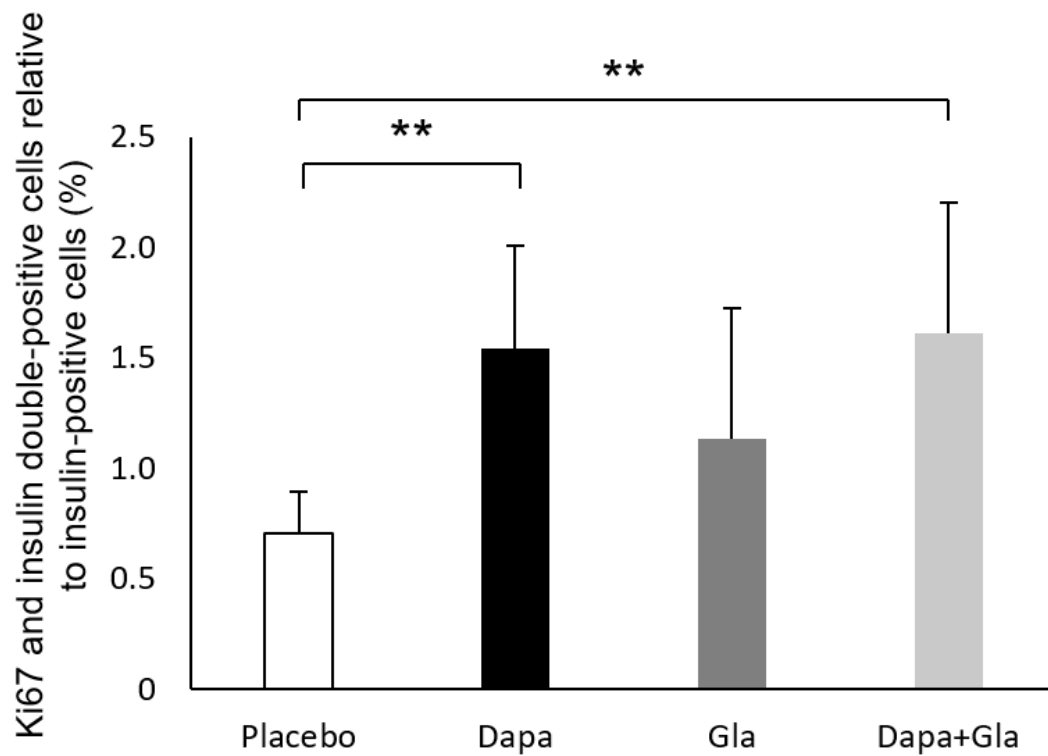


Figure 14. Ki67 染色による膵 β 細胞の増殖の評価

14 週齢の各群のマウスの膵組織における Ki67 染色陽性膵 β 細胞の割合を算出した。

Placebo 群 (白)、Dapa 群 (黒)、Gla 群 (灰色)、Dapa+Gla 群 (薄灰色) ($n=9-10$)
(平均 $\pm$ SD) ** $p < 0.01$

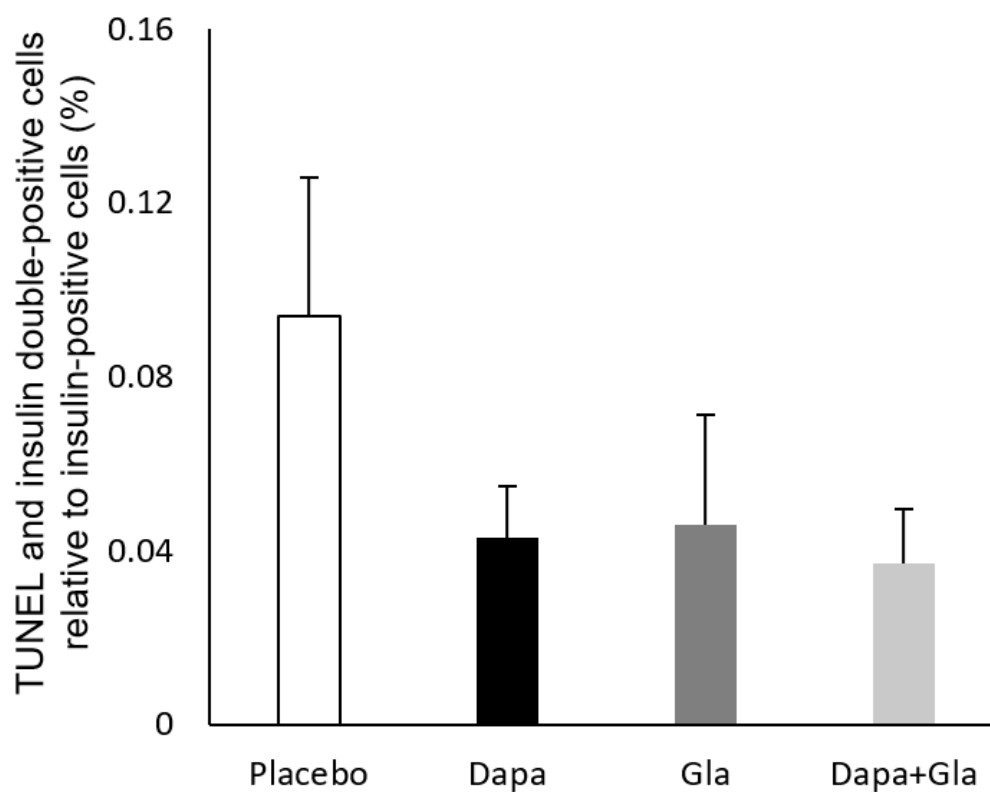


Figure 15. TUNEL 染色による膵 β 細胞のアポトーシスの評価

14 週齢の各群のマウスの膵組織の TUNEL 染色陽性膵 β 細胞の割合を算出した。Placebo 群 (白)、Dapa 群 (黒)、Gla 群 (灰色)、Dapa+Gla 群 (薄灰色) ($n = 9-10$). (平均 $\pm$ SD)

5.4.2.3 膵 β 細胞と膵 α 細胞に関する検討

抗インスリン抗体と抗グルカゴン抗体を用いた蛍光二重免疫染色を行った (Figure 16)。その結果、膵島の $\alpha + \beta$ 細胞数に対する β 細胞数の比率は、Dapa 群では Placebo 群に比べて有意に高かった (Figure 17)。一方、空腹時血漿グルカゴン値には 4 群間で有意な差を認めなかった (Figure 18)。これらの結果から、ダパグリフロジンおよびダパグリフロジンとインスリンの併用治療は、db/db マウスの α 細胞を増加させることなく膵 β 細胞量を保持したことが示唆された。

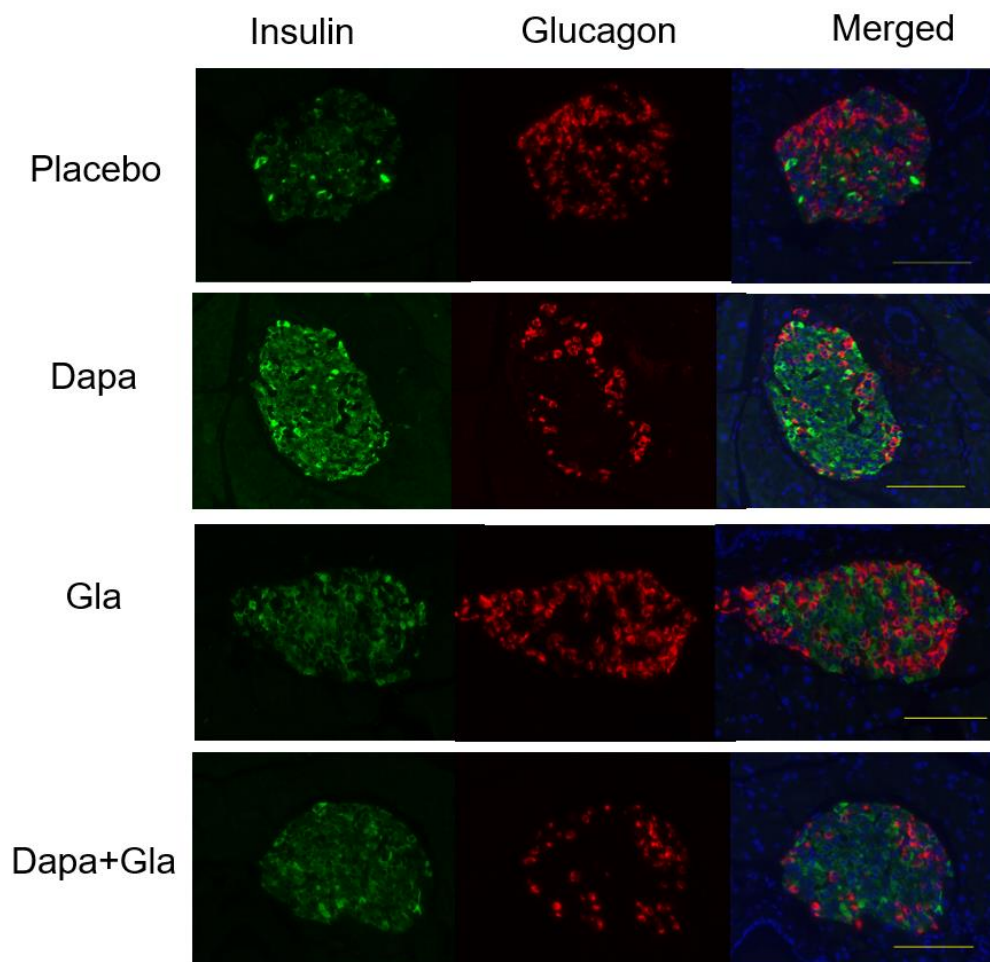


Figure 16. 膵島におけるインスリン・グルカゴン二重蛍光免疫染色
 14 週齢の各群のマウスの膵組織切片を抗インスリン抗体、抗グルカゴン抗体にて蛍光免疫染色法で二重染色し、DAPI に対比染色を行った。黄色の線は $100\mu\text{m}$ を示している。

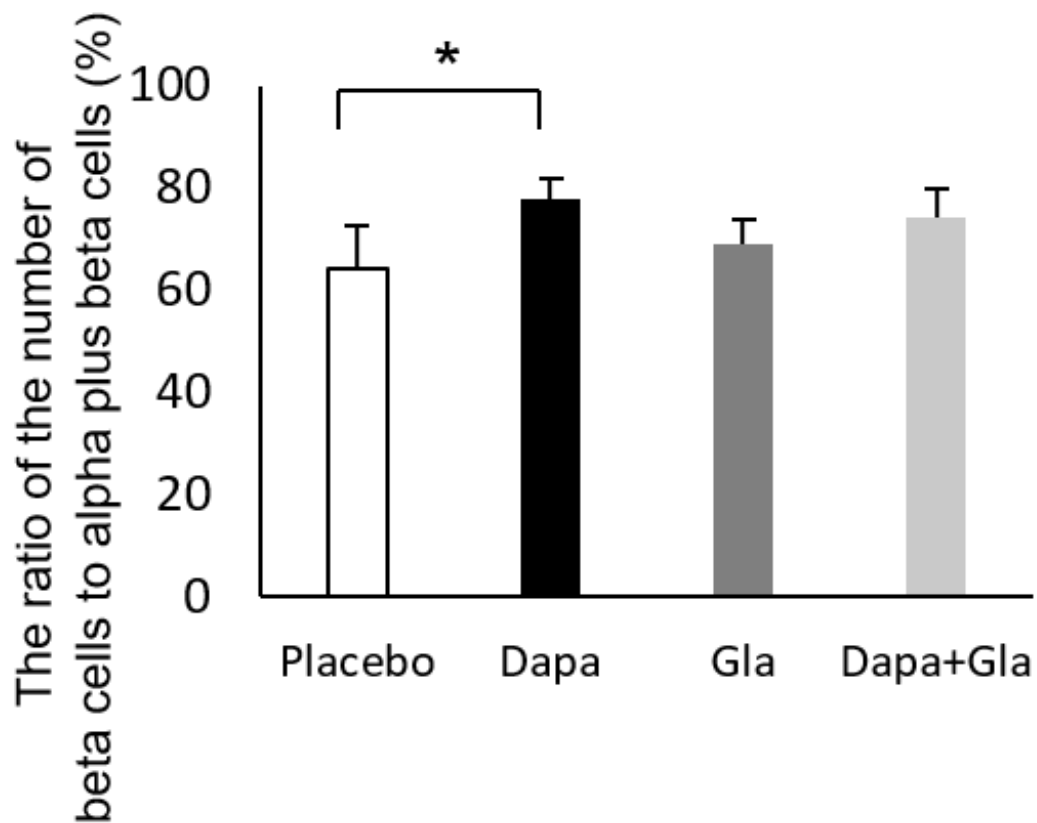


Figure 17. 膵島内の α + β 細胞数における β 細胞数の割合

14 週齢の各群のマウスの膵組織切片を抗インスリン抗体、抗グルカゴン抗体にて蛍光免疫染色法で二重染色した。膵島における β 細胞数を α 細胞と β 細胞の総和で除した。Placebo 群 (白)、Dapa 群 (黒)、Gla 群 (灰色)、Dapa+Gla 群 (薄灰色) ($n = 9-10$) (平均 $\pm$ SD) * $p < 0.05$

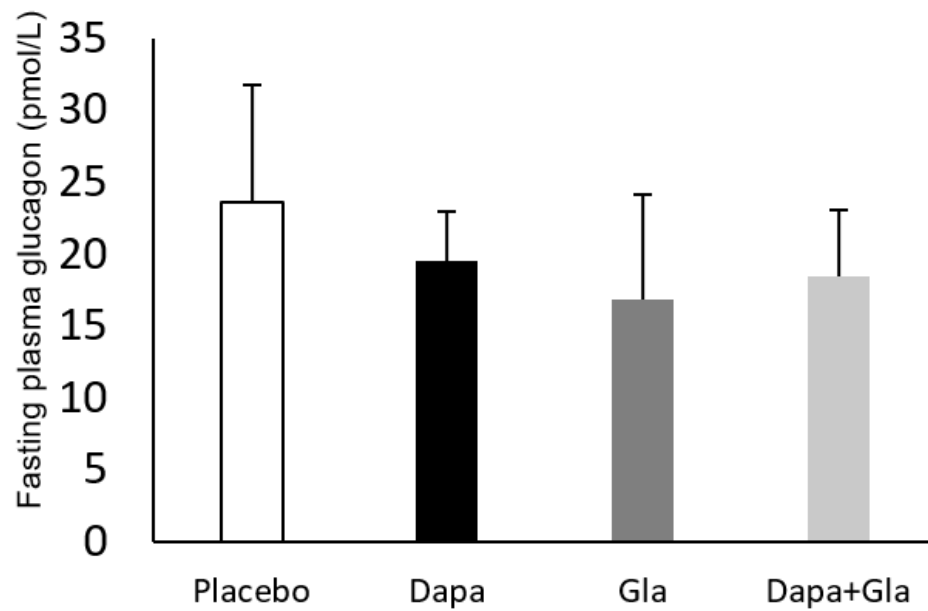


Figure 18. 空腹時時血漿グルカゴン値

13 週齡の空腹時の血漿グルカゴン値を測定した。Placebo 群 (白)、Dapa 群 (黒)、Gla 群 (灰色)、Dapa+Gla 群 (薄灰色) ($n = 4$) (平均 $\pm$ SD)

5.4.3 *db/db* マウスの肝脂肪化に対するダパグリフロジン および/またはインスリングルルギンの効果

5.4.3.1 肝重量と血清脂質

体重で補正した内臓脂肪重量と皮下脂肪重量、肝臓の重量を測定した。内臓脂肪重量は精巣上体脂肪、腸間膜脂肪、腎周囲脂肪の和と定義した。内臓脂肪重量は、Placebo 群と比較して Dapa+Gla 群のみがわずかに高値であったが、皮下脂肪の重量は、3 つの治療群で 8 週間の治療後に Placebo 群と比較して有意に高値であった (Figure 19)。一方、Dapa 群及び Dapa+Gla 群の肝臓重量は、Gla 群では認められなかったが、8 週間後の肝臓重量は、Placebo 群に比べて有意に低かった (Figure 20)。血漿 TG 値は 3 つの治療群で有意に低下したが、血漿遊離脂肪酸値 (non-esterified fatty acid ; NEFA) は Placebo 群と比較して Gla 群のみ有意に低下した (Figure 21、22)。

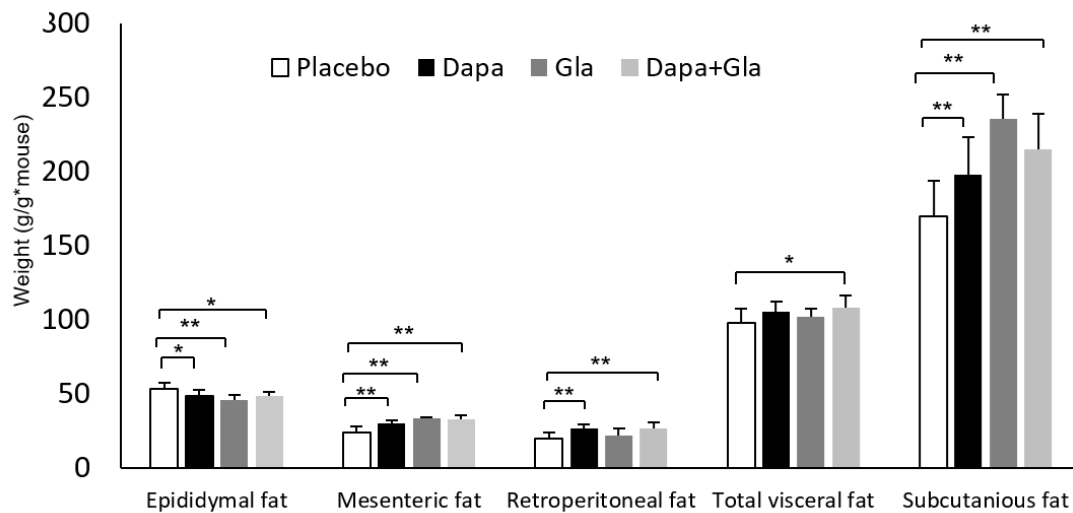


Figure 19. 体重で補正した内臓脂肪と皮下脂肪重量

14 週齢の体重で補正した精巣上体脂肪(Epididymal fat)、腸間膜脂肪(Mesenteric fat)、腎周囲脂肪(Retroperitoneal fat)、内臓脂肪、皮下脂肪を評価した。Placebo 群 (白)、Dapa 群 (黒)、Gla 群 (灰色)、Dapa+Gla 群 (薄灰色) ($n = 9-10$). (平均 $\pm$ SD) ** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$

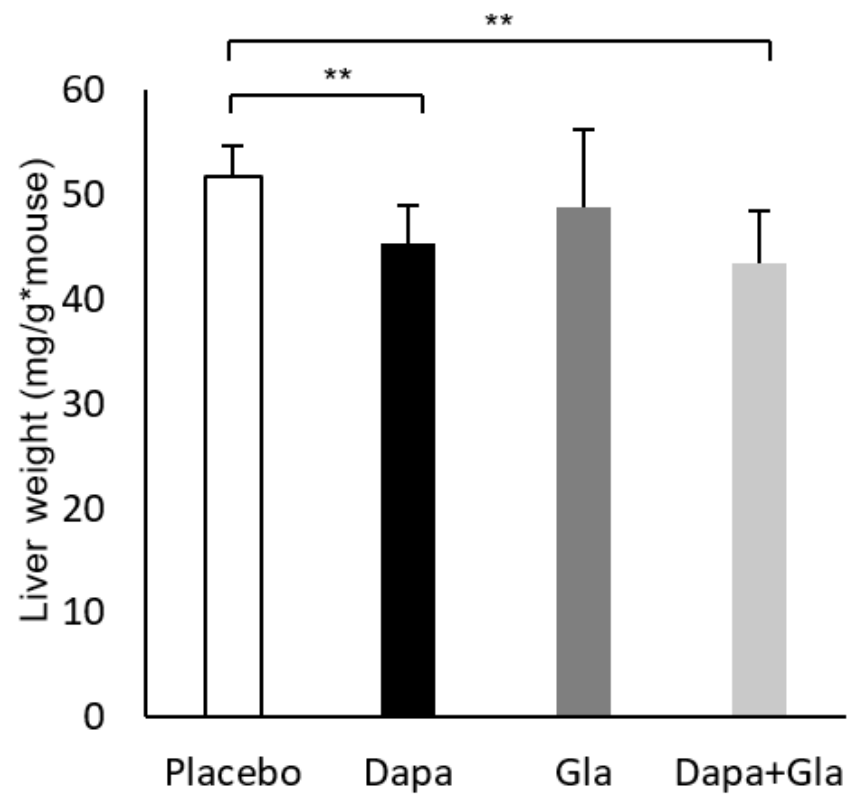


Figure 20. 体重で補正した肝重量
 14 週令の体重で補正した肝重量。Placebo 群 (白)、Dapa 群 (黒)、Gla 群 (灰色)、
 Dapa+Gla 群 (薄灰色) ($n = 9-10$) (平均 $\pm$ SD) ** $p < 0.01$ $p < 0.05$

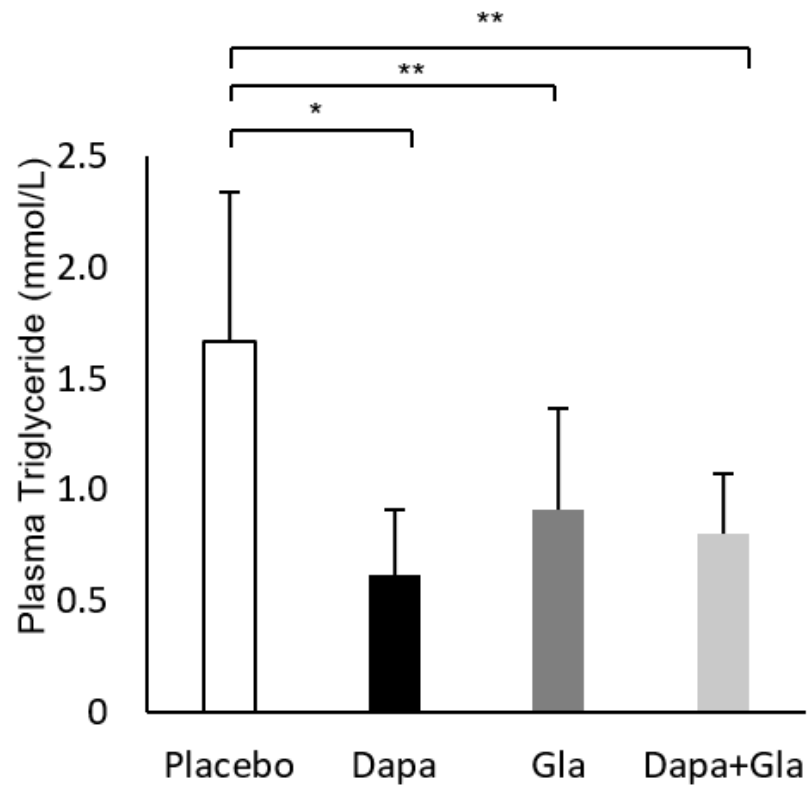


Figure 21. 空腹時血漿中性脂肪

13 週齡の空腹時血漿中性脂肪を測定した。

Placebo 群 (白)、Dapa 群 (黒)、Gla 群 (灰色)、Dapa+Gla 群 (薄灰色) ($n = 4$)
(平均 $\pm$ SD) ** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$

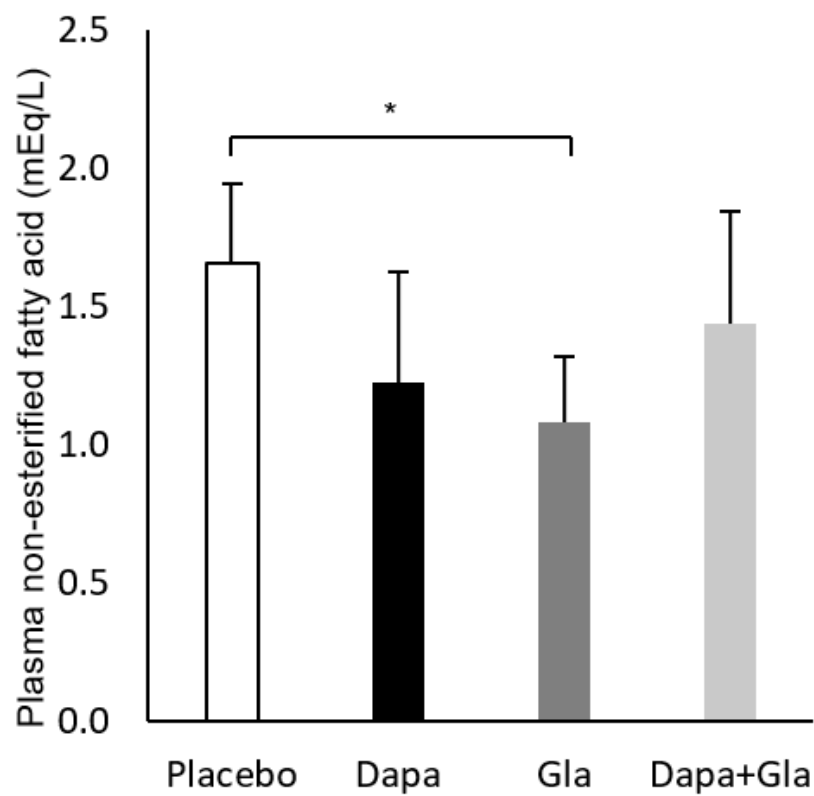


Figure 22. 空腹時血漿遊離脂肪酸

13 週齡の空腹時遊離脂肪酸を測定した。

Placebo 群（白）、Dapa 群（黒）、Gla 群（灰色）、Dapa+Gla 群（薄灰色）（ $n = 4$ ）
（平均 $\pm$ SD）* $p < 0.05$

5.4.3.2 肝臓の組織と脂肪化に関する評価

肝臓のヘマトキシリン・エオジン染色およびオイルレッド O 染色を行ったところ、G1a 群では他の 3 群と比較して高い脂肪滴の蓄積が認められた (Figure 23 および 24)。NASH/NAFLD Clinical Research Network のスコアリングシステムの定義とスコア (Kleiner et al., 2005) に基づいて肝組織を定量化したところ、G1a 群では他の 3 群と比較して総スコアが有意に上昇していた (Figure 25)。また、これらの肝組織の脂肪化をポイントカウントシステム (Marinho et al., 2017) を用いて評価したところ、G1a 群では他の 3 群に比べて有意に脂肪化が増加していることが示された (Figure 26)。

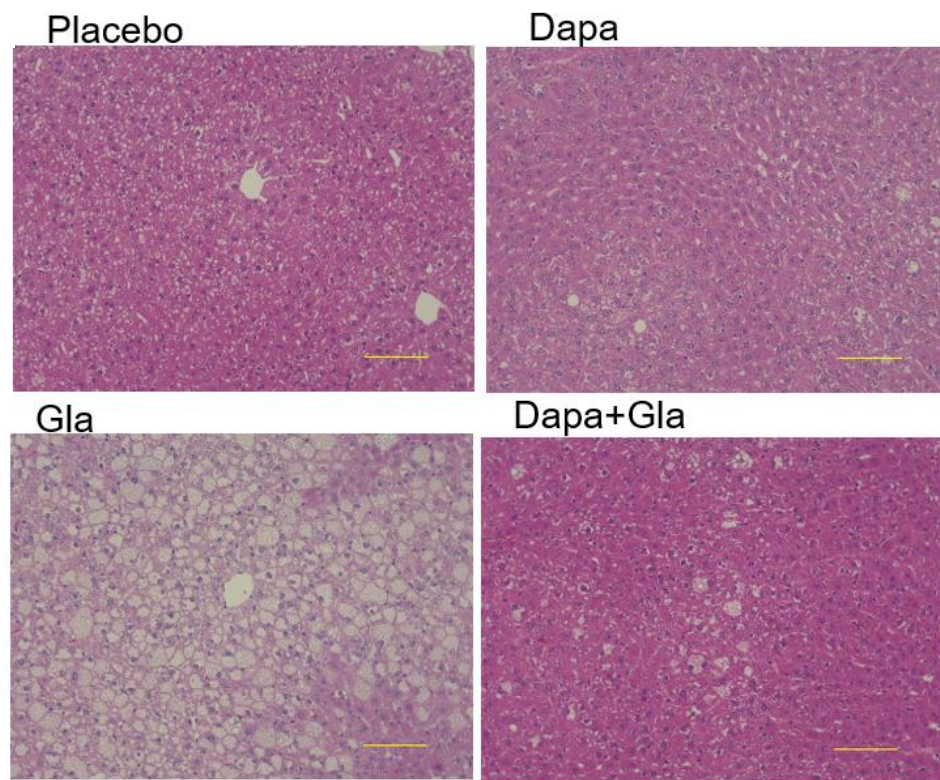


Figure 23. 肝組織のヘマトキシリン・エオジン染色
14 週齢の各群のマウスの肝組織切片に対しヘマトキシリン・エオジン染色を行った。
黄色のスケールバーは 100 μm を示している。

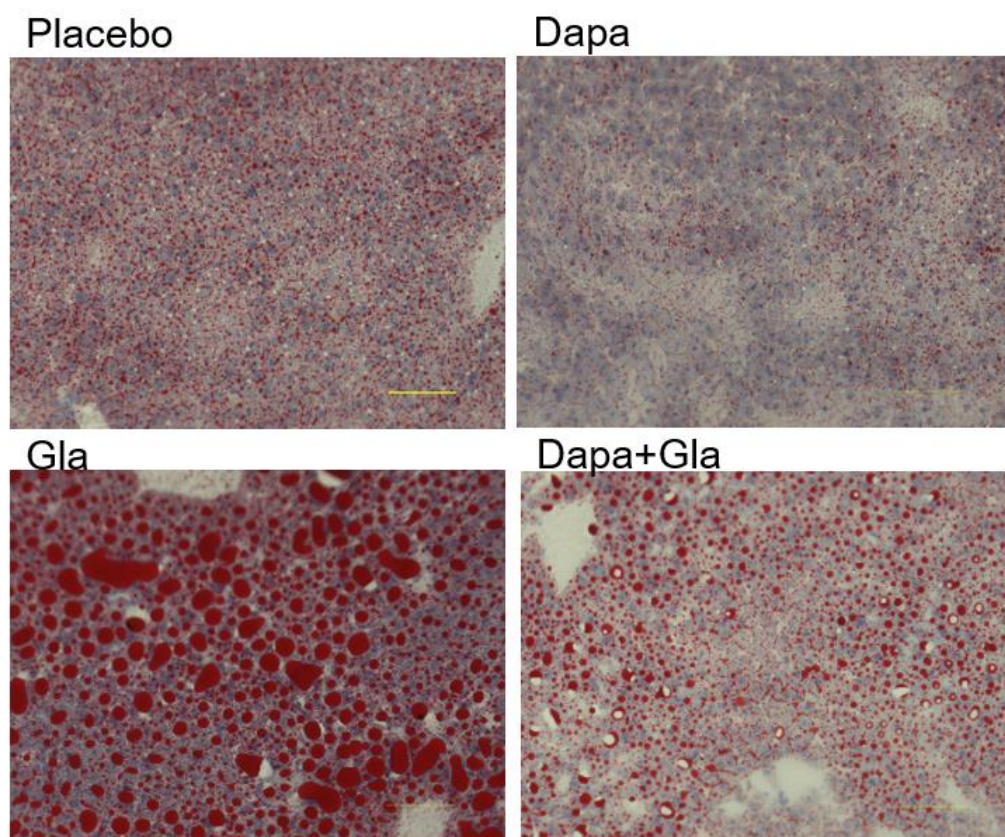


Figure 24. 肝組織のオイルレッド O 染色

14 週齢の各群のマウスの肝組織切片に対しオイルレッド O 染色を行った。黄色のスケールバーは $100\mu\text{m}$ を示している。

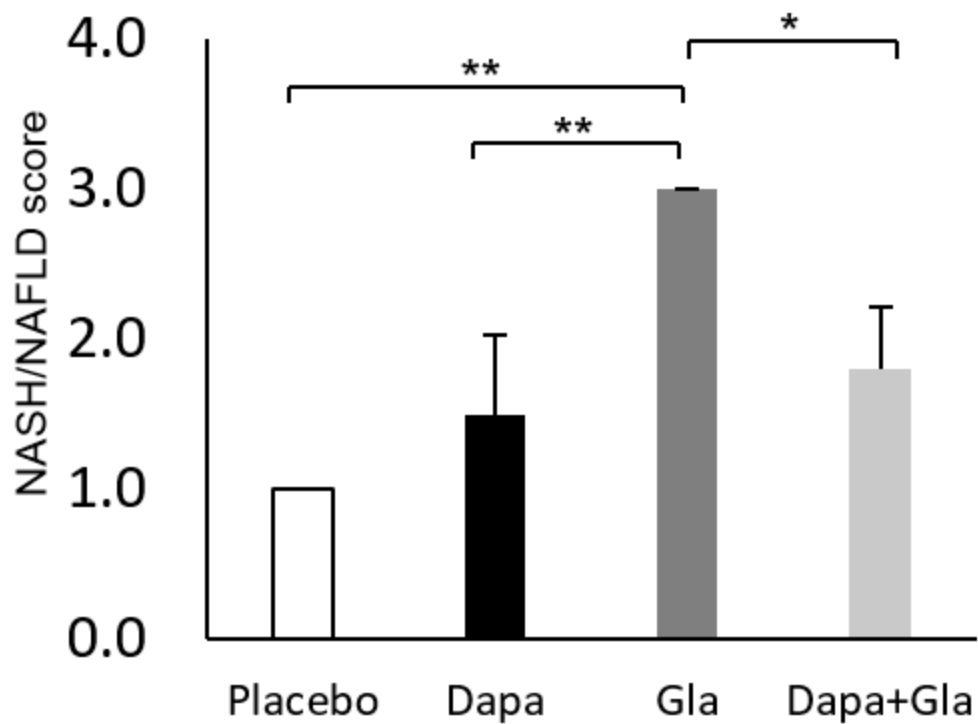


Figure 25. NASH/NAFLD Clinical Research Network のスコアリングシステムに基づく肝組織脂肪化の評価
14 週齢の肝組織切片を評価した。Placebo 群 (白)、Dapa 群 (黒)、Gla 群 (灰色)、Dapa+Gla 群 (薄灰色) ($n = 9-10$) (平均 $\pm$ SD) ** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$

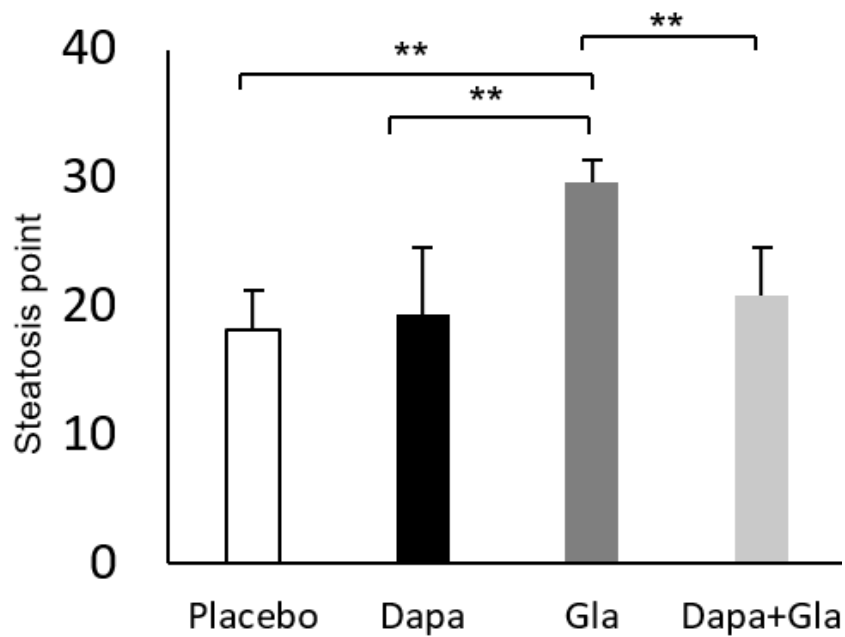


Figure 26. Point count system に基づく肝組織脂肪化の評価
14 週齢の肝組織切片を評価した。Placebo 群 (白)、Dapa 群 (黒)、Gla 群 (灰色)、
Dapa+Gla 群 (薄灰色) ($n = 9-10$) (平均 $\pm$ SD) ** $p < 0.01$

5.4.3.3 肝臓内中性脂肪含量、脂肪酸構成と Desaturation Index

肝臓内の中性脂肪含量を検討したところ、Gla 群では他の 3 群と比較して顕著に上昇していた (Figure 27)。血漿総コレステロール値は Gla 群がプラセボ群、Dapa+Gla 群に比べて高かったが、肝臓内総コレステロール含量は 4 群間で差を認めなかった (Figure 28、29)。次に、肝脂肪酸含量の組成を調べたところ、肝ステアリン酸含量には 4 群間で差はなかったが、パルミチン酸含量及びオレイン酸含量が他の 3 群と比較して Gla 群で有意に増加していることがわかった (Figure 30、31、32)。また、これら 3 つの脂肪酸で計算される Desaturation Index は Placebo 群と比較して Gla 群で高値であった (Figure 33)。この指数の上昇は、典型的には、脂肪形成が誘導されたときに観察される。さらに、血漿脂肪酸の組成を評価したところ、血漿パルミチン酸、オレイン酸、ステアリン酸は 4 群間で差がなかった (Figure 34、35、36)。しかし、Gla 群では、Dapa 群及び Dapa+Gla 群と比較して、Desaturation Index の有意な上昇が認められた (Figure 37)。これらの結果から、インスリングルルギンの単独の投与は、db/db マウスの肝脂肪化を誘導し、インスリングルルギンとダパグリフロジンの併用では脂肪化は促進されないことが示された。

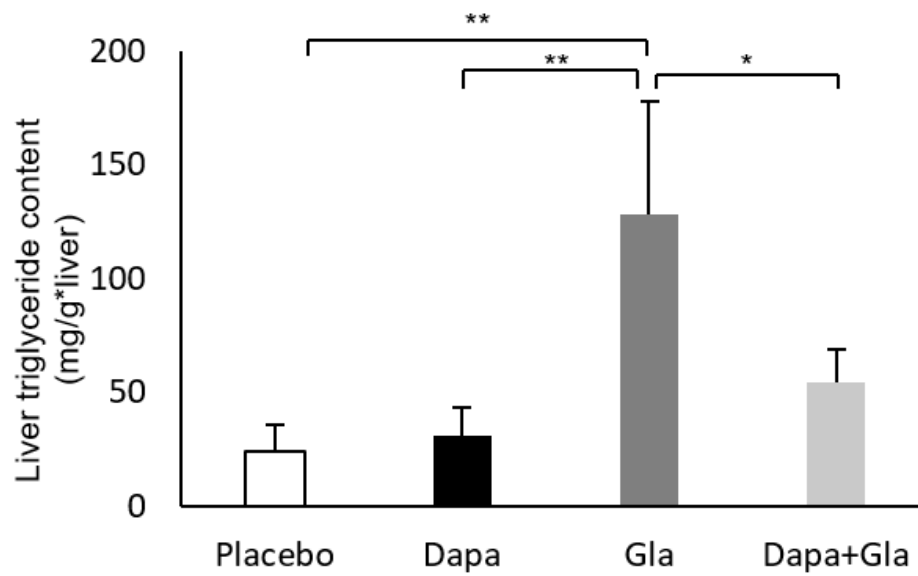


Figure 27. 肝臓内中性脂肪含量

14 週齢の肝臓内中性脂肪含量を測定した。Placebo 群（白）、Dapa 群（黒）、Gla 群（灰色）、Dapa+Gla 群（薄灰色）($n = 4$)（平均 $\pm$ SD）** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$

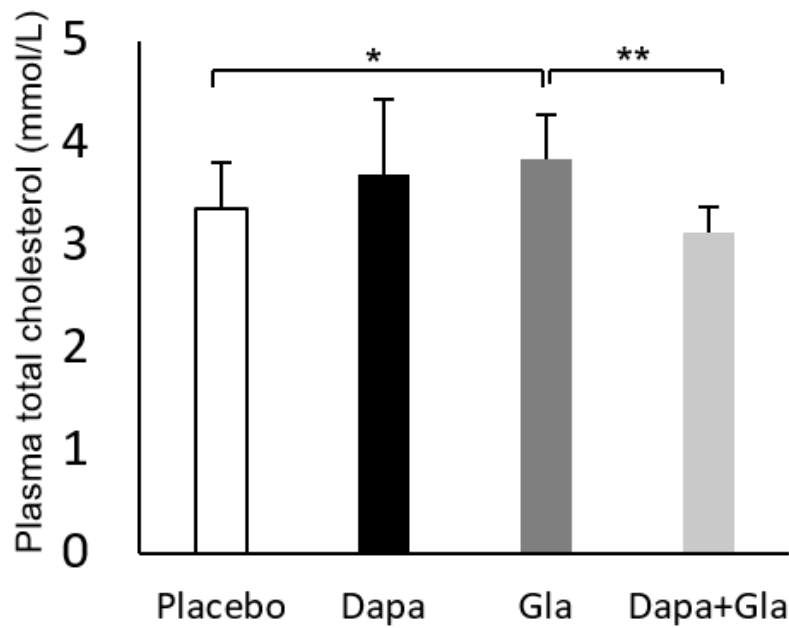


Figure 28. 血漿総コレステロール

13 週齢の空腹時血漿総コレステロールを測定した。Placebo 群 (白)、Dapa 群 (黒)、Gla 群 (灰色)、Dapa+Gla 群 (薄灰色) ($n=4$) (平均 $\pm$ SD) ** $p<0.01$ 、* $p<0.05$

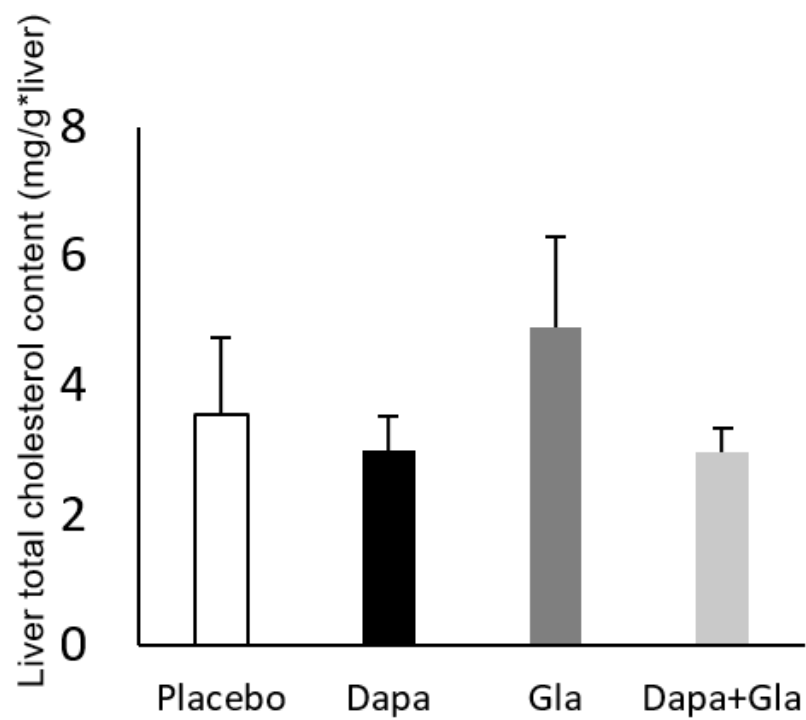


Figure 29. 肝臓内総コレステロール含量

14 週齢の肝臓内総コレステロール含量を評価した。Placebo 群 (白)、Dapa 群 (黒)、Gla 群 (灰色)、Dapa+Gla 群 (薄灰色) ($n = 4$) (平均 $\pm$ SD)

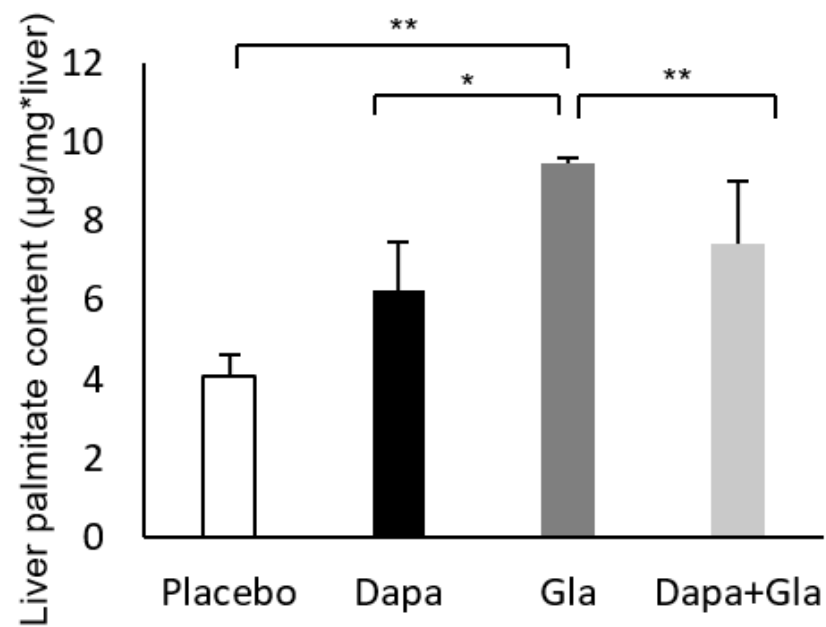


Figure 30. 肝臓内パルミチン酸含量

14 週齢の肝臓内パルミチン酸含量を測定した。Placebo 群 (白)、Dapa 群 (黒)、Gla 群 (灰色)、Dapa+Gla 群 (薄灰色) ($n=4$) (平均 $\pm$ SD) ** $p<0.01$ 、* $p<0.05$

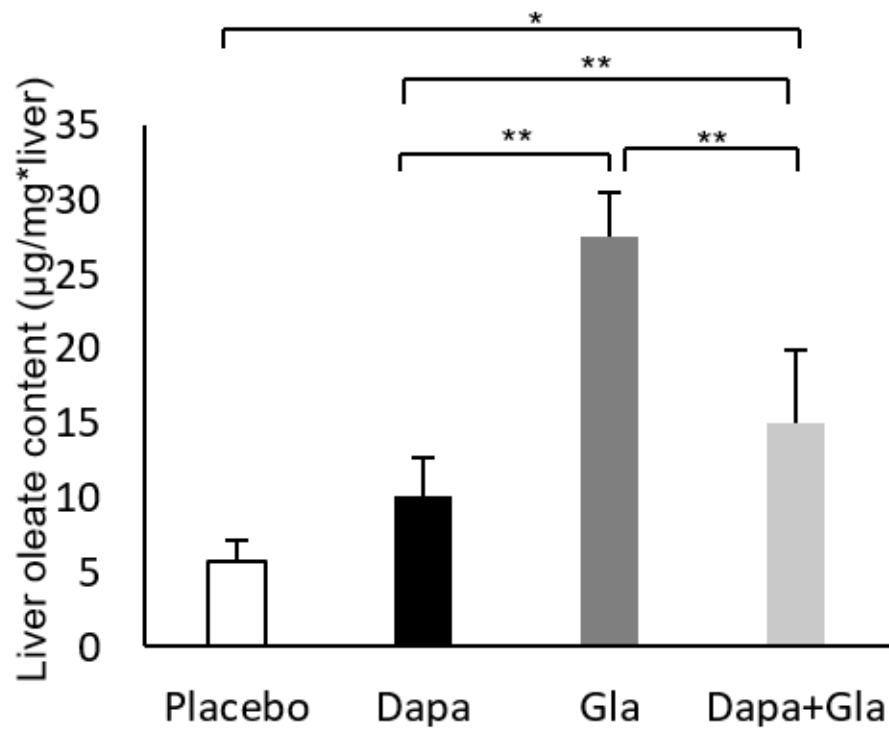


Figure 31. 肝臓内オレイン酸含量

14 週齢の肝臓内オレイン酸を測定した。Placebo 群（白）、Dapa 群（黒）、Gla 群（灰色）、Dapa+Gla 群（薄灰色）($n = 4$)（平均 $\pm$ SD）** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$

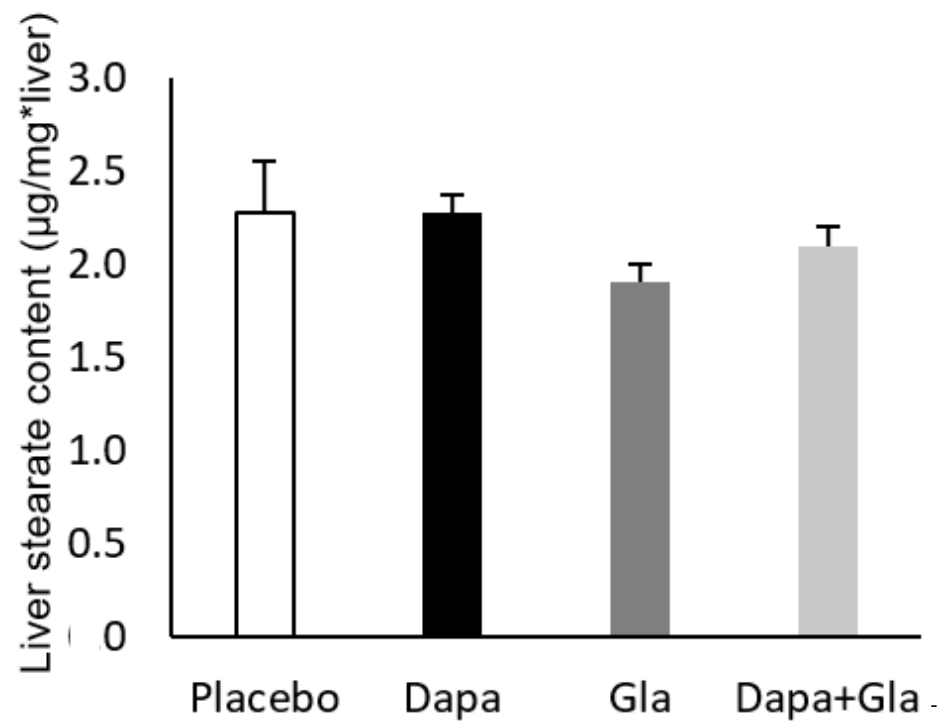


Figure 32. 肝臓内ステアリン酸含量

14 週齢の肝臓内ステアリン酸含量を測定した。Placebo 群（白）、Dapa 群（黒）、Gla 群（灰色）、Dapa+Gla 群（薄灰色） ($n = 4$)（平均 $\pm$ SD）

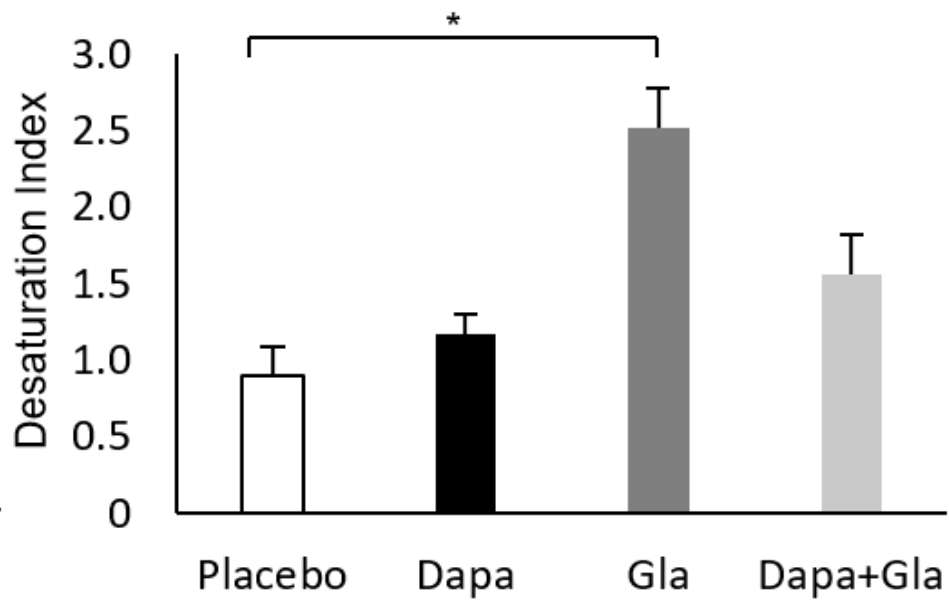


Figure 33. 肝臓 Desaturation Index

14 週齢の肝臓 Desaturation Index を算出した。Placebo 群（白）、Dapa 群（黒）、Gla 群（灰色）、Dapa+Gla 群（薄灰色）($n = 4$)（平均 $\pm$ SD）* $p < 0.05$

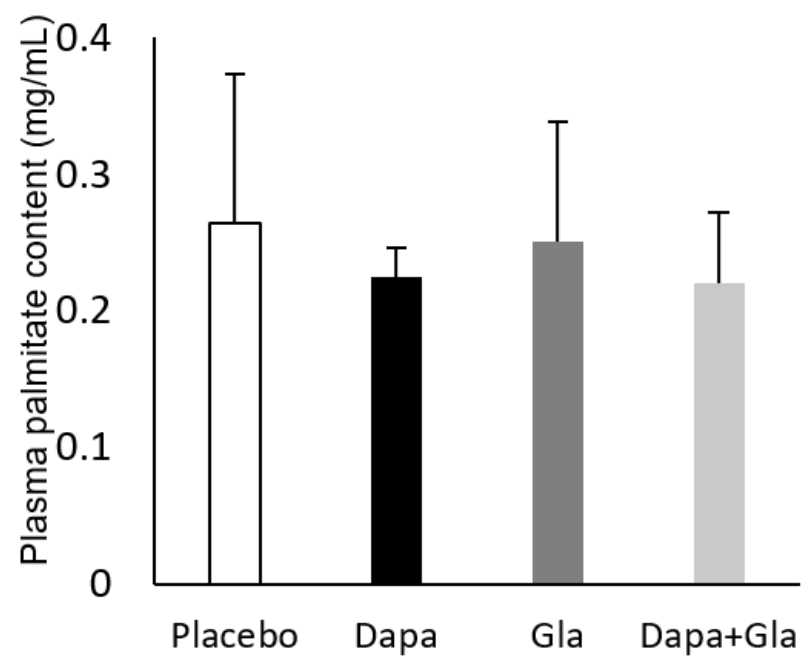


Figure 34. 血漿パルミチン酸

13 週齢の空腹時血漿パルミチン酸を測定した。Placebo 群（白）、Dapa 群（黒）、Gla 群（灰色）、Dapa+Gla 群（薄灰色）($n = 4$)（平均 $\pm$ SD）

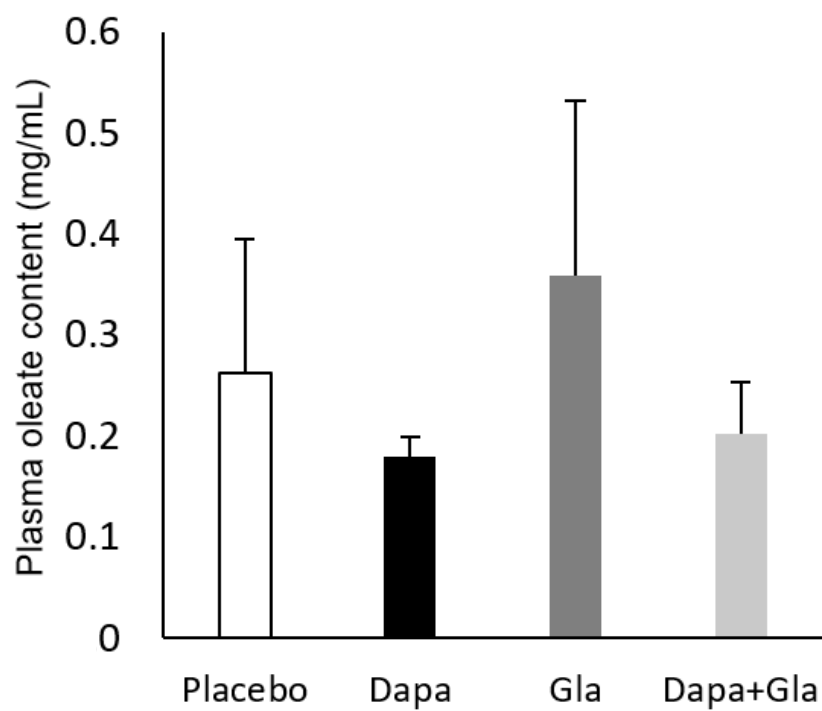


Figure 35. 血漿オレイン酸

13 週齢の空腹時血漿オレイン酸を測定した。Placebo 群（白）、Dapa 群（黒）、Gla 群（灰色）、Dapa+Gla 群（薄灰色）($n = 4$)（平均 $\pm$ SD）

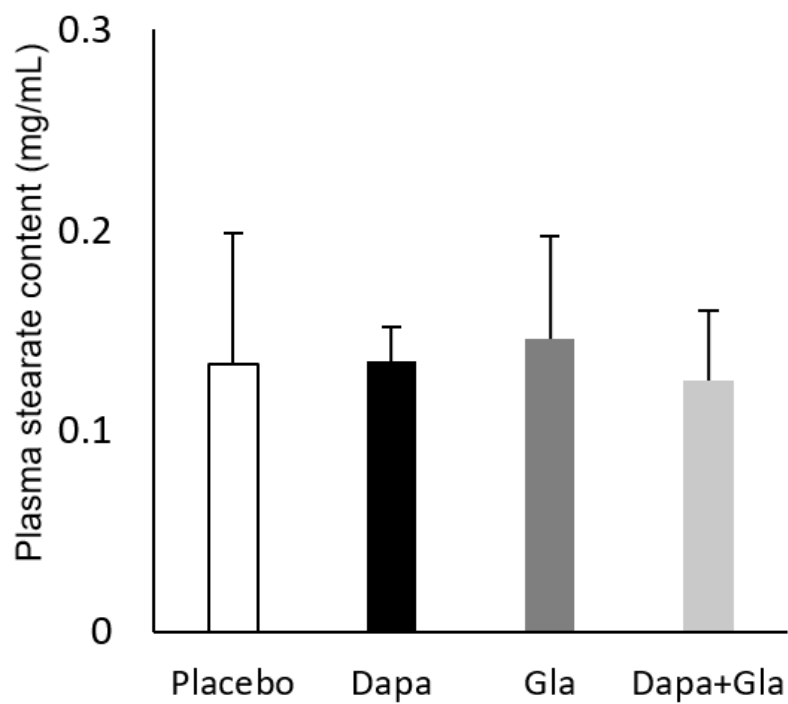


Figure 36. 血漿ステアリン酸

13 週齢の空腹時血漿ステアリン酸を測定した。Placebo 群（白）、Dapa 群（黒）、Gla 群（灰色）、Dapa+Gla 群（薄灰色） ($n = 4$) (平均 $\pm$ SD)

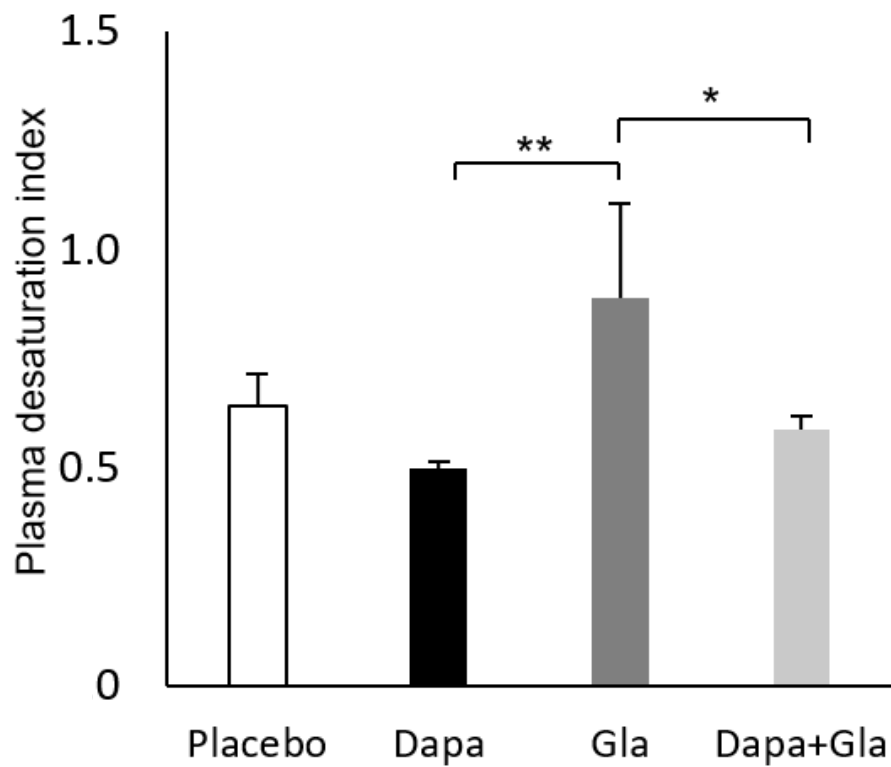


Figure 37. 血漿 Desaturation Index

13 週齡の血漿 Desaturation Index を算出した。Placebo 群（白）、Dapa 群（黒）、Gla 群（灰色）、Dapa+Gla 群（薄灰色）($n=4$) (平均 $\pm$ SD) ** $p<0.01$ 、* $p<0.05$

5.4.4 *db/db* マウスの肝臓における遺伝子発現に及ぼすダパグリフロジンおよび/またはインスリングルルギンの影響

ダパグリフロジンおよび/またはインスリングルルギンを投与した *db/db* マウスの肝脂肪化に関連する遺伝子発現を調べた。まず、4 群のマウスの肝臓で発現している遺伝子のマイクロアレイ解析を行った。その結果、Dapa 群では 89 個、Gla 群では 158 個、Dapa+Gla 群では 219 個の遺伝子がプラセボ群と比較して有意に発現が亢進していた（倍数変化 ≥ 1.5 、 $p < 0.05$ ）主に脂肪酸の貯蔵・合成に関わる *Cidea*、*Cidec*、*Mogat1* は、プラセボ群と比較して Gla 群で有意に発現が亢進していた（Table 3）。これらの遺伝子は、Dapa 群および Dapa+Gla 群では発現の亢進は認めなかった。定量的リアルタイム PCR 法により、脂肪酸合成に関連する遺伝子である *Fas*、*Elovl6*、*Scd1*、*Mogat1* の発現が、プラセボ群と比較して Gla 群で有意に発現が亢進していることが明らかになった（Figure 38）。また、脂肪酸の取り込み・貯蔵に関連する遺伝子の発現量については、*Cidea* と *Cidec* がプラセボ群と比較して Gla 群で有意に上昇していた。また、*Fas*、*Elovl6*、*Scd1*、*Mogat1*、*Cidec* の上流に位置すると考えられる *Pparg2* は、プラセボ群と比較して Gla 群で有意に発現量が上昇していた（Figure 39）。しかし、脂肪酸の酸化や炎症に関与する遺伝子の発現量には、4 群間で明らかな差は認められなかった（Figure 40、41）。これらの結果から、インスリングルルギンが *db/db* マウスの肝臓で脂肪酸合成、取り込み、貯蔵を促進し、脂肪酸の蓄積や脂肪滴形成につながったことが示唆された。

Table 3. 肝臓遺伝子発現のマイクロアレイ解析

Placebo 群に比し、Dapa、Gla、Dapa+Gla 群の遺伝子発現が亢進していた遺伝子の上位 10 個を示した。

Dapa vs. Placebo

Rank	Ratio	Gene symbol	Gene description	P value
1	3.78	<i>Gck</i>	glucokinase	0.01
2	2.64	<i>Pcsk9</i>	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	0.04
3	2.57	<i>Ifit3</i>	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats3	<0.01
4	2.56	<i>Ifit3b</i>	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats3B	<0.01
5	2.4	<i>Gm10972</i>	predicted gene 10972	0.01
6	2.39	<i>Fdps</i>	farnesyl diphosphate synthetase	0.04
7	2.34	<i>Cyp17a1</i>	cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1	<0.01
8	2.33	<i>Gm10198</i>	predicted gene 10198	0.03
9	2.31	<i>Nudt7</i>	nudix -type motif 7	0.04
10	2.2	<i>Zfp125</i>	zinc finger protein 125	<0.01

Gla vs. Placebo

Rank	Ratio	Gene symbol	Gene description	P value
1	7.14	<i>Cidec</i>	cell death-inducing DFFA-like effector c	0.02
2	6.73	<i>Cidea</i>	cell death-inducing DFFA -like effector A	0.046
3	5.4	<i>Gck</i>	glucokinase	<0.01
4	3.81	<i>Pltp</i>	phospholipid transfer protein	0.04
5	3.48	<i>Aqp8</i>	aquaporin 8	0.04
6	3.29	<i>Abcd2</i>	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 2	0.02
7	3.24	<i>Osbpl3</i>	oxysterol binding protein-like 3	0.02
8	3.02	<i>Slc10a2</i>	solute carrier family 10, member 2	<0.01
9	2.91	<i>Mogat1</i>	monoacylglycerol O-acyltransferase 1	0.048
10	2.89	<i>Klk1b4</i>	kallikrein 1-related peptidase b4	<0.01

Dapa+Gla vs. Placebo

Rank	Ratio	Gene symbol	Gene description	P value
1	4.43	<i>Mvd</i>	mevalonate (diphospho) decarboxylase	<0.01
2	4.2	<i>Gck</i>	glucokinase	<0.01
3	4.12	<i>Pltp</i>	phospholipid transfer protein	0.02
4	4.07	<i>Acly</i>	ATP citrate lyase	<0.01
5	3.97	<i>Fasn</i>	fatty acid synthase	0.02
6	3.77	<i>Cyp51</i>	cytochrome P450, family 51	0.02
7	3.66	<i>Me1</i>	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	<0.01
8	3.63	<i>Aqp8</i>	aquaporin 8	0.01
9	3.5	<i>H60b</i>	histocompatibility 60b	0.01
10	3.37	<i>Hmgcr</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme reductase	A 0.047

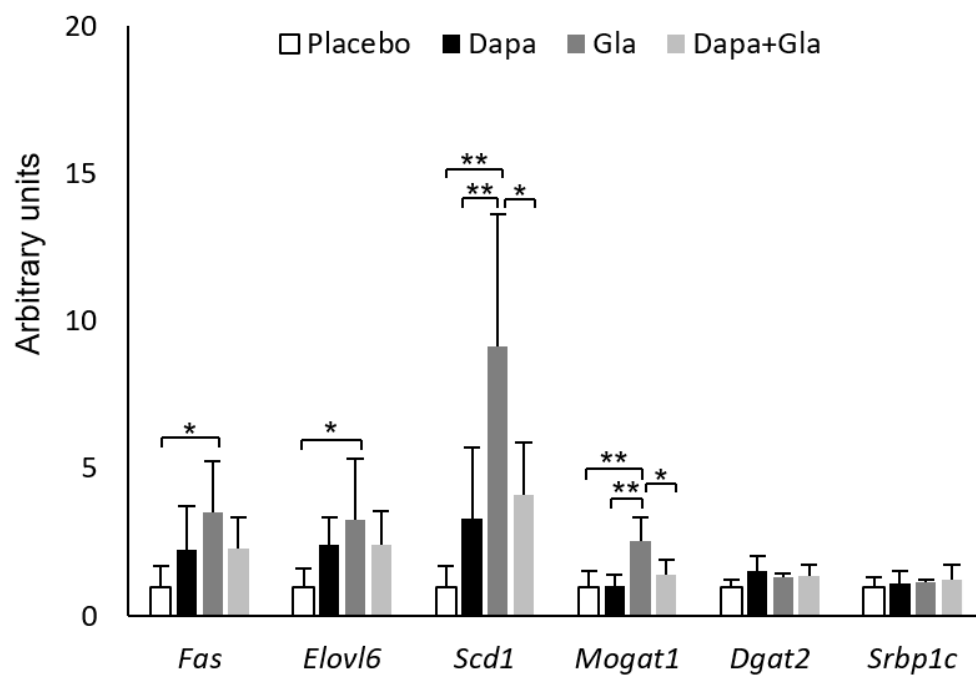


Figure 38. 肝臓の脂肪酸合成にかかわる遺伝子群の発現

定量的リアルタイム PCR 法により 14 週齢の肝臓の遺伝子発現を評価した。

Placebo 群（白）、Dapa 群（黒）、Gla 群（灰色）、Dapa+Gla 群（薄灰色）（ $n = 6$ ）

（平均 $\pm$ SD）** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$

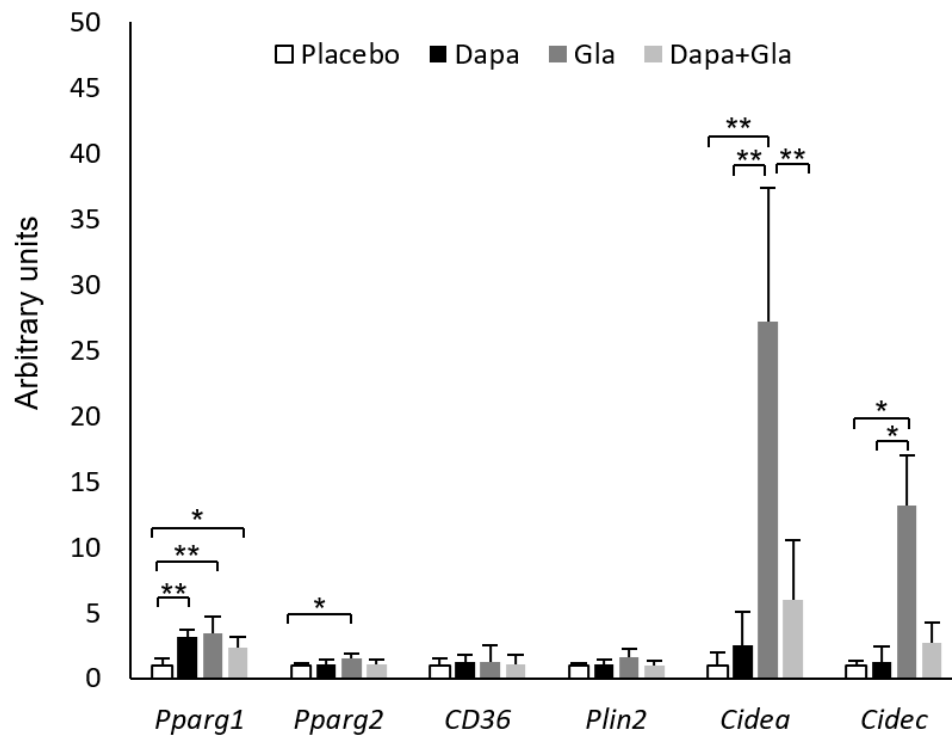


Figure 39. 肝臓の脂肪酸取り込みと貯蔵にかかわる遺伝子群の発現
 定量的リアルタイム PCR 法により 14 週齢の肝臓の遺伝子発現を評価した。
 Placebo 群（白）、Dapa 群（黒）、Gla 群（灰色）、Dapa+Gla 群（薄灰色）（ $n = 6$ ）
 （平均 $\pm$ SD） ** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$

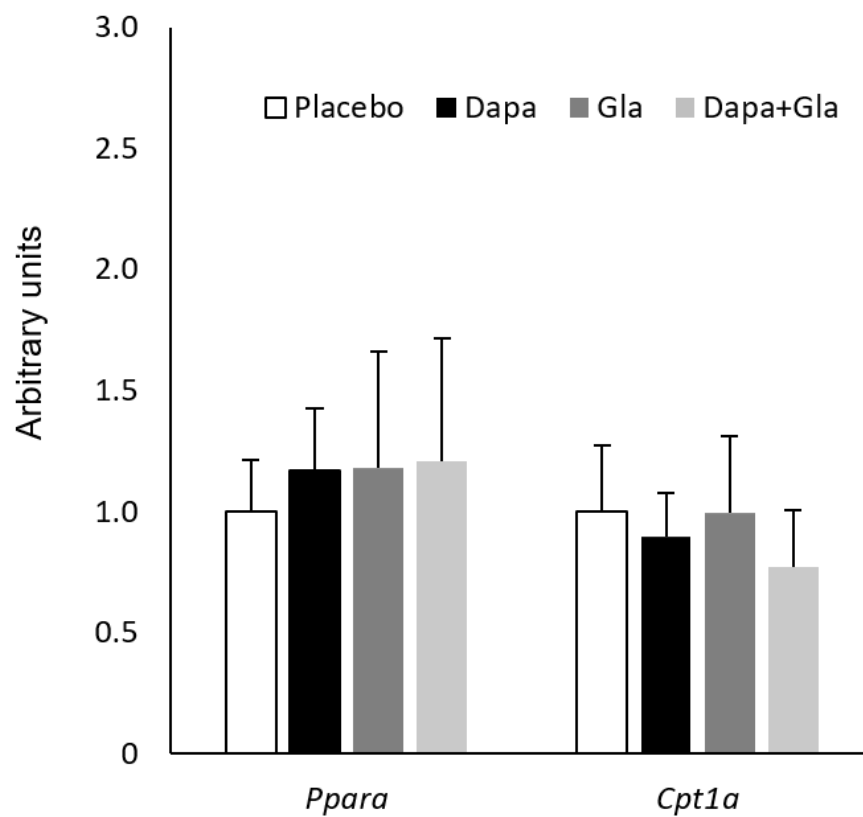


Figure 40. 肝臓の脂肪酸酸化にかかわる遺伝子群の発現
 定量的リアルタイム PCR 法により 14 週齢の肝臓の遺伝子発現を評価した。
 Placebo 群（白）、Dapa 群（黒）、Gla 群（灰色）、Dapa+Gla 群（薄灰色）（ $n = 6$ ）
 （平均 $\pm$ SD）

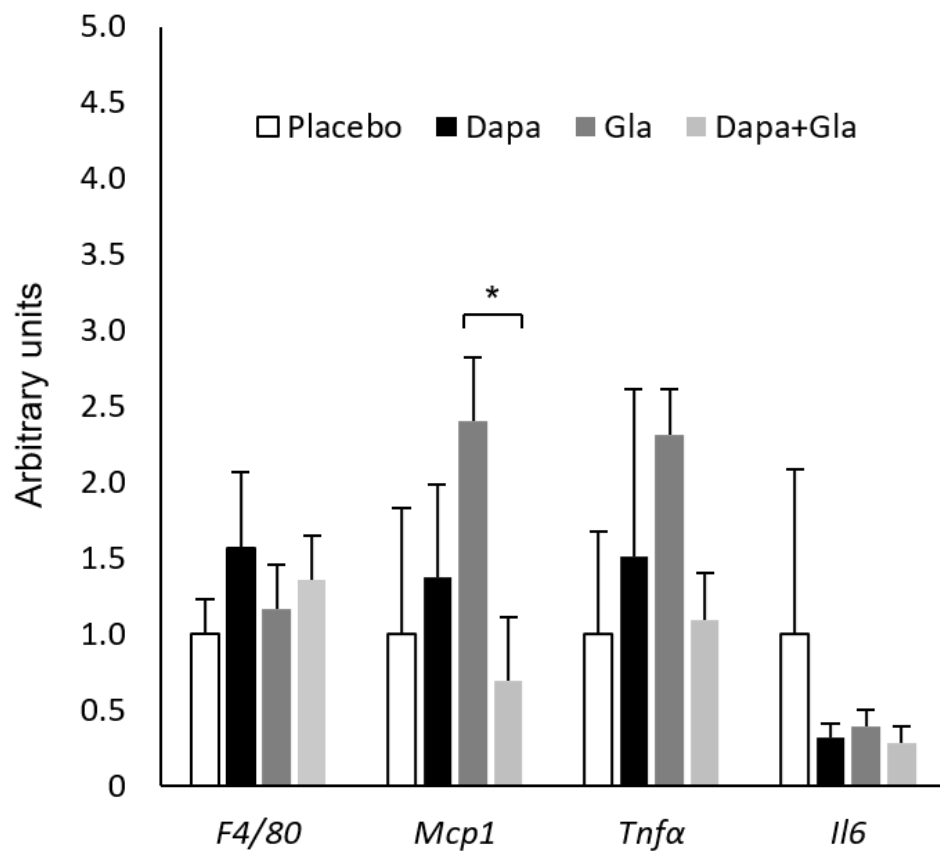


Figure 41. 肝臓の炎症にかかわる遺伝子群の発現
 定量的リアルタイム PCR 法により 14 週齢の肝臓の遺伝子発現を評価した。
 Placebo 群 (白)、Dapa 群 (黒)、Gla 群 (灰色)、Dapa+Gla 群 (薄灰色) ($n = 6$)
 (平均 $\pm$ SD) * $p < 0.05$

5.4.5 *db/db* マウスの血糖日内変動に及ぼすダパグリフロジンおよび/またはインスリングルルギンの影響

膵β細胞量に関して治療群間、特に Gla 群の血糖値にばらつきがあったかどうかを確認するため、1 日の血糖日内変動 (Figure 42) や血糖変動を示す M 値を確認した (Figure 43)。3 つの治療群間で平均血糖値や M 値に有意な差は認められなかった。

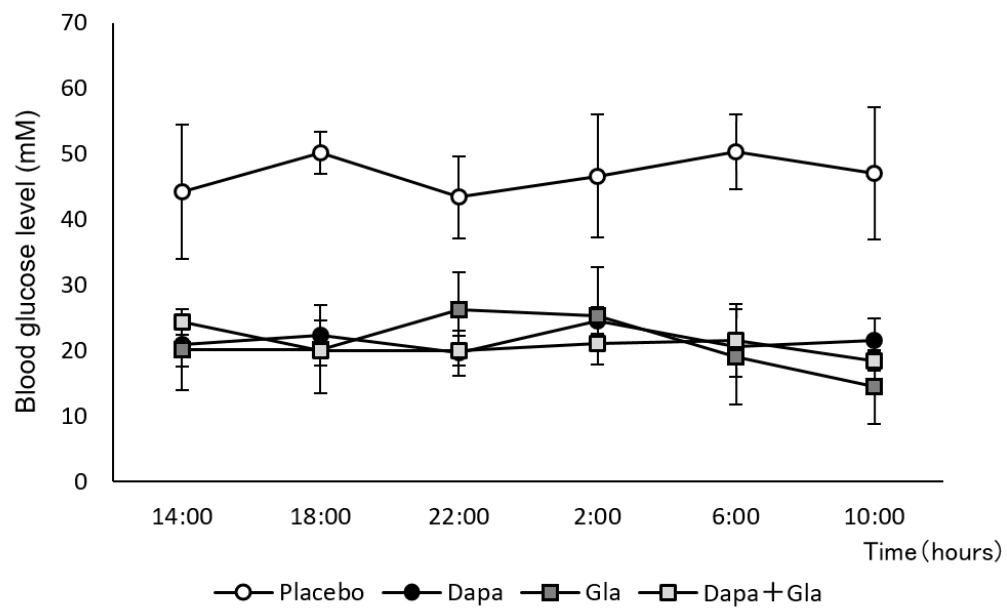


Figure 42. 血糖日内変動

14 週齡の血糖日内変動を測定した。Placebo 群（白）、Dapa 群（黒）、Gla 群（灰色）、Dapa+Gla 群（薄灰色）($n = 5$)（平均 $\pm$ SD）

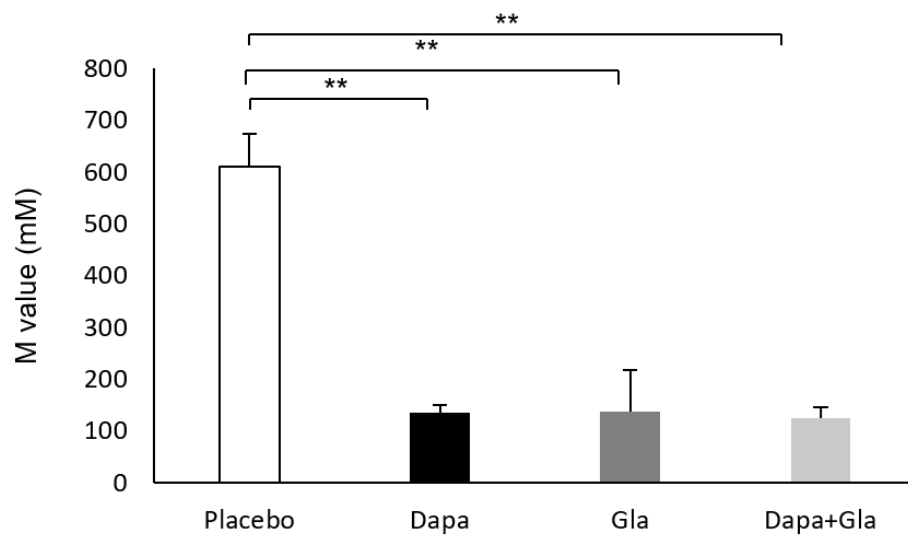


Figure 43. M 値

14 週齡の血糖変動を示す M 値を算出した。Placebo 群（白）、Dapa 群（黒）、Gla 群（灰色）、Dapa+Gla 群（薄灰色）($n = 5$)（平均 $\pm$ SD）** $p < 0.01$

5.5 考察

db/db マウスは、膵 β 細胞の機能と膵 β 細胞量が進行性に低下していくことから、2型糖尿病の自然経過の特徴をよく表している。我々の先行研究(Takahashi et al., 2018)によると、*db/db* マウスの膵 β 細胞機能と膵 β 細胞量は生後6週齢から徐々に低下していた。そこで本研究では、6週齢からダパグリフロジンとインスリングラルギンを投与した。その結果、Placebo 群と比較して、これらの薬剤の投与により体重が有意に増加した (Figure 1)。一般的に SGLT2 阻害薬の投与は体重増加を伴わないと考えられているが(Zaccardi et al., 2016)、Dapa 群でも Placebo 群と比較して、薬剤の投与により体重が増加することがわかった (Figure 1)。*db/db* マウスの体重に対する SGLT2 阻害剤の効果については、以前の報告(Kanno et al., 2019; Terami et al., 2014)でも同様の結果が観察されている。Placebo 群のマウスは、高血糖が顕著に起こり、その後異化作用が亢進したため、時間の経過とともに体重が減少する傾向にあったことが示唆された (Figure 1)。一方、他の3つの治療群 (Dapa、Gla、Dapa+Gla 群) のマウスは、高血糖を改善することで異化が抑制されたため体重が増加したと考えられる。また、インスリンによる治療は尿中のグルコース排泄を促進するのではなく、ブドウ糖の体内での利用を促進したため、Gla 群の体重が最も多かったと示唆される (Figure 4)。

本研究の第一の目的は、ダパグリフロジンおよび/またはインスリングラルギンの膵 β 細胞量に対する効果を検証することであった。Dapa 群の膵 β 細胞量は、プラセボ群と比較して有意に保持された (Figure 12、13) が、これは以前の報告(Takahashi et al., 2018; Terami et al., 2014)と一致していた。膵 β 細胞量の保持効果の重要なメカニズムは、糖毒性の低下であると考えられている(Kanno et al., 2019)。血糖値が Dapa および Dapa+Gla 群と同等であった Gla 群では、なぜ膵 β 細胞量が保持されなかったのだろうか。考えうる説明としては、Gla 群の血糖値に大きなばらつきがあった可能性が考えられる。インスリンを皮下注射で投与したが、これでは安定した血糖降下作用が得られない可能性がある。インスリングラルギンの作用がピークを迎え、血糖値の変動が大きくなる可能性がある。しかし、1日の血糖日内変動 (Figure 42、43) を見ると、3つの治療群間で平均血糖値や血糖変動に有意な差は見られなかった。もう一つ考えられるのは、脂質の違いであり、これは脂質毒性に関連している可能性がある。しかし、血漿中の中性脂肪および遊離脂肪酸値には、3つの治療群間で差はなかった (Figure 20、21)。さらに、膵島のマイクロアレイ解析のデータから、インスリン受容体基質2 (Insulin receptor substrate 2:Irs2) の発現量は、Gla 群では Placebo 群と比較して有意に減

少し (0.35 倍、 $p=0.04$)、Dapa 群及び Dapa+Gla 群では有意な変化は認められなかった (データは示していない)。Irs2 が膵 β 細胞量の調節に重要な役割を果たしていることを考えると (Kubota et al., 2004; Kubota et al., 2000; Withers et al., 1998)、血糖値を Dapa, Dapa+Gla 群と同程度に維持しているにもかかわらず、Gla 群の膵 β 細胞量に影響を与えている可能性があるかもしれない。

本研究で特に興味深いのは、Gla 群で高度の肝脂肪蓄積が認められたことである (Figure 23、24)。SGLT2 阻害薬は、肝臓の脂肪化を抑制することが報告されている (Komiya et al., 2016; Kuchay et al., 2018; Obata et al., 2016; Takase et al., 2017)。肝中性脂肪含量は Dapa 群と Placebo 群の間に有意な差を認めなかったが、前述のように、Placebo 群では著明な高血糖により異化が亢進し、肝臓の中性脂肪含量が減少していたと考えられる。Gla 群の肝脂肪化のメカニズムを明らかにするために、マイクロアレイ解析と定量的リアルタイム PCR を行った。その結果、Gla 群では脂肪酸合成や脂質蓄積に関わる遺伝子群が有意な発現の亢進を認めたのに対し、脂肪酸酸化に関わる遺伝子群では有意な変化は認められなかった (Figure 38、39、40)。Srebp1c は脂肪酸合成の鍵分子であることは一般的に認識されている (Lee et al., 2012)。Srebp1c の下流に位置する *Fas*、*Elovl6*、*Scd1* などの遺伝子の発現が亢進しているにもかかわらず、Gla 群では Srebp1c の発現は亢進していなかった (Figure 38)。したがって、インスリングルタミンによって誘導される肝脂肪化の機序は、Srebp1c とは独立していると考えられる (Rahimian et al., 2001)。また、*Pparg2* の発現量に関しては、Placebo 群と比較して Gla 群で有意に上昇していることが示された (Figure 39)。*Pparg2* は肝脂肪化において重要な役割を果たしていることが知られている (Lee et al., 2012; Rahimian et al., 2001; Schadinger et al., 2005)。また、*Pparg* によって制御されている *Mogat1* と *Cidec* も (Lee et al., 2012)、Placebo 群と比較して Gla 群で増加を認めた。さらに、インスリン投与が *Pparg* の発現亢進に関与していることが報告されており (Werman et al., 1997)、インスリングルタミンによる治療は、*Pparg* に関連する経路を介して肝臓の脂肪化を誘導する可能性が示唆された。

2 型糖尿病は、主に高血糖による進行性の膵 β 細胞機能不全によって引き起こされる。膵 β 細胞機能不全を予防するためには、慢性的な高血糖を改善する必要がある。血糖コントロールを良好にするためには、膵 β 細胞からのインスリン分泌を促す方法と、インスリンの需要を減らす方法がある。後者は「膵 β 細胞の休息」と呼ばれ、膵 β 細胞を持続的に保護するためにはより有効である (van Raalte and Verchere, 2017)。インスリンおよび SGLT2 阻害薬は、この「膵 β 細胞の休息」に寄与していることから、本研究ではこれら 2 つの薬剤を比較することとした。

また本研究では、ダパグリフロジン単独に加え、ダパグリフロジンにインスリングルタミンを併用した治療は、インスリングルタミン単独療法には認められ

ない *db/db* マウスの膵 β 細胞機能障害および肝脂肪化を抑制することを見出した。非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) が非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) や肝細胞癌を誘発することを考えると、SGLT2 阻害薬は高血糖改善のための有効な選択肢となり得る。しかし、SGLT2 阻害薬は、インスリン分泌が著しく低下するなどの条件下では、ケトアシドーシスを引き起こす可能性があることに注意が必要であり、そのような場合には、SGLT2 阻害薬以外の血糖降下薬との併用療法が有効である。このような場合には、SGLT2 阻害薬とインスリンの併用が選択肢の一つとされるが、本研究の結果、SGLT2 阻害薬単独療法と同等の効果が得られた。これらの治療法の有効性と安全性については、今後無作為化臨床試験での検討が必要である。

5.6 結語

db/db マウスにダパグリフロジンまたはダパグリフロジンとインスリングラルギンを併用し 8 週間投与したところ、膵 β 細胞量は保持され、肝脂肪化は予防されたが、インスリングラルギン単独療法においては肝脂肪化が進行していた。この研究は、2 型糖尿病の治療に新たな知見を与えるものと考えられる。

6. 第二章

膵 β 細胞特異的グルコキナーゼ抑制が膵 β 細胞
量に与える影響

6.1 緒言

世界の糖尿病患者数は 5 億人弱であり、2030 年には 25%、2045 年には 51% 増加すると予測されている(Saeedi et al., 2019)。それに伴い糖尿病に対する有効な治療法の確立が急務となっている。1 型糖尿病のみならず 2 型糖尿病においても、膵 β 細胞の量の減少や機能低下によるインスリン分泌不全が特徴であることから(Butler et al., 2003; Hudish et al., 2019; Prentki and Nolan, 2006; Rhodes, 2005; Sakuraba et al., 2002)、膵 β 細胞の機能や膵 β 細胞量を維持・拡大・改善することは、糖尿病治療における理想的な治療法であると考えられている(Vetere et al., 2014)。

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、肝、中枢、消化管などの代謝に関与する組織に発現が限局しており、特に膵 β 細胞におけるグルコースセンサーとしての役割は全身の糖代謝を調節する上で重要である(Matschinsky et al., 2006)。膵 β 細胞では、グルコキナーゼによるグルコースのリン酸化がインスリン分泌の律速段階である。グルコキナーゼの活性化は最終的にインスリン分泌を刺激するが、酵素の不活性化はインスリン分泌を阻害する。肝臓では、グルコキナーゼによるグルコースのリン酸化により、グルコースの取り込みが開始され、グリコーゲン合成が促進され、血糖値の低下につながる。グルコキナーゼはグルコースの恒常性維持に重要な役割を果たしていることから、その活性を高めることを目的とした医薬品開発が行われた(Matschinsky, 2013; Nakamura and Terauchi, 2015)。2003 年以降、多くのグルコキナーゼ活性化薬 (Glucokinase Activator: GKA) が開発され、2 型糖尿病のいくつかの動物モデルで血糖値を低下させる作用が示されている(Futamura et al., 2006; Futamura et al., 2012; Fyfe et al., 2007; Grimsby et al., 2003; Matschinsky, 2013; Nakamura et al., 2011; Nakamura and Terauchi, 2015)。また、GKA が膵 β 細胞におけるインスリン分泌や肝臓におけるグルコース取り込みを増強するだけでなく、膵 β 細胞の増殖を促すことも我々は実証している(Nakamura et al., 2009; Nakamura et al., 2012; Porat et al., 2011; Wei et al., 2009)。

しかし、第 II 相臨床試験の結果は、複数の GKA が短期的には血糖コントロールの改善をもたらしたが、その効果が持続しなかったことを示している(Kiyosue et al., 2013; Meininger et al., 2011; Wilding et al., 2013)。これらの GKA が持続的な効果を得られなかった機序は不明であるが、一つの考えられる理由として、膵 β 細胞における GKA の糖毒性の促進が考えられる。この考えは、膵 β 細胞特異的グルコキナーゼの遺伝子活性化マウスモデルを用いて実証されている

(Tornovsky-Babeay et al., 2014)。すなわち、グルコキナーゼ活性化によるグルコースシグナルの増強は、初期にはインスリン分泌と膵 β 細胞増殖を促進するが、次第に膵 β 細胞障害をきたし、結果として高血糖を助長し糖毒性に至る悪循環を促進する(Nakamura and Terauchi, 2015)。この一時的な膵 β 細胞機能増強とその後の膵 β 細胞障害は、2 型糖尿病の病態でも認められている(Tornovsky-Babeay et al., 2014)。

これらの知見は、グルコキナーゼ活性を低下させることにより、膵 β 細胞における過剰なグルコースシグナル流入のバランスを調整することで、過剰なグルコース流入による膵 β 細胞障害を防ぎ、膵 β 細胞の機能と膵 β 細胞量を維持することで糖尿病状態における耐糖能の改善につながることを示唆している。この逆説的な仮説を証明するために、膵 β 細胞におけるグルコキナーゼヘテロ欠損が耐糖能、膵 β 細胞機能および膵 β 細胞量に及ぼす影響を、肥満糖尿病モデルマウスである *db/db* マウスを用いて検討する。

6.2 目的

膵 β 細胞特異的グルコキナーゼの抑制が膵 β 細胞量に与える影響を検討し、グルコキナーゼの制御による膵 β 細胞量調節の機序を解明する。

6.3 対象と方法

6.3.1 研究デザイン

肥満糖尿病モデル動物である *BKS. Cg-Dock7^m +/+ Lepr^{db}/J (db/db)* マウス (Oriental Yeast Co, Tokyo, Japan) と膵 β 細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損 ($\beta Gck^{+/-}$) マウスを交配させ、膵 β 細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損 *db/db* マウスを樹立し、*db* ヘテロ ($\beta Gck^{+/-}$) マウス、膵 β 細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損 *db* ヘテロ ($\beta Gck^{+/-} db/+$) マウス、*db/db* ($\beta Gck^{+/-} db/db$) マウス、膵 β 細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損 *db/db* ($\beta Gck^{+/+} db/db$) マウスの 4 群で比較検討した。また細胞培養実験では INS-1 細胞を異なるグルコース濃度と薬剤負荷の下培養し、グルコース濃度の有無、薬剤の有無で比較検討した。

6.3.2 対象

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、明らかに正常であり、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)

6 週齢の雄性 *BKS. Cg-Dock7m +/+ Leprdb/J (db/db)* マウスは、オリエンタル酵母株式会社から購入した。と膵 β 細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損 (β *Gck*^{+/-}) マウスは、東京大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝内科教授 門脇孝先生ならびに横浜市立大学大学院医学研究科分子内分泌・糖尿病内科学教授 寺内康夫先生より提供を受けた。(Nakamura et al., 2009; Nakamura et al., 2012)。すべての実験において、1 ケージあたり 2 匹または 3 匹のマウスで飼育した。マウスの飼育環境は、室温 25°C 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。普通食 (MF: Oriental Yeast Co. Ltd., Tokyo, Japan) で摂餌し飼育した。

ラットインスリノーマの細胞株である INS-1 細胞は Wollheim CB から提供され、10% の非動化ウシ胎児血清、100 IU/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシン、10mM HEPES、1 mM ピルビン酸ナトリウム、および 50 μ M β -メルカプトエタノールを添付した RPMI 1640 培地で構成される 10 mL の培地で培養した。

6.3.3 評価項目

主要評価項目は 24 週齢の膵 β 細胞量とした。さらに 4 週から 24 週までの体重、随時血糖、血清脂質、肝機能、膵組織の免疫組織学的染色、10 週齢の単離膵島における DNA マイクロアレイ解析、定量的リアルタイム PCR 法による遺伝子発現、さらにメタボローム解析による代謝産物の測定を行った。また INS-1 細胞においても培養後、定量的リアルタイム PCR 法による遺伝子発現を比較検討した。

6.3.4 体重・摂餌量の測定

6.3.1 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。また、週に 1～2 回ケージ交換する際に各ケージの摂餌量を測定し、群間の比較を行った。

6.3.5 随時血糖の測定

6.3.1 の条件で飼育した 4 群のマウスを、4 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。

6.3.6 経口ブドウ糖負荷試験

6.3.1 と同様の条件で 4 群のマウスを飼育した。経口ブドウ糖負荷試験 (Oral blood glucose test : OGTT) として 23 週齢で 16 時間の絶食下において 0.5 g/kg 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・120 分後に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 (mM)、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でつなぎ、0mM を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 (mM × min) として算出し、各群の比較を行った。

6.3.7 インスリン感受性の評価

6.3.1 と同様の条件で $\beta Gck^{+/+}db/db$ マウスおよび $\beta Gck^{+/-}db/db$ マウスを飼育した。18 週齢で 16 時間絶食下において速効型インスリン (Humulin®R; Eli Lilly, USA) を 4.0 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比較し、インスリン感受性の評価を行った。

6.3.8 膵島単離

6.3.1と同様の条件で飼育したマウスを屠殺し、開腹したのち総胆管を露出させた。十二指腸を鉗子でクランプしたのち、注射針を総胆管にカニューレーションし、超純水で33.3 mg/mlに希釈したcollagenase (Sigma-Aldrich) を注入した。膨張した膵臓を切離し上記のcollagenaseの入ったシリンジに移し、37°Cで24分間温振した。その後、複数回に分けて反応停止液 (Hanks' balanced salt solution (Sigma-Aldrich) にfetal bovine serum (FBS: Gibco BRL, Paisley, UK)を添加して使用) 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、実体顕微鏡下にて膵島を回収して各実験に使用した。

6.3.9 膵島インスリン含量の測定

上記の方法で採取した膵島を2mlの12well plateに10個ずつ分注し、2.8 mMのブドウ糖を含有するKrebs-Ringer's solution bicarbonate/Hepes (KRBH) buffer (129 mM NaCl, 10 mM HEPES, 5.0 mM NaHCO₃, 4.7 mM KCl, 2.0 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, pH7.4) で5%CO₂、37度の条件下で30分間pre-incubationを行い、その後Glucose 5.6 mMまたは22mMを含むKRBH bufferに交換し、更に90分間培養した。その後、上清を静かに採取しインスリンの測定まで-20°Cで保存した。また、チューブに残存した膵島は残存した上清を慎重に吸引した後、500 µlのAcid ethanol (0.4 M HCl in 74 % ethanol) を加えて振盪・溶解し、ELISA法 (Morinaga Institute of Biological Science, Yokohama, Japan) を用いて膵島のインスリン含量を測定した。

6.3.10 膵の組織学的評価

6.3.1 と同様の条件で 4 群のマウスを飼育した。24 週齢で各マウスを屠殺し、膵臓を切離した。切離した膵臓は 4% PFA (paraformaldehyde) / PBS pH 7.4 にて速やかに固定し、パラフィン包埋した。膵臓に対し長軸方向に切片を作製し、下記に示す染色を実施した。

6.3.11 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）を 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 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。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, Santa Cruz Biotechnology）を 500 倍希釈にて用いた。

光学顕微鏡 BIOREVO BZ-9000、BZ-X710 (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・取り込みし、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 (%) × 膵重量 (mg)

6.3.12 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 (Table 4) を 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 (Table 4) を 40 分間反応させた。洗浄後にインスリン抗体 (Table 4) を用いて室温で 60 分反応させた後、PBS で洗浄し対応する二次抗体 (Table 4) を 40 分間反応させた。PBS で洗浄し、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Laboratory, Burlingame, USA) で対比染色を行った。膵β細胞のアポトーシスの評価として terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling (TUNEL) system (Deadend; Promega, Madison, WI) を用いた。

Table 4. 免疫組織学的染色に使用した抗体

Primary antibodies				
Antigen	Species	Manufacturer	Catalog#	Working dilution
Insulin	Rabbit	Proteintech	15848-1-AP	1:1000
Insulin	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology	H-86	1:250
Insulin	Guinea pig	Dako	IR002	1:1
Ki67	Rabbit	Cell Signaling Technology	D3B5	1:200
MafA	Rabbit	BETHYL	IHC-00352	1:50
Nkx6.1	Rabbit	Cell Signaling Technology	D8O4R	1:200
Tom20	Rabbit	Cell Signaling Technology	D8T4N	1:200
Secondary antibodies				
Antigen	Species	Fluorescent dye	Catalog#	Manufacturer
Guinea pig IgG	Goat	Alexa Fluor 488	A11073	Life Technologies
Rabbit IgG	Goat	Alexa Fluor 488	A11008	Life Technologies
Rabbit IgG	Goat	Alexa Fluor 594	A11012	Life Technologies

6.3.13 遺伝子発現解析

各マウスの単離臍島や INS-1 細胞から、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 Real-time 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 5 に記載した。

内因性コントロールとして、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) またはbeta-actinを用いた。

Table 5. 定量的リアルタイム PCR に用いたプライマーの配列

Mouse	
Gene (Forward/Reverse)	Sequence
<i>Gapdh</i> forward	GGCCCCTCTGGAAAGCTGTGGTGT
<i>Gapdh</i> reverse	GTTGGGGGGCCGAGTTGGGATAGG
<i>Ki67</i> forward	CTGCCTGCGAAGAGAGCATC
<i>Ki67</i> reverse	AGCTCCACTTCGCCTTTTGG
<i>Ccna2</i> forward	TCCTTGCTTTTGACTTGGCT
<i>Ccna2</i> reverse	ATGACTCAGGCCAGCTCTGT
<i>Ccnb1</i> forward	TGGCCTCACAAAGCACATGA
<i>Ccnb1</i> reverse	GCTGTGCCAGCGTGCTAATC
<i>Ccnd1</i> forward	TAGGCCCTCAGCCTCACTC
<i>Ccnd1</i> reverse	CCACCCCTGGGATAAAGCAC
<i>Ccnd2</i> forward	AAGCCTGCCAGGAGCAAA
<i>Ccnd2</i> reverse	ATCCGGCGTTATGCTGCTCT
<i>Ccnd3</i> forward	CCAGCGTGTCTGTCAGAGTT
<i>Ccnd3</i> reverse	CCTTTTGCACGCACTGGAAG
<i>Nkx6.1</i> forward	CTGCACAGTATGGCCGAGATG
<i>Nkx6.1</i> reverse	CCGGGTTATGTGAGCCCAA
<i>Mafa</i> forward	CTTCAGCAAGGAGGAGGTCATC
<i>Mafa</i> reverse	GCGTAGCCGCGGTTCTT
<i>Pdx1</i> forward	CTCCGGACATCTCCCCATAC
<i>Pdx1</i> reverse	ACGGGTCCTCTTGTTTTCCT
<i>Ins1</i> forward	GACCAGCTATAATCAGAGACC
<i>Ins1</i> reverse	AGTTGCAGTAGTTCTCCAGCTG
<i>Ins2</i> forward	AGCCCTAAGTGATCCGCTACAA
<i>Ins2</i> reverse	AGTTGCAGTAGTTCTCCAGCTG
<i>Neurog3</i> forward	CCAAGAGCGAGTTGGCACT
<i>Neurog3</i> reverse	CGGGCCATAGAAGCTGTGG
<i>Aldh1a</i> forward	ATCAACAACGACTGGCACGAA
<i>Aldh1a</i> reverse	CACATCGGGCTTATCTCCTTC
<i>Atf3</i> forward	CAGACCCCTGGAGATGTCAGT
<i>Atf3</i> reverse	TTCTTGTTTCGACTTTCCTGGA
<i>Cyba</i> forward	TGCCAGTGTGATCTATCTGCT

<i>Cyba</i> reverse	TCGGCTTCTTTTCGGACCTCT
<i>Cybb</i> forward	AGCTATGAGGTGGTGATGTTAGTGG
<i>Cybb</i> reverse	CACAATATTTGTACCAGACAGACTTGAG
<i>Ncf1</i> forward	ACACCTTCATTTCGCCATATTGC
<i>Ncf1</i> reverse	CCTGCCACTTAACCAGGAACA
<i>Chop</i> forward	CACCACACCTGAAAGCAGAA
<i>Chop</i> reverse	GGTGAAAGGCAGGGACTCA
<i>Casp3</i> forward	ATGGAGAACAACAAAACCTCAGT
<i>Casp3</i> reverse	TTGCTCCCATGTATGGTCTTTAC
<i>Pcx</i> forward	CTGAAGTTCCAAACAGTTCGAGG
<i>Pcx</i> reverse	CGCACGAAACACTCGGATG
<i>Aldob</i> forward	CATTGCCAGCATCTGTCAGC
<i>Aldob</i> reverse	TCATGGTCTCCGTCAGGAA
<i>Pfkfb3</i> forward	AGAACTTCCACTCTCCCACCC
<i>Pfkfb3</i> reverse	AGGGTAGTGCCCATTTGTTGAA

Rat	
Gene (Forward/Reverse)	Sequence
<i>Beta-actin</i> forward	ACGAGGCCCAGAGCAAGA
<i>Beta-actin</i> reverse	TTGGTTACAATGCCGTGTTCA
<i>Nkx6.1</i> forward	GGAGAGTCAGGTCAAGGTCTG
<i>Nkx6.1</i> reverse	TCTCGTCGTCAGAGTTCGGG

6.3.14 メタボローム解析

単離凍結した腓島約 5mgを、内部標準物質（H3304-1002、Human Metabolome Technologies, Inc.）を用い組織を組織ホモジナイザー（Micro Smash MS100R、タカトミーデジタルバイオロジー株式会社、東京）を用いて 1,500rpm、120秒で2回ホモジナイズした後、2,300×g、4°Cで5分間遠心分離した。その後、上層水層400μLをMillipore 5-kDaカットオフフィルターで遠心ろ過し（9,100×g、4°C、120分間）タンパク質を除去した。濾液を遠心濃縮し、25μLのMilli-Q水に再懸濁してCE-MS分析を行った。

メタボローム測定は、鶴岡市の Human Metabolome Technologies, Inc.の施設で行った。カチオン性化合物は CE-TOFMS のポジティブモードで、アニオン性化合物は CE-MS/MS のポジティブモードとネガティブモードで、曾我ら(Soga and Heiger, 2000; Soga et al., 2003; Soga et al., 2002)の開発した方法に従って測定した。階層型クラスター分析（HCA）は、PeakStat、SampleStat を用いて行った。検出された代謝物は、VANTED (Visualization and Analysis of Networks containing Experimental Data) ソフトウェアを用いて代謝経路マップ上にプロットした (Junker et al., 2006)。

6.3.15 細胞培養実験

INS-1 細胞は RPMI 1640 培地で培養した。細胞は1週間に1回継代し、5%CO₂を含む加湿雰囲気下で37°Cのインキュベーターで培養した。INS-1 細胞を、グルコース濃度 11mM の培地下で一晩インキュベートした後、以下の3つのグループに分け、48 時間培養し、回収した。(4mM グルコース、11mM グルコース、11mM グルコース+1mM D-Mannoheptulose を含む培地)

6.3.16 統計分析

データは平均±標準偏差 (SD) で示された。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の検定を用いて評価した。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)、JMP Pro software (ver. 12.0; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) と GraphPad Prism software (ver. 7.02; GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA) を用いて行った。

6.4 結果

6.4.1 膵β細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損 *db/db* マウスの樹立および表現型の解析

6.4.1.1 随時血糖と体重の推移、摂餌量

肥満2型糖尿病モデルマウスである *db/db* マウスと $\beta Gck^{+/-}$ マウスを交配させ、 $\beta Gck^{+/+}db/+$ 群、 $\beta Gck^{+/-}db/+$ 群、 $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群の4群で体重や耐糖能といった表現型を比較検討した。体重の推移に関しては、 $Gck^{+/+}db/+$ 群および $\beta Gck^{+/-}db/+$ 群に比し、 $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群および $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群で週齢とともに著明に増加するが、 $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群では18週齢ごろより体重は不変もしくは低下傾向を示すのに対し、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群では18週齢以降さらなる増加を示した (Figure 44)。摂餌量に関しては、 $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群と $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群では差を認めなかった (Figure 45)。随時血糖の推移については、 $\beta Gck^{+/+}db/+$ 群と $\beta Gck^{+/-}db/+$ 群との比較では $\beta Gck^{+/-}db/+$ 群で高値であった。対照的に週齢とともに血糖が上昇する $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群および $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群の比較では、興味深いことに13週齢以降では $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群に比し、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群で随時血糖が低下することを見出した (Figure 46)。

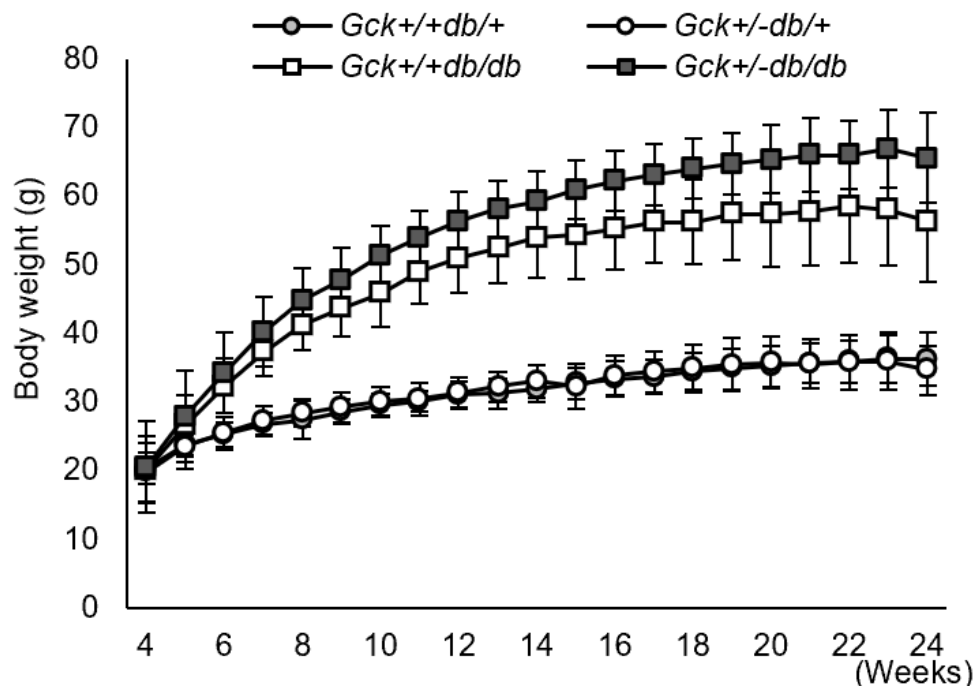


Figure 44. 体重の推移

$\beta Gck^{+/+}db/+$ 群 (薄灰色の丸印)、 $\beta Gck^{+/-}db/+$ 群 (白い丸印)、 $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群 (白い四角)、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群 (灰色の四角) における体重の変化 (n=15-17) (平均 $\pm$ SD)

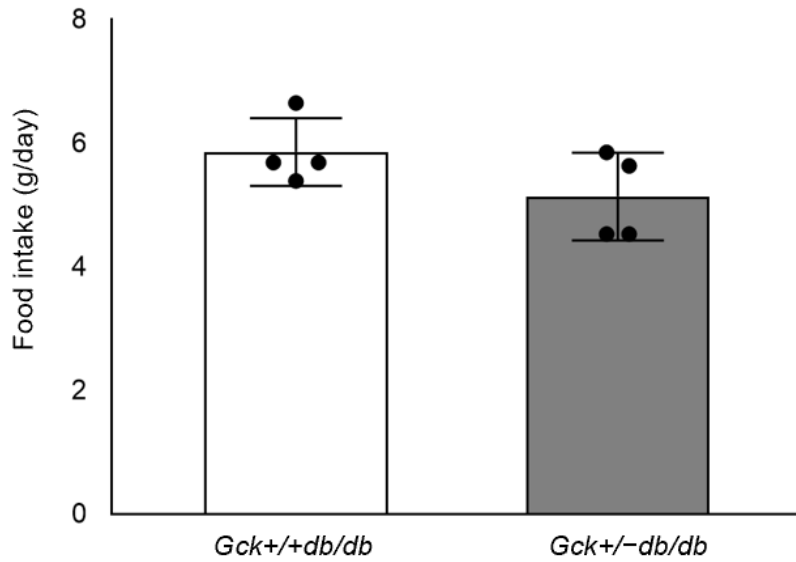


Figure 45. 摂餌量

23 週齢の $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群（白）、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群（濃灰色）における摂餌量を比較した（ $n=4$ ）（平均 $\pm$ SD）

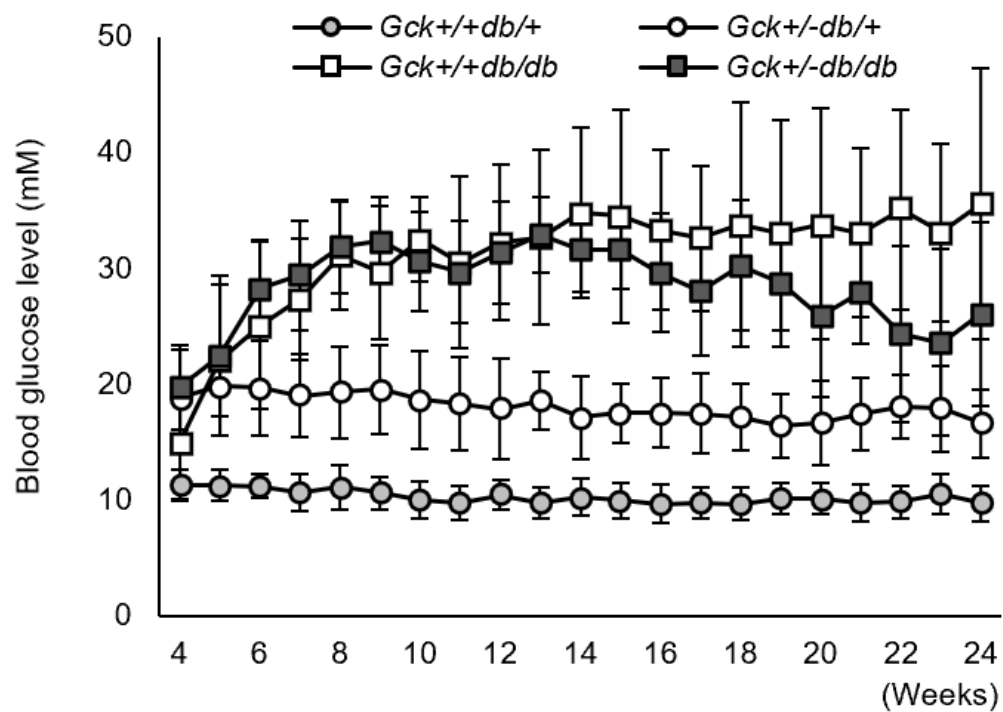


Figure 46. 随時血糖の推移

$\beta Gck^{+/+}db/+$ 群 (薄灰色丸)、 $\beta Gck^{+/-}db/+$ 群 (白丸)、 $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群 (白四角)、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群 (濃灰色四角) における随時血糖の変化 (n=15-17) (平均 $\pm$ SD)

6.4.1.2 経口ブドウ糖負荷試験 (Oral glucose tolerance test) による耐糖能の評価

耐糖能を評価するために 23 週齢で施行した経口ブドウ糖負荷試験では既報通り (Terauchi et al., 1995; Terauchi et al., 2007)、 $\beta Gck^{+/+}db/+$ 群に比し $\beta Gck^{+/-}db/+$ 群で耐糖能が悪化しているのに対し、 $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群に比し $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群では明らかな耐糖能の改善を認めた (Figure 47、48)。

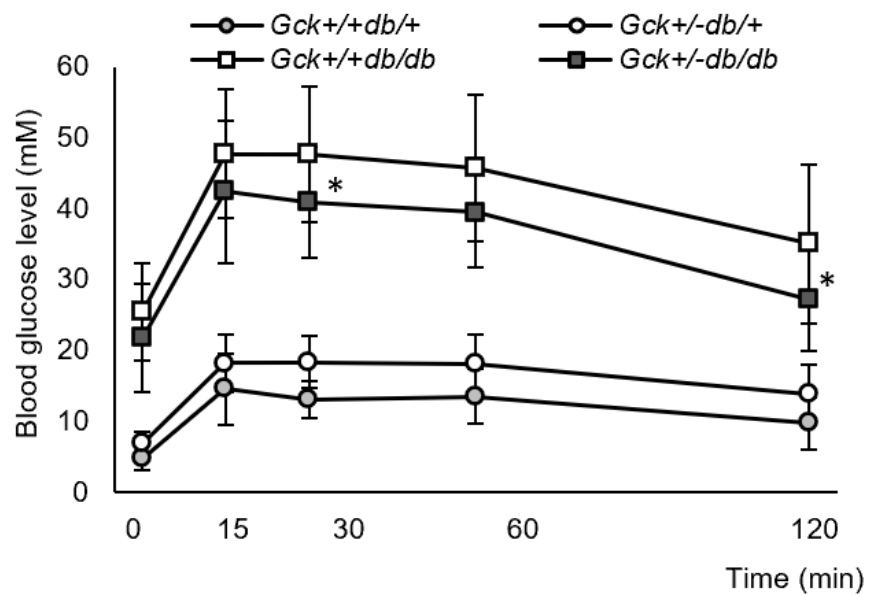


Figure 47. 経口ブドウ糖負荷試験（OGTT）時の血糖値の推移
 23 週齢の 16 時間絶食後の $\beta Gck^{+/+}db/+$ 群（薄灰色丸）、 $\beta Gck^{+/-}db/+$ 群（白丸）、 $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群（白四角）、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群（濃灰色四角）の OGTT 時の血糖値の推移を示した（ $n=12-18$ ）（平均 $\pm$ SD）* $p < 0.05$ vs. $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群

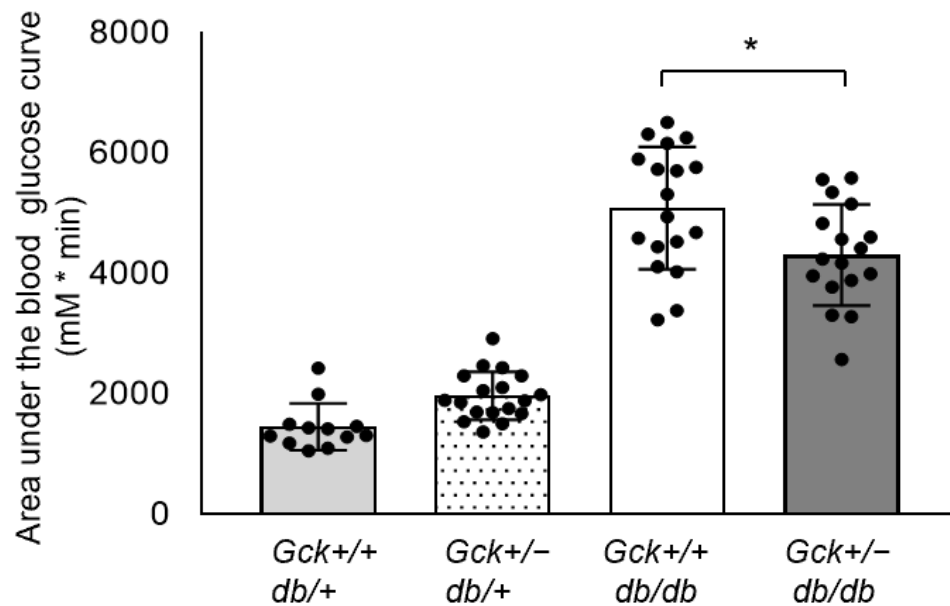


Figure 48. OGTT による血糖曲線下面積（AUC）の評価

23 週齢の $\beta Gck^{+/+} db/+$ 群（薄灰色）、 $\beta Gck^{+/-} db/+$ 群（黒点）、 $\beta Gck^{+/+} db/db$ 群（白）、 $\beta Gck^{+/-} db/db$ 群（濃灰色）における OGTT による血糖曲線下面積（AUC）を用い耐糖能を評価した。（ $n=12-18$ ）（平均 $\pm$ SD）* $p < 0.05$

6.4.1.3 インスリン負荷試験 (Insulin tolerance test) によるインスリン感受性の評価

$\beta Gck^{+/-}db/db$ 群と $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群においてインスリン負荷試験によりインスリン感受性を評価したところ、2 群間に差を認めなかった (Figure 49)

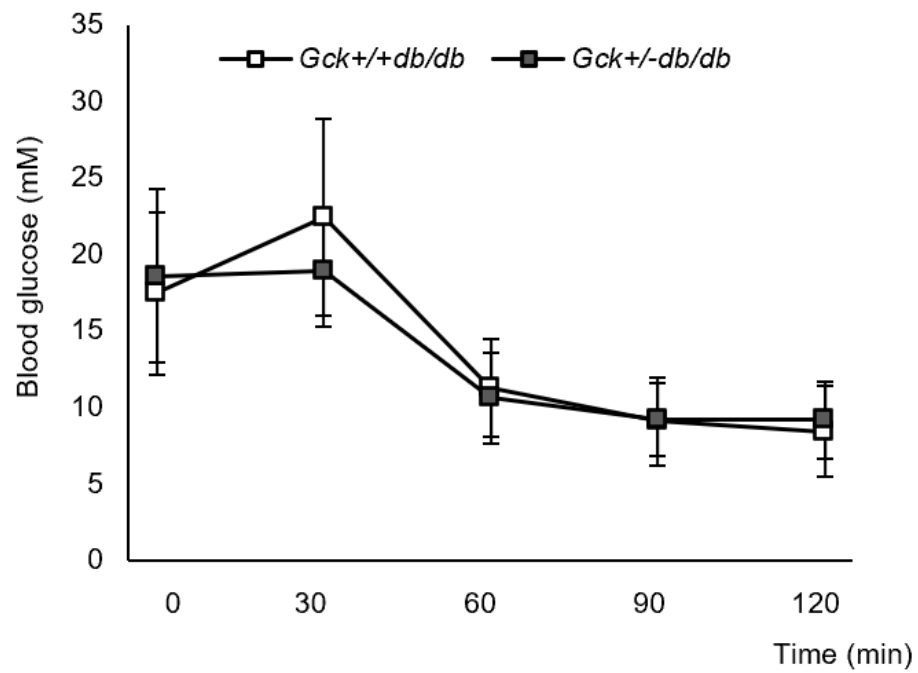


Figure 49. インスリン負荷試験による血糖の推移

18週齢の群 $\beta Gck^{+/+}db/db$ (白四角)、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群 (灰色四角) におけるインスリン負荷試験による血糖の推移を示した (n=7-13) (平均 $\pm$ SD) * $p < 0.05$

6.4.1.4 内因性インスリン分泌の評価

次に空腹時のインスリン分泌を比較したところ、 $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群に比し $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群では増加傾向を認めた (Figure 50)。さらに 24 週齢の膵島を単離しグルコース応答性インスリン分泌能を評価したところ、 $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群に比し $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群で有意なグルコース応答性インスリン分泌能の増大を認めた (Figure 51)。インスリン感受性に差を認めないことから (Figure 49)、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群は $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群に比し、インスリン分泌が保たれることで耐糖能が改善すると考えられた。

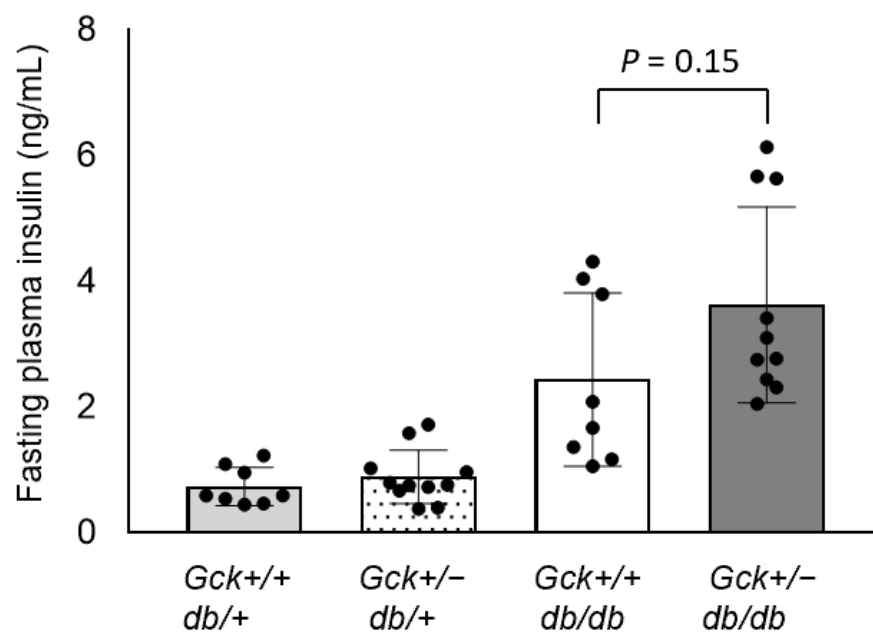


Figure 50. 空腹時インスリン値

$\beta Gck^{+/+} db/+$ 群 (薄灰色)、 $\beta Gck^{+/-} db/+$ 群 (黒点)、 $\beta Gck^{+/+} db/db$ 群 (白)、 $\beta Gck^{+/-} db/db$ 群 (濃灰色) における空腹時インスリン値を測定した (n=8-11) (平均 ± SD)

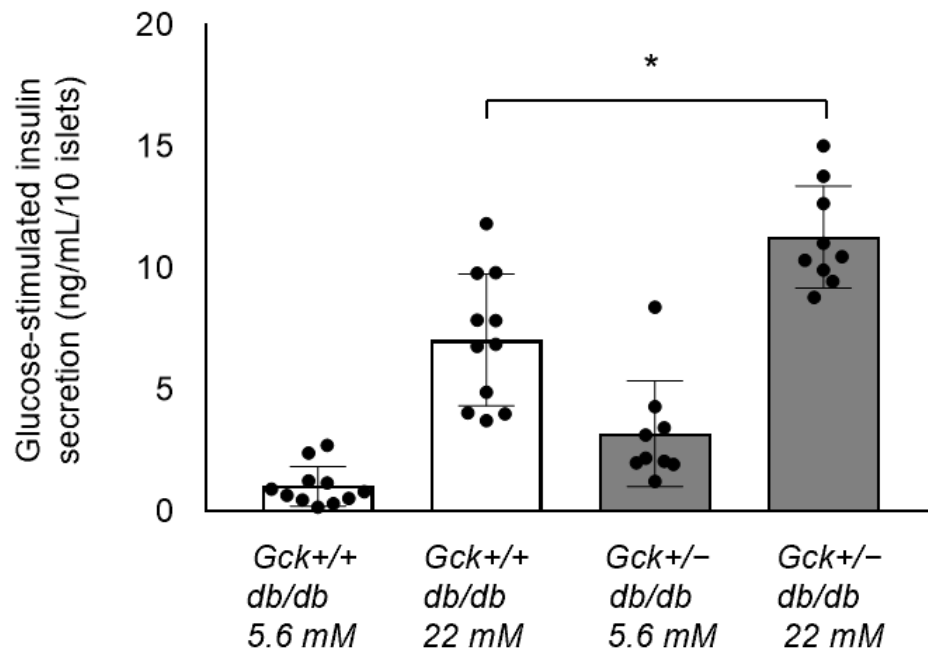


Figure 51. 単離膵島におけるグルコース応答性インスリン分泌
 $\beta Gck^{+/+} db/db$ 群 5.6mM (白)、 $\beta Gck^{+/+} db/db$ 群 22mM (白)、 $\beta Gck^{+/-} db/db$ 群
 5.6mM (濃灰色)、 $\beta Gck^{+/-} db/db$ 群 22mM (濃灰色) におけるグルコース応答性
 インスリン分泌を測定した (n=9-11) (平均 $\pm$ SD) * $p < 0.05$

6.4.1.5 血漿脂質と肝機能

$\beta Gck^{+/+}db/db$ 群、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群において血中遊離脂肪酸や中性脂肪値といった脂質代謝パラメーターや肝機能を測定したが、2 群間には差を認めなかった。(Figure 52、53、54)。

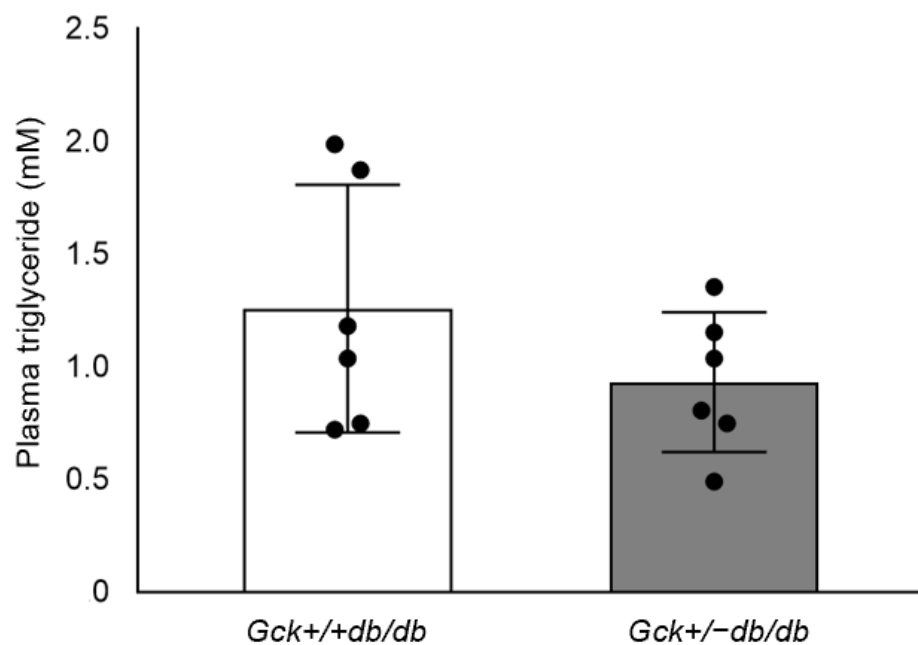


Figure 52. 23 週齢の空腹時の血漿中性脂肪値

23 週齢の $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群（白）、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群（濃灰色）における空腹時の血漿中性脂肪値を測定した（ $n=6$ ）（平均 $\pm$ SD）

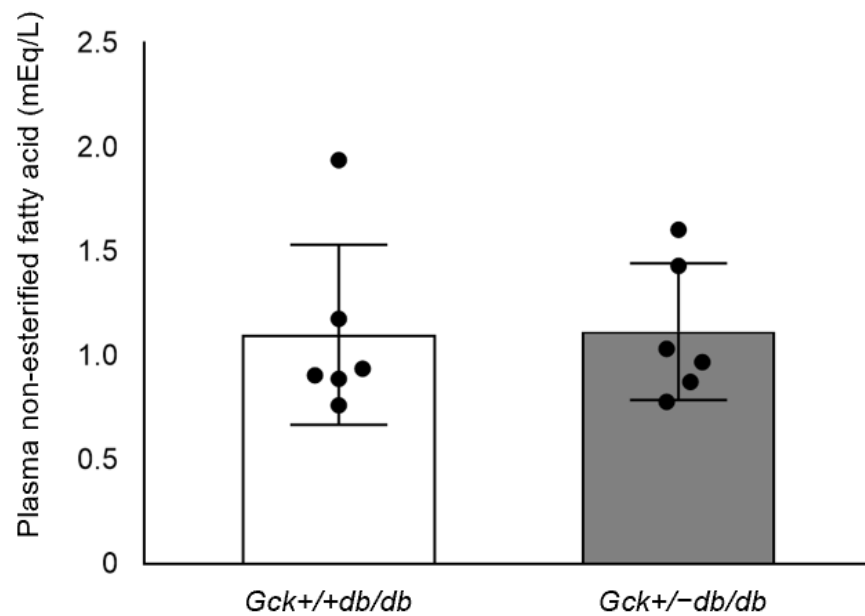


Figure 53. 23 週齢の空腹時の血漿遊離脂肪酸値

23 週齢の $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群（白）、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群（濃灰色）における空腹時の血漿遊離脂肪酸値を測定した（ $n=6$ ）（平均 $\pm$ SD）

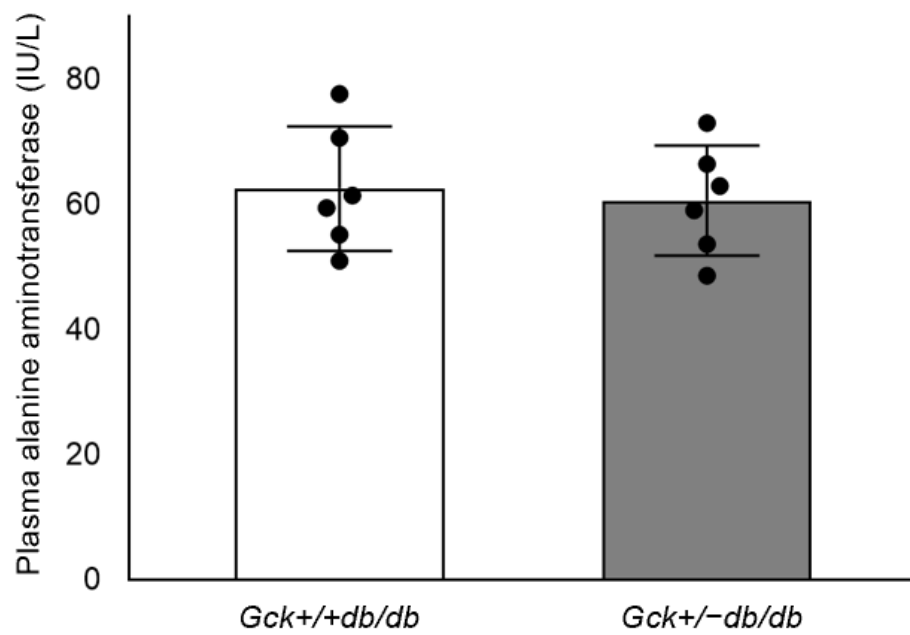


Figure 54. 23 週齢の空腹時の血漿 alanine aminotransferase (ALT) 値
23 週齢の $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群 (白)、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群 (濃灰色) における空腹時の ALT 値を測定した (n=6) (平均 $\pm$ SD)

6.4.1.6 膵 β 細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損 db/db マウスの生存率

興味深いことに、 $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群と $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群の生存率を比較したところ、 $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群に比し $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群で有意な生存率の延長が認められ (Figure 55)、膵 β 細胞におけるグルコキナーゼの抑制が db/db マウスにおいて、耐糖能のみならず生存にも影響を及ぼすことがわかった。

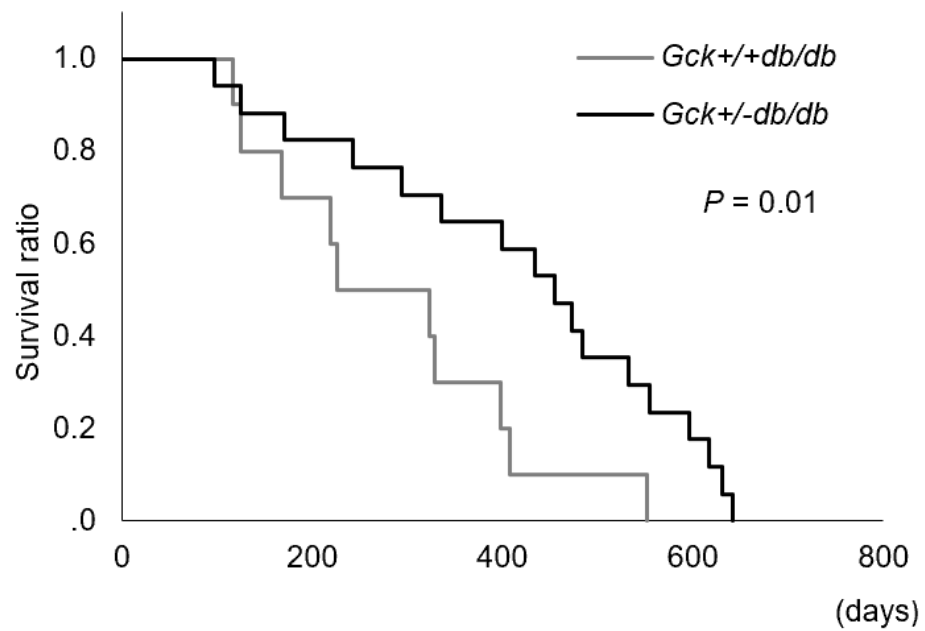
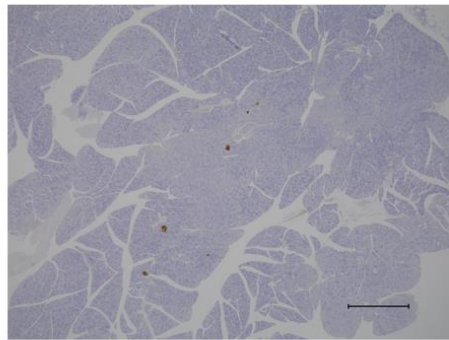


Figure 55.生存期間

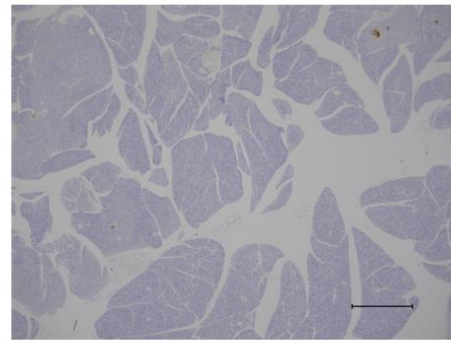
$\beta Gck^{+/+}db/db$ 群（濃灰色）、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群（黒色）における生存期間（ $n=10-17$ ）（平均 $\pm$ SD）Logrank 検定

6.4.2 膵 β 細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損 db/db マウスの膵 β 細胞量

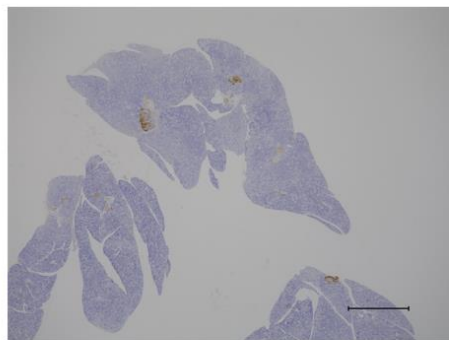
次に耐糖能に差がある 24 週における膵 β 細胞量を比較検討したところ、 $\beta Gck^{+/+}db/+$ 群と $\beta Gck^{+/-}db/+$ 群との比較では膵 β 細胞量に差を認めないのに対し、 $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群に比し $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群では著明な膵 β 細胞量の増大を認め、先に述べた $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群の耐糖能の改善は、膵 β 細胞量が増大していることに起因していることが示唆された (Figure 56、57)。



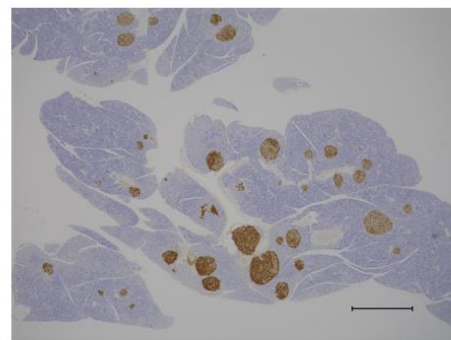
Gck+/+db/+



Gck+/-db/+



Gck+/+db/db



Gck+/-db/db

Figure 56. 膵β細胞の免疫組織学的染色

24 週齢の各群のマウスの膵組織切片を抗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。黒色の線は 300μm を示している。

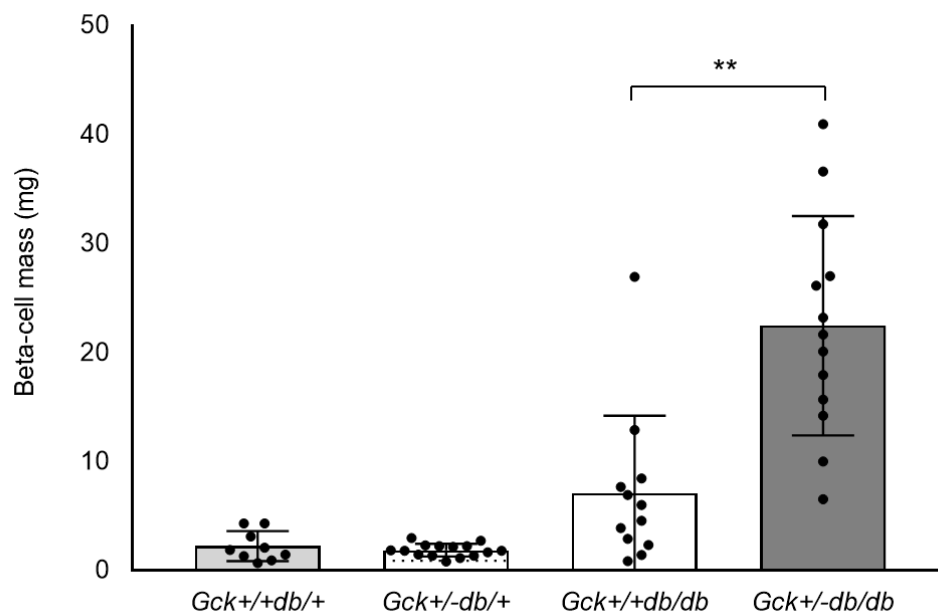


Figure 57. 膵β細胞量

24 週齢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
 $\beta Gck^{+/+}db/+$ 群 (薄灰色)、 $\beta Gck^{+/-}db/+$ 群 (黒点)、 $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群 (白)、
 $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群 (濃灰色) (n=9-15) (平均 $\pm$ SD) ** $p < 0.01$

6.4.3 膵β細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損 *db/db* マウス単離膵島の遺伝子発現の比較検討

6.4.3.1 10 週齢の膵β細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損 *db/db* マウスの表現系と膵島のマイクロアレイ解析

$\beta Gck^{+/+}db/db$ 群に比し $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群では著明な膵β細胞量の増大を認めるメカニズムを明らかにするために、より若齢の10週齢の両マウスの膵島を単離し、DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現の差異を網羅的に解析した。なお10週齢においては、 $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群と $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群では、経口ブドウ糖負荷試験で評価された耐糖能 (Figure 58) や膵β細胞量 (Figure 59) には差を認めていないことを確認している。その結果、 $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群に比し $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群で発現が有意にかつ1.5倍以上に上昇している遺伝子が432、0.67倍未満に低下している遺伝子が1052存在していた。さらにパスウェイ解析を行ったところ、有意に遺伝子群が上昇しているパスウェイが7、低下しているパスウェイが22存在し、その中でも *Ptfla*-related regulatory pathway の上昇、Oxidative Stress の低下を認めていた (Table 6)。また、既報(Kjørholt et al., 2005)の如く10週齢 *db/db* マウスで発現が変化していた遺伝子群に着目して比較したところ、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群において、*Nkx6.1* や *Mafa*、*Pdx1* といった膵β細胞機能・成熟に関与する転写因子群の発現上昇、*Aldob* や *Slc2a2*、*Pcx* といったブドウ糖代謝に関与する遺伝子群の発現上昇 (*Slc2a2*、*Pcx*) や低下 (*Aldob*)、さらには *Atf3* や *Hmox1* といったストレス関連遺伝子群の発現低下を認めた (Table 7)。以上より膵β細胞量の増大メカニズムとして、ブドウ糖代謝、膵β細胞機能・成熟に関与する転写因子、酸化ストレスの関与が示唆された。

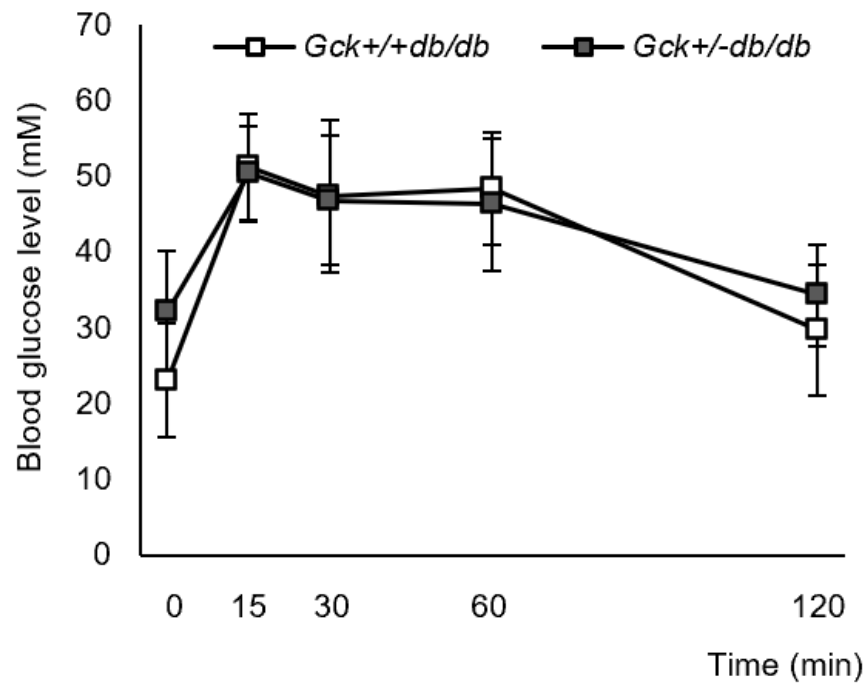


Figure 58. OGTT による血糖の推移

10 週齢の $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群（白四角）、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群（濃灰色四角）に対し 16 時間絶食後 OGTT にて耐糖能を評価した（n=10-11）（平均 ± SD）

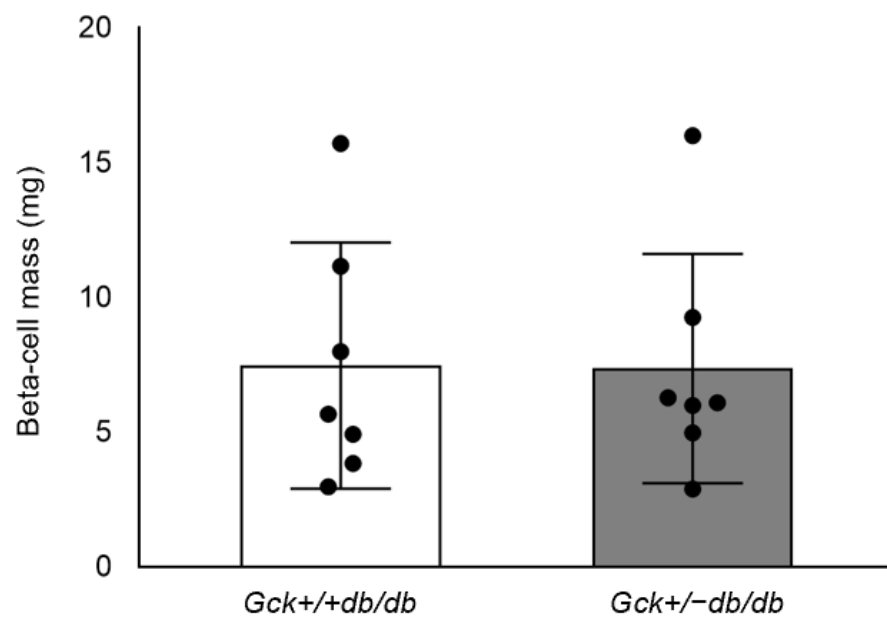


Figure 59. 膵β細胞量

10週齢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

$\beta Gck^{+/+}db/db$ 群（白）、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群（濃灰色）（ $n=7$ ）（平均 $\pm$ SD）

Table 6. パスウェイ解析により発現が有意に変動していた遺伝子群

Ratio>1.5

Pathway Name	Changed Genes	Total Genes	Z score	P-value	Gene symbol
Mm_Amino_Acid_metabolism_WP662_71177	8	95	4.56	<0.01	Hnmt Hadh Hibadh Ddc Pycr1 Auh Mut Pcx
Mm_GPCRs_Class_B_Secretin-like_WP456_69131	3	22	3.96	0.012	Adgrl3 Gpr Glp1r
Mm_Ptfla_related_regulatory_pathway_WP201_69113	2	11	3.89	0.025	Pdx1 Nkx6-1
Mm_G1_to_S_cell_cycle_control_WP413_84705	4	61	2.60	0.035	E2f1 Cend2 Cdc45 Cdkn1a
Mm_G_Protein_Signaling_Pathways_WP232_89955	5	91	2.44	0.036	Pde7a Pde4b Gng12 Akap13 Akap5
Mm_Non-odorant_GPCRs_WP1396_69993	10	266	2.13	0.041	Adgrb3 P2ry1 Gabbr2 Adgrl3 Gpr Ackr2 Sstr3 Glp1r Mc5r Adra2a
Mm_Metapathway_biotransformation_WP1251_69747	6	133	2.13	0.049	Hnmt Akr1b10 Chst11 Gal3st1 Gpx2 Hs3st6

Ratio<0.67

Pathway Name	Changed Genes	Total Genes	Z score	P-value	Gene symbol
Mm_Cytoplasmic_Ribosomal_Proteins_WP163_78425	34	79	10.40	<0.01	Rpl37a Rpl7 Rpl7a Rpl35 Rps3a1 Rpl34 Rps20 Rps8 Rpl9 Rpl37rt Rps5 Rps19 Rps16 Rpl27a Rplp2 Rps11 Rps13 Rps15a Rpl13 Rps25 Rpl36a Rpl39 Rps4x Rps12 Rpl26 Rps27a Rpl23a Rps7 Rpl37 Rpl3 Rpl35a Rps28 Rps14 Fau
Mm_Focal_Adhesion_WP85_82887	40	184	5.88	<0.01	Col3a1 Lamb3 Col5a2 Fn1 Lamc1

					Col5a1 Lamc3 Pdgfc Jun Hgf Pdgfra Spp1 Pxn Actb Col1a2 Cav2 Cav1 Met Vwf Itgam Dock1 Col4a2 Pdgfd Lamb2 Figf Flna Lama4 Igfl Lama2 Col6a2 Vtn Col1a1 Erbb2 Itgb4 Rhob Itgb8 Shc3 Mylk Lama3 Pdgfrb
Mm_PodNet- protein-protein_interactions_in_the_podocyte_WP2310_82879	56	315	5.26	<0.01	Sulfl Cfh Lamc1 Tgfb2 Olfm1 Angptl2 Notch2 Cyr61 Hspg2 Pdpn Agrn Spp1 Pxn Slc29a4 Arpc1b Actb Smurf1 Met Cxcl12 Plaur Tgfb1 Cd151 Bcam Fcgrt Nr2f2 Sh2d4a Nrpl Palld Myo1e Lamb2 Tagln Smad3 Tgfb2 Ctgf Igfl Tcf21 Col18a1 Myh10 Itgb4 Wwcl Cxcl16 Egn3 Tgfb3 Nid1 Dbn1 Ctsl Scel Bmp4 Lgals1 Angpt1 Igsf5 Crim1 Epas1 Ezr Notch3 Plcel
Mm_XPodNet - protein- protein_interactions_in_the_podocyte_expanded_by_STRING_WP2309_82878	113	825	4.44	<0.01	Sulfl Cfh Lamc1 Tgfb2 Olfm1 Angptl2 Notch2 Cyr61 Hspg2 Pdpn Agrn Spp1 Pxn Slc29a4 Arpc1b Actb Smurf1 Met Cxcl12 Plaur Tgfb1 Cd151 Bcam Fcgrt Nr2f2 Sh2d4a Nrpl Palld Myo1e Lamb2 Tagln Smad3 Tgfb2 Ctgf Igfl Tcf21 Col18a1 Myh10 Itgb4 Wwcl Cxcl16 Egn3 Tgfb3 Nid1 Actn2 Dbn1 Ctsl Scel Bmp4 Ajuba Sorbs3 Cdc42ep1 Lgals1 Angpt1 Plec Cldn8 Igsf5 Ltbp1 Crim1 Epas1 Ezr Notch3 Pdgfrb Csf1r Rin1 Ffar4 Plcel Sorbs1 Blnk
Mm_Prostaglandin_Synthesis_and_Regulation_WP374_69204	11	31	5.07	<0.01	Hsd11b1 Ptgs1 S100a6 S100a10 Ptger3 Anxa3 Tbxas1 Hpgd Anxa2 Ednrb Anxa1

Mm_Endochondral_Ossification_WP1270_87973	16	62	4.53	<0.01	Ddr2 Tgfb2 Fgfr3 Spp1 Mgp Tgfb1 Serpinh1 Sox6 Fgfr1 Timp3 Igf1 Enpp1 Sox9 Mef2c Ctsl Slc38a2
Mm_Complement_Activation_Classical_Pathway_WP200_72061	7	16	4.78	<0.01	C1qb C1qc C1ra C1s1 C7 Maspl C4b
Mm_Spinal_Cord_Injury_WP2432_87679	19	96	3.59	<0.01	Selp Fcgr2b Vim Rhoc Tlr4 Tgfb1 Rgma Zfp36 Pirb Mmp12 Icam1 Gja1 Sox9 Rhob Rtn4r Egr1 Aqp4 Sema6a Anxa1
Mm_Complement_and_Coagulation_Cascades_WP449_71733	14	61	3.72	<0.01	Cfh Tfpi Serping1 C1qb C1qc C1ra Vwf C1s1 Plaur C7 Pros1 Maspl C4b Cfb
Mm_Macrophage_markers_WP2271_69962	5	10	4.47	<0.01	Cd52 Cd163 Lyz2 Cd68 Cd14
Mm_TYROBP_Causal_Network_WP3625_90841	13	58	3.48	<0.01	Dpyd C1qc Spp1 Tyrobp Kcne3 Itgam Igsf6 Elf4 Cxcl16 Npc2 Lhfp12 Slc7a7 Zfp3612
Mm_Focal_Adhesion-PI3K-Akt-mTOR-signaling_pathway_WP2841_89989	44	318	2.86	0.011	Col3a1 Lamb3 Col5a2 Fn1 Lamc1 Col5a1 Lamc3 Pfkfb3 Pdgfc Ngf Csfl Slc2a1 Hgf Fgfr3 Pdgfra Spp1 Ppargc1a Colla2 Met Vwf Itgam Fgfr2 Col4a2 Fgfr1 Pdgfd Lamb2 Figf Lama4 Igf1 Kitl Lama2 Col6a2 Vtn Colla1 Itgb4 Itgb8 Fgfr4 Osmr Angpt1 Epas1 Lama3 Pdgfrb Csflr Ppp2r2b
Mm_Oxidative_Stress_WP412_89965	7	27	3.01	0.021	Cat Mgst1 Hmox1 Mt1 Nfix Junb Cyba
Mm_Alpha6-Beta4_Integrin_Signaling_Pathway_WP488_72049	13	66	2.95	0.021	Lamb3 Lamc1 Vim Met Cd151 Lamb2 Smad3 Ar Lama2 Erbb2 Itgb4 Plec Lama3
Mm_Striated_Muscle_Contraction_WP216_87693	10	45	3.02	0.023	Des Vim Myl9 Tpm3 Tpm2 Tpm4 Tpm1 Dmd Actn2 Acta2
Mm_Primary_Focal_Segmental_Glomerulosclerosis_FSGS_WP2573_89874	13	70	2.71	0.026	Vim Jag1 Tlr4 Agrn Plaur Tgfb1 Cd151 Myole Lamb2 Vtn Itgb4 Ctsl Plcel
Mm_Matrix_Metalloproteinases_WP441_69114	7	29	2.79	0.028	Mmp23 Mmp2 Mmp15 Mmp12

					Timp3 Timp2 Mmp14
Mm_Inflammatory_Response_Pathway_WP458_78438	7	30	2.68	0.032	Col3a1 Fn1 Lamc1 Colla2 Lamb2 Vtn Colla1
Mm_Microglia_Pathogen_Phagocytosis_Pathway_WP3626_87399	9	41	2.83	0.034	Vav3 Lyn Clqb Clqc Arpc1b Tyrobp Itgam Plcg2 Cyba
Mm_Factors_and_pathways_affecting_insulin-like_growth_factor_(IGF1)- Akt_signaling_WP3675_90178	7	31	2.58	0.037	Igfbp5 Pdk1 Pld1 Ppargc1a Smad3 Igf1 Igfbp4
Mm_Irinotecan_Pathway_WP475_69144	3	7	3.08	0.045	Bche Abcg2 Ces1d
Mm_Statin_Pathway_WP1_73346	5	19	2.58	0.046	Pltp Abca1 Scarb1 Apoe Lrp1

Table 7. マイクロアレイ解析による $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群と $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群の膵島遺伝子発現の比較 $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群に対する $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群の比で示す

	Ratio	P value
Transcription factors		
<i>Nkx6.1</i>	2.32	<0.01
<i>Mafa</i>	1.95	0.10
<i>Pdx1</i>	1.86	0.01
<i>Pax6</i>	1.22	<0.01
<i>Hnf1a</i>	1.41	0.07
<i>Id1</i>	0.61	0.32
<i>Pparg</i>	1.20	0.22
Metabolism		
<i>Slc2a2</i>	3.56	0.03
<i>Pcx</i>	2.62	0.01
<i>Gapdh</i>	0.93	0.30
<i>Aldob</i>	0.12	<0.01
<i>Ucp2</i>	1.05	0.83
Ion channels/pumps		
<i>Kcnj11</i>	1.32	0.06
<i>Atp2a2</i>	1.13	0.13
<i>Atp2a3</i>	1.55	0.03
Exocytosis		
<i>S100a6</i>	0.28	<0.01
<i>Snap25</i>	1.04	0.76
Stress genes		
<i>Atf3</i>	0.12	<0.01
<i>Hmox1</i>	0.46	0.04
<i>Gpx1</i>	0.97	0.91

6.4.4 膵 β 細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損 db/db マウスの膵 β 細胞機能及び増殖能

6.4.4.1 膵 β 細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損 db/db マウスの膵 β 細胞の増殖能

10 週齢の $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群と $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群では、先に述べたように膵 β 細胞量には差を認めないが、インスリン含量は $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群に比し $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群で有意に高値であった (Figure 60)。また、膵 β 細胞増殖能も $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群に比し $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群で有意に亢進していた (Figure 61) が、アポトーシスの割合 (Figure 62) や脱分化マーカー (Figure 63) には差を認めないことから、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ マウスにおける膵 β 細胞量の増大は主に増殖に起因するものと考えられた。

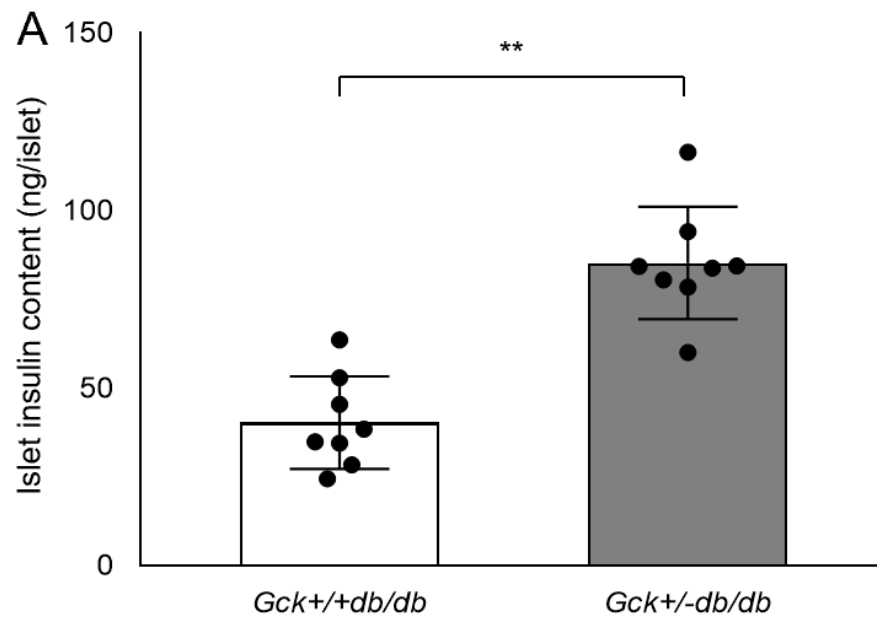


Figure 60. 膵島インスリン含量

10 週齢の各群のマウスの膵島インスリン含量を測定した

$\beta Gck^{+/+}db/db$ 群 (白)、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群 (濃灰色) (n=8) (平均 $\pm$ SD)

** $p < 0.01$

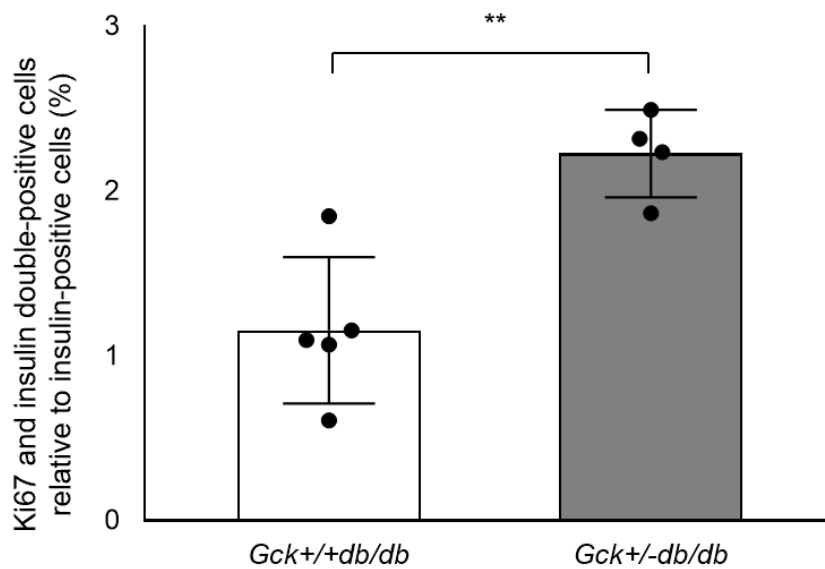


Figure 61. Ki67 染色による膵 β 細胞の増殖の評価

24 週齢の各群のマウスの膵組織における Ki67 染色陽性膵 β 細胞の割合を算出した $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群 (白)、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群 (濃灰色) ($n=4-5$) (平均 $\pm$ SD)

** $p < 0.01$

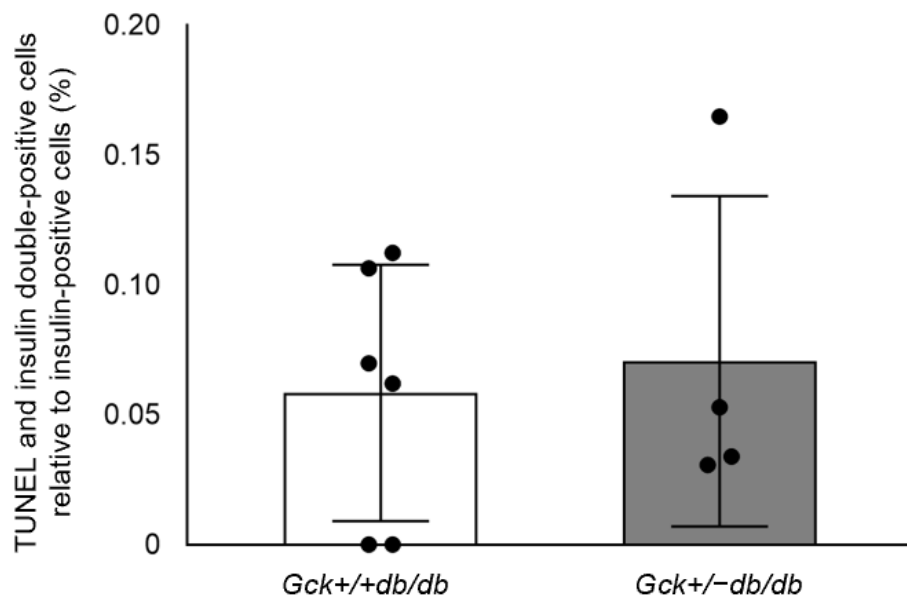


Figure 62. TUNEL 染色による膵 β 細胞のアポトーシスの評価
 10 週齢の各群のマウスの膵組織における TUNEL 染色陽性膵 β 細胞の割合を算出した $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群 (白)、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群 (濃灰色) ($n=4-6$) (平均 $\pm$ SD)

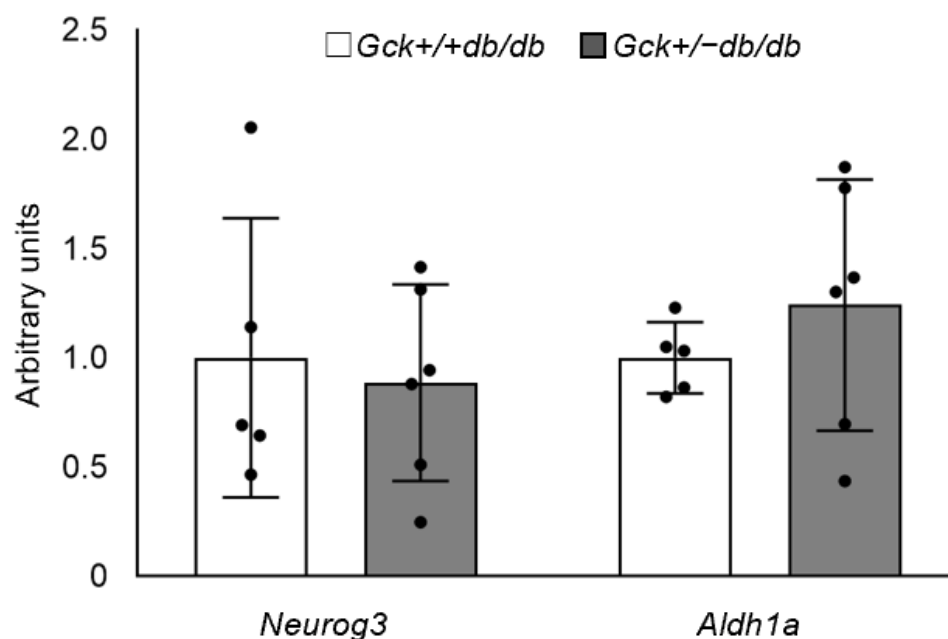


Figure 63. 脱分化にかかわる遺伝子群の単離膵島における定量的リアルタイムPCR法による遺伝子発現

10週齢の各群のマウスの単離膵島における脱分化にかかわる遺伝子群をリアルタイムPCR法による遺伝子発現により評価した

$\beta Gck^{+/+}db/db$ 群（白）、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群（濃灰色）（n=4-6）（平均 ± SD）

6.4.4.1 膵 β 細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損 *db/db* マウスの膵 β 細胞の機能関連転写因子の発現

細胞周期関連遺伝子の発現を定量的リアルタイム PCR 法を用いて比較すると、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群で *Ki67*、*Ccnd2*、*Ccnb1* の発現上昇を認めた (Figure 64)。先のマイクロアレイで発現上昇を認めていた *Nkx6.1* や *Pdx1* の mRNA も $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群で有意な発現上昇を認めており (Figure 65)、免疫組織化学染色で評価した *Nkx6.1* および MafA の核内陽性率も $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群で高値であった (Figure 66、67、68、69)。以上より $\beta Gck^{+/-}db/db$ マウスでは、*Nkx6.1* や *Mafa* といった膵 β 細胞機能関連転写因子の発現が保持されることで、インスリン含量が保たれるのと同時に膵 β 細胞増殖能が亢進することで膵 β 細胞量の増大につながると考えられた。

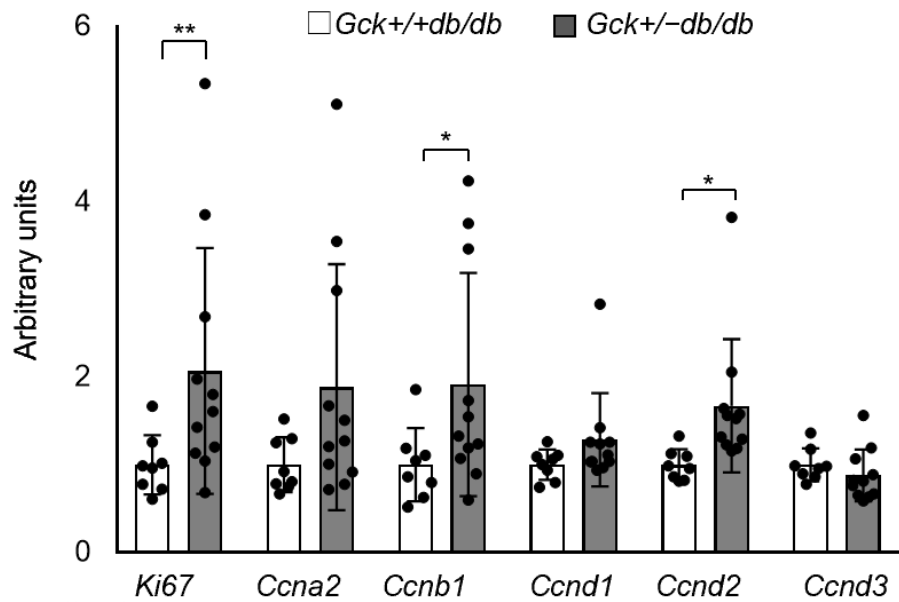


Figure 64.細胞周期にかかわる遺伝子群の単離腓島における定量的リアルタイムPCR 法による遺伝子発現

10 週齢の各群のマウスの単離腓島細胞周期にかかわる遺伝子群を単離腓島における定量的リアルタイム PCR 法による遺伝子発現にて評価した

$\beta Gck^{+/+}db/db$ 群 (白)、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群 (濃灰色) (n=8-11) (平均 $\pm$ SD)

** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$

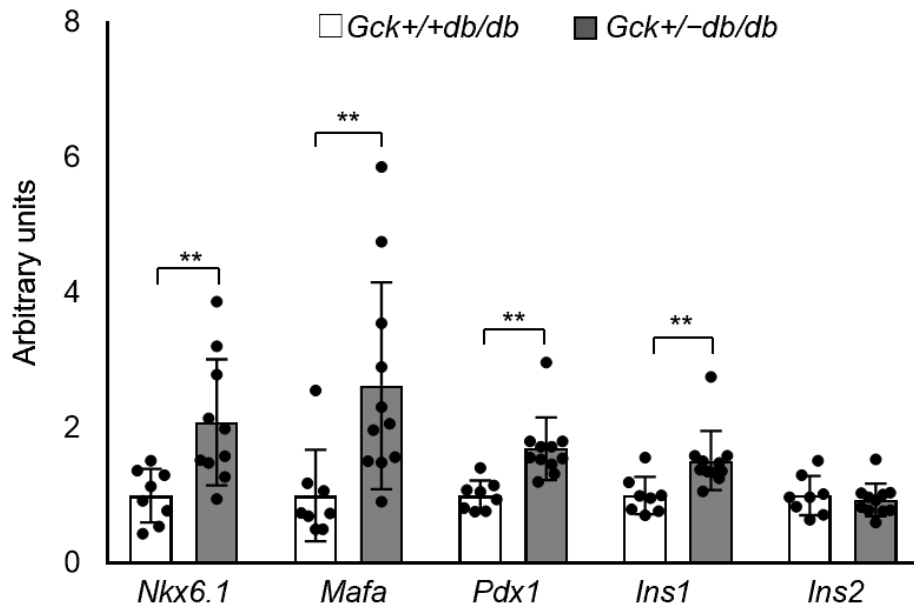


Figure 65. 膵β細胞機能関連転写因子にかかわる遺伝子群の単離膵島における定量的リアルタイム PCR 法による遺伝子発現

膵β細胞機能関連転写因子に関する遺伝子群を単離膵島における定量的リアルタイム PCR 法により遺伝子発現を評価した

$\beta Gck^{+/+}db/db$ 群 (白)、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群 (濃灰色) (n=8-11) (平均 ± SD)

** $p < 0.01$

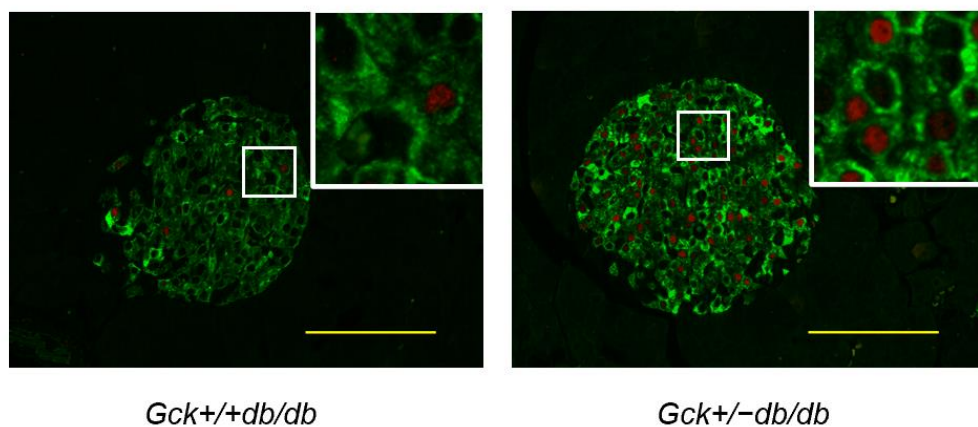


Figure 66. 膵島におけるインスリン・MafA 二重蛍光免疫染色
 10 週齢の各群のマウスの膵組織切片を抗インスリン抗体（緑）、抗 MafA 抗体（赤）にて蛍光免疫染色法で二重染色した。黄色の線は 100 μ m を示している。

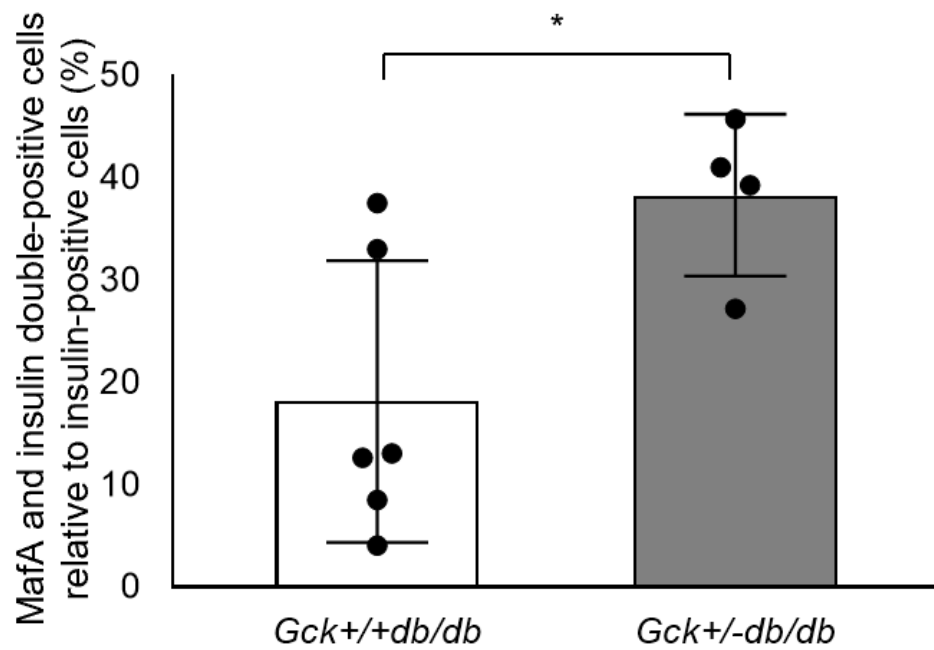


Figure 67. 膵β細胞における MafA 陽性細胞率
 膵β細胞における MafA 陽性細胞率を算出した
 $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群 (白)、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群 (濃灰色) (n=4-6) (平均 $\pm$ SD) * $p < 0.05$

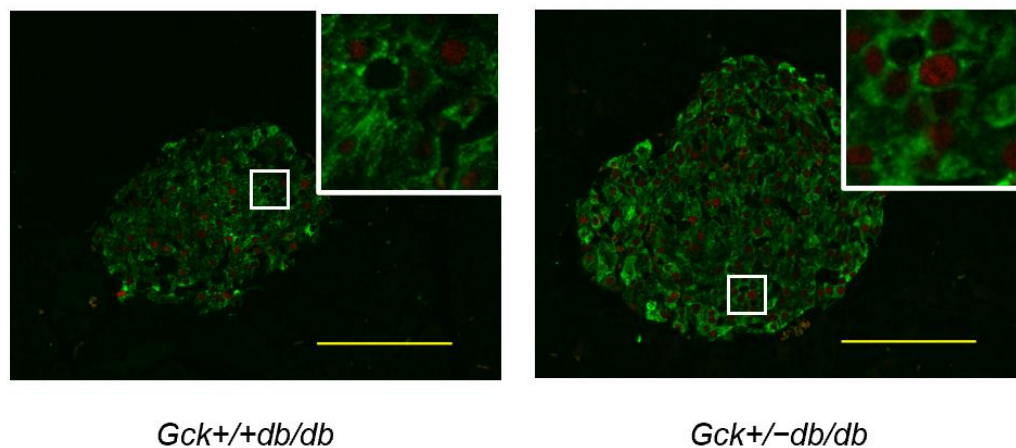


Figure 68. 膵島におけるインスリン・Nkx6.1 二重蛍光免疫染色
 10 週齢の各群のマウスの膵組織切片を抗インスリン抗体（緑）、抗 Nkx6.1 抗体（赤）にて蛍光免疫染色法で二重染色した。黄色の線は 100µm を示している。

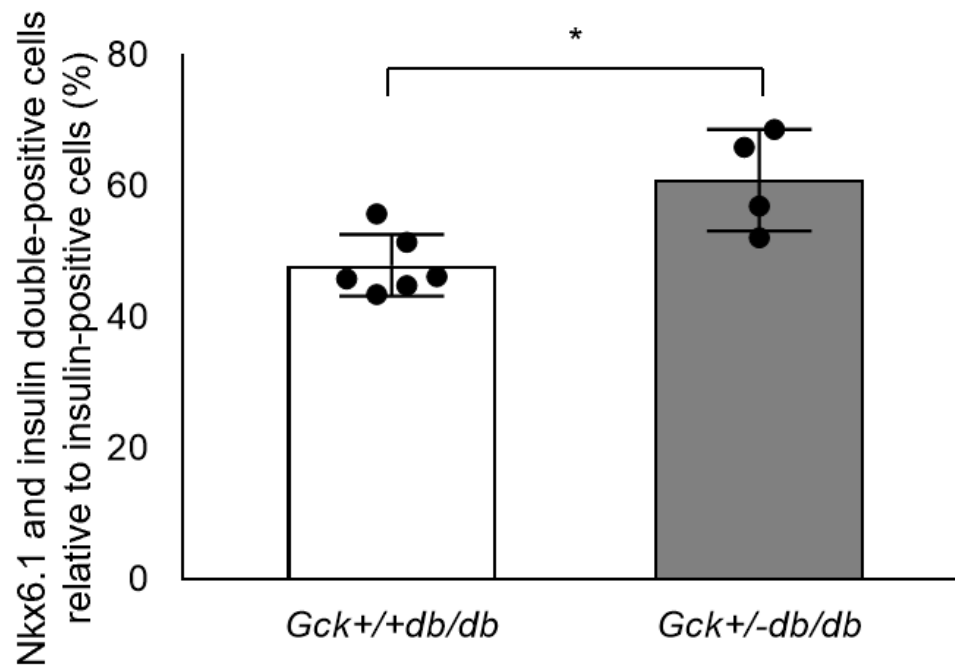


Figure 69. 膵β細胞における Nkx6.1 陽性細胞率

膵β細胞における Nkx6.1 陽性細胞率を算出した。

β*Gck*^{+/+}*db/db* 群 (白)、β*Gck*^{+/-}*db/db* 群 (濃灰色) (n=4-6) (平均 ± SD) **p* < 0.05

6.4.5 膵β細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損 db/db マウスにおけるストレスマーカー及びブドウ糖代謝関連発現遺伝子

酸化ストレスが膵β細胞機能関連転写因子を抑制させることが既報で示されており (Guo et al., 2013)、 $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群に比し $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群で膵β細胞機能関連転写因子の発現が上昇する機序として、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群で酸化ストレスが抑制されている可能性が考えられた。先に示したとおり、DNA マイクロアレイの結果より、 $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群に比し $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群で酸化ストレス遺伝子群の低下を認めており、定量的リアルタイム PCR 法での比較でも、 $Gck^{+/+}db/db$ 群に比し $Gck^{+/-}db/db$ 群で *Atf3* に加えて、NADPH 酸化酵素複合体の一部である *Cyba* および好中球細胞質因子 1 (*Ncf1*) の mRNA 発現の有意な低下を認めた (Figure 70)。次に、両群のマウスの膵β細胞において、酸化ストレスの影響を受けやすいミトコンドリアの形態を調べた。Figure 71 に示すように、 $\beta Gck^{+/+}db/db$ マウスでは、ミトコンドリアネットワークの断片化 (Haythorne et al., 2019) を示す Tom20 染色の不均一性を認めた。一方、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ マウスでは、その染色は均一であり、膵β細胞全体に広がっていた。定量的には、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ マウスの膵β細胞のミトコンドリア面積は $\beta Gck^{+/+}db/db$ マウスに比し有意に高値であった (Figure 72)。DNA マイクロアレイで変動を認めた解糖系などのブドウ糖代謝に関連する遺伝子発現を定量的リアルタイム PCR 法で検討したところ、 $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群に比し $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群で *Aldob*、*Pfkfb3* の低下、*Pcx* の上昇を認め、糖尿病状態でみられる遺伝子発現パターンが改善されることを見出した (Figure 73)。

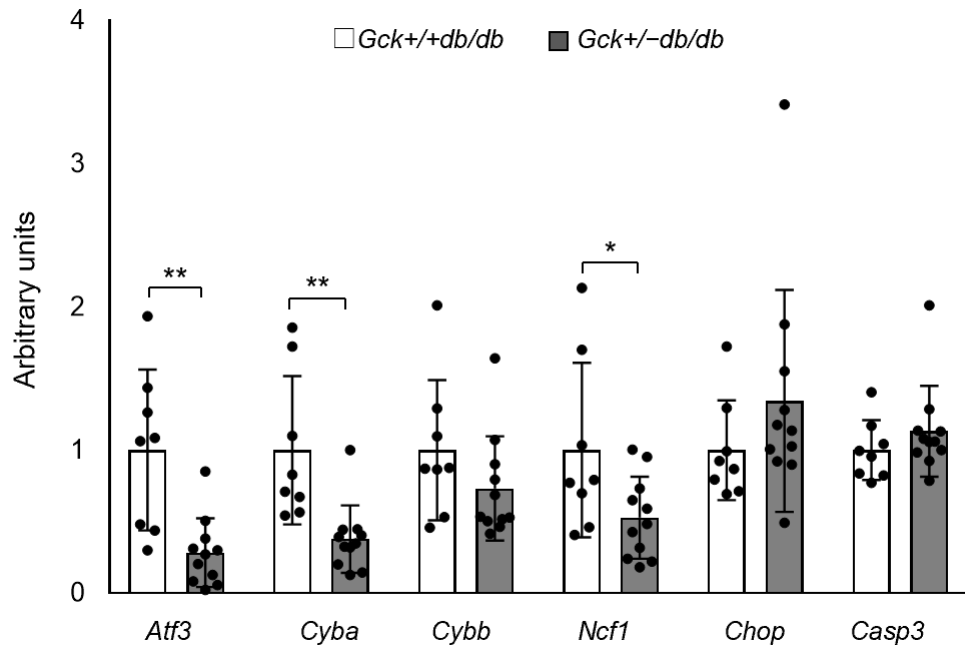


Figure 70. 酸化ストレス関連遺伝子群を単離腓島における定量的リアルタイムPCR法を用いて遺伝子発現を検討した

$\beta Gck^{+/+}db/db$ 群 (白)、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群 (濃灰色) (n=8-11) (平均 $\pm$ SD)

** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$

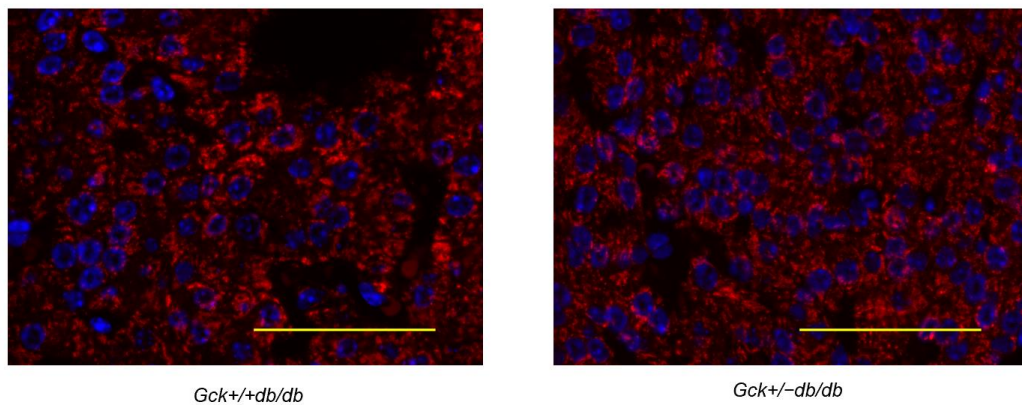


Figure 71. 膵島における Tom20 二重蛍光免疫染色
 10 週齢の各群のマウスの膵組織切片を抗 Tom20 抗体にて蛍光免疫染色法で染色し、核は DAPI で染色を行った。黄色の線は 50 μ m を示している。

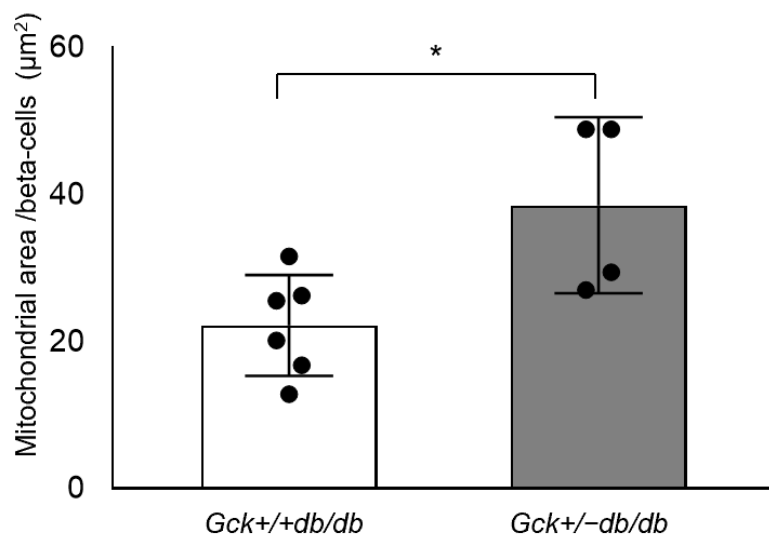


Figure 72. 膵β細胞における Tom20 染色陽性面積

10 週齢の各群のマウスの膵組織切片を抗 Tom20 抗体と抗インスリン抗体にて蛍光免疫染色法で染色し、膵β細胞における Tom20 染色陽性面積の割合を算出した $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群（白）、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群（濃灰色）（n=4-6）（平均 ± SD）

* $p < 0.05$

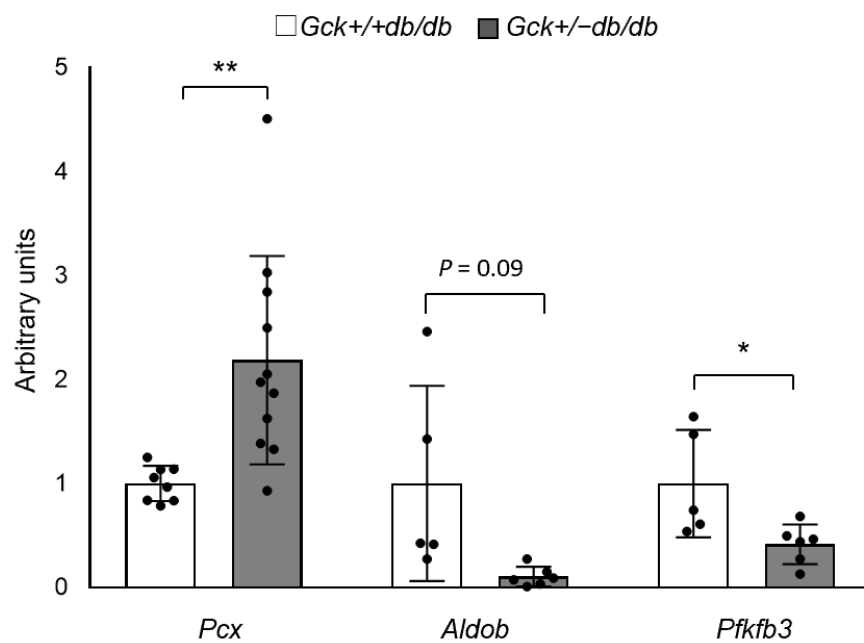


Figure 73. 代謝関連遺伝子群の単離腓島における定量的リアルタイム PCR 法による遺伝子発現

$\beta Gck^{+/+}db/db$ 群 (白)、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群 (濃灰色) (n=5-11) (平均 $\pm$ SD)

** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$

6.4.6 膵β細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損 db/db マウスにおける膵島細胞内代謝パターンの変動

次に 10 週齢の $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群と $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群の膵島を単離し、メタボローム解析による代謝産物の比較を行った。Figure 74 は、検出された 95 種類の代謝物の階層型クラスター分析によるヒートマップである。この結果から、両群間で単離膵島の代謝物に変化を生じていたことが明らかになった。Figure 75 に示す通り、 $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群に比し $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群において解糖系の中間代謝産物のフルクトース 6-リン酸、ピルビン酸、乳酸などの代謝物が減少していた。TCA サイクルでは、イソクエン酸が増加し、フマル酸やリンゴ酸が減少していた。なお、ピルビン酸またはリンゴ酸からクエン酸への経路での代謝物の比率 ($\beta Gck^{+/-}db/db$ マウス/ $\beta Gck^{+/+}db/db$ マウス) が、それぞれ $0.6 \rightarrow 1.0$ 、 $0.3 \rightarrow 1.0$ とステップアップしていた。 $Gck^{+/-}db/db$ マウスでは *Pcx* の発現レベルが上昇し (Figure 73)、ATP レベルが上昇したことから、 $Gck^{+/-}db/db$ マウスの代謝パターンは糖尿病性膵島(Haythorne et al., 2019)で見られる解糖系優位から、TCA サイクルと酸化的リン酸化優位へとシフトしていると考えられた。

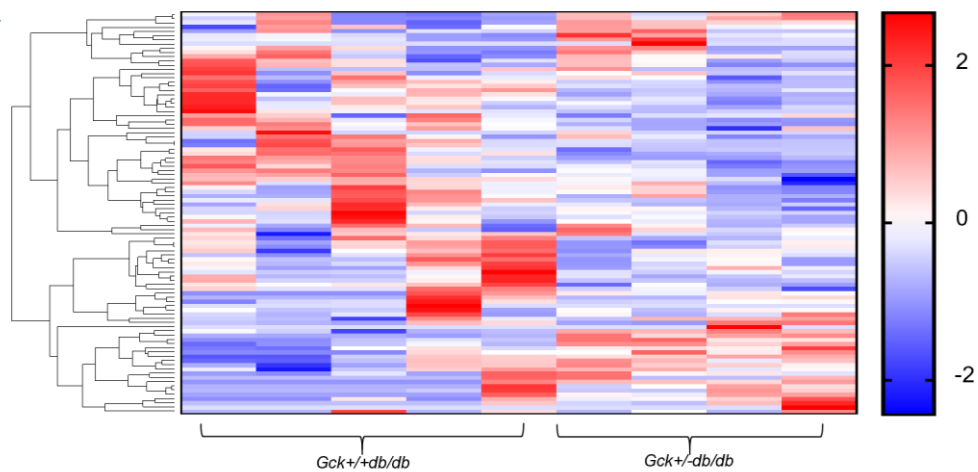


Figure 74. 単離膵島における代謝産物の階層型クラスタリング解析
 10 週齢の $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群と $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群の膵島を単離し、メタボローム解析
 による代謝産物の比較を行った (n=4-5)

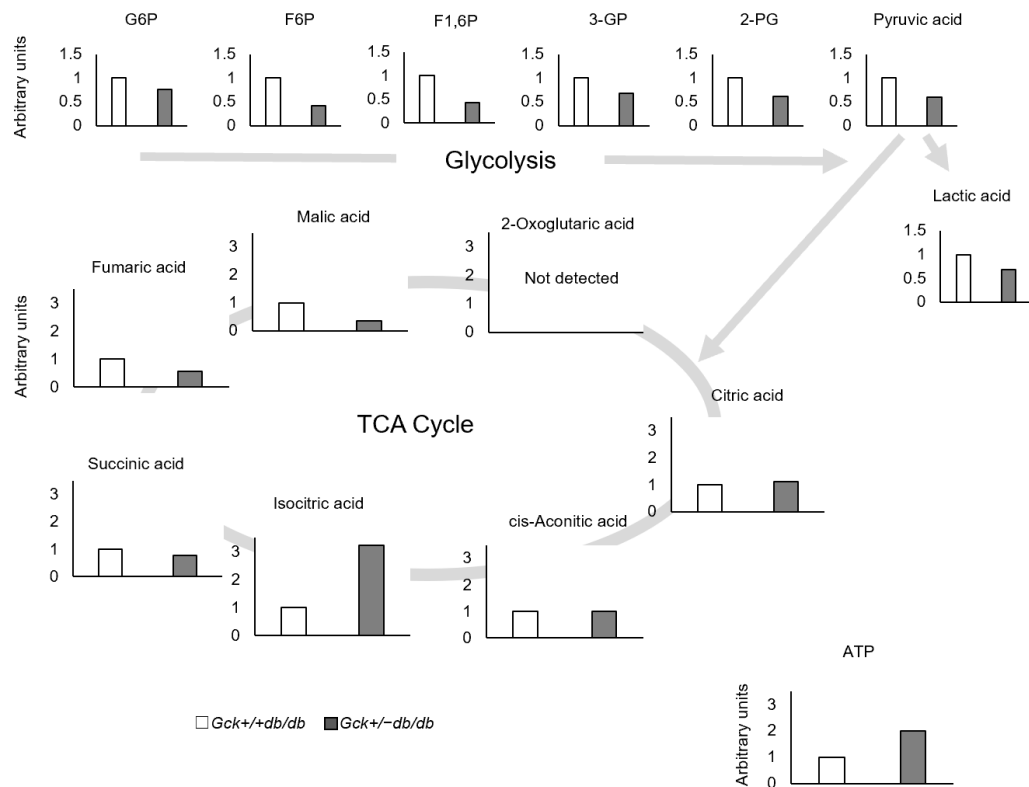


Figure 75. 単離膵島における代謝産物

10 週齢の $\beta Gck^{+/+}db/db$ 群と $\beta Gck^{+/-}db/db$ 群の膵島を単離し、メタボローム解析による代謝産物の比較を行った

$\beta Gck^{+/+}db/db$ 群 (白)、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ (濃灰色) (n=4-5)

G6P: Glucose 6-phosphate

F6P: Fructose 6-phosphate

F1,6P: Fructose 1,6-diphosphate

3-PG: 3-Phosphoglyceric acid

2-PG: 2-Phosphoglyceric acid

6.4.7 高ブドウ糖状態下での膵 β 細胞関連転写因子に対するグルコキナーゼ阻害薬の効果

グルコキナーゼを抑制することで、高ブドウ糖による膵 β 細胞関連転写因子の発現低下を改善させるかどうかを検証するために、グルコキナーゼ阻害薬である D-mannoheptulose の高ブドウ糖条件下における *Nkx6.1* 発現への影響について、INS-1 細胞を用いて検討した。INS-1 細胞を 4mM グルコース、11mM グルコース、11mM グルコース + 1mM D-mannoheptulose の 3 群に分け、48 時間培養し、定量的リアルタイム PCR 法で遺伝子発現を評価した。11mM グルコース群では、4mM グルコース群と比較して *Nkx6.1* の発現量は減少したが、11mM グルコース + 1mM D-mannoheptulose 群では *Nkx6.1* の発現量が回復したことが観察された (Figure 76)。これらの結果から、高ブドウ糖により惹起された膵 β 細胞関連転写因子の低下が、グルコキナーゼの抑制により回復したことが示された。

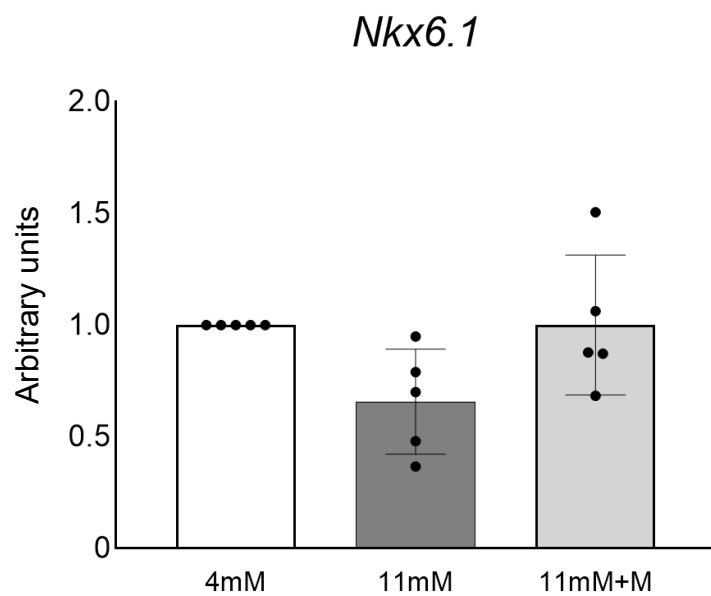


Figure 76. INS-1 細胞における *Nkx6.1* の発現

INS-1 細胞における *Nkx6.1* の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法により評価した 4mM グルコース（白）、11mM グルコース（濃灰色）、11mM グルコース+1mM D-mannoheptulose（M）（薄灰色）（n=5）

6.5 考察

本研究では、膵 β 細胞におけるグルコキナーゼのヘテロ欠損が、膵 β 細胞量の増加に伴いインスリン分泌を増加させ、耐糖能を改善することを示した。この知見は、グルコキナーゼを抑制することで膵 β 細胞の過剰なグルコースシグナルのバランスを調整し、過剰なグルコース流入による膵 β 細胞障害を防ぎ、膵 β 細胞の機能と膵 β 細胞量を維持することで糖尿病状態における耐糖能の改善につながるのではないかと我々の仮説を立証した。最近では、グルコキナーゼ活性を低下させることでインスリンの分泌パターンが回復し、この改善は *db/db* マウスの膵島におけるインスリン分泌の亢進と関連していることが報告されている(Corbin et al., 2016; Jahan et al., 2018)。これらの結果は我々の知見と一致している。我々の研究では膵 β 細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損モデルマウスを用いることにより、個体レベルで膵 β 細胞量に与える影響を明らかにした点において独自性がある。さらに、膵 β 細胞でのグルコキナーゼ抑制が糖尿病モデルマウスの耐糖能を改善させた効果についての最初の報告である。

上記の効果のメカニズムとしては、1)グルコキナーゼヘテロ欠損が膵臓 β 細胞への過剰なグルコース流入による活性酸素種(Reactive oxygen species: ROS)を含む酸化ストレスの増加を抑制する。2) 酸化ストレスの抑制は、膵 β 細胞関連転写因子の発現を増加させ、酸化ストレスによるミトコンドリアの損傷を緩和し、効率的な ATP 産生をもたらす。3) これらの転写因子の発現の増加と ATP の効率的な生産は、膵 β 細胞のインスリン合成を増加させ、膵 β 細胞の増殖能力を高め、糖尿病病態における膵 β 細胞の機能と膵 β 細胞量を維持する。その結果、耐糖能が改善されるという機序が推察される。

グルコースは刺激の強さと持続時間に応じて膵 β 細胞に二面的な効果を及ぼす(Bensellam et al., 2012)。短期またはわずかに上昇したグルコースの曝露は、膵 β 細胞におけるグルコース感受性を上げ、インスリン遺伝子発現の上昇をもたらす。対照的に高濃度のグルコースの長期曝露は、膵 β 細胞の機能および生存の毒性効果（糖毒性）を誘導する(Prentki et al., 2020)。この膵 β 細胞機能障害はさらなる高血糖を引き起こし、その結果 2 型糖尿病の経過過程で観察される膵 β 細胞の機能及び量の低下を進行させる。膵 β 細胞における糖毒性のメカニズムはいくつか示されている(Bensellam et al., 2012; Poitout and Robertson, 2008; Robertson, 2004)が、膵 β 細胞の糖毒性を引き起こすには酸化ストレスが重要な役割を果たしている。実際、*db/db* マウスの膵 β 細胞は長期の高血糖状態で酸化ストレスが上昇している(Bensellam et al., 2012; Poitout and Robertson, 2008)。高血糖が酸化ストレスの原因となる ROS を過剰に発生させる生化学的経路は複数存在する。グルコース代謝物は主に酸化的リン酸化を介して、ミトコンドリア呼吸

鎖の ATP と同時に ROS の産生につながる。また、グルコース代謝物は代替経路にも過剰流入し、ROS 産生の増加に寄与している(Poitout and Robertson, 2008; Robertson, 2004)。このように、高血糖状態下では、過剰なグルコース代謝物が ROS の産生を増加させる。グルコキナーゼヘテロ欠損は、過剰なグルコース代謝物の流入を抑制することで ROS 産生を抑制し、結果として酸化ストレスを減少させる可能性が示唆された。マイクロアレイ解析のデータはこの考えを支持するものである。また膵島における *Cyba* と *Ncf1* 遺伝子の発現が低下していることから、酸化ストレスの減少はミトコンドリア呼吸鎖だけでなく、NADPH 酸化酵素複合体に由来する可能性があることが示唆された。

抗酸化酵素の過剰発現または抗酸化剤の投与による酸化ストレスの低減は、*db/db* マウスの膵 β 細胞の機能と膵 β 細胞量を回復させた(Harmon et al., 2009; Kaneto et al., 1999)。この際、膵 β 細胞関連転写因子がこの回復に重要である。Guo らは、*db/db* マウスの MafA と Nkx6.1 を標的とした高血糖と酸化ストレスが膵 β 細胞の機能障害を引き起こし、*db/db* マウスの膵 β 細胞でグルタチオンペルオキシダーゼ-1 抗酸化酵素を過剰発現させると、MafA、Nkx6.1、膵 β 細胞の機能が回復することを報告している(Guo et al., 2013)。これらの知見は、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ マウスの免疫組織染色において MafA および Nkx6.1 陽性膵 β 細胞の割合が $\beta Gck^{+/+}db/db$ マウスに比べ有意に高いことを示す我々の結果と一致していた。MafA 産生 *db/db* マウスは、血糖コントロールの改善、膵 β 細胞の機能と膵 β 細胞量の増大を示し(Matsuoka et al., 2015)、Nkx6.1 の過剰発現は GSIS の改善と膵 β 細胞増殖の亢進をもたらす(Schisler et al., 2008)。さらに、Taylor らは、Nkx6.1 がピルビン酸の TCA サイクルへの代謝に重要な役割を果たす *Pcx* を含むグルコース代謝に関わる遺伝子の転写を直接制御していることを明らかにした(Taylor et al., 2013)。 $\beta Gck^{+/-}db/db$ マウスの膵島では、 $\beta Gck^{+/+}db/db$ マウスに比べて *Pcx* の発現レベルが高く、代謝パターンが TCA サイクルと酸化的リン酸化優位にシフトし、その後 ATP 産生が増加したことから、Nkx6.1 による *Pcx* の増加が膵 β 細胞の機能と膵 β 細胞量の増加に関与している可能性があると考えられる(Li et al., 2016; Xu et al., 2008)。

もう一つの可能性としては、酸化ストレスの減少がミトコンドリアの損傷を減少させることが考えられる。我々のデータでは、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ マウスではミトコンドリアの形態が改善され、*Pfkfb3* の発現が有意に減少していることが示されている。最近、膵 β 細胞でのミトコンドリアの断片化とそれに伴う *Pfkfb3* の発現増加により、ピルビン酸を乳酸に変換する嫌気性解糖が促進されることが報告されている(Montemurro et al., 2019)。つまり、*Pfkfb3* は、TCA サイクルや酸化的リン酸化優位から解糖系経路優位へとシフトした代謝パターンを促進し、代謝リモデリングの起点となる。したがって、*Pfkfb3* の発現低下は、糖尿病病態

でみられるこのような代謝リモデリングを改善することで、 $\beta Gck^{+/-} db/db$ マウスの膵 β 細胞の機能と膵 β 細胞量の回復に寄与している可能性がある。

臨床的な観点からは、2 型糖尿病患者の血糖コントロールは、内因性インスリン分泌を促進するか、またはインスリン分泌を介さず高血糖とインスリン分泌需要の両方を減少させて、膵 β 細胞の休息を与えることによって達成されることが考えられる(van Raalte and Verchere, 2017)。後者の戦略は、膵 β 細胞の機能および膵 β 細胞量を維持することが期待されるため最も有用である。膵 β 細胞における過剰なグルコースシグナルの流入は、最初はインスリン分泌および膵 β 細胞増殖を刺激するが、慢性的に酸化ストレスを増大させ、膵 β 細胞不全をもたらす(Porat et al., 2011; Tornovsky-Babeay et al., 2014)。むしろ過剰なグルコースシグナルを適正化すれば、膵 β 細胞に休息を与え、膵 β 細胞の機能と質量の低下を防ぐことにつながる。したがって、膵 β 細胞におけるグルコキナーゼの抑制は、2 型糖尿病における「膵 β 細胞の休息」を与える新たな治療標的として期待される。また、ヒト膵島アミロイドポリペプチド過剰発現マウスの膵 β 細胞におけるグルコキナーゼヘテロ欠損が、膵島アミロイドの発生率と量を減少させたという知見(Andrikopoulos et al., 2000)は、グルコキナーゼ抑制の有用性を示すものであるかもしれない。本研究では、INS-1 細胞においてグルコキナーゼ阻害薬の一つである D-mannoheptulose が、高グルコース条件下で減少した膵 β 細胞関連転写因子の発現レベルを回復させた。この結果は、グルコキナーゼ阻害薬の膵 β 細胞に対する好ましい効果を直接的に示している。しかし、臨床応用には課題がある。一つは、グルコキナーゼ阻害の程度が重要である。グルコキナーゼの完全な阻害は、ホモ接合性不活性化グルコキナーゼ変異を有する永久新生児糖尿病で示されるように、顕著な高血糖をもたらすであろう(Osbak et al., 2009)。もう一つの問題は、グルコキナーゼ阻害薬が膵 β 細胞特異的であるかどうかである。膵 β 細胞におけるグルコキナーゼのヘテロ欠損が耐糖能を改善することを示したが、グルコキナーゼは膵臓だけでなく肝臓、脳、消化管にも発現している(Nakamura and Terauchi, 2015)。したがって、グルコキナーゼ抑制による肝臓や脳への影響を十分検証したうえで、臨床応用を展開していく必要がある。

6.6 結語

膵 β 細胞におけるグルコキナーゼの抑制が、膵 β 細胞機能ならびに膵 β 細胞量を保持することで耐糖能を改善するということを、個体レベルで初めて明らかにした。本研究はグルコキナーゼを抑制する、という従来とは全く逆の発想による 2 型糖尿病治療へのアプローチであり、今後創薬などを通じて、臨床応用に展開できることが期待される。

7. 結論

第一章では肥満糖尿病モデルマウスにおいてインスリングルルギンに対するダパグリフロジンの膵β細胞量保持作用および肝の脂肪化抑制作用を明らかにした。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。

db/db マウス雄性 6 週齢を普通食飼育群 (Placebo 群) と SGLT2 阻害薬のダパグリフロジン投与群 (Dapa 群)、Dapa 群と同等に血糖を降下させたインスリングルルギン群 (Gla 群)、ダパグリフロジンとインスリングルルギンを併用した群 (Dapa+Gla 群) に群別し 8 週間飼育したところ、

1. Placebo 群に比べ Dapa 群、Gla 群、Dapa+Gla 群で体重は有意に増加し、随時血糖は同等に低下した
2. Placebo 群に比べ膵β細胞量及び機能は Dapa 群、Dapa+Gla 群で有意に保持された
3. Placebo 群に比べ肝内中性脂肪含量は Gla 群でのみ有意に増加した
4. Gla 群でのみ肝の脂肪蓄積に関する遺伝子群の発現が亢進していた
5. Placebo 群に比べ肝臓内のパルミチン酸、肝臓の脂肪化の亢進を示す Desaturation Index は Gla 群でのみ有意に増加した

これらの結果から *db/db* マウスにダパグリフロジンまたはダパグリフロジンとインスリングルルギンを併用し 8 週間投与したところ、膵β細胞量は保持され、肝脂肪化は予防されたが、インスリングルルギン単独療法においては肝脂肪化が進行していた。

この研究は、2 型糖尿病の治療に新たな知見を与えるものと考えられる。

これらの治療法の有効性と安全性については、今後無作為化臨床試験での検討が必要である。

第二章では膵β細胞特異的なグルコキナーゼ抑制が、過剰なグルコースシグナルを抑制 (適正化) することにつながり、膵β細胞機能ならびに膵β細胞量を保持することで耐糖能を改善するということを、個体レベルで明らかにした。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。

1. 膵β細胞特異的なグルコキナーゼヘテロ欠損 *db/db* マウス ($\beta Gck^{+/-}db/db$) では、 $\beta Gck^{+/+}db/db$ マウスよりも随時血糖値が 13 週齢以降徐々に低下した

2. $\beta Gck^{+/-}db/db$ マウスでは $\beta Gck^{+/+}db/db$ マウスに比べ 23 週齢の経口ブドウ糖負荷試験で有意に耐糖能が改善した
3. $\beta Gck^{+/-}db/db$ マウスでは $\beta Gck^{+/+}db/db$ マウスと比較して、24 週齢の膵 β 細胞量が有意に増加していた
4. $\beta Gck^{+/-}db/db$ マウスの生存期間は、 $\beta Gck^{+/+}db/db$ $Gck^{+/+}db/db$ マウスの生存期間よりも 有意に長かった
5. DNA マイクロアレイ法を用いて膵島の遺伝子発現を網羅的に解析したところ、 $\beta Gck^{+/+}db/db$ マウスと比較して $\beta Gck^{+/-}db/db$ マウスの膵島では、酸化ストレス関連遺伝子の発現が低下していた
6. 定量的リアルタイム PCR を用いた遺伝子発現の比較検討の結果、 $\beta Gck^{+/-}db/db$ マウスでは $\beta Gck^{+/+}db/db$ マウスと比較して、ブドウ糖代謝に関わるピルビン酸カルボキシラーゼ (*Pcx*)、膵 β 細胞機能や成熟に関わる転写因子である *Nkx6.1*、*Mafa*、*Pdx1*、増殖に関わる *Ki67*、*Ccnd2* の発現が増加していた一方、酸化ストレスに関連する遺伝子である *Atf3* や *Cyba* は減少していた
7. メタボローム解析では、解糖系に属するフルクトース 6-リン酸、ピルビン酸、乳酸などの代謝物が減少し、TCA 回路や酸化的リン酸化に関連するイソクエン酸や ATP が $\beta Gck^{+/-}db/db$ マウスで増加していた。

これらの結果から、膵 β 細胞のグルコキナーゼを抑制することで、酸化ストレスが軽減し、膵 β 細胞関連転写因子の発現が上昇すると同時に、膵島の代謝パターンが糖尿病性膵島で観察されるような解糖系優位から、TCA サイクルと酸化的リン酸化優位へとシフトすることで、膵 β 細胞量が増大し、耐糖能が改善することが示唆された。

今後臨床応用にむけてグルコキナーゼ阻害の程度や膵 β 細胞以外に発現する臓器（肝臓や脳）への影響を十分検証する必要がある。

両研究ともに糖尿病治療を行う上で有用とされる「膵 β 細胞の休息を与えることにより膵 β 細胞の機能および量を維持する」ことが期待される治療戦略である。そのため、今後臨床的な検討を行うことで、上記治療戦略の有効性が示されることが期待される。

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院 内科学分野 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。

また土田和久先生、川田晋一郎先生、山内裕貴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。

9. 利益相反

第一章で開示すべき利益相反状態は以下の通りである。

中村昭伸助教は田辺三菱製薬、日本ベーリンガー株式会社、第一三共株式会社、小野薬品工業株式会社から奨学寄附金を受け取った。三好秀明教授はアステラス製薬、アストラゼネカ、大日本住友製薬株式会社、イーライリリー・アンド・カンパニー、キッセイ薬品、田辺三菱製薬、MSD 株式会社、ノバルティスファーマ、ノボノルディスクファーマ、武田薬品工業、興和株式会社、小野薬品工業株式会社、サノフィから講演料を受け取り、アステラス製薬、アストラゼネカ、第一三共株式会社、大日本住友製薬株式会社、イーライリリー・アンド・カンパニー、田辺三菱製薬、MSD 株式会社、ノボノルディスクファーマ、サノフィ、武田薬品工業、興和株式会社、小野薬品株式会社、大正富山医薬品から奨学寄附金を受け取った。寺内康夫教授はアステラス製薬、アストラゼネカ、バイエル薬品、第一三共、大日本住友製薬株式会社、イーライリリー・アンド・カンパニー、興和株式会社、MSD 株式会社、田辺三菱製薬、日本ベーリンガー株式会社、ノボノルディスクファーマ、小野薬品工業株式会社、三和化学研究所、サノフィ株式会社、塩野義製薬、大正富山医薬品、武田薬品工業から講演料を受け取り、アステラス製薬、第一三共株式会社、大日本住友製薬株式会社、イーライリリー・アンド・カンパニー、田辺三菱製薬、MSD 株式会社、日本ベーリンガー株式会社、ノボノルディスクファーマ、サノフィ、武田薬品工業、小野薬品株式会社から奨学寄附金を受け取った。渥美達也教授は田辺三菱製薬、ユーシービージャパン、中外製薬株式会社、アステラス製薬、武田薬品工業、ファイザー、イーライリリー・アンド・カンパニー、ブリistolマイヤーズ、アッヴィ合同会社、エーザイ株式会社から講演料を受け取り、アステラス製薬、武田薬品工業、田辺三菱製薬、中外製薬株式会社、第一三共株式会社、バイエル薬品、エーザイ株式会社から奨学寄付金を受け取った。その他の著者に開示すべき利益相反状態はない。

第二章で行われた研究において、開示すべき利益相反状態はない。

10. 引用文献

- Andrikopoulos, S., Verchere, C.B., Terauchi, Y., Kadowaki, T., and Kahn, S.E. (2000). beta-cell glucokinase deficiency and hyperglycemia are associated with reduced islet amyloid deposition in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes* 49, 2056-2062.
- Bensellam, M., Laybutt, D.R., and Jonas, J.C. (2012). The molecular mechanisms of pancreatic β -cell glucotoxicity: recent findings and future research directions. *Mol. Cell Endocrinol.* 364, 1-27.
- Bonner, C., Kerr-Conte, J., Gmyr, V., Queniat, G., Moerman, E., Thevenet, J., Beaucamps, C., Delalleau, N., Popescu, I., Malaisse, W.J., *et al.* (2015). Inhibition of the glucose transporter SGLT2 with dapagliflozin in pancreatic alpha cells triggers glucagon secretion. *Nat. Med.* 21, 512-517.
- 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.
- Chen, L., Klein, T., and Leung, P.S. (2012). Effects of combining linagliptin treatment with BI-38335, a novel SGLT2 inhibitor, on pancreatic islet function and inflammation in db/db mice. *Curr. Mol. Med.* 12, 995-1004.
- Corbin, K.L., Waters, C.D., Shaffer, B.K., Verrilli, G.M., and Nunemaker, C.S. (2016). Islet Hypersensitivity to Glucose Is Associated With Disrupted Oscillations and Increased Impact of Proinflammatory Cytokines in Islets From Diabetes-Prone Male Mice. *Endocrinology* 157, 1826-1838.
- Denechaud, P.D., Lopez-Mejia, I.C., Giralt, A., Lai, Q., Blanchet, E., Delacuisine, B., Nicolay, B.N., Dyson, N.J., Bonner, C., Pattou, F., *et al.* (2016). E2F1 mediates sustained lipogenesis and contributes to hepatic steatosis. *J. Clin. Invest.* 126, 137-150.
- Ferrannini, E., Gastaldelli, A., Miyazaki, Y., Matsuda, M., Mari, A., and DeFronzo, R.A. (2005). beta-Cell function in subjects spanning the range from normal glucose tolerance to overt diabetes: a new analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 493-500.
- Ferrannini, E., Muscelli, E., Frascerra, S., Baldi, S., Mari, A., Heise, T., Broedl, U.C., and Woerle, H.J. (2014). Metabolic response to sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in type 2 diabetic patients. *J. Clin. Invest.* 124, 499-508.
- Futamura, M., Hosaka, H., Kadotani, A., Shimazaki, H., Sasaki, K., Ohyama, S., Nishimura, T., Eiki, J., and Nagata, Y. (2006). An allosteric activator of glucokinase impairs the interaction of glucokinase and glucokinase regulatory protein and regulates glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* 281, 37668-37674.
- Futamura, M., Yao, J., Li, X., Bergeron, R., Tran, J.L., Zycband, E., Woods, J., Zhu, Y., Shao, Q., Maruki-Uchida, H., *et al.* (2012). Chronic treatment with a glucokinase

activator delays the onset of hyperglycaemia and preserves beta cell mass in the Zucker diabetic fatty rat. *Diabetologia* 55, 1071-1080.

Fyfe, M.C., White, J.R., Taylor, A., Chatfield, R., Wargent, E., Printz, R.L., Sulpice, T., McCormack, J.G., Procter, M.J., Reynet, C., *et al.* (2007). Glucokinase activator PSN-GK1 displays enhanced antihyperglycaemic and insulinotropic actions. *Diabetologia* 50, 1277-1287.

Grimsby, J., Sarabu, R., Corbett, W.L., Haynes, N.E., Bizzarro, F.T., Coffey, J.W., Guertin, K.R., Hilliard, D.W., Kester, R.F., Mahaney, P.E., *et al.* (2003). Allosteric activators of glucokinase: potential role in diabetes therapy. *Science* 301, 370-373.

Guo, S., Dai, C., Guo, M., Taylor, B., Harmon, J.S., Sander, M., Robertson, R.P., Powers, A.C., and Stein, R. (2013). Inactivation of specific β cell transcription factors in type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* 123, 3305-3316.

Harmon, J.S., Bogdani, M., Parazzoli, S.D., Mak, S.S., Oseid, E.A., Berghmans, M., Leboeuf, R.C., and Robertson, R.P. (2009). beta-Cell-specific overexpression of glutathione peroxidase preserves intranuclear MafA and reverses diabetes in db/db mice. *Endocrinology* 150, 4855-4862.

Haythorne, E., Rohm, M., van de Bunt, M., Brereton, M.F., Tarasov, A.I., Blacker, T.S., Sachse, G., Silva Dos Santos, M., Terron Exposito, R., Davis, S., *et al.* (2019). Diabetes causes marked inhibition of mitochondrial metabolism in pancreatic β -cells. *Nat. Commun.* 10, 2474.

Hudish, L.I., Reusch, J.E., and Sussel, L. (2019). β Cell dysfunction during progression of metabolic syndrome to type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* 129, 4001-4008.

Jahan, I., Corbin, K.L., Bogart, A.M., Whitticar, N.B., Waters, C.D., Schildmeyer, C., Vann, N.W., West, H.L., Law, N.C., Wiseman, J.S., *et al.* (2018). Reducing Glucokinase Activity Restores Endogenous Pulsatility and Enhances Insulin Secretion in Islets From db/db Mice. *Endocrinology* 159, 3747-3760.

Junker, B.H., Klukas, C., and Schreiber, F. (2006). VANTED: a system for advanced data analysis and visualization in the context of biological networks. *BMC Bioinformatics* 7, 109.

Kaneto, H., Kajimoto, Y., Miyagawa, J., Matsuoka, T., Fujitani, Y., Umayahara, Y., Hanafusa, T., Matsuzawa, Y., Yamasaki, Y., and Hori, M. (1999). Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. *Diabetes* 48, 2398-2406.

Kaneto, H., Matsuoka, T.A., Kimura, T., Obata, A., Shimoda, M., Kamei, S., Mune, T., and Kaku, K. (2016). Appropriate therapy for type 2 diabetes mellitus in view of pancreatic beta-cell glucose toxicity: "the earlier, the better". *J. Diabetes* 8, 183-189.

Kanno, A., Asahara, S.I., Kawamura, M., Furubayashi, A., Tsuchiya, S., Suzuki, E., Takai, T., Koyanagi-Kimura, M., Matsuda, T., Okada, Y., *et al.* (2019). Early administration of dapagliflozin preserves pancreatic beta-cell mass through a legacy effect in a mouse model of type 2 diabetes. *J. Diabetes. Investig.* *10*, 577-590.

Kawashima, S., Matsuoka, T.A., Kaneto, H., Tochino, Y., Kato, K., Yamamoto, K., Yamamoto, T., Matsuhisa, M., and Shimomura, I. (2011). Effect of alogliptin, pioglitazone and glargine on pancreatic beta-cells in diabetic db/db mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *404*, 534-540.

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.

Kimura, T., Kaneto, H., Shimoda, M., Hirukawa, H., Okauchi, S., Kohara, K., Hamamoto, S., Tawaramoto, K., Hashiramoto, M., and Kaku, K. (2015). Protective effects of pioglitazone and/or liraglutide on pancreatic beta-cells in db/db mice: Comparison of their effects between in an early and advanced stage of diabetes. *Mol. Cell Endocrinol.* *400*, 78-89.

Kimura, T., Obata, A., Shimoda, M., Okauchi, S., Kanda-Kimura, Y., Nogami, Y., Moriuchi, S., Hirukawa, H., Kohara, K., Nakanishi, S., *et al.* (2018). Protective effects of the SGLT2 inhibitor luseogliflozin on pancreatic beta-cells in db/db mice: The earlier and longer, the better. *Diabetes Obes. Metab.* *20*, 2442-2457.

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.

Kjørholt, C., Akerfeldt, M.C., Biden, T.J., and Laybutt, D.R. (2005). Chronic hyperglycemia, independent of plasma lipid levels, is sufficient for the loss of beta-cell differentiation and secretory function in the db/db mouse model of diabetes. *Diabetes* *54*, 2755-2763.

Kleiner, D.E., Brunt, E.M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M.J., Cummings, O.W., Ferrell, L.D., Liu, Y.C., Torbenson, M.S., Unalp-Arida, A., *et al.* (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* *41*, 1313-1321.

Komiya, C., Tsuchiya, K., Shiba, K., Miyachi, Y., Furuke, S., Shimazu, N., Yamaguchi, S., Kanno, K., and Ogawa, Y. (2016). Ipragliflozin Improves Hepatic Steatosis in Obese Mice and Liver Dysfunction in Type 2 Diabetic Patients Irrespective of Body Weight Reduction. *PLoS One* *11*, e0151511.

Kubota, N., Terauchi, Y., Tobe, K., Yano, W., Suzuki, R., Ueki, K., Takamoto, I., Satoh, H., Maki, T., Kubota, T., *et al.* (2004). Insulin receptor substrate 2 plays a crucial role in beta cells and the hypothalamus. *J. Clin. Invest.* *114*, 917-927.

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.

Kuchay, M.S., Krishan, S., Mishra, S.K., Farooqui, K.J., Singh, M.K., Wasir, J.S., Bansal, B., Kaur, P., Jevalikar, G., Gill, H.K., *et al.* (2018). Effect of Empagliflozin on Liver Fat in Patients With Type 2 Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized Controlled Trial (E-LIFT Trial). *Diabetes Care* 41, 1801-1808.

Lee, Y.J., Ko, E.H., Kim, J.E., Kim, E., Lee, H., Choi, H., Yu, J.H., Kim, H.J., Seong, J.K., Kim, K.S., *et al.* (2012). Nuclear receptor PPARgamma-regulated monoacylglycerol O-acyltransferase 1 (MGAT1) expression is responsible for the lipid accumulation in diet-induced hepatic steatosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 13656-13661.

Li, X., Cheng, K.K.Y., Liu, Z., Yang, J.K., Wang, B., Jiang, X., Zhou, Y., Hallenborg, P., Hoo, R.L.C., Lam, K.S.L., *et al.* (2016). The MDM2-p53-pyruvate carboxylase signalling axis couples mitochondrial metabolism to glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic β -cells. *Nat. Commun.* 7, 11740.

Marinho, T.S., Kawasaki, A., Bryntesson, M., Souza-Mello, V., Barbosa-da-Silva, S., Aguila, M.B., and Mandarim-de-Lacerda, C.A. (2017). Rosuvastatin limits the activation of hepatic stellate cells in diet-induced obese mice. *Hepatol Res* 47, 928-940.

Matschinsky, F.M. (2013). GKAs for diabetes therapy: why no clinically useful drug after two decades of trying? *Trends Pharmacol. Sci.* 34, 90-99.

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.

Matsuoka, T.A., Kaneto, H., Kawashima, S., Miyatsuka, T., Tochino, Y., Yoshikawa, A., Imagawa, A., Miyazaki, J., Gannon, M., Stein, R., *et al.* (2015). Preserving Maf expression in diabetic islet β -cells improves glycemic control in vivo. *J. Biol. Chem.* 290, 7647-7657.

Meininger, G.E., Scott, R., Alba, M., Shentu, Y., Luo, E., Amin, H., Davies, M.J., Kaufman, K.D., and Goldstein, B.J. (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.

Montemurro, C., Nomoto, H., Pei, L., Parekh, V.S., Vongbunyong, K.E., Vadrevu, S., Gurlo, T., Butler, A.E., Subramaniam, R., Ritou, E., *et al.* (2019). IAPP toxicity activates HIF1 α /PDKFB3 signaling delaying β -cell loss at the expense of β -cell function. *Nat. Commun.* 10, 2679.

Nagata, T., Fukuzawa, T., Takeda, M., Fukazawa, M., Mori, T., Nihei, T., Honda, K.,

- Suzuki, Y., and Kawabe, Y. (2013). Tofogliflozin, a novel sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor, improves renal and pancreatic function in db/db mice. *Br. J. Pharmacol.* *170*, 519-531.
- Nakamura, A., Shimazaki, H., Ohyama, S., Eiki, J., and Terauchi, Y. (2011). Effect of long-term treatment with a small-molecule glucokinase activator on glucose metabolism, lipid profiles and hepatic function. *J. Diabetes Investig.* *2*, 276-279.
- Nakamura, A., and Terauchi, Y. (2015). Present status of clinical deployment of glucokinase activators. *J. Diabetes Investig.* *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.
- Neal, B., Perkovic, V., Mahaffey, K.W., de Zeeuw, D., Fulcher, G., Erond, N., Shaw, W., Law, G., Desai, M., and Matthews, D.R. (2017). Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* *377*, 644-657.
- Obata, A., Kubota, N., Kubota, T., Iwamoto, M., Sato, H., Sakurai, Y., Takamoto, I., Katsuyama, H., Suzuki, Y., Fukazawa, M., *et al.* (2016). Tofogliflozin Improves Insulin Resistance in Skeletal Muscle and Accelerates Lipolysis in Adipose Tissue in Male Mice. *Endocrinology* *157*, 1029-1042.
- Okauchi, S., Shimoda, M., Obata, A., Kimura, T., Hirukawa, H., Kohara, K., Mune, T., Kaku, K., and Kaneto, H. (2016). Protective effects of SGLT2 inhibitor luseogliflozin on pancreatic beta-cells in obese type 2 diabetic db/db mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *470*, 772-782.
- Osbak, K.K., Colclough, K., Saint-Martin, C., Beer, N.L., Bellanné-Chantelot, C., Ellard, S., and Gloyn, A.L. (2009). Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia. *Hum. Mutat.* *30*, 1512-1526.
- Poitout, V., and Robertson, R.P. (2008). Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev.* *29*, 351-366.
- Polidori, D., Mari, A., and Ferrannini, E. (2014). Canagliflozin, a sodium glucose co-transporter 2 inhibitor, improves model-based indices of beta cell function in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* *57*, 891-901.
- 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.
- Prentki, M., Peyot, M.L., Masiello, P., and Madiraju, S.R.M. (2020). Nutrient-Induced Metabolic Stress, Adaptation, Detoxification, and Toxicity in the Pancreatic β -Cell. *Diabetes* 69, 279-290.
- Rahimian, R., Masih-Khan, E., Lo, M., van Breemen, C., McManus, B.M., and Dubé, G.P. (2001). Hepatic over-expression of peroxisome proliferator activated receptor gamma2 in the ob/ob mouse model of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Mol. Cell Biochem.* 224, 29-37.
- Rhodes, C.J. (2005). Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science* 307, 380-384.
- Robertson, R.P. (2004). Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J. Biol. Chem.* 279, 42351-42354.
- 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.
- Sakuraba, H., Mizukami, H., Yagihashi, N., Wada, R., Hanyu, C., and Yagihashi, S. (2002). Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. *Diabetologia* 45, 85-96.
- Salunkhe, V.A., Veluthakal, R., Kahn, S.E., and Thurmond, D.C. (2018). Novel approaches to restore beta cell function in prediabetes and type 2 diabetes. *Diabetologia* 61, 1895-1901.
- Schadinger, S.E., Bucher, N.L., Schreiber, B.M., and Farmer, S.R. (2005). PPARgamma2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol. Metab.* 288, E1195-1205.
- Schisler, J.C., Fueger, P.T., Babu, D.A., Hohmeier, H.E., Tessem, J.S., Lu, D., Becker, T.C., Naziruddin, B., Levy, M., Mirmira, R.G., *et al.* (2008). Stimulation of human and rat islet beta-cell proliferation with retention of function by the homeodomain transcription factor Nkx6.1. *Mol. Cell Biol.* 28, 3465-3476.
- Shao, Y., Yuan, G., Feng, Y., Zhang, J., and Guo, X. (2014). Early liraglutide treatment is better in glucose control, beta-cell function improvement and mass preservation in db/db mice. *Peptides* 52, 134-142.

Soga, T., and Heiger, D.N. (2000). Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 72, 1236-1241.

Soga, T., Ohashi, Y., Ueno, Y., Naraoka, H., Tomita, M., and Nishioka, T. (2003). Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 2, 488-494.

Soga, T., Ueno, Y., Naraoka, H., Ohashi, Y., Tomita, M., and Nishioka, T. (2002). Simultaneous determination of anionic intermediates for *Bacillus subtilis* metabolic pathways by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 74, 2233-2239.

Takahashi, K., Nakamura, A., Miyoshi, H., Nomoto, H., Kitao, N., Omori, K., Yamamoto, K., Cho, K.Y., Terauchi, Y., and Atsumi, T. (2018). Effect of the sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor luseogliflozin on pancreatic beta cell mass in db/db mice of different ages. *Sci. Rep.* 8, 6864.

Takase, T., Nakamura, A., Miyoshi, H., Yamamoto, C., and Atsumi, T. (2017). Amelioration of fatty liver index in patients with type 2 diabetes on ipragliflozin: an association with glucose-lowering effects. *Endocr. J.* 64, 363-367.

Taylor, B.L., Liu, F.F., and Sander, M. (2013). Nkx6.1 is essential for maintaining the functional state of pancreatic beta cells. *Cell Rep.* 4, 1262-1275.

Taylor, S.I. (1999). Deconstructing type 2 diabetes. *Cell* 97, 9-12.

Terami, N., Ogawa, D., Tachibana, H., Hatanaka, T., Wada, J., Nakatsuka, A., Eguchi, J., Horiguchi, C.S., Nishii, N., Yamada, H., *et al.* (2014). Long-term treatment with the sodium glucose cotransporter 2 inhibitor, dapagliflozin, ameliorates glucose homeostasis and diabetic nephropathy in db/db mice. *PLoS One* 9, e100777.

Terauchi, Y., Sakura, H., Yasuda, K., Iwamoto, K., Takahashi, N., Ito, K., Kasai, H., Suzuki, H., Ueda, O., Kamada, N., *et al.* (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.

Thomas, L., Grempler, R., Eckhardt, M., Himmelsbach, F., Sauer, A., Klein, T., Eickelmann, P., and Mark, M. (2012). Long-term treatment with empagliflozin, a novel, potent and selective SGLT-2 inhibitor, improves glycaemic control and features of metabolic syndrome in diabetic rats. *Diabetes Obes. Metab.* 14, 94-96.

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 Metab.* *19*, 109-121.

Vallon, V. (2015). The mechanisms and therapeutic potential of SGLT2 inhibitors in diabetes mellitus. *Annu Rev Med* *66*, 255-270.

van Raalte, D.H., and Verchere, C.B. (2017). Improving glycaemic control in type 2 diabetes: Stimulate insulin secretion or provide beta-cell rest? *Diabetes Obes. Metab.* *19*, 1205-1213.

Vetere, A., Choudhary, A., Burns, S.M., and Wagner, B.K. (2014). Targeting the pancreatic β -cell to treat diabetes. *Nat. Rev. Drug Discov.* *13*, 278-289.

Washburn, W.N. (2009). Development of the renal glucose reabsorption inhibitors: a new mechanism for the pharmacotherapy of diabetes mellitus type 2. *J. Med. Chem.* *52*, 1785-1794.

Wei, P., Shi, M., Barnum, S., Cho, H., Carlson, T., and Fraser, J.D. (2009). Effects of glucokinase activators GKA50 and LY2121260 on proliferation and apoptosis in pancreatic INS-1 beta cells. *Diabetologia* *52*, 2142-2150.

Weng, J., Li, Y., Xu, W., Shi, L., Zhang, Q., Zhu, D., Hu, Y., Zhou, Z., Yan, X., Tian, H., *et al.* (2008). Effect of intensive insulin therapy on beta-cell function and glycaemic control in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a multicentre randomised parallel-group trial. *Lancet* *371*, 1753-1760.

Werman, A., Hollenberg, A., Solanes, G., Bjorbaek, C., Vidal-Puig, A.J., and Flier, J.S. (1997). Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). Differential activity of PPARgamma1 and -2 isoforms and influence of insulin. *J. Biol. Chem.* *272*, 20230-20235.

Wilding, J.P., 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.

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.

Xu, J., Han, J., Long, Y.S., Epstein, P.N., and Liu, Y.Q. (2008). The role of pyruvate carboxylase in insulin secretion and proliferation in rat pancreatic beta cells. *Diabetologia* *51*, 2022-2030.

Yamamoto, C., Miyoshi, H., Ono, K., Sugawara, H., Kameda, R., Ichiyama, M., Yamamoto, K., Nomoto, H., Nakamura, A., and Atsumi, T. (2016). Ipragliflozin effectively reduced visceral fat in Japanese patients with type 2 diabetes under adequate diet therapy. *Endocr. J.* *63*, 589-596.

Zaccardi, F., Webb, D.R., Htike, Z.Z., Youssef, D., Khunti, K., and Davies, M.J. (2016). Efficacy and safety of sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors in type 2 diabetes mellitus: systematic review and network meta-analysis. *Diabetes Obes. Metab.* 18, 783-794.

Zinman, B., Wanner, C., Lachin, J.M., Fitchett, D., Bluhmki, E., Hantel, S., Mattheus, M., Devins, T., Johansen, O.E., Woerle, H.J., *et al.* (2015). Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* 373, 2117-2128.