



Title	膵β細胞におけるPFKFB3依存的代謝適応機構
Author(s)	千葉, 幸輝
Description	配架番号 : 2997
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16904号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16904
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99749
Type	doctoral thesis
File Information	CHIBA_Koki.pdf, 全文



学位論文

膵 β 細胞における PFKFB3 依存的代謝適応機構
(Metabolic adaptation to acute metabolic stress via PFKFB3
upregulation in rodent beta cells)

2026 年 3 月

北海道大学

千葉 幸輝

Koki Chiba

学位論文

膵 β 細胞における PFKFB3 依存的代謝適応機構
(Metabolic adaptation to acute metabolic stress via PFKFB3
upregulation in rodent beta cells)

2026 年 3 月

北海道大学

千葉 幸輝

Koki Chiba

目次

1. 発表論文目録及び学会発表目録	1
2. 要旨	3
3. 略語表	6
4. 緒言	7
5. 目的	10
6. 対象と方法	14
6.1 研究デザイン	14
6.1.1 グルコース刺激が細胞内代謝変化に与える影響	14
6.1.2 細胞内代謝変化の可変性	14
6.1.3 細胞内代謝変化への介入	15
6.2 動物	15
6.3 飼料プロトコル	15
6.4 随時血糖値およびインスリンの測定	16
6.5 経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT)	16
6.6 INS-1 832/13 細胞培養	16
6.7 siRNA 導入	17
6.8 MTT アッセイ	17
6.9 脾の免疫組織染色 (酵素抗体法および蛍光抗体法)	17
6.10 脾島単離	20
6.11 遺伝子発現解析	20
6.12 ウェスタンブロッティング	22
6.13 細胞外フラックスアナライザーによる解析	24
6.14 統計解析	24
7. 結果	25
7.1 グルコース刺激が細胞内代謝変化に与える影響	25
7.2 細胞内代謝変化の可変性	47
7.3 細胞内代謝変化への介入	67
8. 考察	84
9. 結語	87
10. 結論	88
11. 謝辞	89
12. 利益相反	90
13. 引用文献	91

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に発表した。

1. Koki Chiba, Hiroshi Nomoto, Rimi Izumihara, Xinxin Zhang, Hiraku Kameda, Akinobu Nakamura, Tatsuya Atsumi. Increased PFKFB3-mediated glycolysis in rodent pancreatic beta cells under diabetic condition is reversible and may compensate for glucose intolerance. *Frontiers in Endocrinology*, 2025. 17;16:1552700

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Chiba K, Nomoto H, Izumihara R, Kameda H, Cho KY, Nakamura A, Miyoshi M, Atsumi T. Effect of Energy Restriction on the Intracellular Metabolism of Rodent Pancreatic β -cells in vitro and Obese Mice, 82th Scientific Sessions for American Diabetes Association. A virtual conference 3-7 June, 2022
2. Chiba K, Nomoto H, Izumihara R, Kameda H, Cho KY, Nakamura A, Miyoshi M, Atsumi T. Intracellular Metabolic Change in Rodent Pancreatic β -cells under Diabetic Condition is Flexible and May Compensate for Glucose Intolerance, 83th Scientific Sessions for American Diabetes Association. San Diego 22-28 June, 2023.
3. Chiba K, Nomoto H, Izumihara R, Kameda H, Nakamura A, Atsumi T. Intracellular Metabolic Change in Rodent Pancreatic β -cells under Diabetic Condition is Flexible and May Compensate for Glucose Intolerance, Asia Islet Biology and Incretin Symposium. Incheon, Korea 28-30 March, 2024
4. Chiba K, Nomoto H, Izumihara R, Kameda H, Nakamura A, Atsumi T. Increased expression of PFKFB3 in diabetic pancreatic β -cells may compensate for the maintenance of glucose metabolism, 84th Scientific Sessions for American Diabetes Association. Orlando 21-24 June, 2024.
5. 千葉幸輝、野本博司、泉原里美、亀田啓、曹圭龍、中村昭伸、三好秀明、渥美達也。「肥満糖尿病病態への介入は膵島の細胞内代謝変化を是正する」．第 65 回日本糖尿病年次学術集会、神戸、2022 年 5 月 12-14 日
6. 千葉幸輝、野本博司、泉原里美、亀田啓、曹圭龍、中村昭伸、三好秀明、渥美達也。「肥満糖尿病病態への介入による膵 β 細胞の細胞内代謝変化」．第 35 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、2022 年 5 月 21-22 日、Web 開催

7. 千葉幸輝、野本博司、泉原里美、亀田啓、曹圭龍、中村昭伸、三好秀明、渥美達也。「膵β細胞の細胞内代謝変化における可変性の検討」.第36回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、2023年2月17-18日
8. 千葉幸輝、野本博司、泉原里美、亀田啓、曹圭龍、中村昭伸、三好秀明、渥美達也。「肥満糖尿病病態における膵β細胞の細胞内代謝変化」.第58回日本臨床分子医学会、東京、2023年4月14-15日
9. 千葉幸輝、野本博司、泉原里美、亀田啓、曹圭龍、中村昭伸、三好秀明、渥美達也。「肥満糖尿病病態への介入は膵島の細胞内代謝変化を是正する」.第66回日本糖尿病年次学術集会、鹿児島、2023年5月11-13日
10. 千葉幸輝、野本博司、泉原里美、亀田啓、曹圭龍、中村昭伸、渥美達也。「糖尿病病態下の膵β細胞において解糖系酵素 PFKFB3 の抑制はインスリン分泌および耐糖能を増悪させる」.第34回分子糖尿病学シンポジウム、仙台、2023年12月2日
11. 千葉幸輝、野本博司、泉原里美、亀田啓、中村昭伸、渥美達也。「膵β細胞において糖尿病病態で亢進している HIF1 α /PFKFB3 経路の抑制はインスリン分泌および耐糖能を増悪させる」.第37回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、東京、2024年3月15-16日
12. 千葉幸輝、野本博司、泉原里美、亀田啓、中村昭伸、渥美達也。「糖尿病病態下の膵β細胞における解糖系酵素 PFKFB3 の活性化は代償的に耐糖能維持に寄与している」.第58回日本臨床分子医学会、YIAセッション、東京、2024年4月12-13日
13. 千葉幸輝、野本博司、泉原里美、亀田啓、中村昭伸、渥美達也。「糖尿病病態下の膵β細胞における解糖系酵素 PFKFB3 の抑制はインスリン分泌および耐糖能を増悪させる」.第67回日本糖尿病年次学術集会、YIAセッション、東京、2024年5月17-19日

2. 要旨

【背景と目的】

糖尿病における膵 β 細胞の機能低下は、インスリン分泌不全と強く関係しており、その分子基盤の解明は重要な課題である。従来、慢性高血糖環境や脂肪酸過剰環境による持続的な代謝ストレスが膵 β 細胞の構造的・機能的障害を引き起こすと考えられてきたが、糖尿病発症初期における膵 β 細胞の代謝動態については未解明の部分が多い。糖尿病病態下での膵 β 細胞では、種々の代謝ストレスがミトコンドリアの機能障害を惹起し、酸化リン酸化を低下させること、また膵 β 細胞内の細胞内代謝が酸化リン酸化から解糖系にシフトすることが知られている。この細胞内代謝変化に解糖系酵素 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3(PFKFB3)の活性化の関与が示唆されているが、その可変性および生理的意義は不明である。本研究では糖尿病病態下での PFKFB3 活性化と関連する細胞内代謝変化について、細胞実験ならびに肥満糖尿病動物への種々の介入を用いて検討し、特に急性代謝ストレスに対する膵 β 細胞の代謝的適応応答に注目した。

【対象と方法】

細胞内代謝変化の評価 : 1.1) INS-1 832/13 細胞、C57BL/6J 雄性マウスの単離膵島を 5.5 mM グルコース濃度の低グルコース環境 (低 G:glucose 群)、11 mM、ないし 22 mM グルコース濃度の高 G 環境 (高 G 群) 下で 48 時間培養し、遺伝子・タンパク質の発現変化を解析した。さらに細胞外フラックスアナライザーを用いてミトコンドリア機能を解析した。1.2)6-10 週齢まで普通食 CE-2 の自由摂餌下で飼育した肥満を呈さない雄性 ob/+マウス (対照群) および肥満 2 型糖尿病モデルマウスである雄性 ob/ob マウス (自由摂餌群) に加え、CE-2 を 2g/日の摂餌量に制限した群 (摂餌制限群) を設定した。体重・血糖値の測定に加え、経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT: oral glucose tolerance test) を用いて耐糖能を評価した。10 週齢時点で膵組織の免疫染色、単離膵島から抽出されたタンパク質を用いたウェスタンブロット法にて PFKFB3 発現の検討を行った。

細胞内代謝変化の可変性 : 2.1) INS-1 832/13 細胞、C57BL/6J 雄性マウスの単離膵島を 5.5 mM グルコース濃度の低 G 環境 (低 G 群) ないし 22 mM グルコース濃度の高 G 環境 (高 G 群) で 48 時間、高 G 環境で 24 時間培養した後に低 G 濃度に変更してさらに 24 時間培養し、遺伝子・タンパク質の発現変化を解析した。さらに細胞外フラックスアナライザーを用いてミトコンドリア機能を解析した。2.2)8 週齢の ob/ob マウスを自由摂餌群、摂餌制限群、自由摂餌下で sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor(SGLT2i)を投与した群 (SGLT2i 群) に分け飼育し、体重・血糖値の測定に加え、OGTT を用いて耐糖能を評価した。12 週齢時点で膵組織の免疫染色、単離膵島から抽出されたタンパク質を用いたウェスタンブロット

法にて PFKFB3 発現の検討を行った。

細胞内代謝変化への介入：3.1) INS-1 832/13 細胞を PFKFB3 阻害薬 3PO(3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one)あるいは PFKFB3 siRNA の投与別に、低 G 環境ないし高 G 環境で 48 時間培養し、遺伝子発現とグルコース応答性インスリン分泌を比較した。3.2) C57B6/J マウスに Streptozotocin(STZ)を投与する群(STZ 群)と STZ および 3PO を投与する群(STZ+3PO 群)を設定した。OGTT を用いて耐糖能の評価を行い、免疫染色で膵島の MafA 発現を評価した。

【結果】

1.1)高 G 群で PFKFB3 を含む解糖系酵素の発現が亢進し、ミトコンドリア機能は低下した。1.2)自由摂餌群で体重増加および耐糖能増悪を認め、膵島での PFKFB3 を含む解糖系酵素群の発現は上昇したが、一方で体重・耐糖能が悪化しなかった摂餌制限群では変化を認めなかった。2.1)高 G 群で PFKFB3 を含む解糖系酵素の発現が亢進し、ミトコンドリア機能は低下したが、これらの変化は低 G 環境では是正された。2.2)自由摂餌群で体重増加および耐糖能の増悪を認め、膵島での PFKFB3 の発現は上昇したが、摂餌制限群および SGLT2i 群ではこれらの変化は是正された。3.1)3PO および si-PFKFB3 の導入により Pfkfb3 の発現は抑制された。高 G 環境下で Pdx-1、Mafa の発現は低下し、Pfkfb3 の抑制はこの変化に影響を及ぼさなかった。Pfkfb3 のノックダウンにより高 G 刺激時のインスリン分泌が低下した。さらに、3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, yellow tetrazole(MTT)アッセイでは Pfkfb3 ノックダウン群の相対細胞活性が時間依存的に低下した。3.2)STZ 群と STZ+3PO 群では体重差はなかったが、STZ+3PO 群で随時血糖値は高値で、耐糖能の増悪を認めた。STZ 群で膵島の PFKFB3 発現は亢進したが、STZ+3PO 群で PFKFB3 の発現は低下した。膵 β 細胞における MafA の発現には群間差を認めなかった。

【考察】

急性代謝ストレス下では、PFKFB3 を介した解糖系亢進が短期的な適応応答として細胞生存維持とインスリン分泌に寄与し、PFKFB3 の抑制はインスリン分泌および耐糖能を悪化させた。一方、この亢進した PFKFB3 発現は摂餌制限や SGLT2 阻害薬投与などにより可変的に低減し、慢性的な過活性化は膵 β 細胞機能低下を招きうる可能性が示唆された。すなわち、膵 β 細胞における PFKFB3 に関連した細胞内代謝変化は時間依存的に適応と不適応の様相が変化し得ると考えられた。このため、糖尿病病態における PFKFB3 経路への解釈や介入においては急性期と慢性期を明確に区別し、時間軸を踏まえた評価が重要である。

【結語】

急性の代謝ストレス下における PFKFB3 の発現亢進は、膵 β 細胞機能を維持するための適応的応答である可能性がある。PFKFB3 活性の抑制はインスリン分

泌および耐糖能を損ない、この経路が一過性の代謝ストレスに対する適応において重要な役割を果たすことを示唆する。

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.

3PO	3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one
ADP	Adenosine diphosphate
ATP	adenosine triphosphate
AUC	area under the blood glucose concentration curve
DMSO	dimethyl sulfoxide
FCCP	carbonyl cyanide p-trifluoro methoxyphenylhydrazine
FBS	fetal bovine serum
G	glucose
HIF	hypoxia-inducible factor
HK1	hexokinase 1
LDHA	Lactate dehydrogenase A
Mafa	v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A
MTT	3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, yellow tetrazole
NS	not significant
OCR	oxygen consumption rate
OGTT	oral glucose tolerance test
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
Pdx-1	pancreatic and duodenal homeobox 1
PFKFB3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3
PS	physiological saline
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SGLT2i	sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor
STZ	streptozotocin
TCA	tricarboxylic acid

4. 緒言

糖尿病におけるインスリン分泌低下は、膵 β 細胞の機能低下と細胞数減少に起因する(Butler et al, 2003; MacDonald et al, 2005; Marrano et al, 2020)。これらの変化を調節するメカニズムを明らかにすることは、糖尿病の病態生理を理解するために重要である。先行研究によれば、非糖尿病ラットの膵島では、膵 β 細胞内に取り込まれたグルコースがピルビン酸に代謝され、その後、tricarboxylic acid(TCA) 回路と酸化リン酸化で利用されることで adenosine triphosphate(ATP)/adenosine diphosphate(ADP)比が上昇する。ATP/ADP 比の上昇は ATP 感受性 K^+ チャネルを閉鎖し、膜脱分極、電位依存性 Ca^{2+} チャネルの開口、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を介してインスリン顆粒の開口放出を誘導する(Henquin, 2000; Henquin, 2009)。すなわち、グルコース代謝の変化が電気生理学的変化とインスリン分泌反応へ連動する一連の機序により、グルコース刺激インスリン分泌が成立する(図 1)。一方、肥満やインスリン抵抗性に伴う高血糖状態の持続、あるいは炎症性サイトカイン曝露などの代謝ストレス環境下では、膵 β 細胞で酸化リン酸化の低下と解糖系への依存亢進がしばしば観測され、細胞内代謝の偏り（細胞内代謝リモデリング）が生じることが示されている(Sasaki et al, 2013; Montemurro et al, 2019)。低酸素誘導因子 Hypoxia inducible factor-1 α (HIF1 α)と、6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3(PFKFB3)は、このような代謝変化に関与する中心的な分子群として位置づけられる。代謝ストレス条件下では TCA 回路活性の低下や TCA 回路中間代謝産物（コハク酸、フマル酸など）の蓄積を介して、HIF1 α を水酸化して分解へ導く HIF1 α プロリン水酸化酵素の活性が低下し得る。その結果、HIF1 α が安定化して PFKFB3 の発現が亢進することが報告されている。その後、PFKFB3 がフルクトース-2,6-ビスリン酸を合成し、解糖酵素であるホスホフルクトキナーゼ-1 を活性化することで、解糖経路での細胞内グルコースの利用を促進する(Minchenko et al, 2002; Houddane et al, 2017)。PFKFB3 はフルクトース-2,6-ビスリン酸の産生を介してホスホフルクトキナーゼ-1 活性を調節することから、解糖系の制御における主要因子（マスターレギュレーター）として理解される(図 2)。

慢性的な代謝ストレス環境下で見られる膵 β 細胞における HIF1 α /PFKFB3 経路の活性化は細胞生存の維持に寄与する可能性が指摘される一方で、グルコース刺激応答性を中心とするインスリン分泌機能の低下を伴い得ることが報告されている。例えば、高グルコース刺激条件下や肥満糖尿病病態の膵 β 細胞では、酸素消費速度の低下や乳酸産生の増加などを背景に、グルコース刺激インスリン分泌が優位に低下する一方、基礎インスリン分泌の相対的増加を示す所見が

報告されている(Roche et al, 1997; Bensellam et al, 2009; Montemurro et al, 2019)。また、炎症性サイトカイン(IL-1 β 、TNF- α など)の負荷においても HIF1 α /PFKFB3 経路の活性化により、膵 β 細胞死が抑制され得る一方で、グルコース刺激応答性が障害され得ることが示されている(Puri et al, 2009; Nomoto et al, 2020)。これらの所見は、PFKFB3 を介した解糖系優位の細胞内代謝変化が、細胞生存の観点では有利に働き得る一方、グルコース刺激に対するインスリン分泌応答性を損なう可能性を示している。

膵 β 細胞の機能維持には、上記の代謝機序に加え、細胞の成熟性・機能的同一性を規定する転写因子群が重要である。Pancreatic and duodenal homeobox 1(Pdx-1)および v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A(MafA)は、成熟膵 β 細胞におけるインスリン遺伝子発現とグルコース刺激応答性分泌を支える主要な転写因子として知られ(図 3)、代謝ストレス条件下ではこれらの発現低下がグルコース刺激インスリン分泌と関連して報告されている(Yang YP et al, 2017; Zhang C et al, 2005)。したがって、PFKFB3 経路の活性化が、インスリン分泌の「量」と「グルコース刺激に対する応答性」さらに、Pdx-1/MafA の発現維持にどのように関与するかを、時間的経過を踏まえて整理することは病態理解において重要である。

しかし、既報の多くは慢性の代謝ストレス環境における所見を中心としており、PFKFB3 発現亢進が生じる急性代謝ストレス期における PFKFB3 の機能的意義およびストレス軽減(摂餌制限や薬理的介入)による可変性については、十分に体系化されていない。また、膵島内で PFKFB3 高発現細胞と低発現細胞が混在することが報告され(Sasaki et al, 2013; Montemurro et al, 2019)、細胞間不均一性が示唆される一方で、その病態意義やインスリン分泌表現型との関連は明らかとなっていない。さらに、PFKFB3 抑制がインスリン分泌の「量」に与える影響と、「グルコース刺激応答性」に与える影響を明確に区別して検討した報告は限られる。本研究はこれらの課題を踏まえ、急性の代謝ストレス環境に焦点を当て、PFKFB3 を介した細胞内代謝変化の時間的依存性と可変性を、細胞実験および動物実験の両面から検証した。運用上、本研究では代謝ストレスの時間軸を実験系ごとに定義した。細胞実験では高グルコースなどの曝露が 24-72 時間の条件を急性代謝ストレスとした。動物実験では、肥満・高血糖を中心とする代謝ストレスを惹起する条件およびそれを軽減する介入条件を含め、4 週間の観察期間で評価する系を短期代謝ストレスとして扱い、その初期相(急性期)に生じる PFKFB3 発現亢進の意義、摂餌制限や SGLT2 阻害薬などの介入による可変性、PFKFB3 抑制がインスリンの「量」と「グルコース刺激応答性」に及ぼす影響、ならびに Pdx-1/MafA 発現との関係性を評価し、膵 β 細胞における PFKFB3 依存の代謝適応を時間軸の観点から整理することを目的とした。本研究の新規性は、

PFKFB3 を中心とする代謝変化を静的な現象としてではなく、急性期の適応と慢性期の不適応をつなぐ動的過程として捉え、その可変性と介入可能性を、インスリン分泌機能および転写因子レベルの両面から実証的に示す点にある。

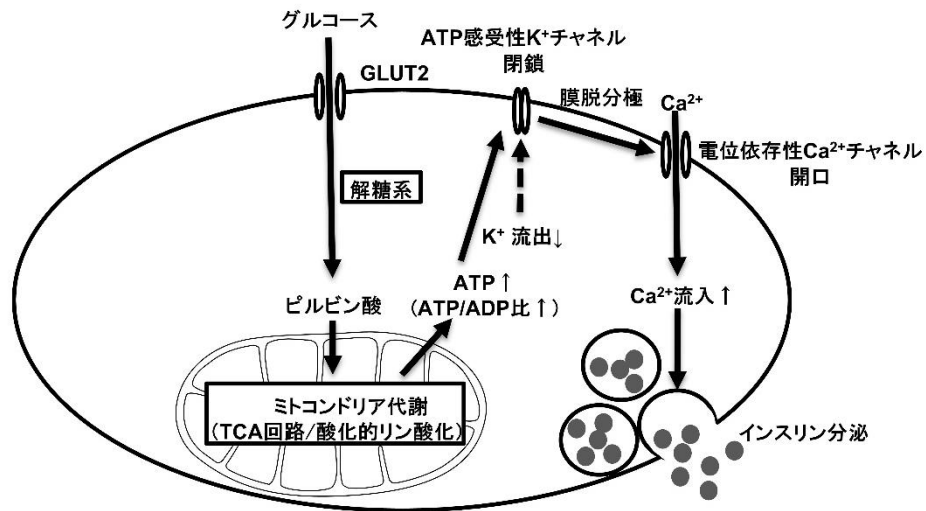


図 1. グルコース刺激インスリン分泌の機序概要

膵 β 細胞に取り込まれたグルコースは解糖系を経てピルビン酸となり、TCA 回路および酸化的リン酸化により、ATP/ADP 比を上昇させる。ATP/ADP 比の上昇は ATP 感受性 K^+ チャネルを閉鎖し、膜脱分極、電位依存性 Ca^{2+} チャネル開口、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を介してインスリン顆粒の開口放出を誘導する。ADP, adenosine diphosphate; ATP, adenosine triphosphate; GLUT2, glucose transporter 2; TCA, tricarboxylic acid

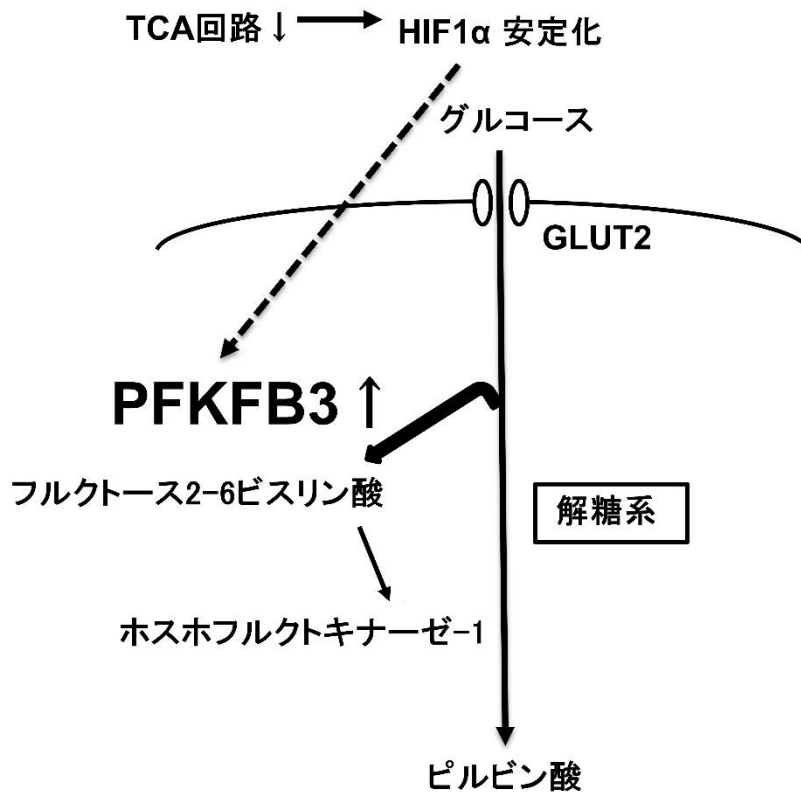


図 2. 代謝ストレス環境下における HIF1 α /PFKFB3 経路を介した細胞内代謝リモデリング

代謝ストレス条件下では TCA 回路が低下し、TCA 回路由来代謝産物であるコハク酸やフマル酸の増加などを介して、HIF1 α の分解に関与する HIF1 α プロリン水酸化酵素の活性が低下し得る。その結果、HIF1 α が安定化して PFKFB3 発現が亢進する。PFKFB3 はフルクトース-2,6-ビスリン酸を産生し、ホスホフルクトキナーゼ-1 を活性化することで解糖系フラックスを促進する。GLUT2, glucose transporter 2; HIF1 α , hypoxia inducible factor-1 α ; TCA, tricarboxylic acid; PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3

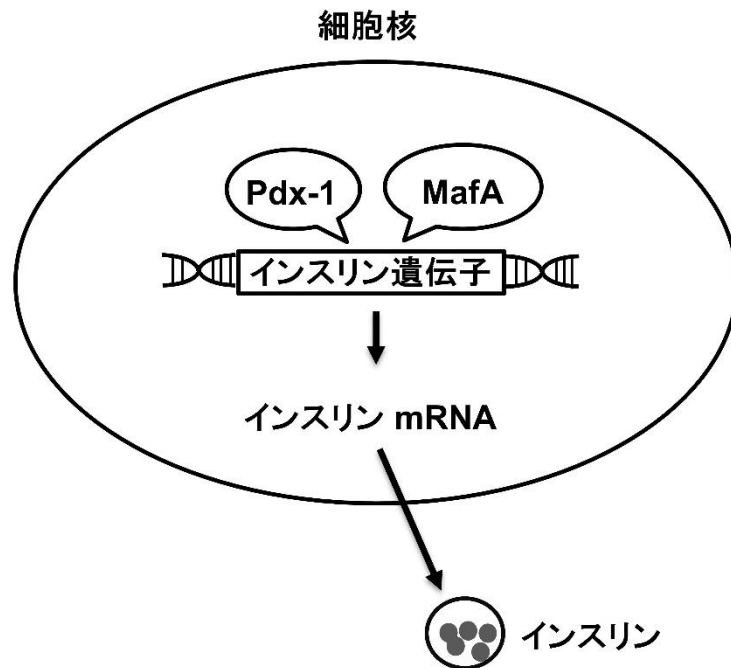


図 3. 膵 β 細胞の成熟性・機能的同一性を規定する転写因子 Pdx-1 および MafA とインスリン分泌機能

Pdx-1 および MafA は成熟膵 β 細胞においてインスリン遺伝子発現およびグルコース刺激に対するインスリン分泌応答性を支持する主要な転写因子である。代謝ストレス環境下ではこれらの発現が低下し、グルコース刺激インスリン分泌不全と関連することが報告されている。Pdx-1, pancreatic and duodenal homeobox 1; Mafa, v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A

5. 目的

本研究は、糖尿病病態下における膵 β 細胞の細胞内代謝変化の可変性を検討し、これらの変化が糖尿病の病態生理において持つ意義を明らかにすることを目的とした。

6. 対象と方法

6.1 研究デザイン

6.1.1 グルコース刺激が細胞内代謝変化に与える影響

6.1.1.1) INS-1 832/13 細胞、C57BL/6J 雄性マウスの単離膵島を 10% fetal bovine serum(FBS: Gibco BRL, Paisley, UK)を含む Roswell Park Memorial Institute(RPMI) 培地で、5.5 mM グルコース濃度の低グルコース環境（低 G 群）、または 11 mM ないし 22 mM グルコース濃度の高 G 環境（高 G 群）下で 48 時間培養し、Real-time polymerase chain reaction(PCR)法・ウェスタンブロット法・細胞外フラックスアナライザーを用いて遺伝子・タンパク質の発現変化およびミトコンドリア機能を解析した。

6.1.1.2) 6-10 週齢まで普通食 CE-2 の自由摂餌下で飼育した肥満を呈さない雄性 ob/+マウス（対照群）および肥満 2 型糖尿病モデルマウスである雄性 ob/ob マウス（自由摂餌群）に加え、CE-2 を 2g/日の摂餌量に制限した群（摂餌制限群）を設定した。体重・血糖値の測定に加え、経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT: oral glucose tolerance test) として 1.0mg/g のブドウ糖水溶液を投与して耐糖能を評価した。10 週齢時点で膵組織の免疫染色を行い、単離膵島のタンパク発現をウェスタンブロット法を用いて解析した。

6.1.2 細胞内代謝変化の可変性

6.1.2.1) INS-1 832/13 細胞、C57BL/6J 雄性マウスの単離膵島を 5.5 mM グルコース濃度の低 G 環境（低 G 群）ないし 22 mM グルコース濃度の高 G 環境（高 G 群）下で 48 時間、高 G 環境下で 24 時間培養した後に低 G 環境下に変更してさらに 24 時間培養し、Real-time PCR 法・ウェスタンブロット法・細胞外フラックスアナライザーを用いて遺伝子・タンパク質の発現変化およびミトコンドリア機能を解析した。

6.1.2.2) 8 週齢の ob/ob マウスを自由摂餌群、摂餌制限群、自由摂餌下で sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor(SGLT2i)であるトホグリフロジンを投与した群（SGLT2i 群）に分け飼育した。SGLT2i 群では CE-2 400g あたりトホグリフロジ

ン 0.06g を混合し、自由摂餌で投与した。体重・血糖値の測定に加え、OGTT を用いて耐糖能を評価した。12 週齢時点で膵組織の免疫染色を行い、単離膵島のタンパク発現をウェスタンブロット法を用いて解析した。

6.1.3 細胞内代謝変化への介入

6.1.3.1) INS-1 832/13 細胞を、低 G 環境下または高 G 環境下で PFKFB3 siRNA またはコントロール siRNA を導入して 48 時間培養した。Real-time PCR 法による遺伝子発現およびグルコース刺激によるインスリン分泌を比較した。

6.1.3.2) PFKFB3 阻害薬として、3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one (3PO) を使用し、streptozotocin(STZ)は膵臓 β 細胞障害を介して高血糖を呈する糖尿病モデルを誘発するために用いた。本研究では 16-20 週齢の雄 C57BL/6J マウスを以下の 3 つの方法で処置した：対照群は生理食塩水+dimethyl sulfoxide (DMSO) 群（5 日間の生理食塩水投与後に 2 週間隔日で DMSO を投与）、streptozotocin(STZ)+DMSO 群（5 日間 50 mg/kg/日の STZ 投与後に 2 週間隔日で DMSO を投与）、STZ+3PO 群（5 日間 50 mg/kg/日の STZ 投与後に 2 週間隔日で 50 μ g/g/日の 3PO を投与）。OGTT を用いて耐糖能の評価を行い、免疫染色で膵島の v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene(MafA)発現を評価した。

6.2 動物

6 週齢の雄性 BKS.B6.Cg-*Lep^{ob}*/J(ob/ob)、ob/+、C57BL/6J マウスを使用した（Oriental Yeast Co. Ltd., Tokyo, Japan）。1 ケージあたり 1 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行動および水道水の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。

6.3 飼料プロトコル

標準飼料 (MF; Oriental Yeast Co. Ltd., Tokyo, Japan) を使用した(Kitao et al, 2018)。SGLT2 阻害薬であるトホグリフロジンは、興和株式会社 (Tokyo, Japan) より提供された。

6.4 随時血糖値およびインスリンの測定

採血は尾静脈から行い、血糖測定にはグルテストミニト携帯型血糖計 (Sanwa Chemical Co., Nagoya, Japan) を使用して測定した。インスリンは血液サンプルから血漿を分離し、インスリン enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA) キット (Morinaga Institute of Biological Science, Yokohama, Japan) を用いて測定した (Nomoto et al, 2015)。抗体固相化プレートにモルモット抗インスリン血清を 95 μ L/well 分注し、標準液または検体を 5 μ L/well 添加した後、4 $^{\circ}$ C で 16-20 時間静置して一次反応を行った。翌日、各 well の内容液を除去し、希釈した洗浄液を用いて 300 μ L/well で 3 回洗浄した。続いて、調製した酵素標識抗モルモット IgG 抗体を 100 μ L/well で分注し、室温で 1 時間静置して二次反応を行った。反応後、内容液を除去し、洗浄液を用いて 300 μ L/well で 5 回洗浄した。その後、酵素基質液を 100 μ L/well 分注し、遮光下・室温で 30 分反応させた後、反応停止液を 100 μ L/well 加えて反応を停止した。吸光度はマイクロプレートリーダーで主波長 450nm (副波長 610-650nm) にて測定し、反応停止後 30 分以内に測定した。標準液の吸光度から標準曲線を作成し、検体中インスリン濃度を測定した。測定は二重測定で実施した。培養上清など血漿以外の飼料についても、同一キットを用いて同様に測定した。

6.5 経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT)

経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT) として 16 時間の絶食下において、1.0mg/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、120 分後に尾静脈から採血を行い、血糖値を測定した。血糖濃度曲線下面積 (AUC: area under the blood glucose concentration curve) は、ブドウ糖投与後 0~120 分のデータから算出した。

6.6 INS-1 832/13 細胞培養

Merck Millipore (Darmstadt, Germany) から購入したラット由来の膵 β 細胞株で

ある INS-1 832/13 細胞を、湿度調整された環境下で 37°C に保ち、10% FBS、1% ペニシリン・ストレプトマイシン、50 μ M β -メルカプトエタノール、1 mM ピルビン酸ナトリウム、10 mM 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid および 1% GlutaMAX (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を添加した RPMI-1640 培地で培養した。特に記載がない限り、11 mM のグルコース濃度で培養した。

6.7 siRNA 導入

INS-1 832/13 細胞を RPMI1640 培地 (11 mM グルコース濃度、10% FBS、37°C、5% CO₂) でプレインキュベーションした。Pfkfb3 のノックダウンには ON-TARGET plus Rat Pfkfb3 siRNA SMART pool (L-095107-02-0010, Horizon Discovery, Cambridge, UK) を、そのコントロールには ON-TARGET plus Non-targeting Pool (D-001810-10-20, Horizon Discovery) を使用した。トランスフェクションには Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) を使用し、Opti-MEM で希釈した。RNAiMAX 5 μ L + Opti-MEM 300 μ L と siRNA 0.6 μ L (20 μ M) + Opti-MEM 300 μ L をそれぞれ室温で 5 分静置後、1:1 で混和し室温で 20 分反応させた。この混合液を 5.5 mM または 22 mM グルコース濃度の RPMI1640 培地の各 well に 600 μ L ずつ添加し、最終 siRNA 濃度 20 nM で 48 時間培養した。培養後、細胞を回収し解析に用いた。

6.8 MTT アッセイ

細胞内代謝活性に対する Pfkfb3 ノックダウンの影響を評価するため、INS-1 832/13 細胞に Pfkfb3 特異的 siRNA をトランスフェクションし、11 mM グルコース含有培地で 24、48、72 時間培養した。細胞活性は、MTT アッセイキット (Cell Proliferation Kit I, Roche, Cat. No. 11465007001, Sigma-Aldrich) を用いて測定した。吸光度は 570 nm にてマイクロプレートリーダーで測定した。本アッセイは主としてミトコンドリア代謝活性を反映し、細胞生存性または増殖能の間接指標となり得る。

6.9 膵の免疫組織染色 (酵素抗体法および蛍光抗体法)

摘出した膵臓組織を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、4°Cで一晩固定した。組織をパラフィン包埋し、標準的な手法で 5 μ m の切片を作成した。酵素抗体法においては切片は内因性ペルオキシダーゼ活性を不活化するために、0.3%(v/v)H₂O₂を含むメタノールに 15 分間反応させた。phosphate-buffered saline (PBS)で洗浄後、ウサギ抗ヒトインスリン抗体(1:1000)(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)で免疫染色を行った。 β 細胞量は以下の式で算出した： β 細胞量(mg)=(β 細胞面積 / 膵臓面積) $\times$ 膵臓重量(mg)(Kitao et al, 2018; Nomoto et al, 2015)。免疫蛍光染色のため、組織切片を一次抗体(表 1)とともに 4°Cで一晩インキュベートした。PBS で洗浄後、二次抗体を用いて 60 分間インキュベートした(表 1)(Nomoto et al, 2015; Takahashi et al, 2018)。染色後、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-IIanalyzer ver.1.41(Keyence)を用いて写真の解析を行った。

表 1. 免疫組織学的染色に使用した抗体

1 次抗体				
Antigen	Species	Dilution	Manufacturer	Catalog#
Insulin	Guinea pig	1:1	Dako	IR002
PFKFB3	Rabbit	1:400	abcam	ab18186
MafA	Rabbit	1:250	Fortis Life Sciences	IHC-00352
2 次抗体				
Guinea pig IgG (Alexa Fluor 488)	Goat	1:200	Life Technologies	A11073
Rabbit IgG (Alexa Fluor 594)	Goat	1:200	Life Technologies	A11012

6.10 膵島単離

マウスを屠殺し、開腹したのち総胆管を露出させた。十二指腸乳頭部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 33.3mg/ml に希釈した collagenase(Sigma-Aldrich, St. Louis)を注入した。膨張した膵臓を切離し上部の 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 FBS を添加した反応停止液(Hanks' balanced salt solution:Sigma-Aldrich)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実験に使用した。

6.11 遺伝子発現解析

各マウスの膵臓から 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、10 mM dNTP(Promega, WI, USA)、Superscript®III、RNaseOUT, 5x Fast Standard Buffer(Life Technologies)を用いて complementary DNA(cDNA)を作成し、SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, 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表 2 に記載した。内因性コントロールとして β actin を用いた。

表 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
ラット	
β actin forward	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA
β actin reverse	GTCGTACCACTGGCATTGTG
PFKFB3 forward	CACGGCGAGAATGAGTACAA
PFKFB3 reverse	TTCAGCTGACTGGTCCACAC
MafA forward	CTTCAGCAAGGAGGAGGTCATC
MafA reverse	GCGTAGCCGCGGTTCTT
Pdx-1 forward	AGGAGGTGCATACGCAGCAG
Pdx-1 reverse	GAGGCCGGGAGATGTATTTGTT
マウス	
β actin forward	ATATCGCTGCGCTGGTCTGTC
β actin reverse	AGCACAGCCTGGATGGCTAC
PFKFB3 forward	AGAACTTCCACTCTCCCACCC
PFKFB3 reverse	AGGGTAGTGCCCATTGTTGAA
MafA forward	CTTCAGCAAGGAGGAGGTCATC
MafA reverse	GCGTAGCCGCGGTTCTT
Pdx-1 forward	CTCCGGACATCTCCCCATAC
Pdx-1 reverse	ACGGGTCCTCTTGTTTTCCT

6.12 ウェスタンブロッティング

各 INS-1 832/13 細胞およびマウスから分離した膵島を、プロテアーゼ阻害薬を添加した CellLytic M (Sigma Aldrich)で氷上で溶解し、13000rpm、3 分、4°C で遠心分離し、可溶性画分を回収した。BCA 法でタンパク質濃度を測定し、各レーンに 15 μ g をロードして 10%のポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。電気泳動後、Poly Vinylidene Fluoride (PVDF) membrane に転写した。Membrane は TBST (Tris buffered saline+0.1% Tween-20)で調整した 10%スキムミルクを使用し室温で 1 時間ブロッキングをした。1 次抗体を 4°C overnight でインキュベートした。TBST で洗浄後、2 次抗体を室温で 1 時間インキュベートした。使用した 1 次抗体および 2 次抗体は表 3 に示した。バンドは ImmunoStar LD ウェスタンブロッティング検出キット (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) で可視化し、LAS-4000 imager(Fujifilm, Tokyo, Japan)を使用して撮影した。内因性コントロールとして β actin を用い、ImageJ ソフトウェア (National Institutes of Health, Bethesda, USA) でバンド強度を定量化して β actin で正規化し、相対発現量を求めた。

表 3. ウェスタンブロッティングで使用した 1 次抗体および 2 次抗体

1 次抗体				
Antigen	Species	Dilution	Manufacturer	Catalog#
HIF1-alpha	Rabbit	1:1000	abcam	ab2185
PFKFB3	Rabbit	1:1000	abcam	ab181861
LDHA	Rabbit	1:1000	Cell signaling	2012S
HK1	Rabbit	1:1000	Cell signaling	2024T
GAPDH	Rabbit	1:1000	Cell signaling	2118S
β actin	Goat	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-1615
2 次抗体				
Goat anti Rabbit HRP	Goat	1:10000	Bio-Rad Laboratories	170-6515
Donkey anti Goat HRP	Donkey	1:10000	Santa Cruz Biotechnology	sc-2020

6.13 細胞外フラックスアナライザーによる解析

酸素消費率 (oxygen consumption rate:OCR) の測定は、細胞外フラックスアナライザーXF HS Mini(Agilent Technologies, CA, USA)を用いて行った。測定用培地はグルコース無添加 RPMI 培地 9.7ml に 1M グルコース溶液 100 μ L および L-グルタミン溶液 100 μ L を添加して調製し、37°Cで平衡化した。OCR を導出するためにそれぞれグルコース (5.5、11、22 mM) を添加し、ATP 合成酵素阻害剤オリゴマイシン A を添加して ATP-linked OCR を導出し、carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazine(FCCP)を添加して最大 OCR を導出し、ミトコンドリア複合体阻害剤ロテノン/アンチマイシン A を添加してミトコンドリア呼吸を遮断した。各条件は同一実験内で二重測定し、波形解析ソフトウェア (wave) により OCR を算出した。

6.14 統計解析

データは平均値 $\pm$ 標準偏差 (SD) で示した。3 群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 Bonferroni 法を用いて評価した。データは JMP Pro v17.0.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA)を使用して解析した。 $p < 0.05$ を統計的に有意とした。

7. 結果

7.1 グルコース刺激が細胞内代謝変化に与える影響

7.1.1 INS-1 832/13 細胞および C57B6/J マウスの単離膵島の検討

異なるグルコース濃度環境が膵 β 細胞の細胞内代謝に与える影響を評価するため、INS-1 832/13 細胞および C57B6/J マウスの単離膵島を用いて PFKFB3 の発現を評価した。PCR 解析の結果、INS-1 832/13 細胞では高グルコース環境 (22 mM) において低グルコース環境 (5.5 mM) よりも Pfkfb3 の発現が有意に高かった(図 4)。これらの結果はウェスタンブロット法によるタンパク質発現の検討でも同様であった(図 5-8)。

一方で、細胞外フラックスアナライザーによる解析では高グルコース刺激下では低グルコース刺激下と比較してミトコンドリア機能の低下を認めた($p < 0.05$; 図 9-11)。

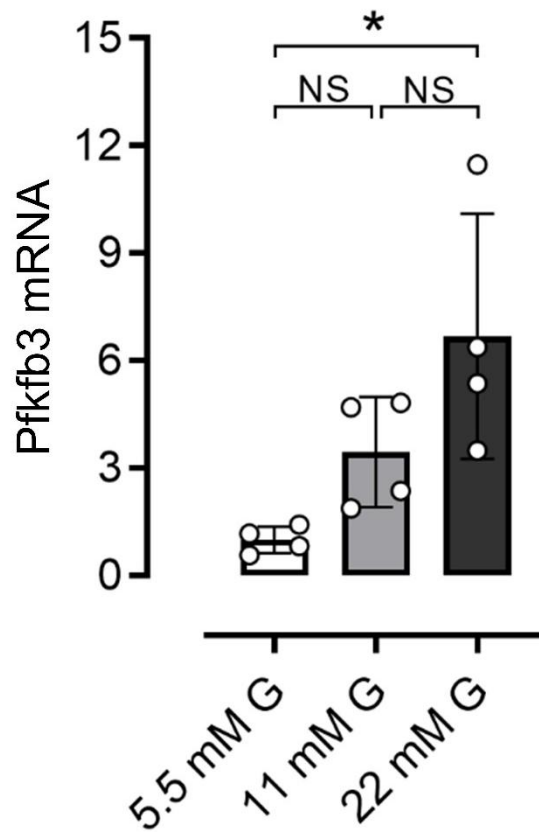


図 4. INS-1 832/13 細胞における Pfkfb3 遺伝子発現量

各グルコース濃度で培養した INS-1 832/13 細胞における Pfkfb3 遺伝子発現量を Real-time PCR 法で定量的に評価した。内因性コントロールとして β actin で正規化し、5.5 mM G 群を 1 とした相対発現量として表示した。5.5 mM G 群（白）、11 mM G 群（灰色）、22 mM G 群（黒）（n=4）（平均値 $\pm$ SD） * $p < 0.05$ 、一元配置分散分析（Bonferroni 法による事後検定）、G, glucose; Pfkfb3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3; NS, not significant

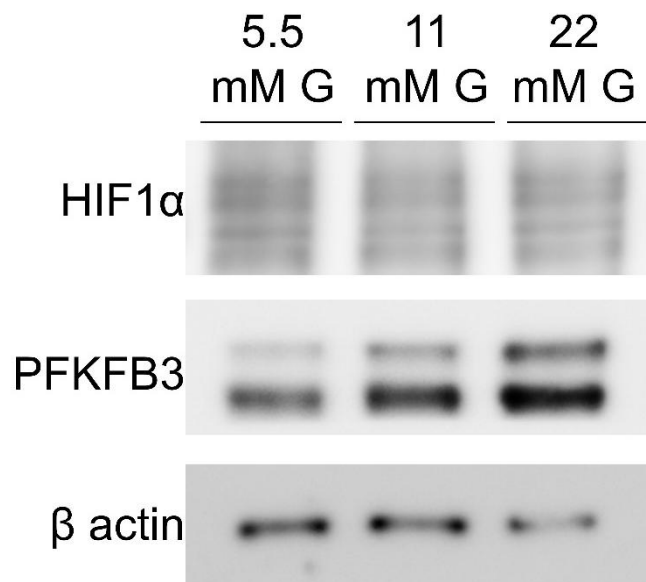


図 5. INS-1 832/13 細胞の代表的なウェスタンブロット

各グルコース濃度で培養した INS-1 832/13 細胞の PFKFB3 および HIF1 α の代表的なウェスタンブロット。G, glucose; HIF1 α , hypoxia inducible factor-1 α ; PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3

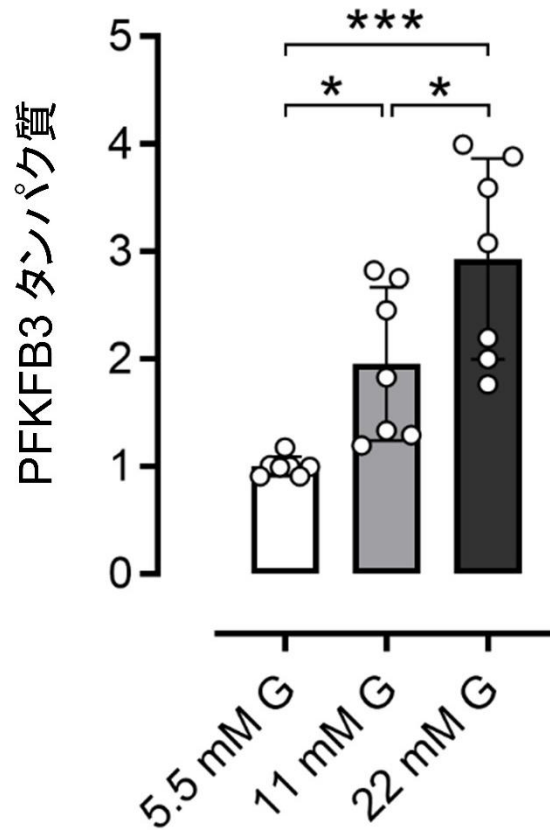


図 6. INS-1 832/13 細胞における PFKFB3 発現量の定量評価

各グルコース濃度で培養した INS-1 832/13 細胞における PFKFB3 発現量をウェスタンブロットで定量的に評価した。内因性コントロールとして β actin で正規化し、5.5 mM G 群を 1 とした相対発現量として表示した。5.5 mM G 群（白）、11 mM G 群（灰色）、22 mM G 群（黒）（n=7）（平均値 $\pm$ SD） * $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$ 、一元配置分散分析（Bonferroni 法による事後検定）、G, glucose; PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3

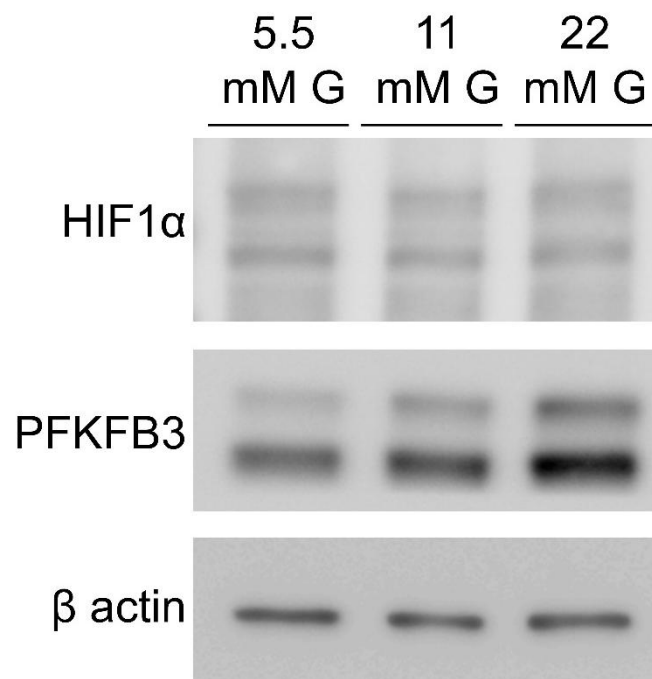


図 7. C57BL6/J マウス膵島の代表的なウェスタンブロット。
各グルコース濃度で培養した C57BL6/J マウス膵島における PFKFB3 および HIF1 α の代表的なウェスタンブロット。G, glucose; HIF1 α , hypoxia inducible factor-1 α ; PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3

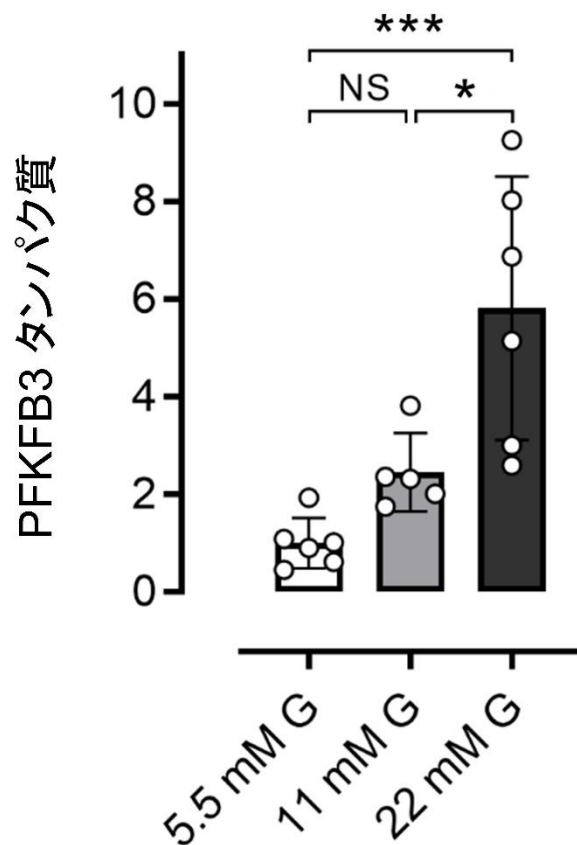


図 8. C57BL6/J マウス膵島における PFKFB3 発現量の定量評価

各グルコース濃度下で培養した C57BL6/J マウス膵島における PFKFB3 発現量をウェスタンブロットで定量的に評価した。内因性コントロールとして β actin で正規化し、5.5 mM G 群を 1 とした相対発現量として表示した。5.5 mM G 群 (白)、11 mM G 群 (灰色)、22 mM G 群 (黒) (n=5-6) (平均値 $\pm$ SD) * $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$ 、一元配置分散分析 (Bonferroni 法による事後検定)、G, glucose; PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3; NS, not significant

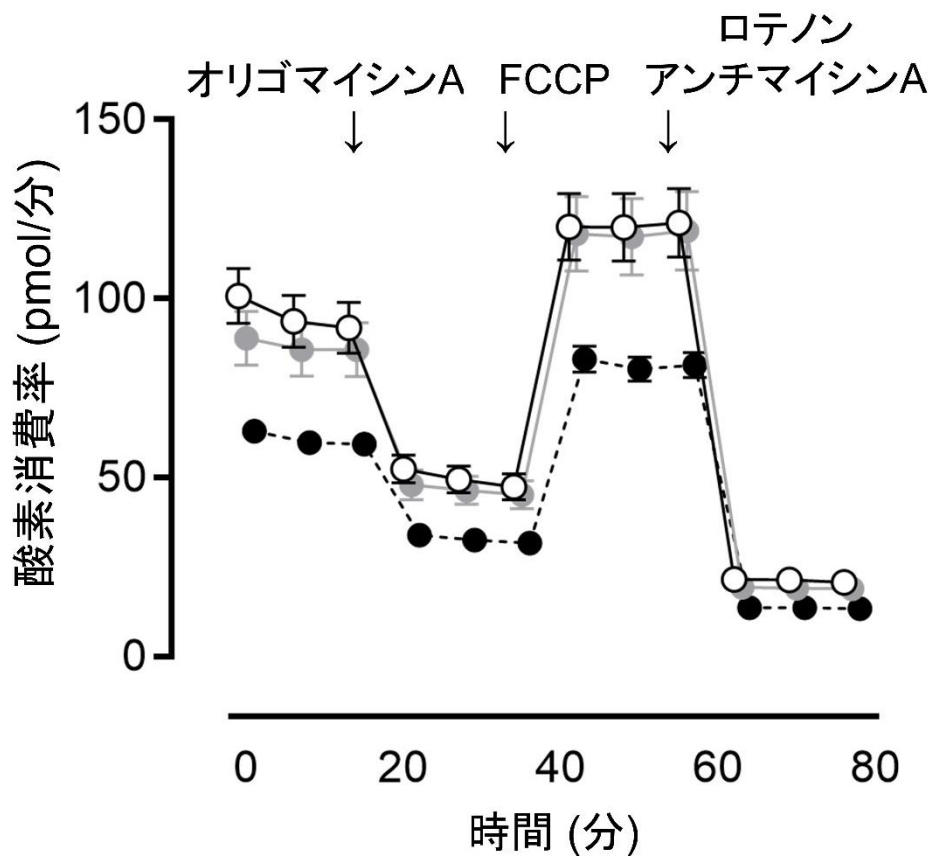


図 9. INS-1 832/13 細胞における酸素消費率

細胞外フラックスアナライザーを用いて、各グルコース濃度で培養した INS-1 832/13 細胞の時間経過に伴う酸素消費率 (OCR) を測定。それぞれグルコース (5.5、11、22 mM) を添加して刺激条件下の OCR を評価し、ATP 合成酵素阻害剤オリゴマイシン A を添加して ATP 依存性の OCR を算出、FCCP でミトコンドリアを解離し最大 OCR を評価し、最後にミトコンドリア複合体阻害剤であるロテノン/アンチマイシン A を添加してミトコンドリア呼吸を遮断した。5.5 mM G 群 (白)、11 mM G 群 (灰色)、22 mM G 群 (黒) (n=3-4) (平均値±SD)、FCCP, carbonyl cyanide p-trifluoro methoxyphenylhydrazone.

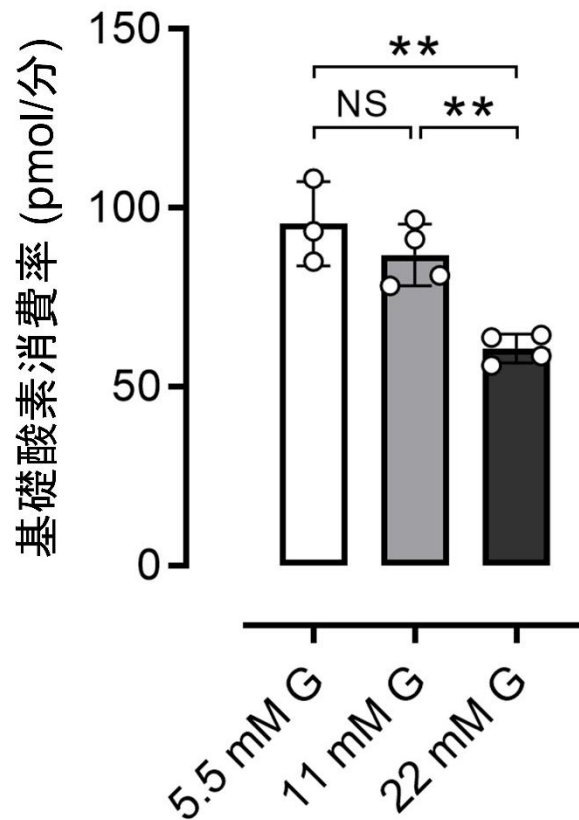


図 10. INS-1 832/13 細胞における基礎酸素消費率

各グルコース濃度で培養した INS-1 832/13 細胞の基礎酸素消費率 (OCR) を定量的に解析した。5.5 mM G 群 (白)、11 mM G 群 (灰色)、22 mM G 群 (黒) (n=3–4) (平均値±SD) ** $p < 0.01$ 、一元配置分散分析 (Bonferroni 法による事後検定)、G, glucose; NS, not significant

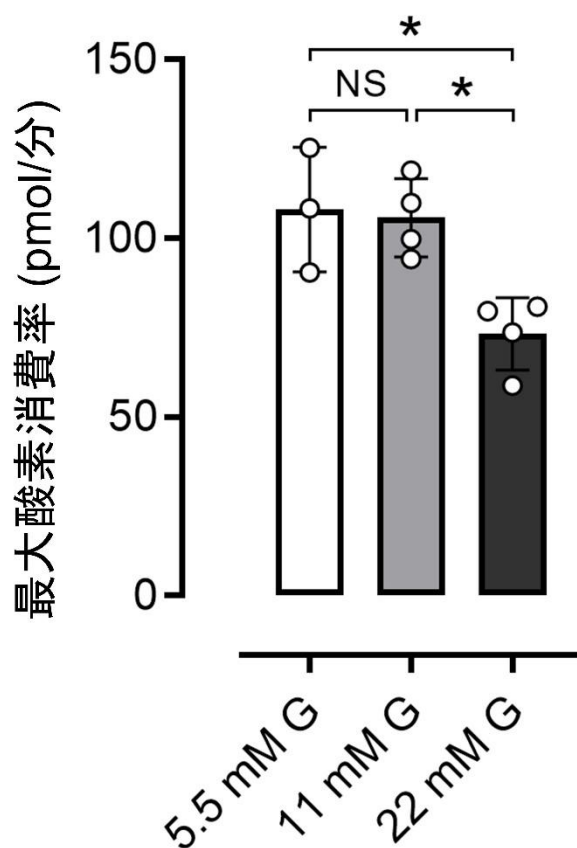


図 11. INS-1 832/13 細胞における最大酸素消費率

各グルコース濃度で培養した INS-1 832/13 細胞の最大酸素消費率 (OCR) を定量的に解析した。5.5 mM G 群 (白)、11 mM G 群 (灰色)、22 mM G 群 (黒) (n=3–4) (平均値±SD) * $p < 0.05$ 、一元配置分散分析 (Bonferroni 法による事後検定)、G, glucose; NS, not significant

7.1.2 ob/+マウスおよび ob/ob マウスでの検討

ob/ob マウスは、出生後数週間で肥満および高血糖状態となり、加齢とともに進行する糖尿病モデル動物である。このため、これらのマウスにおいては膵β細胞に対する過剰な代謝負荷が想定されている。6週齢の時点では、高血糖は顕著ではなく、ob/ob マウスの膵β細胞における PFKFB3 の発現は、対照群である ob/+マウスと明確な差異は見られなかった。しかし、その後の週齢の進行に伴い、ob/ob マウスでは体重増加と血糖上昇が進行し、PFKFB3 の発現が亢進していた(図 12-13)。

過剰な食事摂取が肥満および高血糖に寄与することを考慮し、ob/ob マウスに6週齢から摂餌制限を行った。摂餌制限を行った ob/ob マウスでは、体重および血糖値は対照群である ob/+マウスと同程度となり(図 14-16)、OGTT における耐糖能も改善した(図 17-18)。単離膵島のタンパク発現では、ob/ob の自由摂取群で PFKFB3 を含む解糖系酵素の発現が対照群に比べて上昇していた($p < 0.05$)。しかし、摂餌制限群の膵島では、これらの解糖系酵素の発現が対照群と差を認めなかった(図 19-20)。同様に、膵切片の免疫染色においては、膵β細胞内の PFKFB3 の発現が ob/ob の自由摂取群で対照群よりも有意に高いことが確認された($p < 0.05$)。摂餌制限群では、PFKFB3 の発現が ob/ob の自由摂取群よりも有意に低いものの、対照群よりは有意に高いことが観察された(いずれも $p < 0.001$; 図 21-22)。膵島の免疫染色により、ob/ob の自由摂取群で膵β細胞量が有意に増加していることが示された(対照群および摂餌制限群と比較して $p < 0.001$)、しかしこの増加は摂餌制限によって抑制されていた(図 23)。

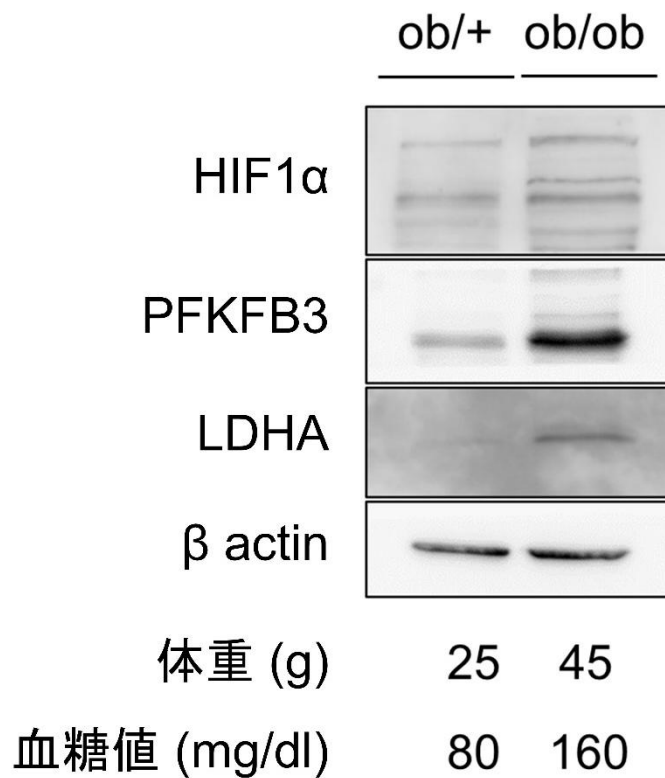


図 12. 10 週齢の ob/+および ob/ob マウスの膵島における代表的なウェスタンブロット

ob/+および ob/ob マウスの膵島における PFKFB3 および HIF1 α の代表的なウェスタンブロット、体重および血糖値。HIF1 α , hypoxia inducible factor-1 α ; PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3; LDHA, lactate dehydrogenase A

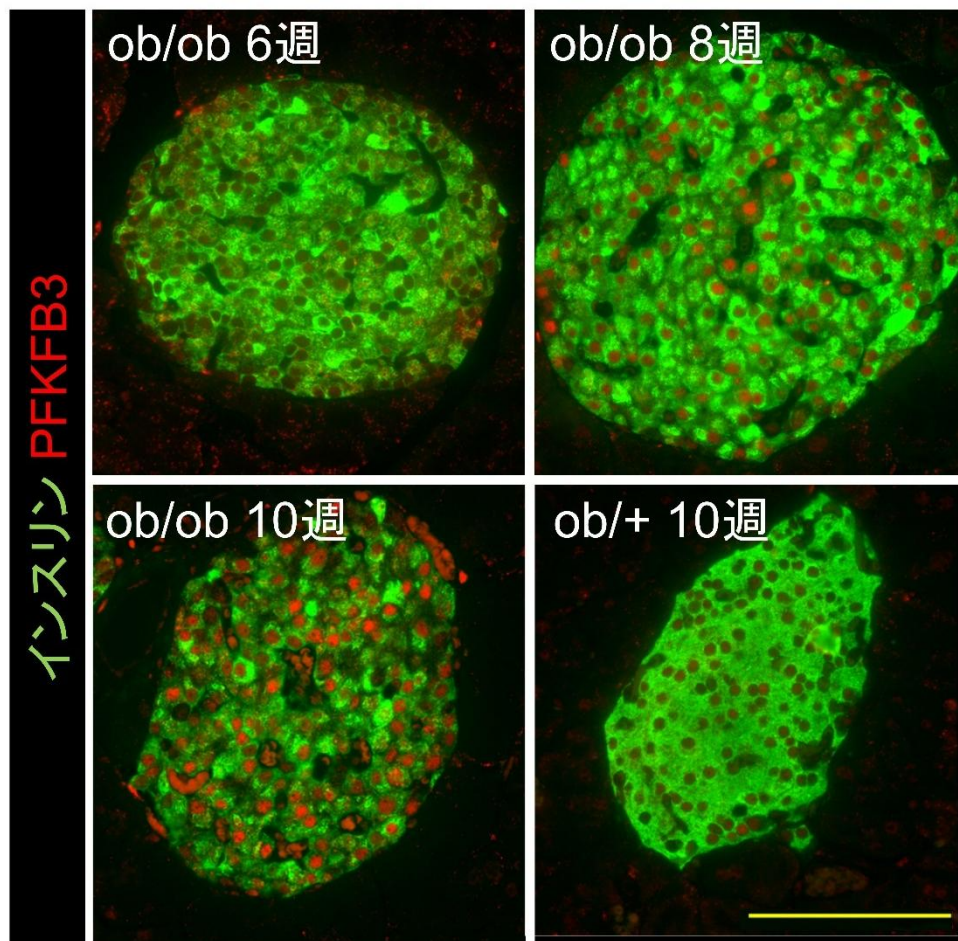


図 13. ob/ob マウスの膵島の免疫組織化学染色

各週齢の ob/ob マウスの膵組織切片を抗 PFKFB3 抗体（赤）、抗インスリン抗体（緑）にて蛍光免疫染色法で二重染色した。黄色スケールバーは 100 μm を示している。

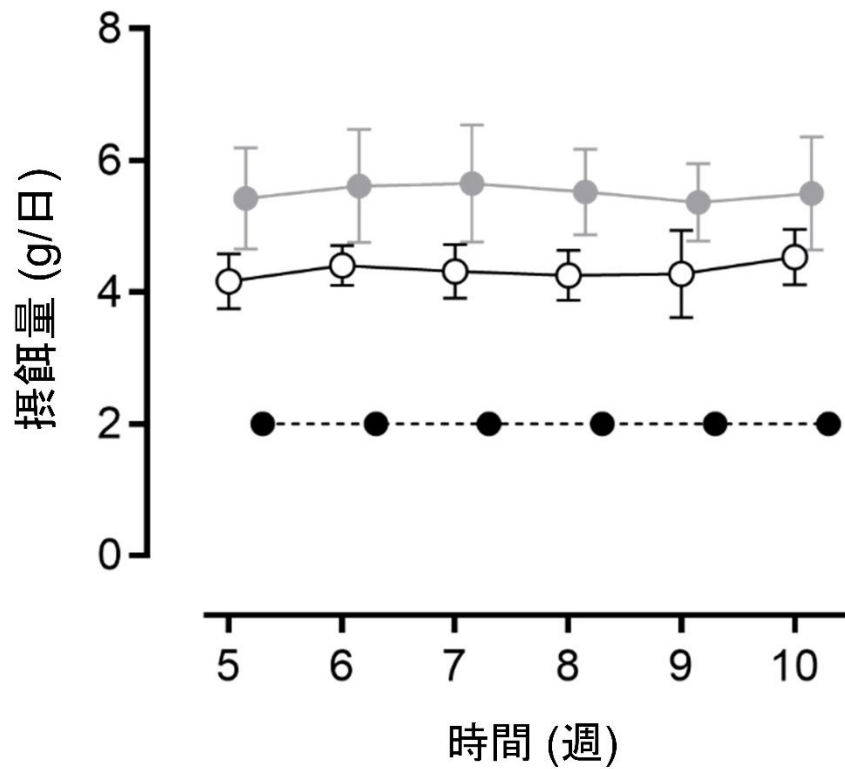


図 14. 摂餌量の変化

6 週齢から 10 週齢まで自由摂餌を行った ob/+マウス群、自由摂餌を行った ob/ob マウス群、摂餌制限を行った ob/ob マウス群の摂餌量の比較。自由摂餌を行った ob/+マウス群（白）、自由摂餌を行った ob/ob マウス群（灰色）、摂餌制限を行った ob/ob マウス群（黒）（n=6-10）（平均値±SD）

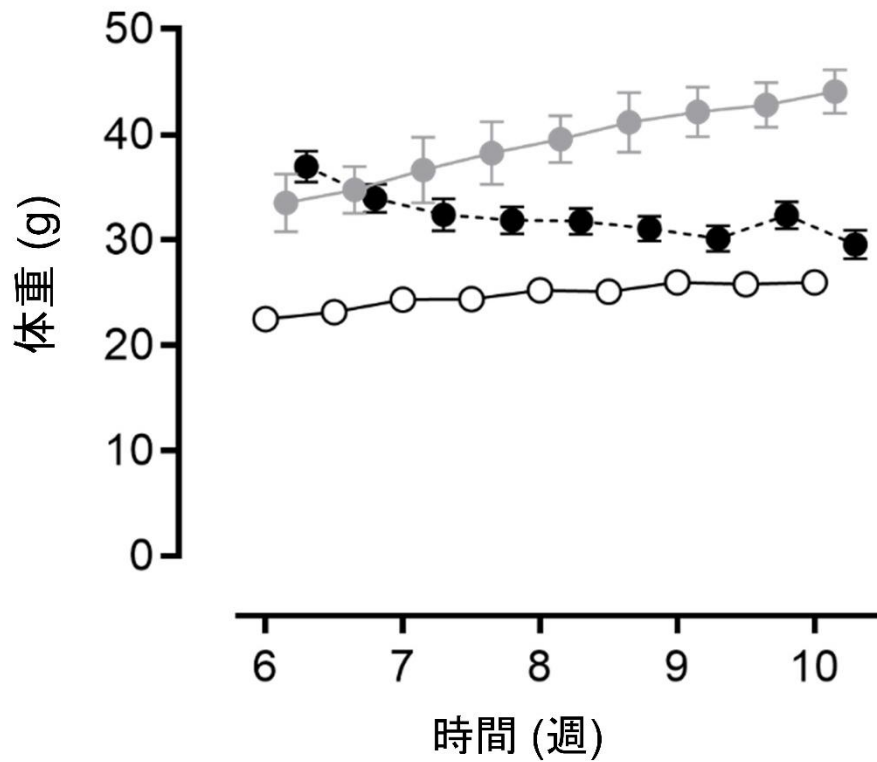


図 15. 体重の変化

6 週齢から 10 週齢まで自由摂餌を行った ob/+マウス群、自由摂餌を行った ob/ob マウス群、摂餌制限を行った ob/ob マウス群の体重の比較。自由摂餌を行った ob/+マウス群（白）、自由摂餌を行った ob/ob マウス群（灰色）、摂餌制限を行った ob/ob マウス群（黒）（n=6-10）（平均値±SD）

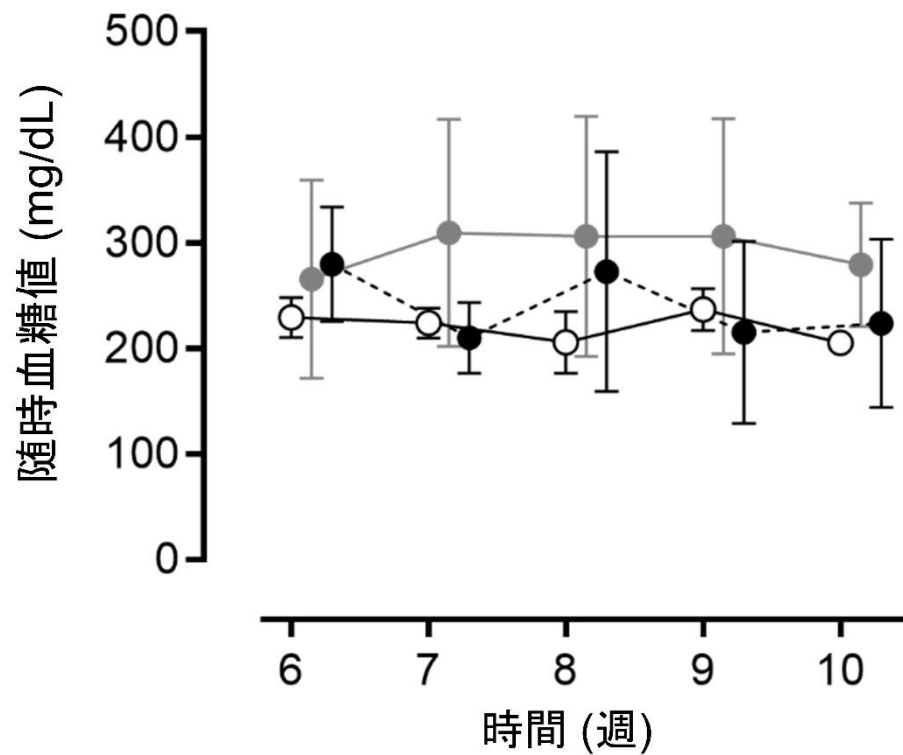


図 16. 随時血糖値の変化

6 週齢から 10 週齢まで自由摂餌を行った ob/+マウス群、自由摂餌を行った ob/ob マウス群、摂餌制限を行った ob/ob マウス群の随時血糖値の比較。自由摂餌を行った ob/+マウス群（白）、自由摂餌を行った ob/ob マウス群（灰色）、摂餌制限を行った ob/ob マウス群（黒）（n=6-10）（平均値±SD）

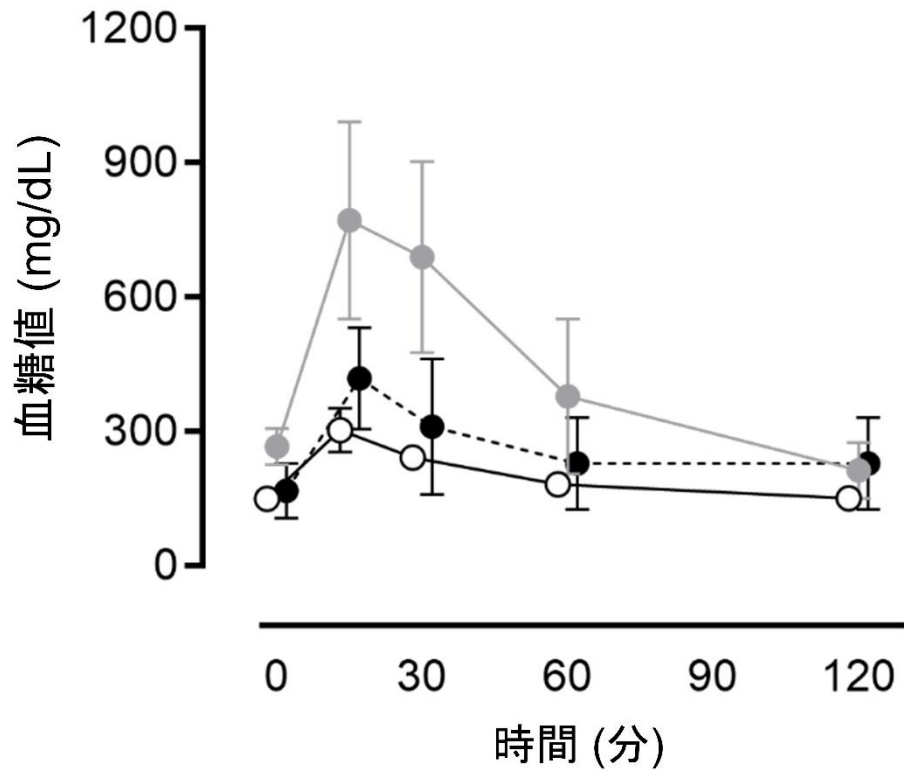


図 17. 経口ブドウ糖負荷試験（OGTT）における血糖値の変化

6 週齢から 10 週齢まで自由摂餌を行った ob/+マウス、ob/ob マウス、もしくは摂餌制限を行った ob/ob マウスの経口ブドウ糖試験中の血糖値変化。自由摂餌を行った ob/+マウス群（白）、自由摂餌を行った ob/ob マウス群（灰色）、摂餌制限を行った ob/ob マウス群（黒）（n=6-10）（平均値±SD）

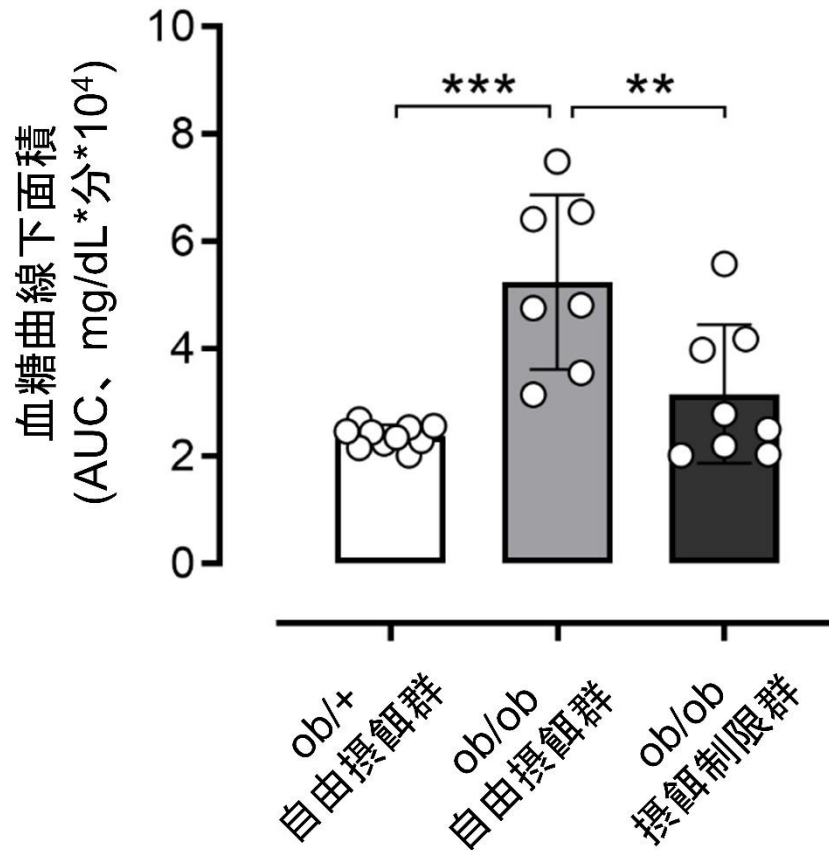


図 18. 経口ブドウ糖試験における血糖値曲線下面積 (AUC)

6 週齢から 10 週齢まで自由摂餌を行った ob/+マウス、ob/ob マウス、もしくは摂餌制限を行った ob/ob マウスの経口ブドウ糖試験における血糖値曲線下面積 (AUC)。自由摂餌を行った ob/+マウス群 (白)、自由摂餌を行った ob/ob マウス群 (灰色)、摂餌制限を行った ob/ob マウス群 (黒) (n=6–10) (平均値±SD) (n=6–10) (平均値±SD) ** p<0.01、*** p<0.001、一元配置分散分析 (Bonferroni 法による事後検定)、AUC, Area under the blood glucose curve

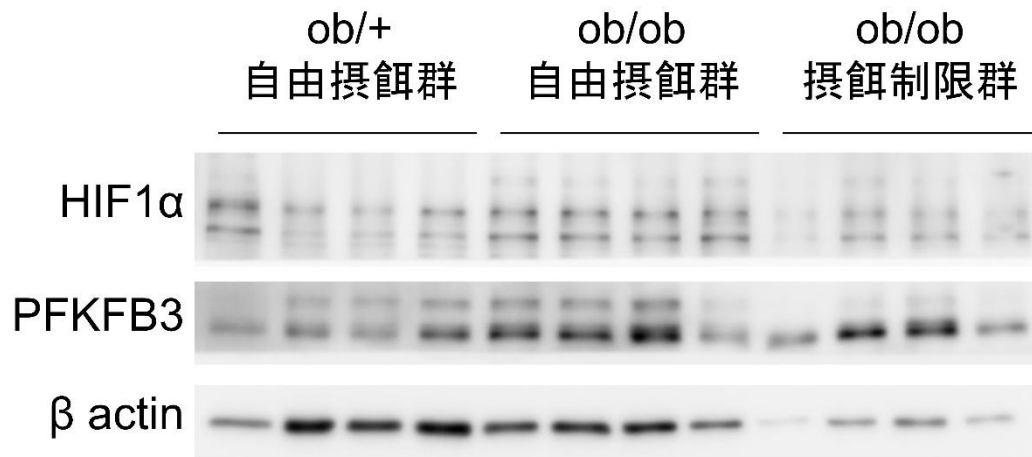


図 19. ob/+マウスおよび ob/ob マウスの臍島における代表的なウェスタンブロット。

ob/+マウスおよび ob/ob マウスの臍島における PFKFB3 および HIF1 α の代表的なウェスタンブロット。HIF1 α , hypoxia inducible factor-1 α ; PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphate 3

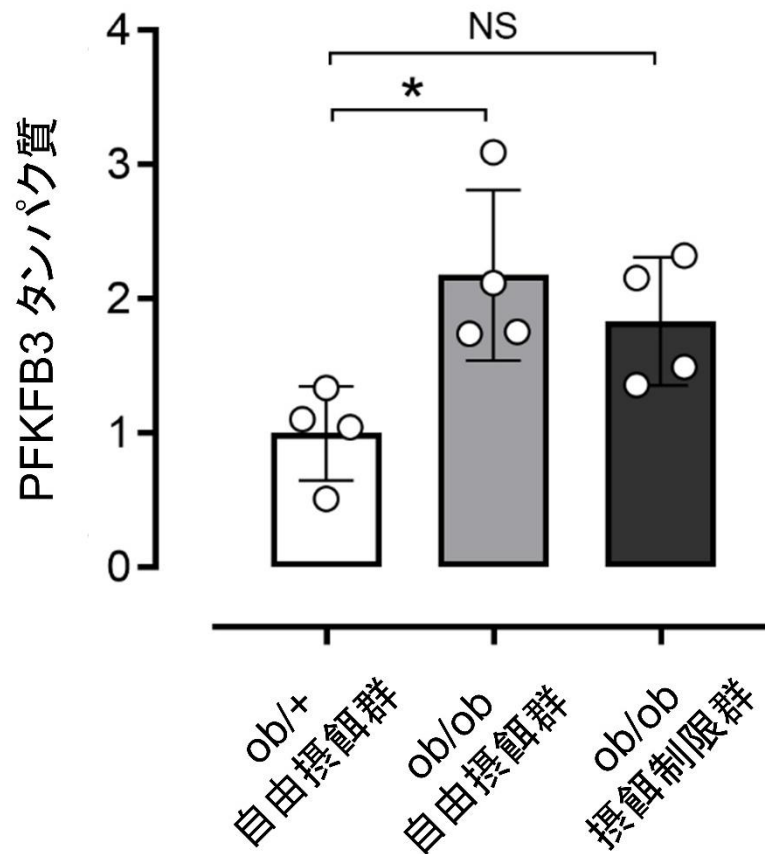


図 20. ob/+マウスおよび ob/ob マウスの膵島における PFKFB3 発現量の定量化
各条件下における膵島での PFKFB3 発現量をウェスタンブロットで定量的に評価した。内因性コントロールとして β actin で正規化し、ob/+マウス群を 1 とした相対発現量として表示した。自由摂餌を行った ob/+マウス群（白）、自由摂餌を行った ob/ob マウス群（灰色）、摂食制限を行った ob/ob マウス群（黒）（n=4）（平均値±SD） * $p < 0.05$ 、一元配置分散分析（Bonferroni 法による事後検定）、PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3 ; NS, not significant

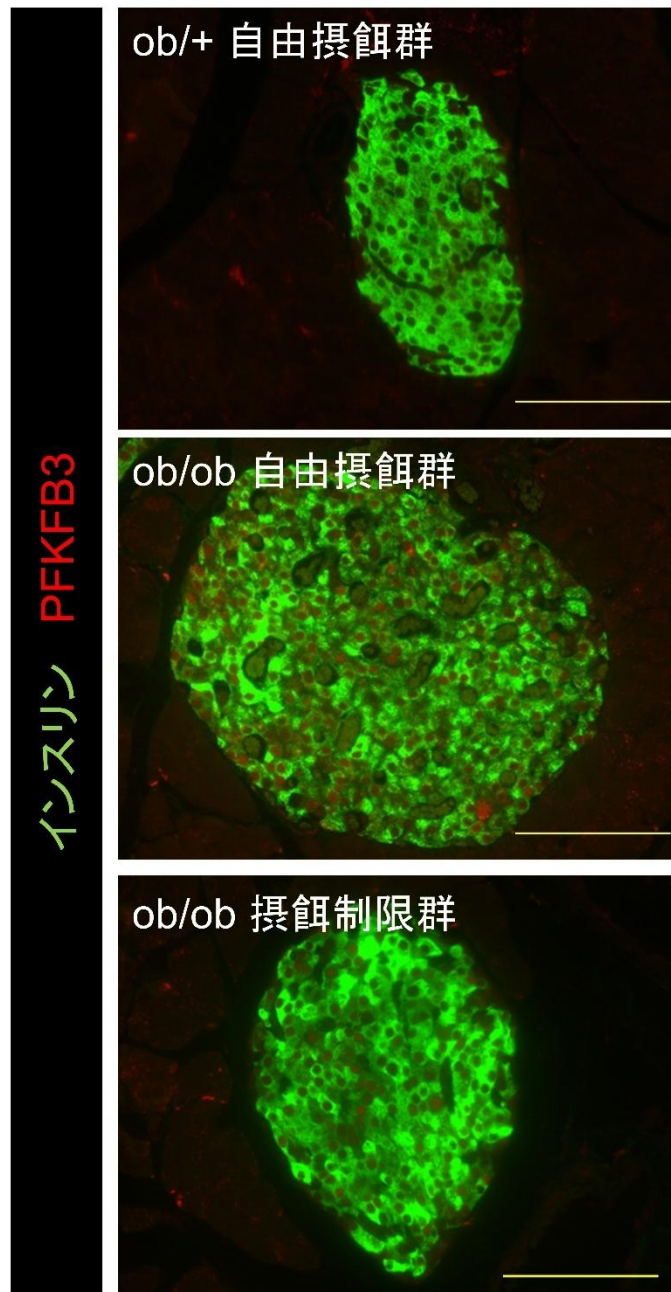


図 21. ob/+マウスおよび ob/ob マウスの膵島における免疫組織化学染色
ob/+マウスおよび ob/ob マウスの膵組織切片を抗 PFKFB3 抗体（赤）、抗インスリン抗体（緑）にて蛍光免疫染色法で二重染色した。黄色スケールバーは 100 μm を示している。PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3

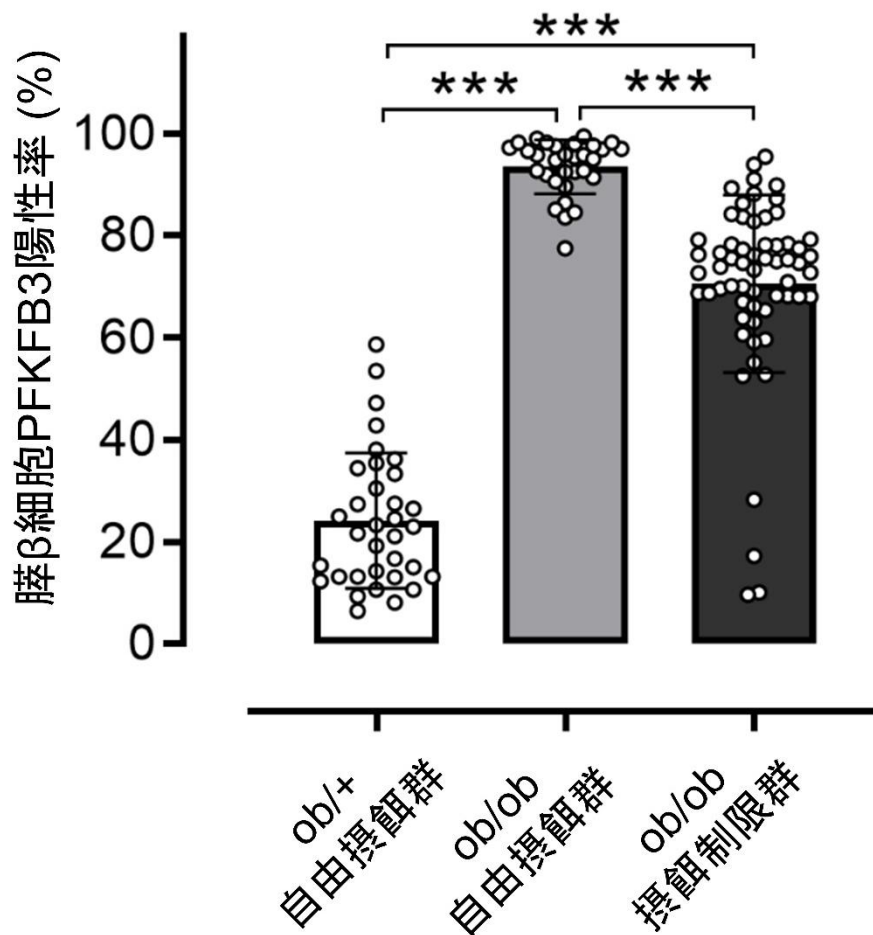


図 22. 膵β細胞における PFKFB3 陽性細胞率

自由摂餌を行った ob/+ マウスおよび ob/ob マウス、摂餌制限を行った ob/ob マウスの膵β細胞における PFKFB3 陽性細胞率を算出した。各群とも 3 匹のマウス由来とし、1 匹のマウスにつき 31-61 個の膵島を観察し、PFKFB3 陽性細胞数をカウントした。自由摂餌を行った ob/+マウス群（白）、自由摂餌を行った ob/ob マウス群（灰色）、摂餌制限を行った ob/ob マウス群（黒）（平均値±SD） *** $p < 0.001$ 、一元配置分散分析（Bonferroni 法による事後検定）、PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3

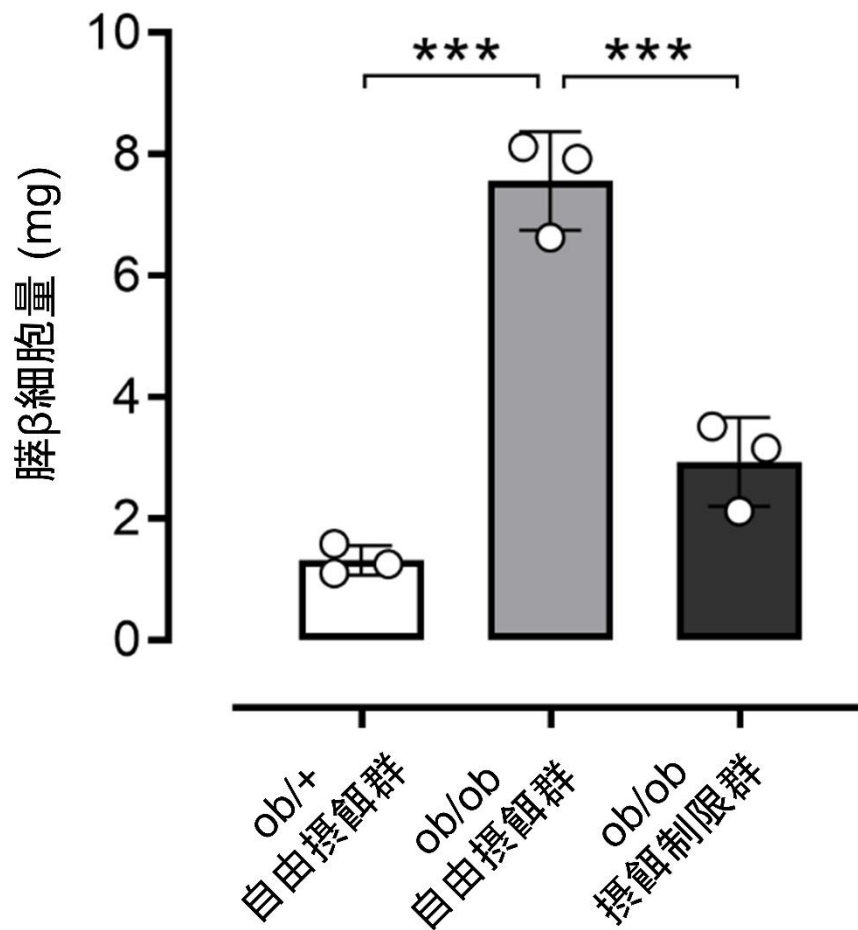


図 23. 膵β細胞量

自由摂餌を行った ob/+ マウスおよび ob/ob マウス、摂餌制限を行った ob/ob マウスの膵β細胞量を算出した。β細胞量は以下の式で計算: β細胞量 (mg) = (膵β細胞面積 / 膵臓面積) × 膵臓重量 (mg)。自由摂餌を行った ob/+マウス群 (白)、自由摂餌を行った ob/obマウス群 (灰色)、摂餌制限を行った ob/ob マウス群 (黒) (n=3) (平均値±SD) *** p<0.001、一元配置分散分析 (Bonferroni 法による事後検定)

7.2 細胞内代謝変化の可変性

7.2.1 INS-1 832/13 細胞および C57B6/J マウスの単離膵島の検討

次に、高グルコース環境で亢進した PFKFB3 の発現およびミトコンドリア機能障害が、グルコース曝露の変化によって改善されるかどうかを検討した。

INS-1 832/13 細胞および単離膵島では高グルコース環境で PFKFB3 を含む解糖系酵素の発現が亢進したがこれらの変化は低グルコース環境では是正された(図 24-28)。また、高グルコース環境でミトコンドリア機能は低下したが、これも低グルコース環境に暴露することによって改善した(図 29-31)。

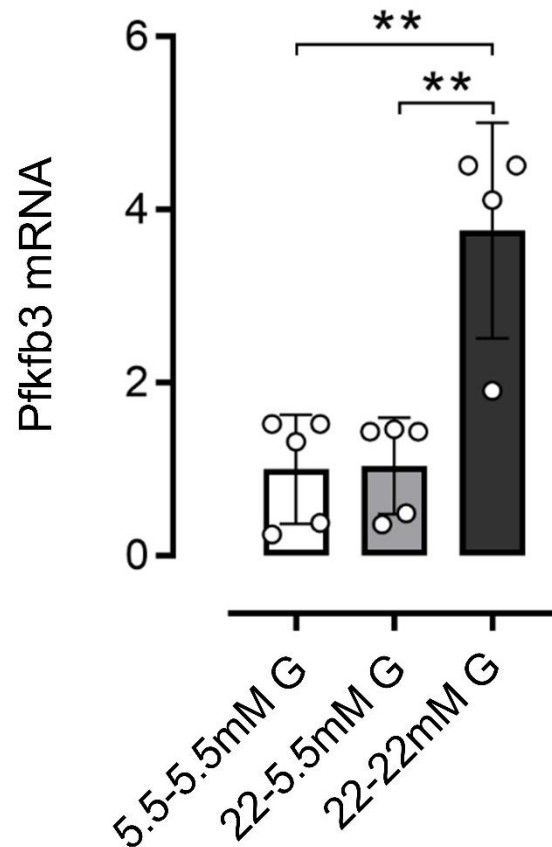


図 24. INS-1 832/13 細胞における Pfkfb3 遺伝子発現量

低グルコース (5.5 mM G) 条件で 48 時間培養した INS-1 832/13 細胞 (5.5-5.5 mM G)、22 mM G で 24 時間培養後に 5.5 mM G でさらに 24 時間培養した INS-1 832/13 細胞 (22-5.5 mM G)、高グルコース (22 mM G) 条件で 48 時間培養した INS-1 832/13 細胞 (22-22 mM G) における Pfkfb3 遺伝子発現量を Real-time PCR 法で定量的に評価した。内因性コントロールとして β actin で正規化し、5.5-5.5 mM G 群を 1 とした相対発現量として表示した。5.5-5.5 mM G 群 (白)、22-5.5 mM G 群 (灰色)、22-22 mM G 群 (黒) (n=4-5) (平均値 $\pm$ SD) ** $p < 0.01$ 、一元配置分散分析 (Bonferroni 法による事後検定)、G, glucose; Pfkfb3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3

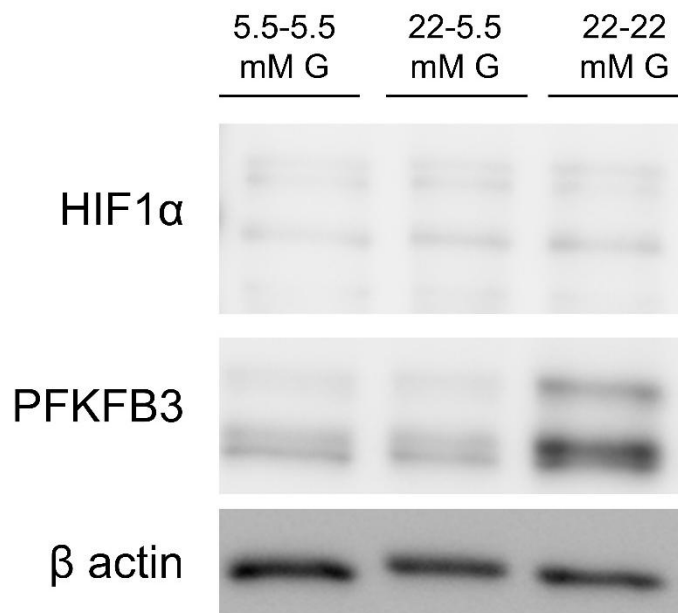


図 25. INS-1 832/13 細胞の代表的なウェスタンブロット

低グルコース (5.5 mM G) 条件で 48 時間培養した INS-1 832/13 細胞 (5.5-5.5 mM G)、22 mM G で 24 時間培養後に 5.5 mM G でさらに 24 時間培養した INS-1 832/13 細胞 (22-5.5 mM G)、高グルコース (22 mM G) 条件で 48 時間培養した INS-1 832/13 細胞 (22-22 mM G) の PFKFB3 および HIF1 α の代表的なウェスタンブロット。G, glucose; HIF1 α , hypoxia inducible factor-1 α ; PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3

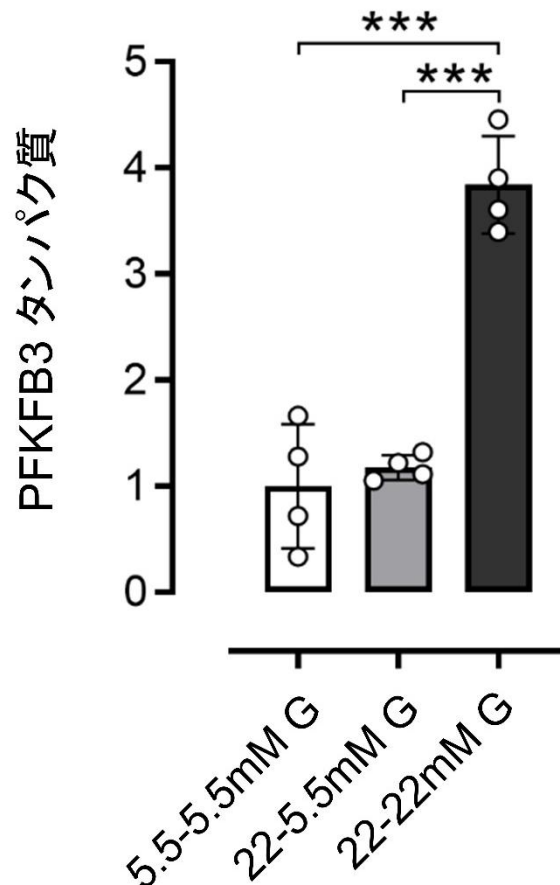


図 26. INS-1 832/13 細胞における PFKFB3 発現量の定量評価
 低グルコース (5.5 mM G) 条件で 48 時間培養した INS-1 832/13 細胞 (5.5-5.5 mM G)、22 mM G で 24 時間培養後に 5.5 mM G でさらに 24 時間培養した INS-1 832/13 細胞 (22-5.5 mM G)、高グルコース (22 mM G) 条件で 48 時間培養した INS-1 832/13 細胞 (22-22 mM G) における PFKFB3 発現量をウェスタンブロットで定量的に評価した。内因性コントロールとして β actin で正規化し、5.5-5.5 mM G 群を 1 とした相対発現量として表示した。5.5-5.5 mM G 群 (白)、22-5.5 mM G 群 (灰色)、22-22 mM G 群 (黒) (n=4) (平均値 $\pm$ SD) *** $p < 0.001$ 、一元配置分散分析 (Bonferroni 法による事後検定)、G, glucose; PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3

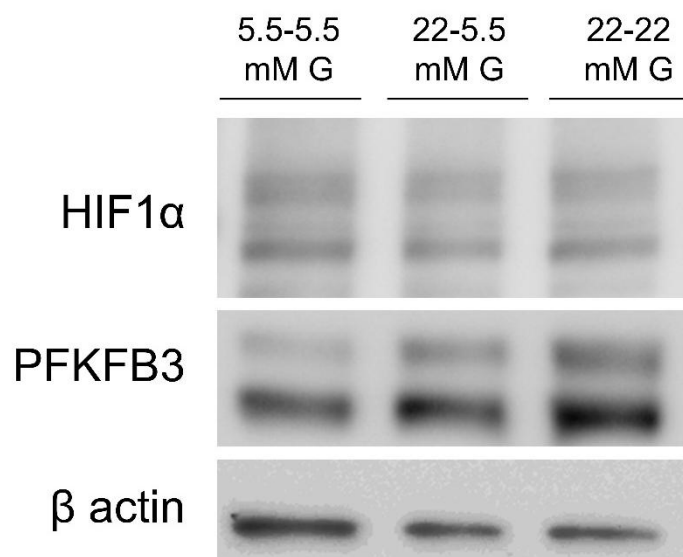


図 27. C57BL6/J マウス膵島の代表的なウェスタンブロット。
 低グルコース (5.5 mM G) 条件で 48 時間培養した C57BL6/J マウス膵島 (5.5-5.5 mM G)、22 mM G で 24 時間培養後に 5.5 mM G でさらに 24 時間培養した INS-1 832/13 細胞 (22-5.5 mM G)、高グルコース (22 mM G) 条件で 48 時間培養した C57BL6/J マウス膵島 (22-22 mM G) の PFKFB3 および HIF1 α の代表的なウェスタンブロット。G, glucose; HIF1 α , hypoxia inducible factor-1 α ; PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3

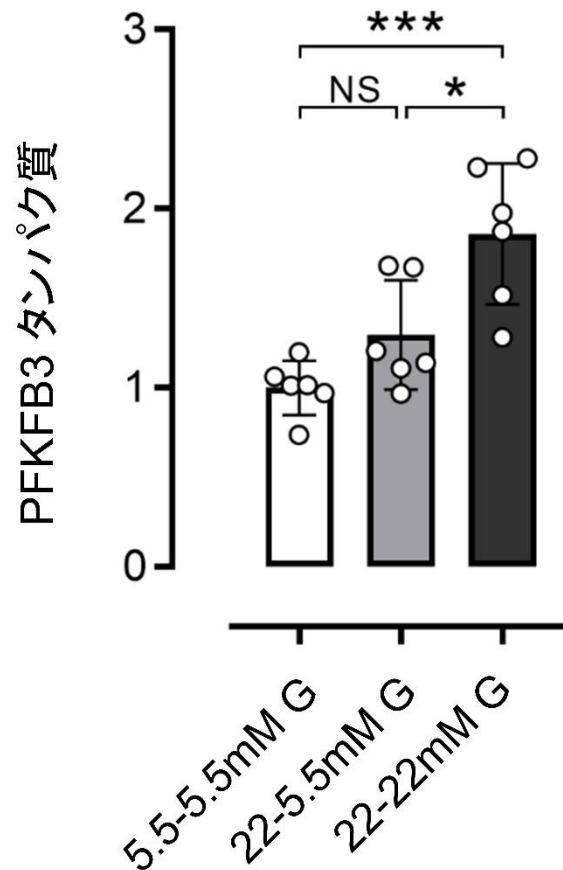


図 28. C57BL6/J マウス膵島における PFKFB3 発現量の定量評価

低グルコース (5.5 mM G) 条件で 48 時間培養した C57BL6/J マウス膵島 (5.5-5.5 mM G)、22 mM G で 24 時間培養後に 5.5 mM G でさらに 24 時間培養した INS-1 832/13 細胞 (22-5.5 mM G)、高グルコース (22 mM G) 条件で 48 時間培養した C57BL6/J マウス膵島 (22-22 mM G) における PFKFB3 発現量をウェスタンブロットで定量的に評価した。内因性コントロールとして β actin で正規化し、5.5-5.5 mM G 群を 1 とした相対発現量として表示した。5.5-5.5 mM G 群 (白)、22-5.5 mM G 群 (灰色)、22-22 mM G 群 (黒) (n=6) (平均値 $\pm$ SD) * $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$ 、一元配置分散分析 (Bonferroni 法による事後検定)、G, glucose; PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3; NS, not significant

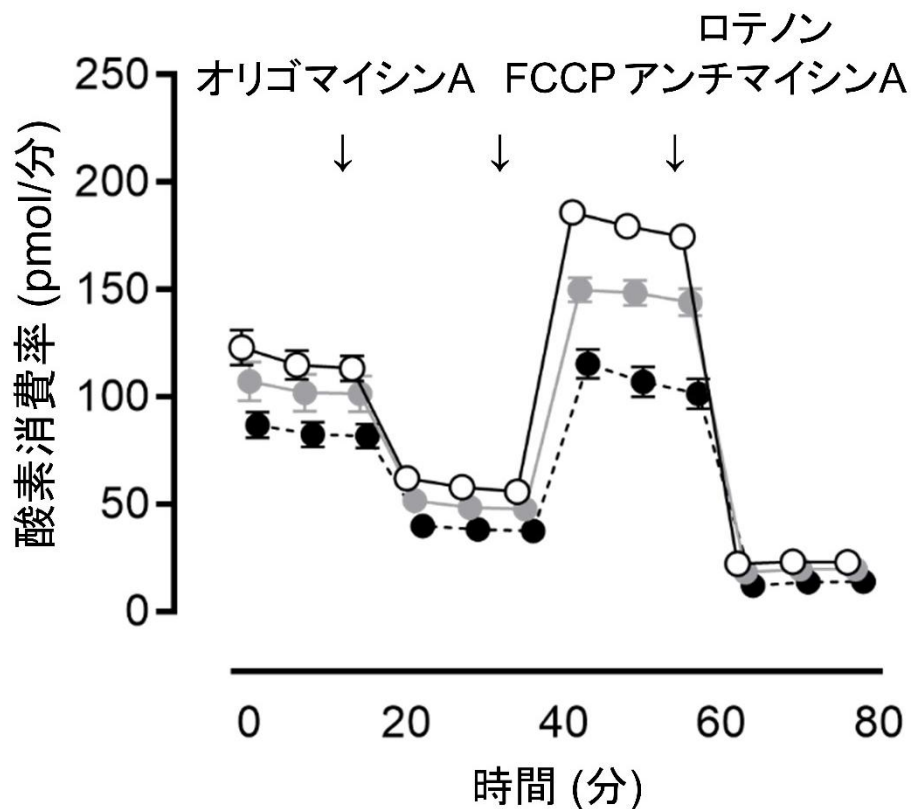


図 29. INS-1 832/13 細胞における酸素消費率

低グルコース (5.5 mM G) 条件で 48 時間培養した INS-1 832/13 細胞 (5.5-5.5 mM G)、22 mM G で 24 時間培養後に 5.5 mM G でさらに 24 時間培養した INS-1 832/13 細胞 (22-5.5 mM G)、高グルコース (22 mM G) 条件で 48 時間培養した INS-1 832/13 細胞 (22-22 mM G) における酸素消費率 (OCR) を細胞外フラックスアナライザーを用いて測定した。ATP 合成酵素阻害剤オリゴマイシン A を添加して ATP 依存性の OCR を算出、FCCP でミトコンドリアを解離し最大 OCR を評価し、最後にミトコンドリア複合体阻害剤であるロテノン/アンチマイシン A を添加してミトコンドリア呼吸を遮断した。5.5-5.5 mM G 群 (白)、22-5.5 mM G 群 (灰色)、22-22 mM G 群 (黒) (n=4) (平均値±SD)、FCCP, carbonyl cyanide p-trifluoro methoxyphenylhydrazine

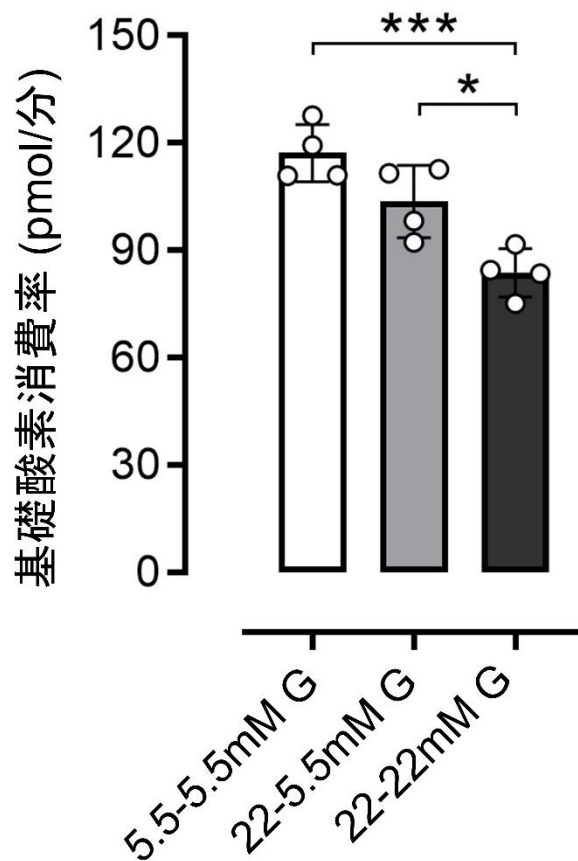


図 30. INS-1 832/13 細胞における基礎酸素消費率

低グルコース (5.5 mM G) 条件で 48 時間培養した INS-1 832/13 細胞 (5.5-5.5 mM G)、22 mM G で 24 時間培養後に 5.5 mM G でさらに 24 時間培養した INS-1 832/13 細胞 (22-5.5 mM G)、高グルコース (22 mM G) 条件で 48 時間培養した INS-1 832/13 細胞 (22-22mM G) の基礎酸素消費率 (OCR) を定量的に解析した。5.5-5.5 mM G 群 (白)、22-5.5 mM G 群 (灰色)、22-22 mM G 群 (黒) (n=4) (平均値±SD) * $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$ 、一元配置分散分析 (Bonferroni 法による事後検定)、G, glucose

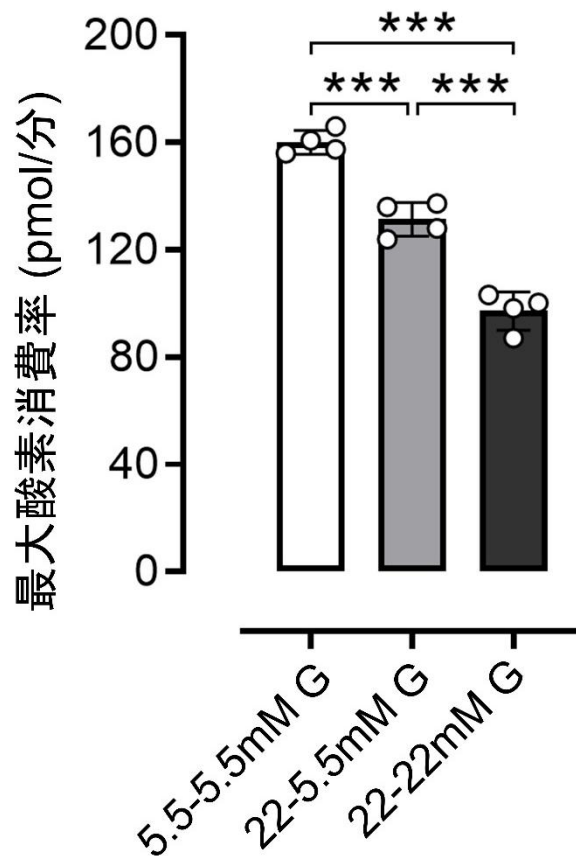


図 31. INS-1 832/13 細胞における最大酸素消費率

低グルコース (5.5 mM G) 条件で 48 時間培養した INS-1 832/13 細胞 (5.5-5.5 mM G)、22 mM G で 24 時間培養後に 5.5 mM G でさらに 24 時間培養した INS-1 832/13 細胞 (22-5.5 mM G)、高グルコース (22 mM G) 条件で 48 時間培養した INS-1 832/13 細胞 (22-22 mM G) の最大酸素消費率 (OCR) を定量的に解析した。5.5-5.5 mM G 群 (白)、22-5.5 mM G 群 (灰色)、22-22 mM G 群 (黒) (n=4) (平均値±SD) *** $p < 0.001$ 、一元配置分散分析 (Bonferroni 法による事後検定)、G, glucose

7.2.2 ob/ob マウスでの検討

図 12-13 に示されているように、8 週齢の ob/ob マウスは ob/+ マウスと比較して過体重および高血糖を呈しており、膵 β 細胞における PFKFB3 の発現はすでに増加していた。したがって、これらの代謝変化が食物制限および SGLT2 阻害薬であるトホグリフロジンの投与によって改善されるかどうかを検討した。SGLT2 阻害薬投与により、摂餌量は増加、体重はわずかに減少し、耐糖能は有意に改善した($p < 0.05$)。摂餌制限は体重を著しく減少させ、耐糖能を有意に改善した($p < 0.001$; 図 32-36)。

膵 β 細胞に対する過剰な負荷が減少した結果、SGLT2 阻害薬群および摂餌制限群の膵 β 細胞量は、自由摂餌群と比較して有意に低かった(いずれも $p < 0.05$; 図 37)。また、膵島における PFKFB3 のタンパク質発現も、自由摂餌群と比較して SGLT2 阻害薬群および摂餌制限群の両群で有意に低かった(いずれも $p < 0.05$; 図 38-41)。

これらの結果は、高グルコース条件および肥満糖尿病状態での PFKFB3 の発現亢進が、それらの条件の是正によって可変性をもって変化し、摂餌制限や薬理的介入によって抑制される可能性があることを示唆している。

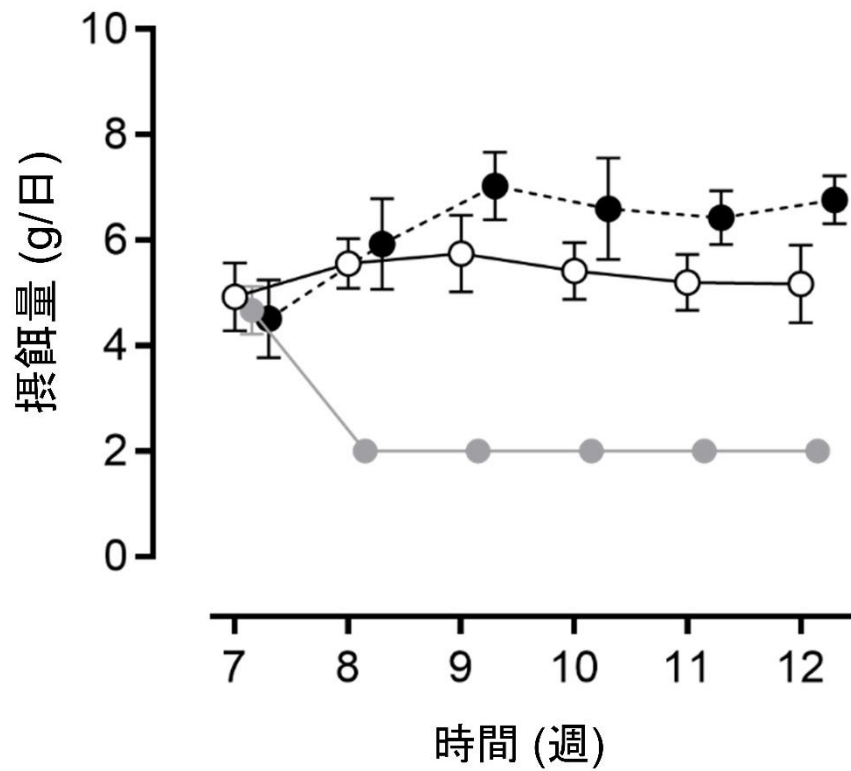


図 32. 摂餌量の変化

8 週齢から 12 週齢まで自由摂餌を行った ob/ob マウス群、摂餌制限を行った ob/ob マウス群、自由摂餌下で SGLT2 阻害薬であるトホグリフロジン投与した ob/ob マウス群の摂餌量の比較。自由摂餌を行った ob/ob マウス群 (白)、摂餌制限を行った ob/ob マウス群 (灰色)、自由摂餌下で SGLT2 阻害薬投与を行った ob/ob マウス群 (黒) (n=16-18) (平均値±SD)

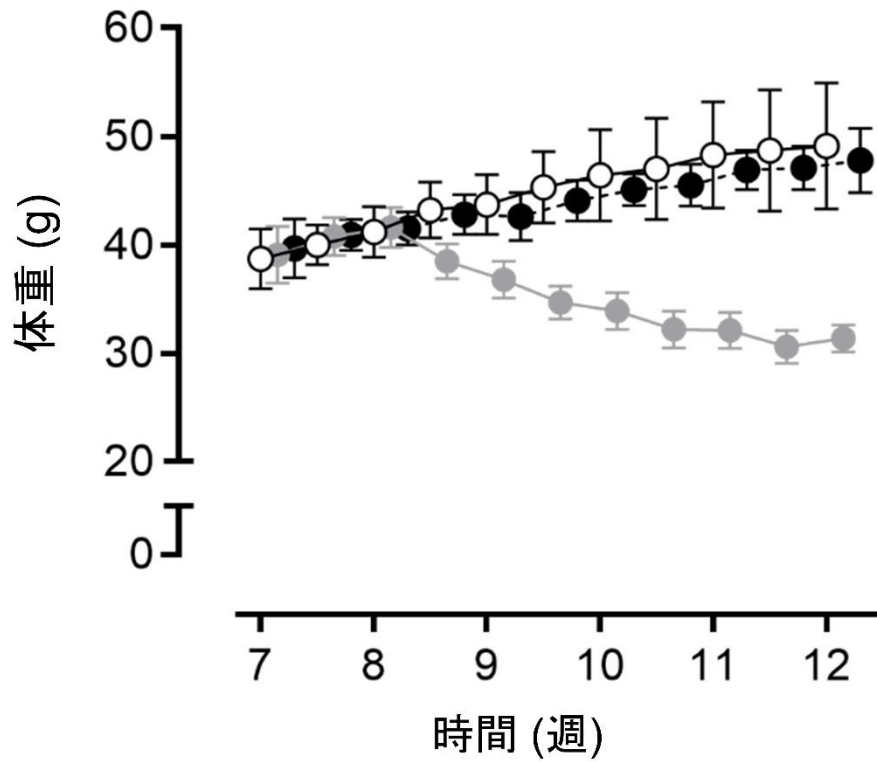


図 33. 体重の変化

8 週齢から 12 週齢まで自由摂餌を行った ob/ob マウス群、摂餌制限を行った ob/ob マウス群、自由摂餌下で SGLT2 阻害薬であるトホグリフロジンを投与した ob/ob マウス群の体重の比較。自由摂餌を行った ob/ob マウス群（白）、摂餌制限を行った ob/ob マウス群（灰色）、自由摂餌下で SGLT2 阻害薬投与を行った ob/ob マウス群（黒）（n=16–18）（平均値±SD）

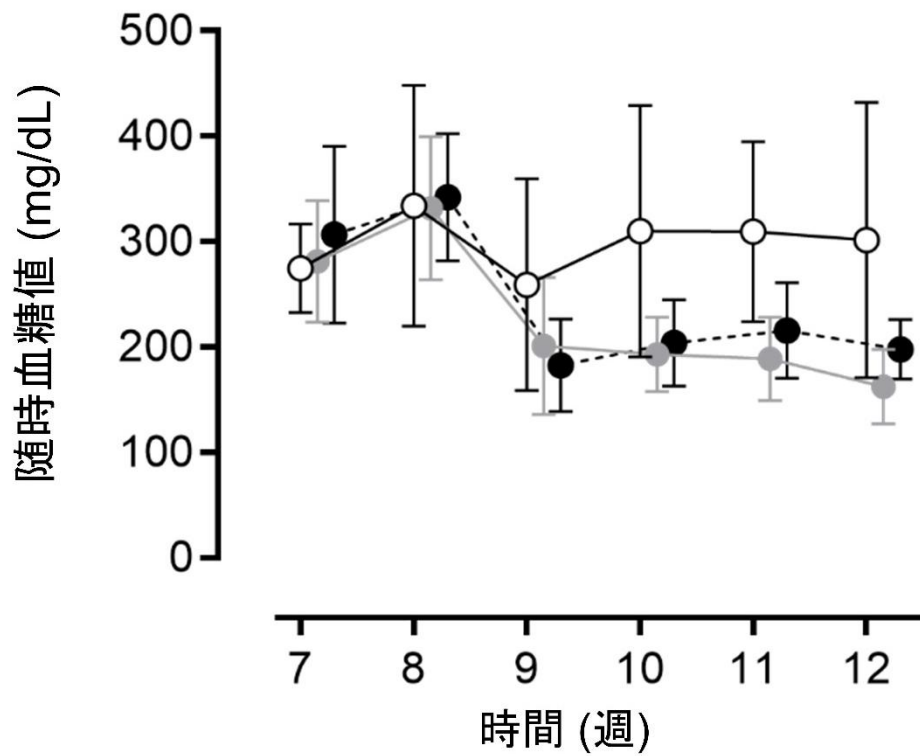


図 34. 随時血糖値の変化

8 週齢から 12 週齢まで自由摂餌を行った ob/ob マウス群、摂餌制限を行った ob/ob マウス群、自由摂餌下で SGLT2 阻害薬であるトホグリフロジン投与した ob/ob マウス群の随時血糖値の比較。自由摂餌を行った ob/ob マウス群 (白)、摂餌制限を行った ob/ob マウス群 (灰色)、自由摂餌下で SGLT2 阻害薬投与を行った ob/ob マウス群 (黒) (n=16–18) (平均値±SD)

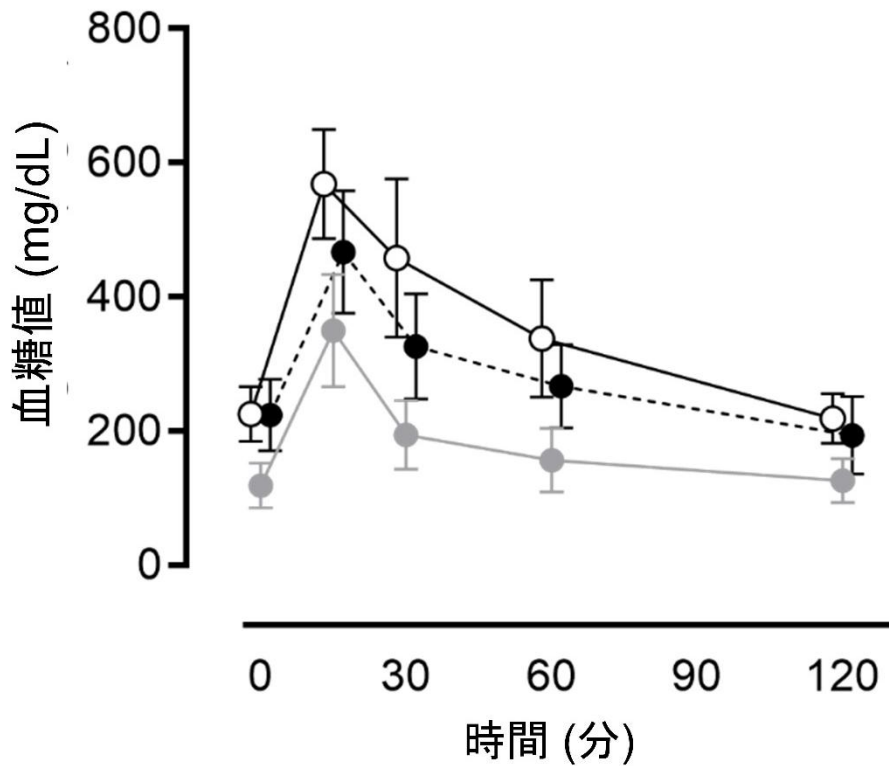


図 35. 経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT) における血糖値の変化

8 週齢から 12 週齢まで自由摂餌を行った ob/ob マウス、摂餌制限を行った ob/ob マウス、もしくは自由摂餌下で SGLT2 阻害薬投与を行った ob/ob マウスの経口ブドウ糖試験中の血糖値変化。自由摂餌を行った ob/ob マウス群 (白)、摂餌制限を行った ob/ob マウス群 (灰色)、自由摂餌下で SGLT2 阻害薬投与を行った ob/ob マウス群 (黒) (n=16–18) (平均値±SD)

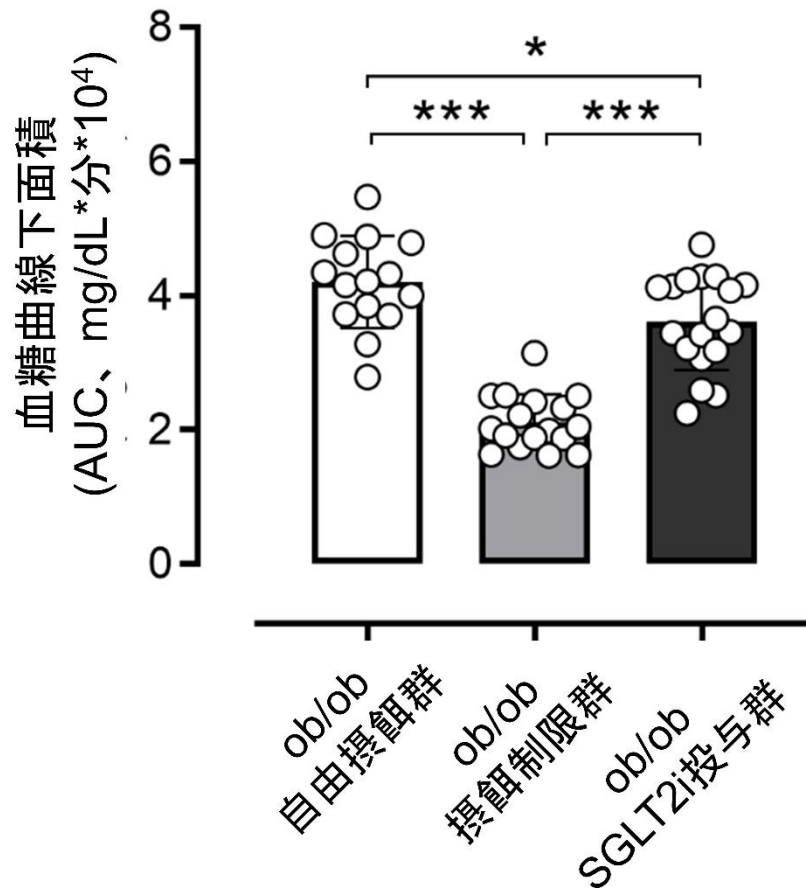


図 36. 経口ブドウ糖負荷試験（OGTT）における血糖曲線下面積（AUC）
 8 週齢から 12 週齢まで自由摂餌を行った ob/ob マウス、摂餌制限を行った ob/ob マウス、もしくは自由摂餌下で SGLT2 阻害薬投与を行った ob/ob マウスの経口ブドウ糖試験における血糖値曲線下面積（AUC）。自由摂餌を行った ob/ob マウス群（白）、摂餌制限を行った ob/ob マウス群（灰色）、自由摂餌下で SGLT2 阻害薬投与を行った ob/ob マウス群（黒）（n=16–18）（平均値±SD） * $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$ 、一元配置分散分析（Bonferroni 法による事後検定）、AUC, Area under the blood glucose curve

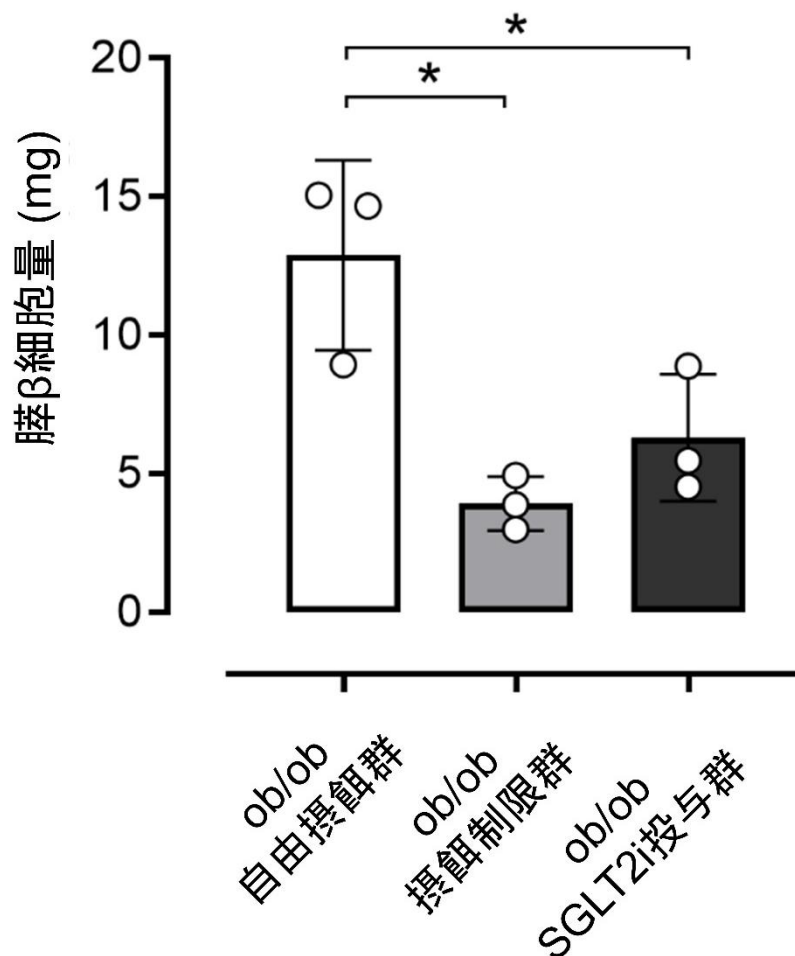


図 37. 膵β細胞量

自由摂餌を行った ob/ob マウス、摂餌制限を行った ob/ob マウス、自由摂餌下で SGLT2 阻害薬投与を行った ob/ob マウスの膵β細胞量を算出した。β細胞量は以下の式で計算: $\beta \text{細胞量 (mg)} = (\beta \text{細胞面積} / \text{膵臓面積}) \times \text{膵臓重量 (mg)}$ 。自由摂餌を行った ob/ob マウス群 (白)、摂餌制限を行った ob/ob マウス群 (灰色)、自由摂餌下で SGLT2 阻害薬投与を行った ob/ob マウス群 (黒) (n=3) (平均値 $\pm$ SD) * $p < 0.05$ 、一元配置分散分析 (Bonferroni 法による事後検定)、SGLT2i, sodium glucose cotransporter 2 inhibitor

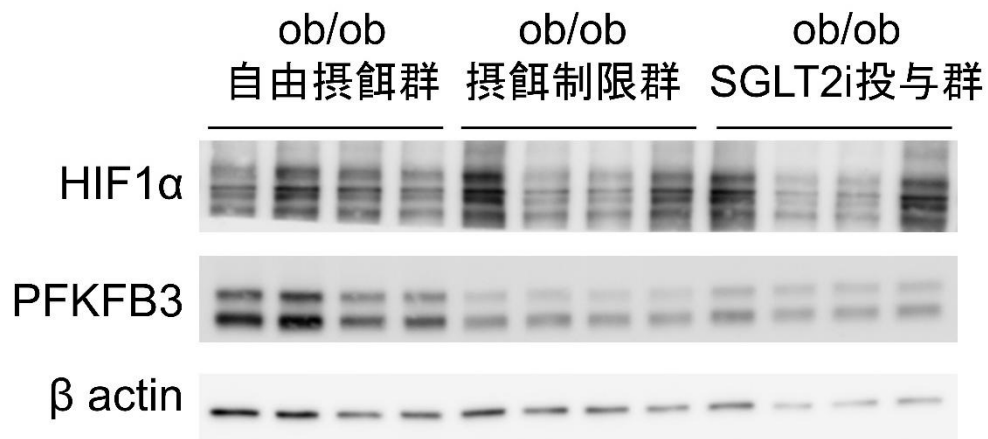


図 38. ob/ob マウスの膵島における代表的なウェスタンブロット
 各条件下で飼育された ob/ob マウス膵島における PFKFB3 および HIF1 α の代表的なウェスタンブロット。HIF1 α , hypoxia inducible factor-1 α ; PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3; SGLT2i, sodium glucose cotransporter 2 inhibitor

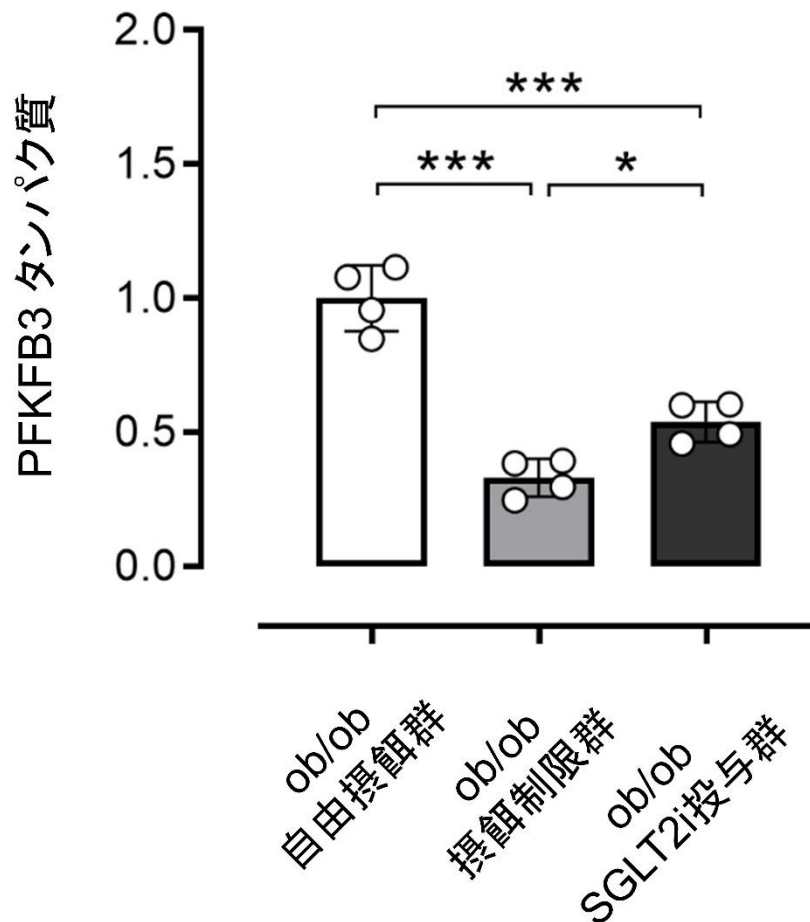


図 39. ob/ob マウスの膵島における PFKFB3 発現量の定量化

各条件下で飼育された ob/ob マウス膵島での PFKFB3 発現量をウェスタンブロットで定量的に評価した。内因性コントロールとして β actin で正規化し、ob/ob 自由摂餌群を 1 とした相対発現量として表示した。自由摂餌を行った ob/ob マウス群 (白)、摂餌制限を行った ob/ob マウス群 (灰色)、自由摂餌下で SGLT2 阻害薬投与を行った ob/ob マウス群 (黒) (n=4) (平均値 $\pm$ SD) * $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$ 、一元配置分散分析 (Bonferroni 法による事後検定)、PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3; SGLT2i, sodium glucose cotransporter 2 inhibitor

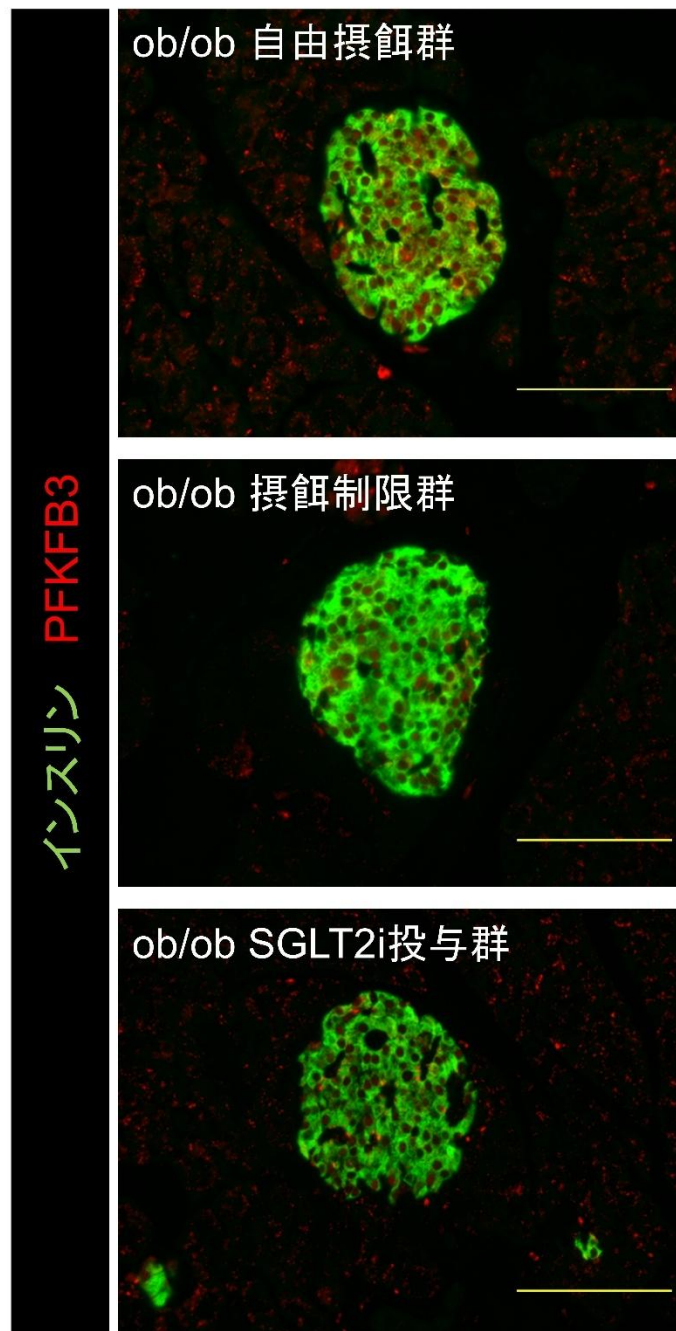


図 40. ob/ob マウスの膵島における免疫組織化学染色

ob/ob マウスの膵組織切片を抗 PFKFB3 抗体 (赤)、抗インスリン抗体 (緑) にて蛍光免疫染色法で二重染色した。黄色スケールバーは 100 μm を示している。
PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3; SGLT2i, sodium glucose cotransporter 2 inhibitor

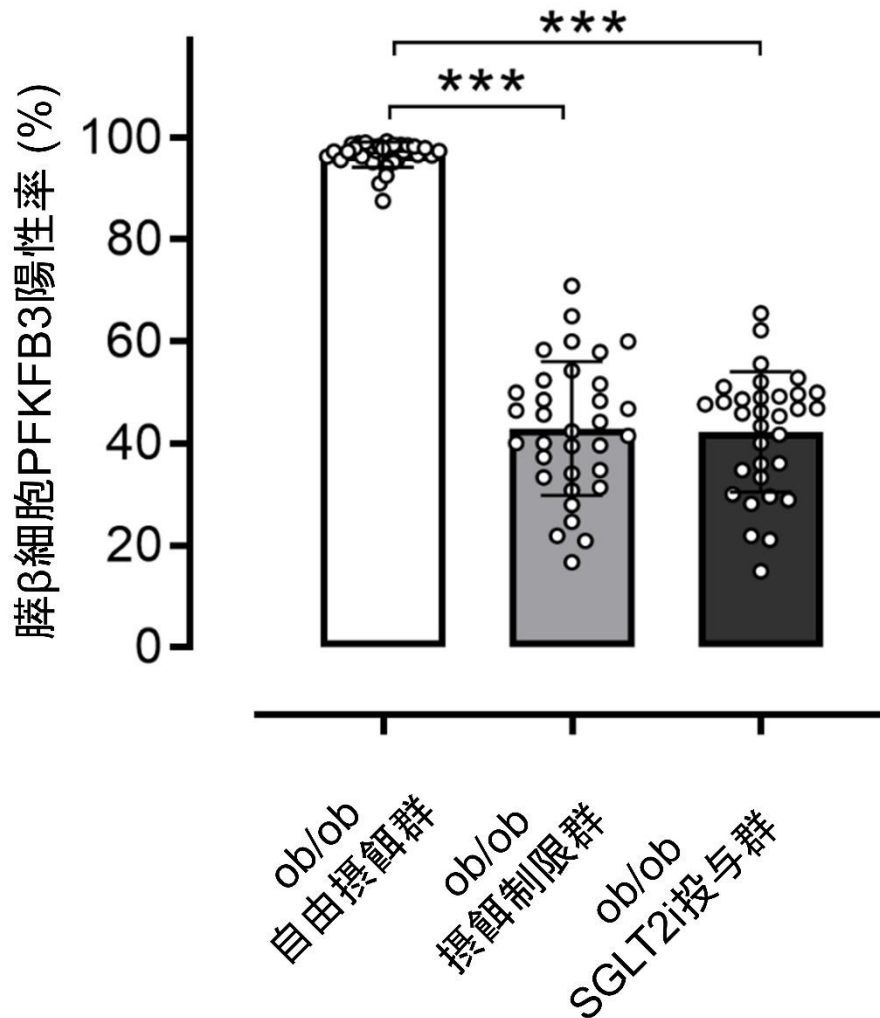


図 41. 膵β細胞における PFKFB3 陽性細胞率

自由摂餌を行った ob/ob マウス、摂餌制限を行った ob/ob マウス、自由摂餌下で SGLT2 阻害薬投与を行った ob/ob マウスの膵β細胞における PFKFB3 陽性細胞率を算出した。各群とも 3 匹のマウス由来とし、1 匹のマウスにつき 32-34 個の膵島を観察し、PFKFB3 陽性細胞数をカウントした。自由摂餌を行った ob/ob マウス群（白）、摂餌制限を行った ob/ob マウス群（灰色）、自由摂餌下で SGLT2 阻害薬投与を行った ob/ob マウス群（黒）（平均値±SD） *** $p < 0.001$ 、一元配置分散分析（Bonferroni 法による事後検定）、PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3; SGLT2i, sodium glucose cotransporter 2 inhibitor

7.3 細胞内代謝変化への介入

7.3.1 INS-1 832/13 細胞での検討

肥満高血糖条件下で PFKFB3 の発現が上昇していることが明らかとなったため、糖尿病病態下における PFKFB3 抑制が細胞内代謝に与える影響を検討した。高グルコース濃度で培養した INS-1 832/13 細胞では、PFKFB3 の発現は亢進しており、膵 β 細胞機能に重要な転写因子である pancreatic and duodenal homeobox 1(Pdx-1)および Mafa 遺伝子の発現が低グルコース培地で培養した場合と比較して有意に低下していた(いずれも $p < 0.001$; 図 42-44)。Pfkfb3 遺伝子を siRNA でノックダウンしても、それらの転写因子の発現は回復しなかった。しかし、高グルコース刺激下でのグルコース刺激インスリン分泌は、Pfkfb3 ノックダウン群で有意に低下していた($p < 0.05$; 図 45)。

さらに、PFKFB3 抑制が細胞活性に及ぼす影響を MTT アッセイで評価した。Pfkfb3 に対する siRNA またはコントロール siRNA を導入し、24、48、72 時間後に測定した吸光度を、コントロール siRNA 群の 24 時間値を 1 として正規化し、相対細胞活性として示した(図 46)。その結果、Pfkfb3 ノックダウン群では時間経過に伴う有意な相対細胞活性の低下を認めた。これらの所見は PFKFB3 の抑制が時間依存的に細胞の代謝活性および生存性を減弱させた可能性を示す。

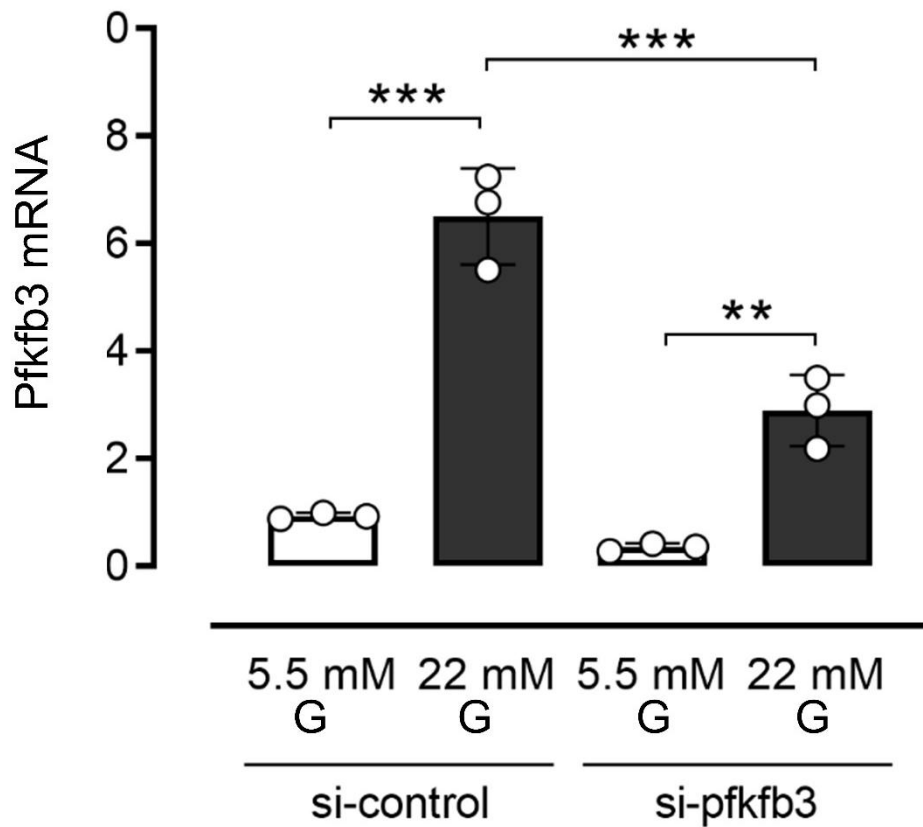


図 42. Pfkfb3 遺伝子発現量

INS-1 832/13 細胞に Pfkfb3 に対する siRNA またはコントロール siRNA を投与し 5.5 mM G または 22 mM G で 48 時間培養した。Pfkfb3 遺伝子発現量を Real-time PCR 法で定量的に評価した。内因性コントロールとして β actin で正規化し、5.5 mM G 群を 1 とした相対発現量として表示した。5.5 mM G 群（白）、22 mM G 群（黒）(n=3) (平均値 $\pm$ SD) ** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、一元配置分散分析 (Bonferroni 法による事後検定)、G, glucose; Pfkfb3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3

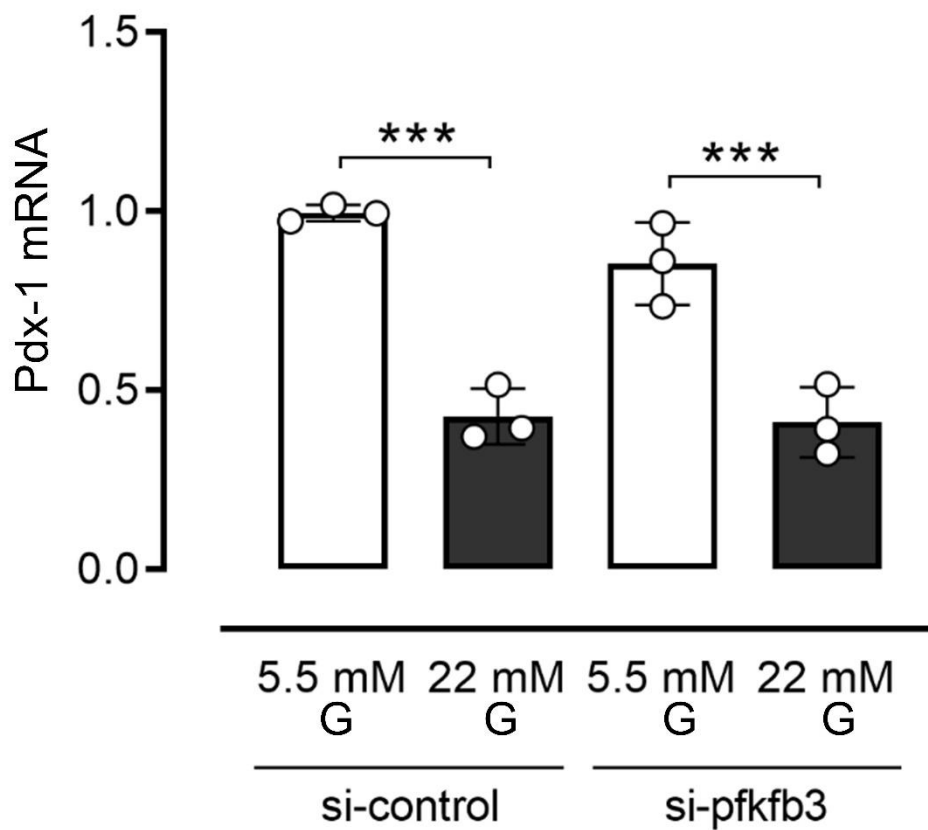


図 43. Pdx-1 遺伝子発現量

INS-1 832/13 細胞に Pfkfb3 に対する siRNA またはコントロール siRNA を投与し 5.5 mM G または 22 mM G で 48 時間培養した。Pdx-1 遺伝子発現量を Real-time PCR 法で定量的に評価した。内因性コントロールとして β actin で正規化し、コントロール siRNA を投与した 5.5 mM G 群を 1 とした相対発現量として表示した。5.5 mM G 群 (白)、22 mM G 群 (黒) (n=3) (平均値 $\pm$ SD)、*** p < 0.001、一元配置分散分析 (Bonferroni 法による事後検定)、G, glucose; Pdx-1, pancreatic and duodenal homeobox 1; Pfkfb3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase

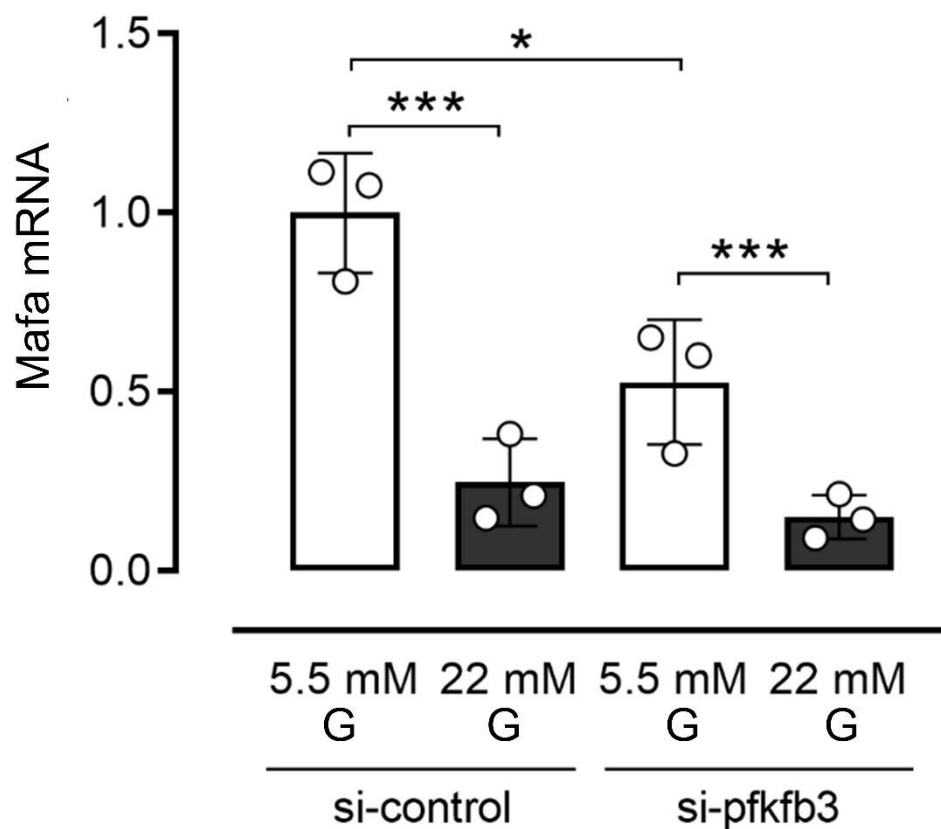


図 44. Mafa 遺伝子発現量

INS-1 832/13 細胞に Pfkfb3 に対する siRNA またはコントロール siRNA を投与し 5.5 mM G または 22 mM G で 48 時間培養した。Mafa 遺伝子発現量を Real-time PCR 法で定量的に評価した。内因性コントロールとして β actin で正規化し、コントロール siRNA を投与した 5.5 mM G 群を 1 とした相対発現量として表示した。5.5 mM G 群（白）、22 mM G 群（黒）（ $n=3$ ）（平均値 $\pm$ SD） * $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$ 、一元配置分散分析（Bonferroni 法による事後検定）、G, glucose; Pfkfb3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3; Mafa, v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene

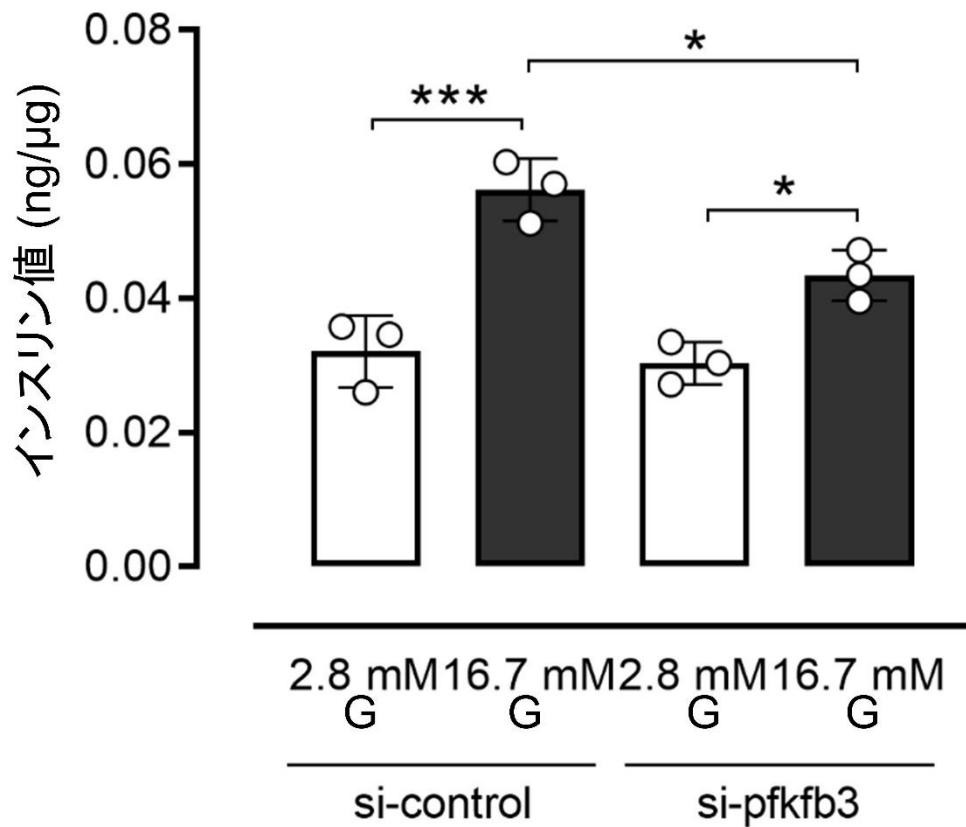


図 45. グルコース負荷試験中のインスリン値

INS-1 832/13 細胞に Pfkfb3 に対する siRNA またはコントロール siRNA を投与しグルコース負荷試験中の培養上清中へのインスリン分泌量を比較した。インスリン値は細胞タンパク質量で正規化した。2.8 mM G 群 (白)、16.7 mM G 群 (黒) (n=3) (平均値±SD) * $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$ 、一元配置分散分析 (Bonferroni 法による事後検定)、G, glucose; Pfkfb3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3

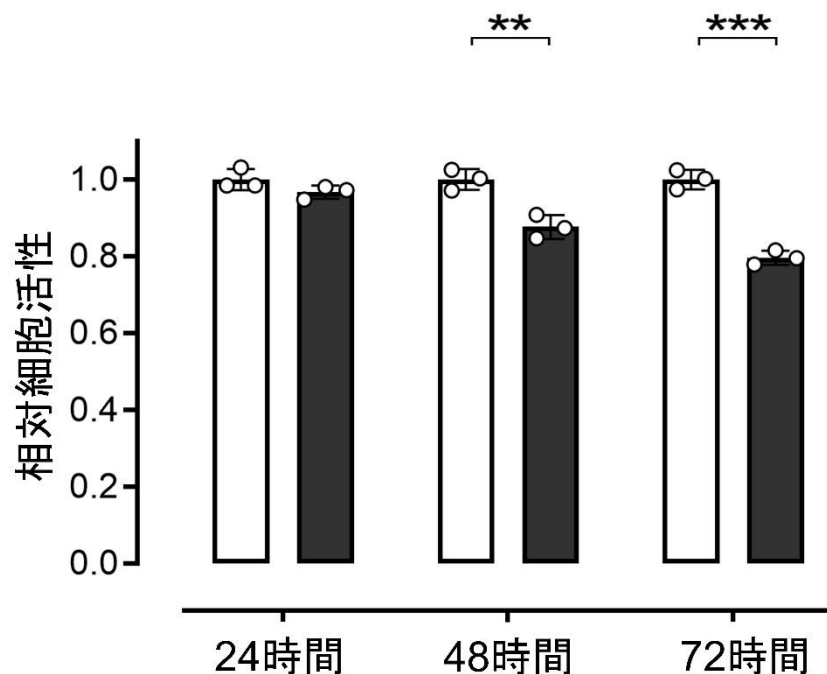


図 46. PFKFB3 ノックダウンが INS-1 832/13 細胞の細胞活性に及ぼす影響
 INS-1 832/13 細胞に Pfkfb3 に対する siRNA またはコントロール siRNA を投与し、24、48、72 時間後の細胞活性を MTT アッセイで評価した。コントロール siRNA を投与した 24 時間値を 1 とし相対細胞活性を示した。コントロール siRNA 投与群 (白)、Pfkfb3 に対する siRNA 投与群 (黒) (n=3) (平均値±SD) ** p < 0.01、*** p < 0.001、一元配置分散分析 (Bonferroni 法による事後検定)、Pfkfb3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3

7.3.2 ストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病マウスでの検討

ストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病マウスでは、膵β細胞における PFKFB3 の発現がコントロール群と比較して有意に高かった($p < 0.001$)が、PFKFB3 阻害薬である 3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one(3PO)によって有意に抑制された($p < 0.001$; 図 47-48)。

体重は STZ+3PO 群と STZ+DMSO 群で有意差はなかったが、血糖値は STZ+3PO 群で STZ + DMSO 群と比較して有意に高値であった(図 49-50)。OGTT では STZ+3PO 群が STZ + DMSO 群と比較して糖負荷後の耐糖能およびインスリン分泌が有意に低下していた(いずれも $p < 0.001$; 図 51-53)

STZ 投与後、膵島における MafA 発現は有意に低下し、3PO 投与でこの変化は改善しなかった(いずれも $p < 0.001$ vs. 対照群; 図 54-55)。さらに、STZ 投与後の膵β細胞量は 88%減少しており、3PO 投与でこの変化は改善しなかった(いずれも $p < 0.001$ vs. 対照群; 図 56)。

これらの実験結果から、糖尿病条件下で亢進している PFKFB3 発現を抑制すると耐糖能を増悪する可能性が示唆された。

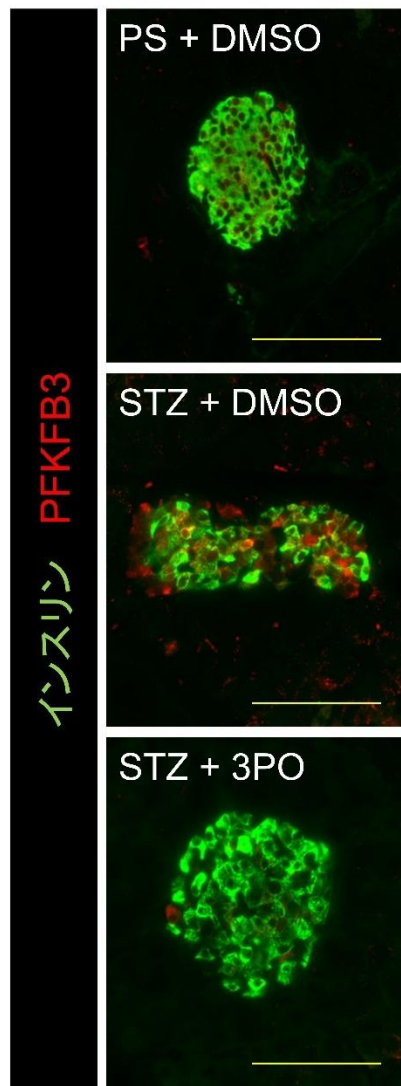


図 47. C57BL6/J マウスの膵島における免疫組織化学染色

PFKFB3 阻害がストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病のマウスの膵島に与える影響を検討した。C57BL6/J マウスを以下の3つのグループに分けた: physiological saline(PS)+DMSO 群(対照群)は生理食塩水を5日間投与後に2週間隔日でDMSOを投与、STZ+DMSO 群はSTZ (50 mg/kg/日を5日間)を投与後に2週間隔日でDMSOを投与、STZ+3PO (PFKFB3 阻害薬) 群はSTZ (50 mg/kg/日を5日間)を投与後に3PO (50 µg/g/日を隔日で2週間)を投与した。膵組織切片を抗 PFKFB3 抗体 (赤)、抗インスリン抗体 (緑) にて蛍光免疫染色法で二重染色した。黄色スケールバーは 100 µm を示している。STZ, streptozotocin; 3PO, 3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one; DMSO, dimethyl sulfoxide; PS, physiological saline; PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3

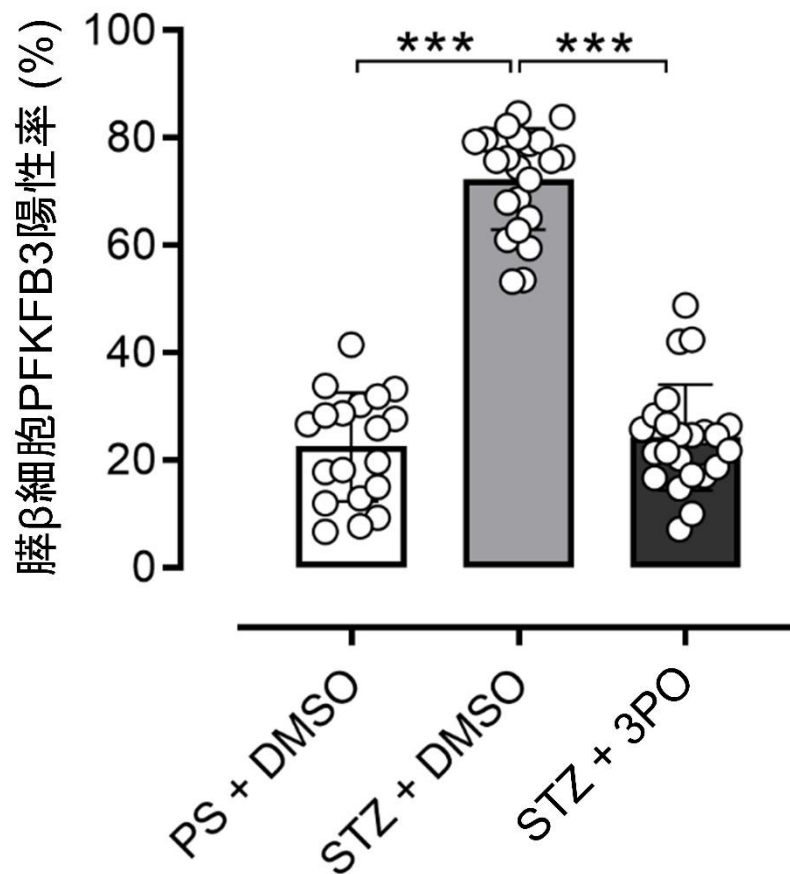


図 48. 膵β細胞における PFKFB3 陽性細胞率

PS+DMSO (対照群)、STZ+DMSO、STZ+3PO 投与を行った C57BL6/J マウスの膵β細胞における PFKFB3 陽性細胞率を算出した。各群とも 3 匹のマウス由来とし、1 匹のマウスにつき 19-23 個の膵島を観察し、PFKFB3 陽性細胞数をカウントした。PS+DMSO 群 (白)、STZ+DMSO 群 (灰色)、STZ+3PO 群 (黒) (平均値±SD) *** $p < 0.001$ 、一元配置分散分析 (Bonferroni 法による事後検定)、STZ, streptozotocin; 3PO, 3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one; DMSO, dimethyl sulfoxide; PS, physiological saline; PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3

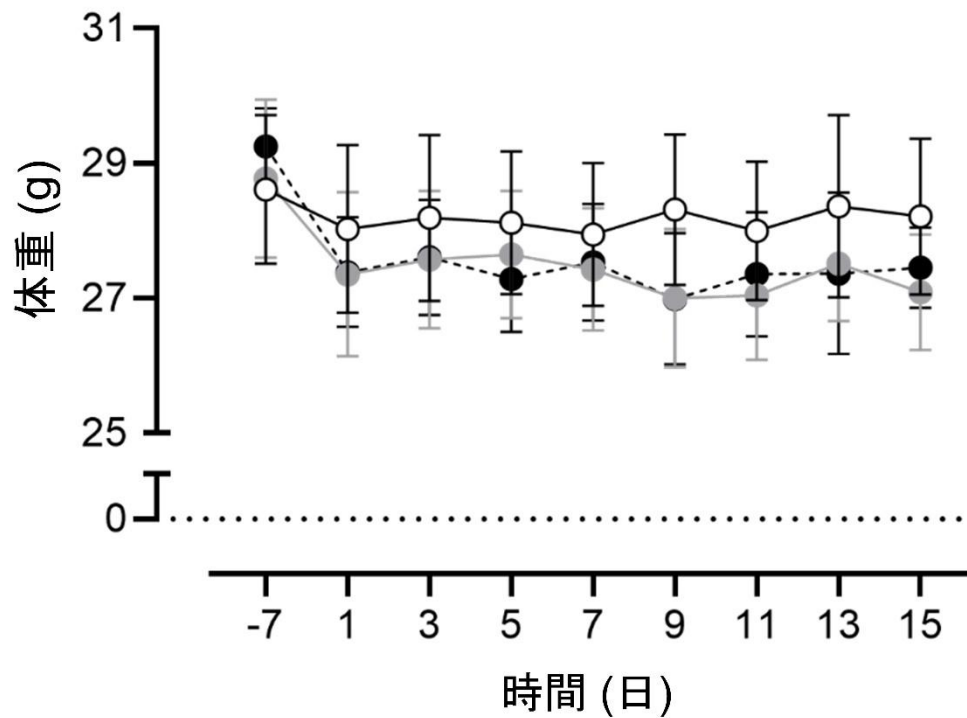


図 49. 体重の変化

PS+DMSO (対照群)、STZ+DMSO、STZ+3PO 投与を行った C57BL/6/J マウスの体重の比較。PS+DMSO 群 (白)、STZ+DMSO 群 (灰色)、STZ+3PO 群 (黒) (n=3–4) (平均値±SD)、STZ, streptozotocin; 3PO, 3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one; DMSO, dimethyl sulfoxide; PS, physiological saline; PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3

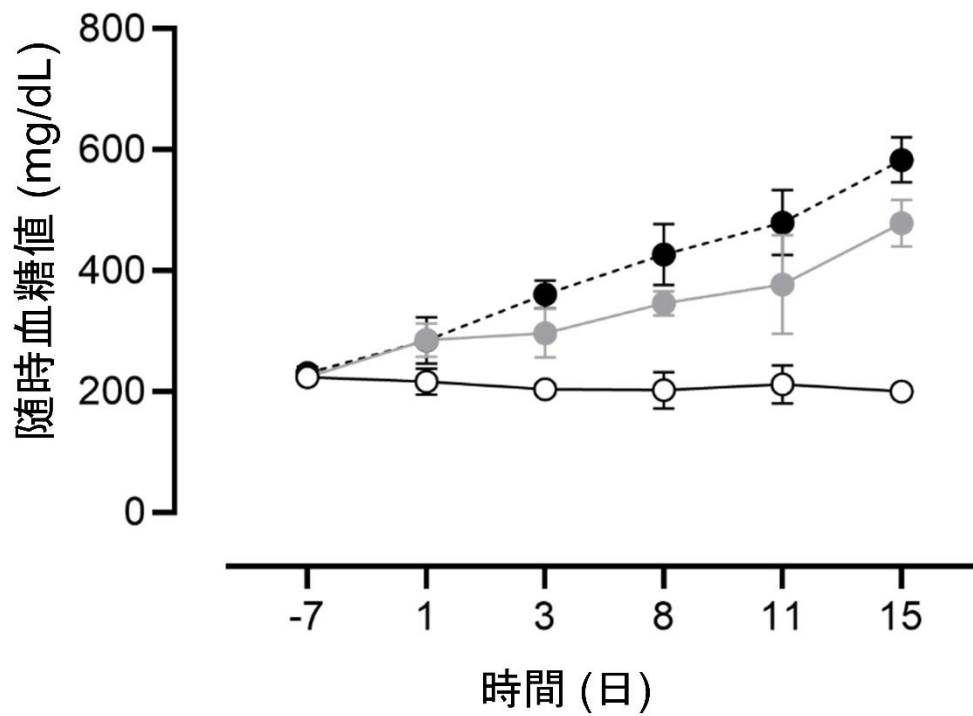


図 50. 随時血糖値の変化

PS+DMSO (対照群)、STZ+DMSO、STZ+3PO 投与を行った C57BL6/J マウスの随時血糖値の比較。PS+DMSO 群 (白)、STZ+DMSO 群 (灰色)、STZ+3PO 群 (黒) (n=3-4) (平均値±SD)、STZ, streptozotocin; 3PO, 3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one; DMSO, dimethyl sulfoxide; PS, physiological saline; PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3

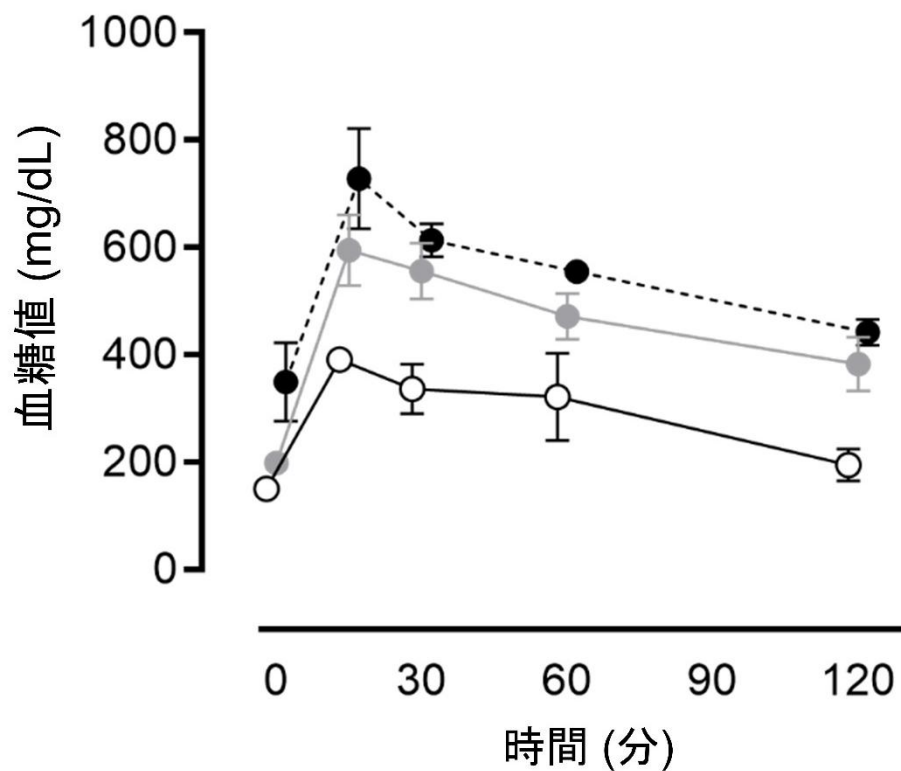


図 51. 経口ブドウ糖試験中の血糖値の変化

PS+DMSO (対照群)、STZ+DMSO、STZ+3PO 投与を行った C57BL/6/J マウスの経口ブドウ糖試験中の血糖値の変化。PS+DMSO 群 (白)、STZ+DMSO 群 (灰色)、STZ+3PO 群 (黒) (n=3-4) (平均値±SD)、STZ, streptozotocin; 3PO, 3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one; DMSO, dimethyl sulfoxide; PS, physiological saline; PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3

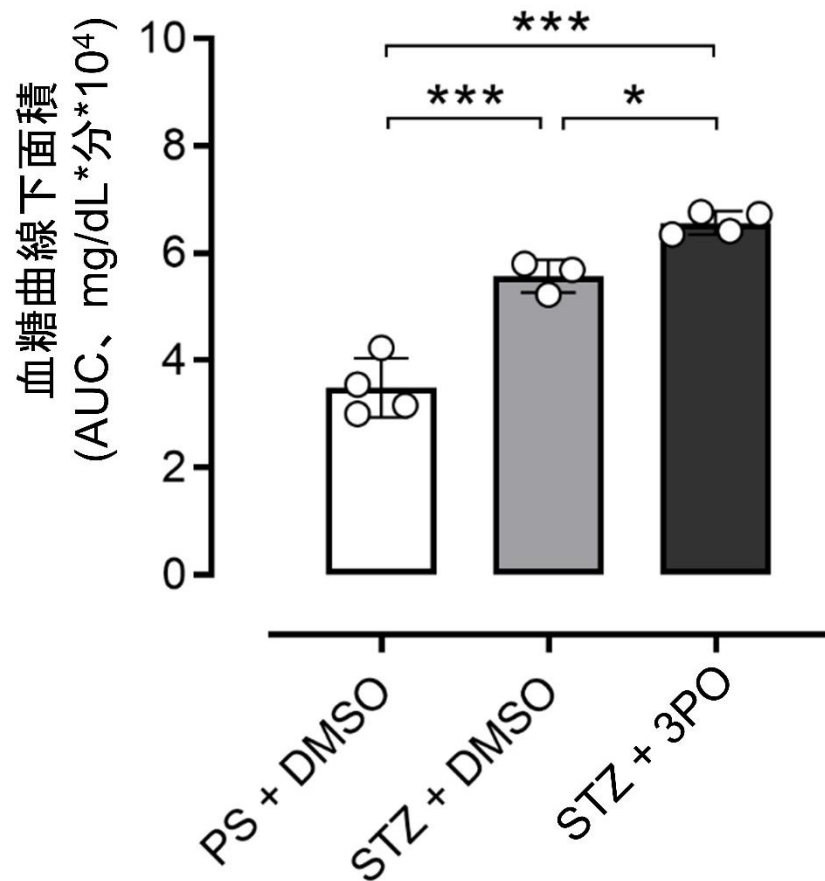


図 52. 経口ブドウ糖負荷試験（OGTT）における血糖曲線下面積（AUC）
 PS+DMSO（対照群）、STZ+DMSO、STZ+3PO 投与を行った C57BL/6/J マウスの
 経口ブドウ糖試験における血糖値曲線下面積（AUC）。PS+DMSO 群（白）、
 STZ+DMSO 群（灰色）、STZ+3PO 群（黒）（n=3-4）（平均値±SD） * $p < 0.05$ 、
 *** $p < 0.001$ 、一元配置分散分析（Bonferroni 法による事後検定）、AUC, Area under
 the blood glucose curve; STZ, streptozotocin; 3PO, 3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-
 propen-1-one; DMSO, dimethyl sulfoxide; PS, physiological saline; PFKFB3, 6-
 phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3

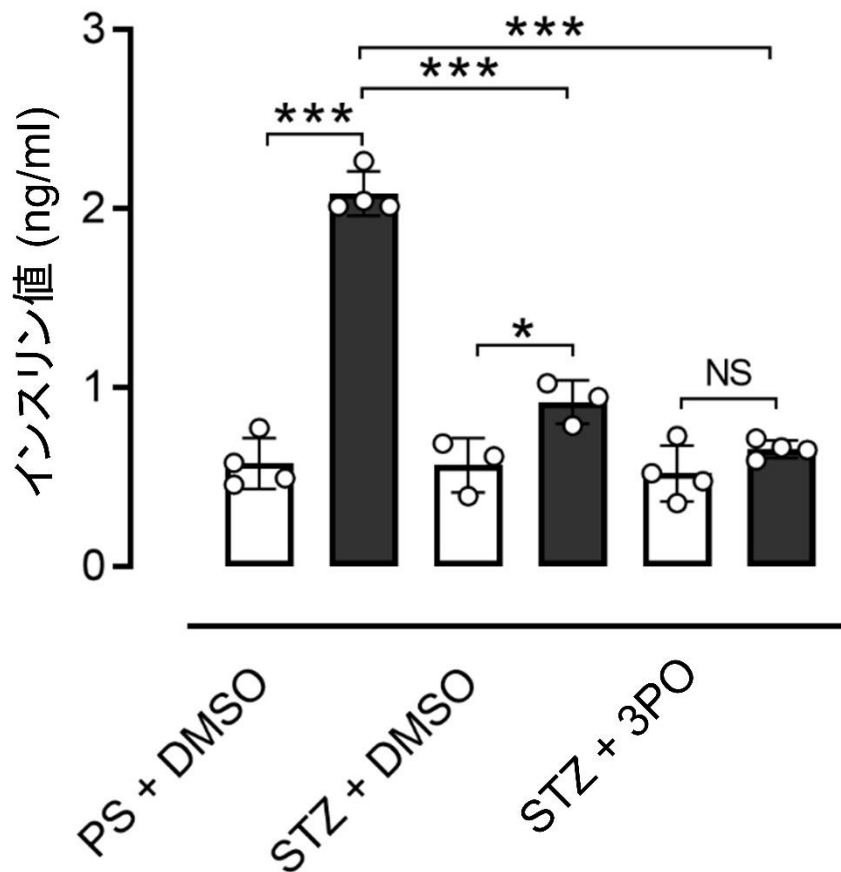


図 53. 経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT) におけるインスリン値
 PS+DMSO (対照群)、STZ+DMSO、STZ+3PO 投与を行った C57BL6/J マウスの
 経口ブドウ糖試験中のインスリン値。ブドウ糖投与前のインスリン値 (白)、15
 分後のインスリン値 (黒) (n=3-4) (平均値±SD) *** $p < 0.001$ 、一元配置分散
 分析 (Bonferroni 法による事後検定)、STZ, streptozotocin; 3PO, 3-(3-pyridinyl)-1-
 (4-pyridinyl)-2-propen-1-one; DMSO, dimethyl sulfoxide; PS, physiological saline;
 PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3; NS, not significant

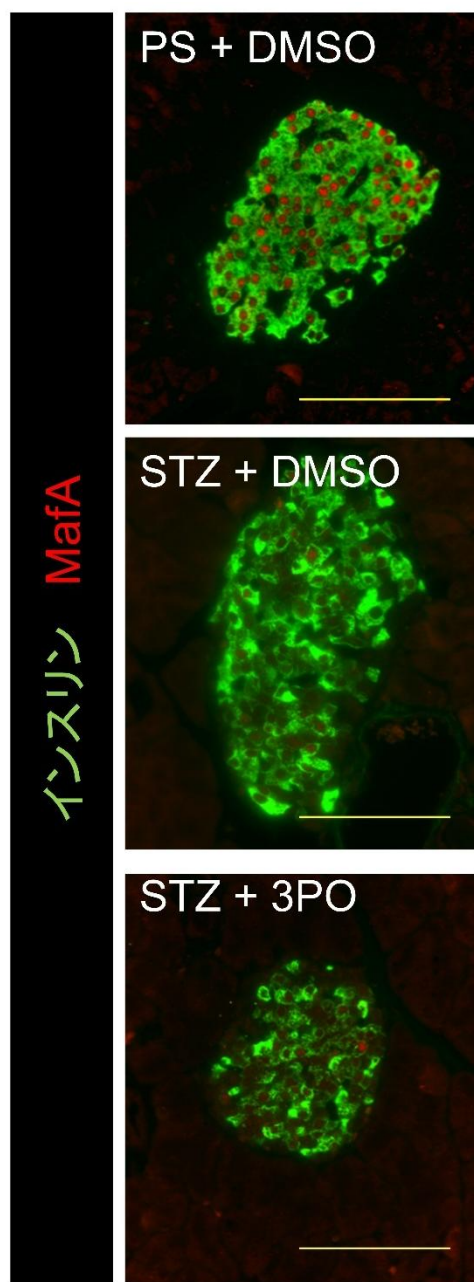


図 54. 膵島における免疫組織化学染色

PS+DMSO（対照群）、STZ+DMSO、STZ+3PO 投与を行った C57BL6/J マウスの膵組織切片を抗 MafA 抗体（赤）、抗インスリン抗体（緑）にて蛍光免疫染色法で二重染色した。黄色スケールバーは 100 μ m を示している。STZ, streptozotocin; 3PO, 3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one; DMSO, dimethyl sulfoxide; PS, physiological saline; MafA, v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A

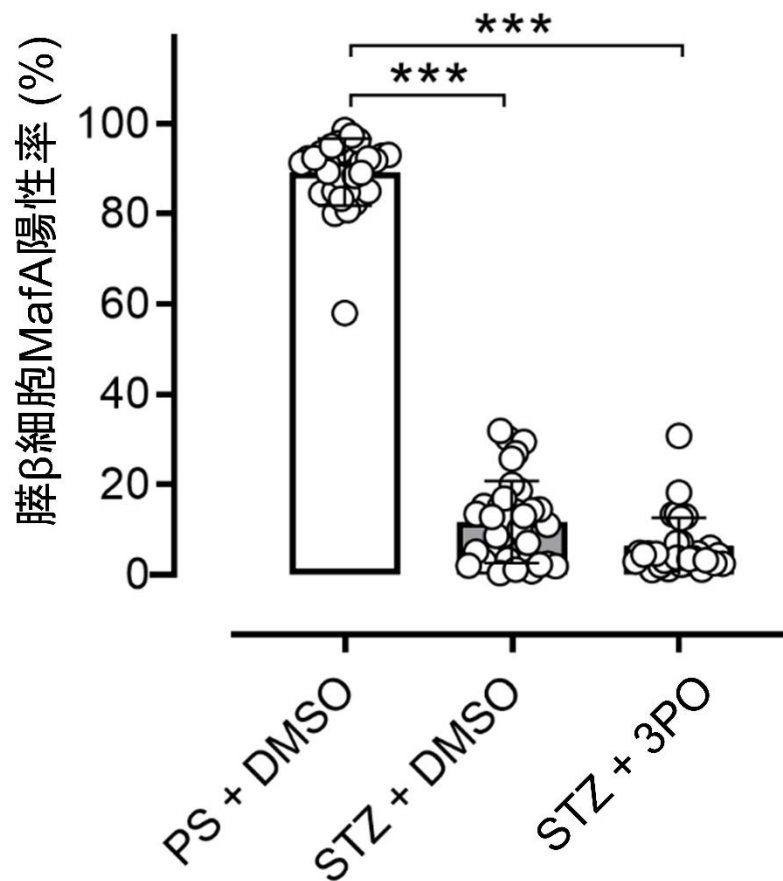


図 55. 膵β細胞における MafA 陽性細胞率

PS+DMSO (対照群)、STZ+DMSO、STZ+3PO 投与を行った C57BL6/J マウスの膵β細胞における PFKFB3 陽性細胞率を算出した。各群とも 3 匹のマウス由来とし、1 匹のマウスにつき 30-35 個の膵島を観察し、MafA 陽性細胞数をカウントした。PS+DMSO 群 (白)、STZ+DMSO 群 (灰色)、STZ+3PO 群 (黒) (平均値±SD) * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、一元配置分散分析 (Bonferroni 法による事後検定)、STZ, streptozotocin; 3PO, 3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one; DMSO, dimethyl sulfoxide; PS, physiological saline; MafA, v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A

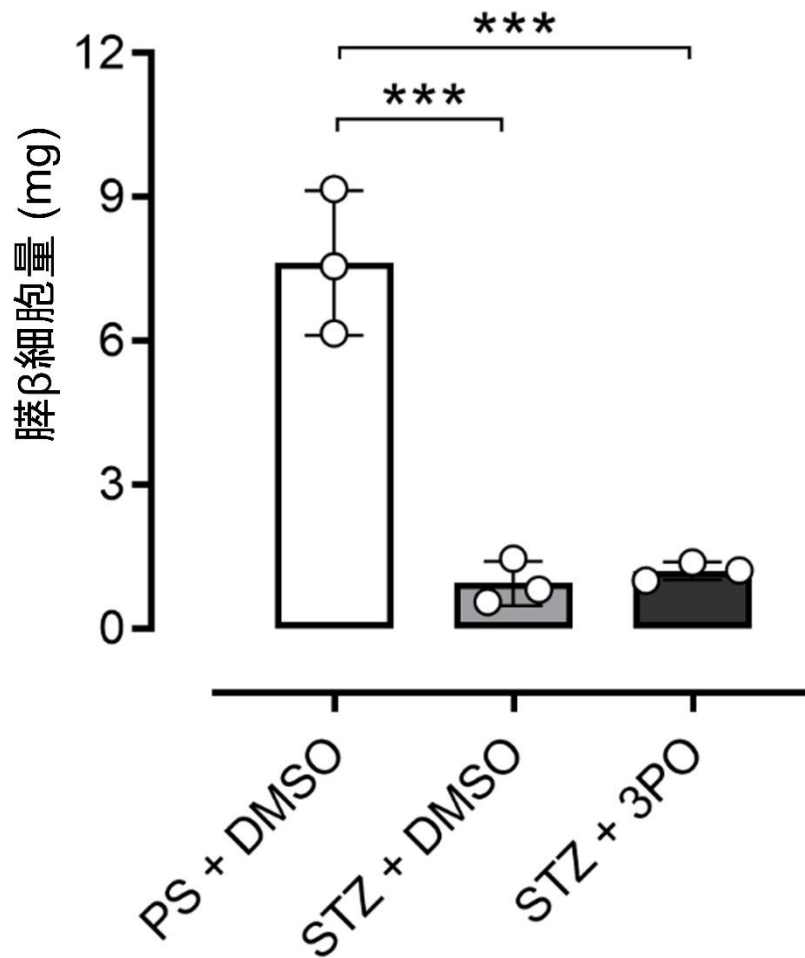


図 56. 膵β細胞量

PS+DMSO (対照群)、STZ+DMSO、STZ+3PO 投与を行った C57BL6/J マウスの膵β細胞量を算出した。膵β細胞量は以下の式で計算:膵β細胞量 (mg) = (膵β細胞面積 / 膵臓面積) × 膵臓重量 (mg)。PS+DMSO 群 (白)、STZ+DMSO 群 (灰色)、STZ+3PO 群 (黒) (n=3) (平均値±SD) *** p < 0.001、一元配置分散分析 (Bonferroni 法による事後検定)、STZ, streptozotocin; 3PO, 3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one; DMSO, dimethyl sulfoxide; PS, physiological saline

8. 考察

本研究では、急性代謝ストレス環境下におけるげっ歯類の膵 β 細胞の代謝適応において、解糖系および、そのマスターレギュレーターである PFKFB3 が果たす役割を検討した。INS-1 832/13 細胞や STZ 誘発糖尿病モデルマウスなどの *in vitro*、*in vivo* モデルを用い、PFKFB3 を介する解糖系に関わる細胞内代謝変化が、インスリン分泌や耐糖能に与える影響を解析した。その結果、急性代謝ストレス環境では PFKFB3 の発現亢進が、短期的には膵 β 細胞の生存維持と機能維持に寄与し得ることが示唆された。一方その有益性は時間依存的に変化し、持続すれば不適応へ傾く可能性が考慮された。

既報によると Goto-Kakizaki ラットの膵島や高グルコース曝露を受けた β 細胞株において解糖系酵素の発現亢進が報告されており、(Hou et al, 2017; Bensellam et al, 2009; Roche et al, 1997; Haythorne et al, 2019)、2 型糖尿病患者の膵島でも PFKFB3 の発現亢進が示されている(Nomoto et al, 2020; Cousminer et al, 2018)。本研究でも PFKFB3 の発現は、過剰な代謝負荷のもとで亢進しており、これらの報告と一致した。さらに、摂餌制限や薬理学的介入により代謝ストレスを低減すると、PFKFB3 の発現亢進が可變的に低下することを示し、それが状況依存的・時間依存的に調節されることを示した。加えて siRNA によるノックダウンや 3PO による薬理学的な解糖系の抑制は代謝ストレス下においてインスリン分泌を低下させ、耐糖能を増悪させた。これは、急性代謝ストレス期における PFKFB3 発現の一過性亢進が膵 β 細胞の機能維持の前提となる生存優先のための細胞内代謝変化を調整するという解釈を裏付ける。

INS-1 832/13 細胞では、Pfkfb3 ノックダウン後にグルコース応答性インスリン分泌は低下した。MTT アッセイでは Pfkfb3 ノックダウン後に細胞代謝活性が時間依存的に低下し、急性代謝ストレス環境下での細胞生存性の脆弱化が示唆された。近年、PFKFB3 陽性の膵 β 細胞がエネルギー消費や生合成を一時的に抑制し、損傷修復の猶予を確保する生存に優位な表現型をとることが報告され (Raval et al, 2024)、本研究の結果はこの概念と一致する。すなわち、PFKFB3 の短期的発現亢進は生存維持を先行して担い、その上で機能維持を支えるという構図である。

一方、慢性高血糖状態の膵島でも PFKFB3 の発現亢進は観察されている(Hou et al, 2017; Bensellam et al, 2009; Roche et al, 1997; Haythorne et al, 2019)ものの、その機能的意義は時間経過により変化し、膵 β 細胞機能障害に至り得ることが慢性モデルで示されている(Raval et al, 2024; Min et al, 2022)。本研究では Pfkfb3 抑制によりグルコース応答性インスリン分泌は低下していたが、PFKFB3 発現亢進

に伴ってインスリン分泌量の増加が観察される場合があっても、グルコース応答性インスリン分泌の増加だけではなく基礎インスリン分泌の増加を反映している可能性にも留意すべきである。HIF1 α に関連する細胞内代謝変化やミトコンドリア機能低下が進行するとグルコース応答性インスリン分泌が低下し、基礎インスリン分泌偏重へ移行し得ることが示唆されており(Nomoto et al, 2020)、PFKFB3は急性期に適応的である一方、持続すると不適応化に寄与し得る二相的役割を有するという考えが適切である。

PFKFB3は細胞質と核の双方に局在し、核内フルクトース-2,6-ビスリン酸の合成を介して cyclin D3 や cell division cycle 25c などの細胞周期制御因子の発現を亢進させることが知られている(Yalcin et al, 2009)。また、PFKFB3はグルコース代謝や発がん性に関連する Ras シグナルにも関与し、低酸素環境下では HIF1 α により強力に制御される(Telang et al, 2006)。3POによる解糖系経路の抑制はがん細胞にアポトーシスを誘導することも知られており(Clem et al, 2013)、PFKFB3が細胞生存・ストレス適応に関与するという見解を支持する。もっとも、3POはフルクトース-2,6-ビスリン酸を低下させるが PFKFB3 に直接結合しないことが示されており(Emini et al, 2020)、本研究で認められた PFKFB3 陽性／陰性細胞比の変化は経路全体の細胞内代謝変化やオフターゲット作用の影響を受けた可能性が考慮される。したがって、薬理学的データは支持的証拠として位置づけられ、因果関係の確証には膵 β 細胞特異的 Pfkfb3 ノックアウトなどの遺伝学的アプローチが望まれる。

本研究において栄養過多モデルである ob/ob マウスを用いた動物実験は、代謝ストレス下における PFKFB3 調節の可変性と適応性を示唆した。ob/ob マウスはヒト 2 型糖尿病の病態を完全に模倣するものではないが、持続的代謝負荷に対する膵 β 細胞の適応を理解するうえで有用である。一方、膵 β 細胞が高度に減少する STZ 誘発糖尿病モデルは、重篤な糖尿病ストレス下における残存膵 β 細胞の代謝応答を評価する目的で用いた。前述の限界を勘案しつつ、本研究は病態背景および時間軸によって PFKFB3 の関与が変動し得ることを示唆する。

本研究にはいくつかの限界がある。第一に、細胞実験で用いた INS-1 832/13 細胞は腫瘍由来で増殖性が高く、成熟ヒト膵 β 細胞の完全な代替とは言い難い。第二に ob/ob マウスは稀なレプチン変異に基づく極端な代謝表現型を示し、STZ 誘発性の糖尿病モデルマウスは急性の膵 β 細胞破壊を誘導するため、慢性進行性のヒト 2 型糖尿病とは異なる。第三に、本研究では PFKFB3 の過剰発現による影響は評価できていない。第四に、解糖系阻害薬としての 3PO は特異性が限定的であり、より選択性の高い代替阻害薬の検討は行っていない。第五に、アポトーシス、細胞周期、ペントースリン酸経路や脂質代謝などの代替代謝経路に対する PFKFB3 調節の影響は検討していない。さらに、代謝ストレス環境下の膵 β

細胞では HIF1 α と PFKFB3 の発現がともに亢進していたが、両者の発現レベル間に一貫した相関は認められなかった。これは Adenosine monophosphate-activated protein kinase や mammalian target of rapamycin などの別経路が PFKFB3 調節に関与する可能性を示唆する。したがって、HIF1 α は PFKFB3 の初期の転写活性化に寄与しうるが、ストレス環境下の膵 β 細胞における PFKFB3 タンパク量や機能的関与の直接指標とはならない可能性がある。

以上を総合すると、PFKFB3 は急性期には適応的に働き、生存維持を通じて機能を支えるが、その状態が長く続くと不適応へ傾き、基礎インスリン分泌が優位となり、グルコース応答性インスリン分泌が低下するという二相的役割を有する。代謝経路を治療標的とする際には、PFKFB3 の時間依存性と病態の経過を踏まえ、介入の時期と条件を慎重に検討すべきである。今後は膵 β 細胞特異的 Pfkfb3 ノックアウトや過剰発現といった遺伝学的手法に加え、より選択性の高い阻害薬の検討、さらに慢性モデルを用いた時系列介入により、PFKFB3 の因果的役割をより精密に評価する必要がある。また、基礎インスリン分泌とグルコース応答性インスリン分泌を区別し、ミトコンドリア機能の評価、ペントースリン酸回路や脂質代謝などの代替経路の解析を行うことにより、PFKFB3 依存の細胞内代謝変化の位相をより具体的に把握することが可能となる。

本研究は PFKFB3 に着目し、膵 β 細胞の細胞内代謝変化を時間軸で再定義した点に独自性があり、急性期の適応を生かしつつ慢性期の不適応を回避するという新たな時間軸依存型の治療設計の理論的基盤に寄与する可能性がある。

今後は膵 β 細胞特異的な遺伝学的介入を用いて急性期と慢性期を区別した検証を行い、その成果をヒト膵島での縦断的検証へと発展させ、時間依存性を踏まえた代謝介入の実装へ結びつける必要がある。

9. 結語

急性代謝ストレス下の膵 β 細胞では、PFKFB3 の発現亢進が機能と生存の短期的維持を支える適応的な代謝応答として働く。一方、この変化は代謝ストレスの低減により是正し得る可変性を示し、PFKFB3 の役割は状況と経過時間に応じて変化する。すなわち、急性期には短期の適応を補強する一方で、慢性期には持続的な過剰活性化が機能低下を伴う不適応へ移行し得る。以上から、PFKFB3 は必ずしも病的変化の誘因ではなく、短期的な代謝適応を担う補償因子として位置づけられ、PFKFB3 経路への介入や所見の解釈にあたっては、急性と慢性を明確に区別し、時間軸を踏まえた評価と介入が不可欠である。

10. 結論

本研究は、急性代謝ストレス環境における膵β細胞の代謝適応に対する解糖系およびPFKFB3の役割を細胞、動物実験により明らかにした。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。

INS-1 832/13 細胞を 5.5、11、22 mM グルコース濃度で培養し、ob/ob マウスを自由摂餌、摂餌制限、SGLT2 阻害薬投与群、STZ 誘発糖尿病モデルマウスでは STZ 単独群と STZ+3PO 投与群に群別し、所定の期間飼育したところ、

1. 高グルコース環境で PFKFB3 を含む解糖系酵素の発現が亢進し、ミトコンドリア機能は低下した
2. 高グルコース環境で誘導された PFKFB3 の発現亢進およびミトコンドリア機能低下は、低グルコース環境への切り替えにより可變的に是正された
3. ob/ob マウスの自由摂餌群では耐糖能が増悪し、膵島の PFKFB3 発現は亢進したが、摂餌制限群および SGLT2 阻害薬投与群ではこれらの変化は低減した
4. PFKFB3 の siRNA によるノックダウンおよび 3PO 投与により PFKFB3 は抑制され、高グルコース刺激時のインスリン分泌は低下した
5. STZ 誘発糖尿病モデルでは STZ+DMSO 群と比較して STZ+3PO 群で随時血糖値および耐糖能は増悪し、膵島の PFKFB3 発現は STZ+DMSO 群より低下した。
6. 高グルコース環境で Pdx-1、Mafa は低下し、PFKFB3 抑制での回復は認めず、PFKFB3 抑制によるインスリン分泌低下と細胞生存性の脆弱化が示唆された

これらの結果から PFKFB3 の発現亢進は急性代謝ストレス期には生存維持を通じて機能維持に寄与する適応応答である一方、それが持続するとグルコース応答性インスリン分泌低下と基礎インスリン分泌偏重を伴う不適応へ移行し得ると考えられた。PFKFB3 は短期的な代謝適応の担い手として位置づけられ、その介入や解釈にあたっては急性期と慢性期を明確に区別し、時間軸を踏まえた評価が必要である。すなわち、急性代謝ストレス期では一過性の PFKFB3 活性を支持する介入は膵β細胞の生存と機能の保持に寄与し、患者の益をもたらすことが期待できる。一方で、長期に高血糖が持続し膵β細胞機能が低下した病態では、PFKFB3 の持続的過活性を抑制する方向の調整が有用となる可能性がある。

今後は遺伝学的手法に加え、より選択性の高い阻害薬の開発、慢性モデルを用いた時系列介入などにより、さらなる検討が必要である。

11. 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結果をまとめたものです。同教室、渥美達也教授には指導教官として本研究の機会を与えて頂き、その遂行にあたって終始、ご指導を頂きました。ここに深謝の意を表します。また同教室の野本博司先生（現・旭川医科大学教授）には研究の立ち上げから論文作成に至るまで終始、丁寧かつ熱心にご指導、適切なご助言を頂きました。ここに心より深く感謝の意を表します。

中村昭伸先生、亀田啓先生、泉原里美先生、張馨心先生には研究カンファで有益なご討論、ご助言を頂きました。ここに深く感謝の意を表します。

また、当科実験助手の東真理さん、渡邊真理華さん、藤森なつみさんのご協力なしに実験を遂行することは不可能でした。心より感謝申し上げます。この他にもこの論文作成にあたり、多くのご協力、ご助言、ご支援を頂きました。重ねまして心より感謝申し上げます。

最後に研究活動を支えてくれました家族に心から感謝いたします。

12. 利益相反

開示すべき利益相反状態は以下の通りである。

中村昭伸准教授および野本博司教授はトホグリフロジンの製造販売元である興和株式会社より研究費の助成およびトホグリフロジンの提供を受けた。ただし本研究の研究デザイン、データ収集・解析、論文執筆、発表において興和株式会社は一切関与していない。その他の著者に開示すべき利益相反はない。

13. 参考文献

- Bensellam M, Lommel LV, Overbergh L, Schuit FC and Jonas JC (2009) Cluster analysis of rat pancreatic islet gene mRNA levels after culture in low-, intermediate- and high-glucose concentrations. *Diabetologia* 52, 463–476.
- Bobarykina AY, Minchenko DO, Opentanova IL, Moenner M, Caro J, Esumi H and Minchenko OH (2006) Hypoxic regulation of PFKFB-3 and PFKFB-4 gene expression in gastric and pancreatic cancer cell lines and expression of PFKFB genes in gastric cancers. *Acta Biochim Pol* 53, 789–799.
- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA and Butler PC (2003) Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 102–110.
- Clem BF, O’Neal J, Tapolsky G, Clem AL, Imbert-Fernandez Y, Kerr DA, Klarer AC, Redman R, Miller DM, Trent JO, et al (2013) Targeting 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) as a therapeutic strategy against cancer. *Mol Cancer Ther* 12, 1461–1470.
- Cousminer DL, Ahlqvist E, Mishra R, Andersen MK, Chesi A, Hawa MI, Davis A, Hodge KM, Bradfield JP, Zhou K, et al (2018) First genome-wide association study of latent autoimmune diabetes in adults reveals novel insights linking immune and metabolic diabetes. *Diabetes Care* 41, 2396–2403.
- Da Q, Huang L, Huang C, Chen Z, Jiang Z, Huang F, Shen T, Sun L, Yan Z, Ye X, et al (2023) Glycolytic regulatory enzyme PFKFB3 as a prognostic and tumor microenvironment biomarker in human cancers. *Aging (Albany NY)* 15, 4533–4559.
- Emeni Veseli B, Perrotta P, Van Wielendaele P, Lambeir AM, Abdali A, Bellosta S, Monaco G, Bultynck G, Martinet W and De Meyer GRY (2020) Small molecule 3PO inhibits glycolysis but does not bind to 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3). *FEBS Lett* 594, 3067–3075.
- Haythorne E, Rohm M, van de Bunt M, Brereton MF, Tarasov AI, Blacker TS, Sachse G, Silva Dos Santos M, Terrón Expósito R, Davis S, et al (2019) Diabetes causes marked inhibition of mitochondrial metabolism in pancreatic β -cells. *Nat Commun* 10, 2474.
- Henquin JC (2009) Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia* 52, 739–751.
- Henquin JC (2000) Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49, 1751–1760.

Hou J, Li Z, Zhong W, Hao Q, Lei L, Wang L, Zhao D, Xu P, Zhou Y and Wang Y, et al (2017) Temporal transcriptomic and proteomic landscapes of deteriorating pancreatic islets in type 2 diabetic rats. *Diabetes* 66, 2188–2200.

Houddane A, Bultot L, Novellasdemunt L, Johanns M, Gueuning MA, Vertommen D, Coulie PG, Bartrons R, Hue L and Rider MH (2017) Role of Akt/PKB and PFKFB isoenzymes in the control of glycolysis, cell proliferation and protein synthesis in mitogen-stimulated thymocytes. *Cell Signal* 34, 23–37.

Kierans SJ and Taylor CT (2021) Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. *J Physiol* 599, 23–37.

Kitao N, Nakamura A, Miyoshi H, Nomoto H, Takahashi K, Omori K, Yamamoto K, Cho KY, Terauchi Y and Atsumi T (2018) The role of glucokinase and insulin receptor substrate-2 in the proliferation of pancreatic beta cells induced by short-term high-fat diet feeding in mice. *Metabolism* 85, 48–58.

MacDonald PE, Joseph JW and Rorsman P (2005) Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360, 2211–2225.

Maechler P and Wollheim CB (2001) Mitochondrial function in normal and diabetic beta-cells. *Nature* 414, 807–812.

Marrano N, Biondi G, Cignarelli A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F and Natalicchio A (2020) Functional loss of pancreatic islets in type 2 diabetes: how can we halt it? *Metabolism* 110, 154304.

Min J, Ma F, Seyran B, Pellegrini M, Greeff O, Moncada S and Tudzarova S (2022) β -Cell-specific deletion of PFKFB3 restores cell fitness competition and physiological replication under diabetogenic stress. *Commun Biol* 5, 248.

Minchenko A, Leshchinsky I, Opentanova I, Sang N, Srinivas V, Armstead V and Caro J (2002) Hypoxia-inducible factor-1-mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) gene: its possible role in the Warburg effect. *J Biol Chem* 277, 6183–6187.

Montemurro C, Nomoto H, Pei L, Parekh VS, Vongbunyong KE, Vadrevu S, Gurlo T, Butler AE, Subramaniam R, Ritou E, et al (2019) IAPP toxicity activates HIF1 α /PFKFB3 signaling delaying β -cell loss at the expense of β -cell function. *Nat Commun* 10, 2679.

Nomoto H, Kondo T, Miyoshi H, Nakamura A, Hida Y, Yamashita K, Sharma AJ and Atsumi T (2015) Inhibition of small Maf function in pancreatic β -cells improves glucose tolerance through the enhancement of insulin gene transcription and insulin secretion. *Endocrinology* 156, 3570–3580.

Nomoto H, Pei L, Montemurro C, Rosenberger M, Furterer A, Coppola G, Nadel B, Pellegrini M, Gurlo T, Butler PC, et al (2020) Activation of the HIF1 α /PFKFB3 stress response pathway in beta cells in type 1 diabetes. *Diabetologia* 63, 149–161.

Puri S, Cano DA and Hebrok M (2009) A role for von Hippel–Lindau protein in pancreatic beta-cell function. *Diabetes* 58, 433–441.

Raval K, Jamshidi N, Seyran B, Salwinski L, Pillai R, Yang L, Ma F, Pellegrini M, Shin J, Yang X et al (2024) Dysfunctional β -cell longevity in diabetes relies on energy conservation and positive epistasis. *Life Sci Alliance* 7, e20242743.

Roche E, Assimacopoulos-Jeannet F, Witters LA, Perruchoud B, Yaney G, Corkey B, Asfari M, and Prentki M (1997) Induction by glucose of genes coding for glycolytic enzymes in a pancreatic beta-cell line (INS-1). *J Biol Chem* 272, 3091–3098.

Sasaki M, Fujimoto S, Sato Y, Nishi Y, Mukai E, Yamano G, Sato H, Tahara Y, Ogura K, Nagashima K et al (2013) Reduction of reactive oxygen species ameliorates metabolism-secretion coupling in islets of diabetic GK rats by suppressing lactate overproduction. *Diabetes* 62, 1996–2003.

Shi L, Pan H, Liu Z, Xie J and Han W (2017) Roles of PFKFB3 in cancer. *Signal Transduct Target Ther* 2, 17044.

Takahashi K, Nakamura A, Miyoshi H, Nomoto H, Kitao N, Omori K, Yamamoto K, Cho KY, 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.

Tawakol A, Singh P, Mojena M, Pimentel-Santillana M, Emami H, MacNabb M, Rudd JH, Narula J, Enriquez JA, Traves PG, et al (2015) HIF-1 α and PFKFB3 mediate a tight relationship between proinflammatory activation and anaerobic metabolism in atherosclerotic macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35, 1463–1471.

Telang S, Yalcin A, Clem AL, Bucala R, Lane AN, Eaton JW and Chesney J (2006) Ras transformation requires metabolic control by 6-phosphofructo-2-kinase. *Oncogene* 25, 7225–7234.

Thirusangu P, Ray U, Sarkar Bhattacharya S, Oien DB, Jin L, Staub J, Kannan N, Molina JR and Shridhar V (2022) PFKFB3 regulates cancer stemness through the Hippo pathway in small cell lung carcinoma. *Oncogene* 41, 4003–4017.

Xintaropoulou C, Ward C, Wise A, Marston H, Turnbull A and Langdon SP (2015) A comparative analysis of inhibitors of the glycolysis pathway in breast and ovarian cancer cell line models. *Oncotarget* 6, 25677–25695.

Yalcin A, Clem BF, Simmons A, Lane AN, Nelson K, Clem AL, Brock E, Siow D, Wattenberg B, Telang S, et al (2009) Nuclear targeting of 6-phosphofructo-2-kinase

(PFKFB3) increases proliferation via cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem* 284, 24223–24232.

Yang YP, Magnuson MA, Stein R and Wright CVE (2017) The mammal-specific Pdx1 Area 2 II enhancer has multiple essential functions in early endocrine cell specification and postnatal β -cell maturation. *Development* 144, 248–257.

Zhang C, et al (2005) MafA is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion. *Mol Cell Biol* 5, 4969–4976.