



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_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 千 葉 幸 輝

学 位 論 文 題 名

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)

【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、酸化的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的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エ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エ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、PFKFB3 の発現亢進は摂餌制限や 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。

【結論】

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。