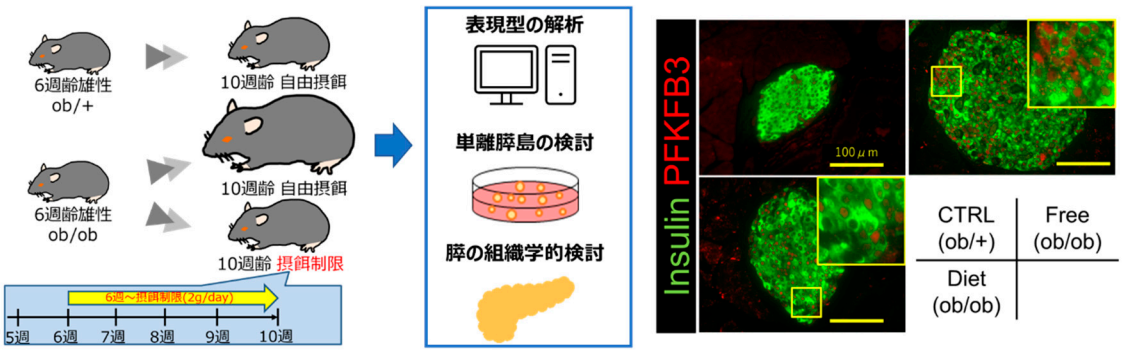
185　糖尿病治療と膵島の細胞内代謝変化との関連の探求	野本　博司

【目的】近年、2 型糖尿病モデル動物の膵島では、充分な酸素下においても癌細胞と同様に解糖系が亢進しており（Warburg 効果）、この病態がインスリン分泌不全へ関与していることが提唱された。しかしその詳しいメカニズムは不明であった。これまで我々は、ヒト膵島ならびに糖尿病モデル動物を用いて、糖尿病病態下の膵β細胞においては、ミトコンドリアの機能障害を端緒とした低酸素誘導因子 HIF1α の安定化とそれに引き続く解糖系酵素 PFKFB3 の活性化により、細胞内代謝がミトコンドリア中心から解糖系にシフトする代謝のリモデリングを生じていることを明らかにした。しかしこのような代謝変化の意義（膵β細胞機能障害の原因か結果か）や、代謝リモデリングが糖尿病への治療や予防的介入により是正しうるのか（可変性）、細胞内代謝への介入が糖尿病病態を改善させるか（治療標的か）はこれまで不明であり検討する意義があると考え検討を行った。

【方法】1. 肥満糖尿病モデルマウスにおける膵島の代謝変化：肥満・糖尿病モデルマウスである ob/ob マウスを用いて、週数別に表現型と膵島における代謝変化について、解糖系酵素 PFKFB3 の発現を中心に検討した。2. 肥満糖尿病モデルマウスへの摂餌制限による膵島の代謝変化：解糖系の明らかな亢進が認められる前の、6 週齢の雄性 ob/ob マウスへ 4 週間の摂餌制限を行うことで、体重・血糖値を正常化させ、膵島の代謝変化に影響を及ぼすかを検討した。3. 膵島の代謝変化が進行した状態における肥満・糖尿病病態への介入効果の検討：既に解糖系の亢進が生じている、8 週齢の雄性 ob/ob マウスへ 4 週間の摂餌制限ないし SGLT2 阻害薬の投与を行うことで血糖値を低下させ、膵島の代謝変化に影響を及ぼすかを検討した。4. ラット由来膵β細胞株 INS-1 832/13 細胞・マウス単離膵島を用いた検討：INS-1 832/13 細胞ならびに雄性 C57BL/6J マウスの単離膵島を用いて、培地中のグルコース濃度の変化が解糖系酵素群の発現にどのような影響を及ぼすかを検討した。

【結果】ob/ob マウスは週数の進行とともに経時的な体重・血糖値の上昇を認めた。膵β細胞における解糖系酵素 PFKFB3 の発現は、6 週齢と比較し 8 週齢・10 週齢において発現が亢進した。6 週齢から 4 週間の摂餌制限を行うことで有意に体重と血糖値の低下が得られ、摂餌制限を行ったマウスでは膵島・膵β細胞の PFKFB3 ならびに解糖系酵素の発現は低下した。PFKFB3 の発現が亢進している 8 週齢から 4 週間の摂餌制限においても同様に、体重・血糖値の抑制とともに、膵島の PFKFB3 の発現は低下した。単離膵島を用いた DNA マイクロアレイ解析では、コントロールマウス（ob/+マウス）と比較し自由摂餌を行った ob/ob マウスでは解糖系パスウェイに存在する遺伝子群の発現亢進と Pcx の発現の低下が認められたが、一方で摂餌制限を行った ob/ob マウスではこれらの変化は是正された。INS-1 細胞やマウス単離膵島を用いた *in vivo*、*ex vivo* の検討においては、培地中のグルコース濃度依存性に PFKFB3 の発現が変化し、可変性が確認された。今後はこのような細胞内代謝変化への介入が病態を修飾しうるかを検討することが望ましい。

肥満糖尿病体が膵島の解糖系酵素の発現に与える影響と病態への介入効果



185. 糖尿病治療と膵島の細胞内代謝変化との関連の探求

野本　博司

*北海道大学病院　内科Ⅱ

Key words：糖尿病，膵β細胞，細胞内代謝，解糖系酵素

緒　言

近年、2型糖尿病モデル動物の膵島では、充分な酸素下においても癌細胞と同様に解糖系が亢進しており（Warburg効果）、この病態がインスリン分泌不全へ関与していることが提唱された［1］。しかしその詳しいメカニズムは不明であった。これまで我々は、ヒト膵島ならびに糖尿病モデル動物を用いて、糖尿病病態下の膵β細胞においては、ミトコンドリアの機能障害を端緒とした低酸素誘導因子 HIF1α の安定化とそれに引き続く解糖系酵素 PFKFB3 の活性化により、細胞内代謝がミトコンドリア中心から解糖系にシフトする代謝のリモデリングを生じていることを明らかにした［2，3］。しかしこのような代謝変化の意義（膵β細胞機能障害の原因か結果か）や、代謝リモデリングが糖尿病への治療や予防的介入により是正しうるのか（可変性）、細胞内代謝への介入が糖尿病病態を改善させるか（治療標的か）はこれまで不明であり検討する意義があると考えた。

そこで今回、我々はこれらの問いに挑戦すべく、肥満糖尿病マウスモデルや膵β細胞株を用い、主に肥満の是正や糖尿病病態への治療介入による膵β細胞内代謝変化についての検討を行った。肥満糖尿病病態や高グルコース環境は膵β細胞の解糖系代謝に関わる遺伝子・タンパク質の発現を亢進させ、ブドウ糖毒性は膵β細胞機能に関わる遺伝子の発現を低下させた。これらの病態への介入や高グルコース環境の是正は、解糖系タンパク質の発現亢進を是正し、膵β細胞の機能関連遺伝子発現も改善させた。細胞内代謝を標的とした膵β細胞の治療戦略の可能性についての検討が待たれる。

方法および結果

1. 肥満糖尿病モデルマウスにおける膵島の代謝変化

本検討に用いるモデル動物として、週齢の進行とともに過食と肥満・糖尿病病態を発症する ob/ob マウスを選択し、その表現型と膵島における解糖系酵素群の発現を検討した。10 週齢の ob/ob マウスとそのコントロールとしての ob/＋マウスを比較したところ、ob/ob マウスにおいて有意な体重の増加（49.6 g vs 26.6 g、$p<0.01$）と空腹時血糖の上昇（159 mg/dL vs 88 mg/dL、$p<0.05$）とを認めた。剖検膵標本の検討では ob/ob マウスでは週数の進行とともに PFKFB3 陽性を呈する膵β細胞が増加し（図 1a）、10 週齢において単離した膵島からタンパク質を抽出し Western blot 法で解析したところ、ob/ob マウス膵島において HIF1α／PFKFB3 と解糖系酵素 LDHA の発現上昇を認めた（図 1b）。これらのことより ob/ob マウスの膵β細胞において HIF1α／PFKFB3 の発現亢進を介した解糖系代謝の亢進が示唆された。

*現在の所属：北海道大学病院 糖尿病・内分泌内科

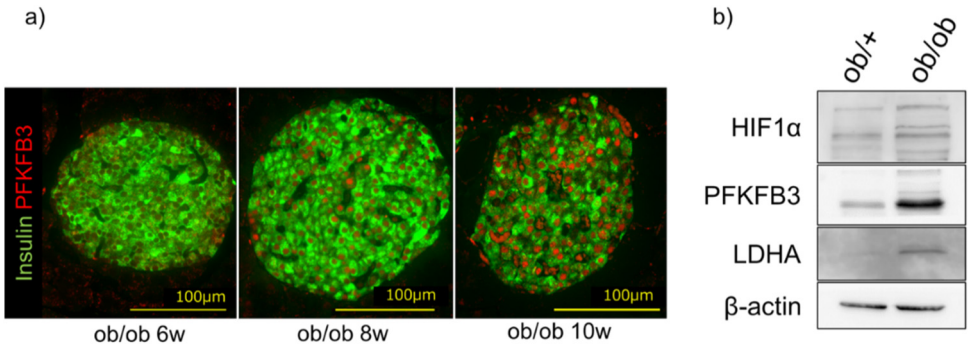


図 1. 10 週齢 ob/ob マウスの膵島の解糖系酵素の発現解析

a) 6 週齢・8 週齢・10 週齢の ob/ob マウスの膵島のインスリン・PFKFB3 の蛍光二重染色。週数の進行とともに PFKFB3 陽性し膵β細胞が増加する。

b) ob/ob マウスの単離膵島の Western Blotting 解析では、ob/+マウスと比較し HIF1α・PFKFB3・LDHA といった解糖系酵素群の発現亢進を認めた。

2. 肥満糖尿病モデルマウスへの摂餌制限による膵島の代謝変化

既報において 6 週齢の ob/ob マウスに 4 週間の 2 g/日の摂餌制限を行うことで、ob/+マウスと同等の体重・耐糖能に改善させうると報告されている［4］。自由摂餌 ob/ob マウス（自由摂餌群）、1 日 2 g の摂餌制限 ob/ob マウス（摂餌制限群）と自由摂餌 ob/+マウス（CTRL 群）の 3 群を 6 週齢～10 週齢まで飼育し、摂餌制限による体重・血糖値の正常化が、ob/ob マウスにおいて生じる膵島の細胞内代謝変化に影響を及ぼすかを検討した。

血糖値・体重・摂餌量の測定、経口ブドウ糖負荷試験やインスリン低血糖試験を行うとともに、10 週齢時点において解剖ならびに膵島単離を行い、膵組織所見を蛍光免疫組織化学染色法にて、単離膵島におけるタンパク発現を Western Blotting 法において検討した。ob/ob マウスへの摂餌制限により体重・血糖値の上昇は抑制され、10 週齢時において施行した経口ブドウ糖負荷試験においては、自由摂餌により上昇した血糖値の曲線下面積が摂餌制限により有意に低下し ob/+マウスと同等であった。検討 1.と同様に膵切片の蛍光免疫染色と単離膵島を用いたタンパク質発現解析を行ったところ、摂餌制限により膵β細胞の PFKFB3 を含む解糖系酵素群の発現が低下していることが示された（図 2）。

3. 膵島の代謝変化が進行した状態における肥満・糖尿病病態への介入効果の検討

検討 2.において、ob/ob マウス 6 週齢という膵島の解糖系酵素の発現亢進が明らかとなる早期の段階からの肥満糖尿病病態への介入が、膵島の代謝変化を予防・改善しうることが明らかとなった。次に、代謝変化を既に生じている 8 週齢（図 1a）からの同様の摂餌制限による介入、ならびに糖尿病治療薬（SGLT2 阻害薬）による薬物介入がマウスの表現型や膵島の細胞内代謝に関わる酵素の発現に影響を及ぼすかを検討した。さらに単離膵島を用いた DNA マイクロアレイ解析を行った。

8 週齢のマウスを、4 週間の自由摂餌飼育（自由摂餌群）、同期間の 1 日 2 g の摂餌制限（摂餌制限群）、SGLT2 阻害薬投与（SGLT2i 群）の 3 群に分け、飼育した。検討 2.と同様に摂餌制限群において自由摂餌群と比較し体重の低下と随時血糖の有意な低下を認めた。一方、SGLT2i 群においても摂餌制限と同様に随時血糖の低下を認めたものの、体重の推移は自由摂餌群と同等であった（非提示）。Western Blotting 法を用いた解糖系酵素の発現についても、自由摂餌群と摂餌制限群との比較では検討 2.の結果と同様であり、解糖系への代謝変化が既に生じた段階からの介入においても、解糖系代謝への変化を是正しうる可能性が示唆された。12 週齢の単離膵島における DNA マイクロアレイ解析では、コントロールマウスと比較し ob/ob マウス自由摂餌群では解糖系パスウェイに存在する遺伝子群の発現亢進とピルビン酸カルボキシラーゼ（Pcx）の発現低下が認められたが、一方 ob/ob マウス摂餌制限群ではこれらの変化は是正された（非提示）。肥満糖尿病病態への適切な介入は、膵島の代謝変化を改善させる可能性が示唆された。

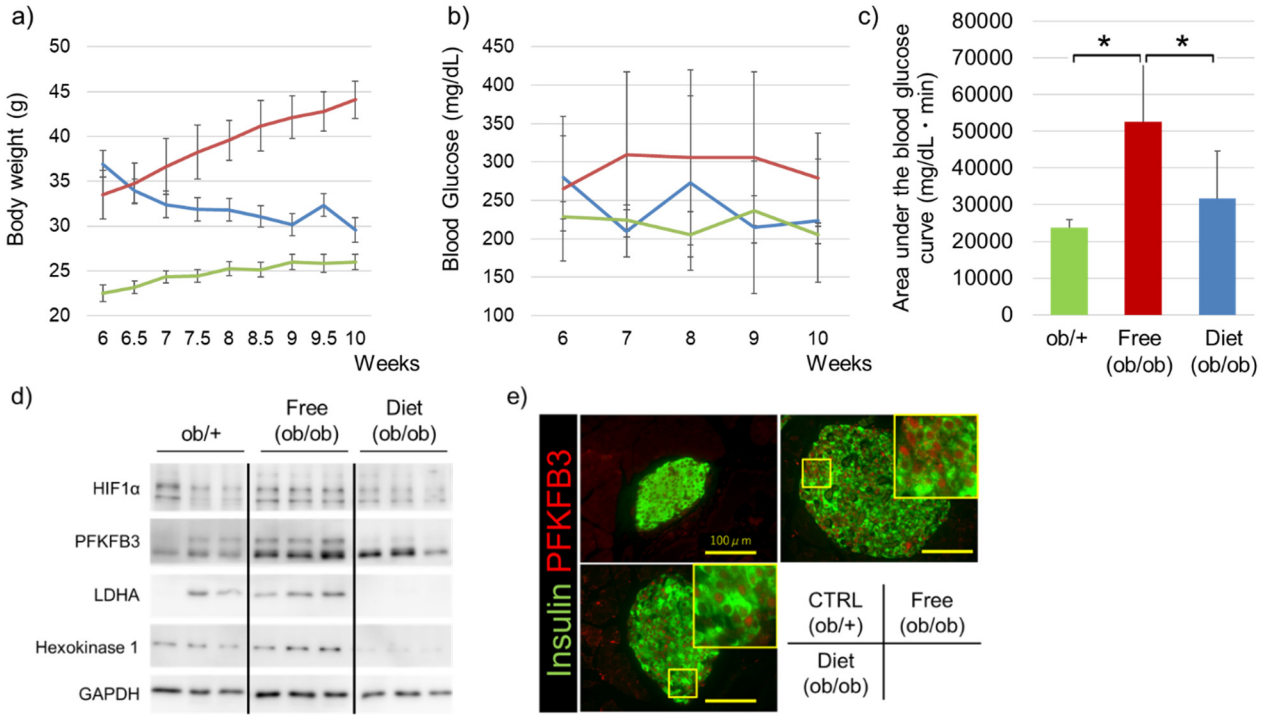


図 2. ob/ob マウスへの摂餌制限による表現型への影響と膵島解糖系酵素の発現

a) 体重の推移。摂餌制限は ob/ob マウスの体重を抑制した。N＝8～9、平均±SD。赤：自由摂餌 ob/ob マウス、青：摂餌制限 ob/ob マウス、緑：ob/＋マウス。

b) 随時血糖の推移。摂餌制限は ob/ob マウスの血糖値を抑制した。N＝8～9、平均±SD。赤：自由摂餌 ob/ob マウス、青：摂餌制限 ob/ob マウス、緑：ob/＋マウス。

c) 経口ブドウ糖負荷試験の曲線下面積。摂餌制限は ob/ob マウスの耐糖能を改善させた。N＝8～9、平均±SD、*p＜0.05、ANOVA 検定ならびに Tukey 検定。

d) 単離膵島を用いた Western Blotting 法によるタンパク発現の比較。摂餌制限により解糖系酵素群の発現低下が認められる。

e) 膵島のインスリン・PFKFB3 の蛍光二重染色。摂餌制限により膵β細胞における PFKFB3 の発現が低下した。

4. ラット由来膵β細胞株 INS-1 832/13 細胞・マウス単離膵島を用いた検討

膵β細胞へβのブドウ糖毒性そのものが細胞内代謝変化に及ぼす影響を検討するため、ラット由来膵β細胞株 INS-1 832/13 細胞と単離膵島とを用いた検討を行うこととした。16～20 週齢の雄性 C57BL/6J マウスの単離膵島ならびに INS-1 細胞を 11 mM Glucose を含有する RPMI 培地で Pre-incubation を行った後に 5.5 mM Glucose、11 mM Glucose、22 mM Glucose のブドウ糖濃度の RPMI 培地でそれぞれ 24～48 時間の培養を行い、細胞を回収して解糖系に関連するタンパク質の発現ならびに膵β細胞機能に関わる遺伝子の発現を、Western Blotting 法ならびに Real-time PCR 法を用いて比較検討した。Western Blotting 解析の結果は、得られたバンドを Image J を用いて定量化し、統計学的に比較検定した。

INS-1 細胞を各グルコース濃度で 48 時間培養したところ、グルコース濃度依存性に HIF1α／PFKFB3 の発現が上昇した（図 3a、b）。さらに同条件の細胞の遺伝子発現を評価したところ、PFKFB3 は同様にグルコース濃度依存性の発現上昇を認め（未提示）、一方で膵β細胞の機能マーカーである Mafa・Pdx-1 の遺伝子発現は長期間の高グルコース暴露により低下した（図 3c）。単離膵島においても同様に、グルコース濃度依存性の PFKFB3 の発現亢進が確認された（未提示）。

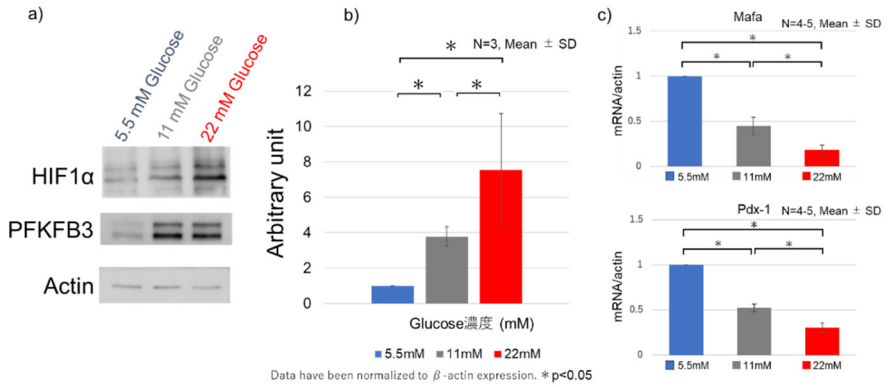


図 3. INS-1 832/13 細胞を用いたグルコース濃度別の培養実験

a, b）各グルコース濃度別に 48 時間培養後に回収した細胞を用いた Western blotting 法による解析。代表的な Western blotting 法の結果（a）と繰り返し実験の定量結果（b）。グルコース濃度の依存性に PFKFB3 のタンパク発現が上昇した。N=3、平均±SD、*p<0.05、ANOVA 検定ならびに Tukey 検定。

c）各グルコース濃度別に 48 時間培養後に回収した細胞を用いた Real-time PCR 法による遺伝子発現の評価。膵β細胞機能マーカーは高グルコース環境で発現が低下した。N=4～5、平均±SD、*p<0.05、ANOVA 検定ならびに Tukey 検定。

次に、高グルコース条件下での培養において発現が亢進した PFKFB3 が、グルコース濃度を低下させることで変化するかを検討することとした。INS-1 細胞ならびに単離膵島を、22 mM Glucose 含有培地で 24 時間の培養後に、5.5 mM Glucose 含有培地にてさらに 24 時間培養し、先ほどと同様に回収しタンパク質と遺伝子発現とを解析した。INS-1 細胞において、48 時間の高グルコース条件下の培養で発現が亢進した PFKFB3 は、24 時間の低グルコース培養においてその発現が部分的に低下し（図 4a、b）、単離膵島においても同様の結果が得られた（未提示）。膵β細胞機能のマーカーである Mafa・Pdx-1 の遺伝子発現も、同様の変化を示した（図 4c）。

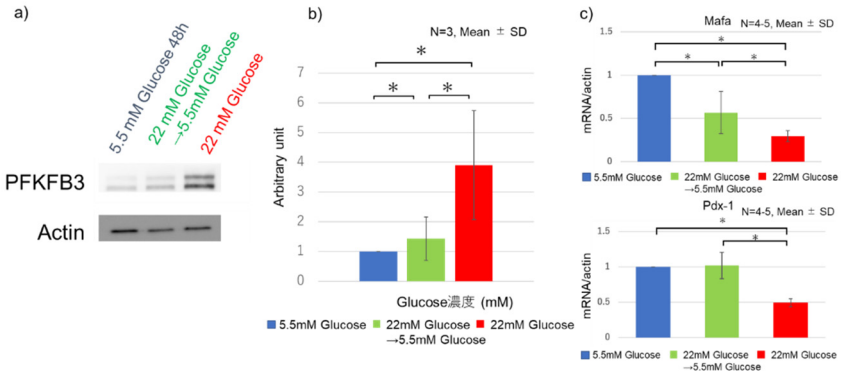


図 4. INS-1 832/13 細胞を用いたグルコース濃度変化による PFKFB3 の発現変化

a, b）5.5m M Glucose ないし 22 mM Glucose により 48 時間培養した細胞と、22 mM Glucose での 24 時間培養後に 5.5m M Glucose で 24 時間培養した細胞とにおける、Western blotting 法によるタンパク発現の比較解析。代表的な Western blotting 法の結果（a）と繰り返し実験の定量結果（b）。グルコース濃度を低下させると、PFKFB3 タンパクの発現は部分的に発現が低下した。N=3、平均±SD、*p<0.05、ANOVA 検定ならびに Tukey 検定。

c) Real-time PCR 法による遺伝子発現の評価。22 mM Glucose で低下した膵β細胞機能マーカーである Mafa・Pdx-1 の発現は、5.5 mM Glucose に戻すことで部分的に回復した。N=4～5、平均±SD、*p<0.05、ANOVA 検定ならびに Tukey 検定。

考　察

本検討は、肥満・糖尿病病態が膵島・膵β細胞の細胞内代謝に与える影響を明らかとすることに加え、生じた変化が病態への介入によりどのような影響を受けるかを検討することを目的に施行した。実験 1～3 では週齢の進行とともに肥満・糖尿病病態を呈する ob/ob マウスを用いて、実験 4 では膵β細胞株と C57BL/6J マウスからの単離膵島を用いて検討を行った。*in vivo*、*ex vivo*、*in vitro* のいずれの系においても、高グルコース環境が膵島・膵β細胞の細胞内代謝を解糖系にシフトさせることが示唆された。我々の糖尿病状態の 2 型糖尿病モデルラットを用いた既報ならびに 1 型糖尿病モデル膵島・膵β細胞株によるこれまでの検討では、ヒト型アミロイドポリペプチドやサイトカインといった刺激が、膵β細胞内のミトコンドリア機能障害を介して、HIF1αの安定化とそれに引き続く解糖系マスターレギュレーター酵素 PFKFB3 の発現が亢進し、膵β細胞において解糖系代謝が亢進する「細胞内代謝リモデリング」を来すことが示されてきた［2, 3］。本検討では検討 1・2 にみられるように、必ずしも HIF1αの発現亢進を伴っていない。高血糖環境そのものが HIF1αの安定化を阻害すると報告されており［5］、種々のストレスによるミトコンドリアの機能障害による HIF1αの安定化と拮抗的に作用している可能性がある。その中で、既報の糖尿病モデルの検討と同様に、本検討でも肥満・糖尿病病態や高グルコース環境が、一貫して PFKFB3 の発現亢進を惹起した。DNA マイクロアレイ解析で示されたように、ob/ob マウスではこのような解糖系酵素群の発現が亢進した一方でピルビン酸カルボキシラーゼ（Pcx）の発現が低下し、これらの変化は肥満・糖尿病病態の解除により是正された。膵島の代謝変化は不可逆的ではないことが示され、また病態に応じたダイナミックな変化を呈していることから、糖尿病膵島の機能異常へ重要な役割を果たしている可能性が考えられる。糖尿病病態における膵島細胞内代謝への介入が、糖尿病病態にどのような影響を及ぼすかを明らかとしていく必要がある。

文　献

1) Sasaki M, Fujimoto S, Sato Y, Nishi Y, Mukai E, Yamano G, Sato H, Tahara Y, Ogura K, Nagashima K, Inagaki N. Reduction of reactive oxygen species ameliorates metabolism-secretion coupling in islets of diabetic GK rats by suppressing lactate overproduction. Diabetes. 2013 Jun;62(6):1996-2003. Epub 2013 Jan 24. PMID: 23349483 DOI: 10.2337/db12-0903

2) Montemurro C, Nomoto H, Pei L, Parekh VS, Vongbunyong KE, Vadrevu S, Gurlo T, Butler AE, Subramaniam R, Ritou E, Shirihai OS, Satin LS, Butler PC, Tudzarova S. IAPP toxicity activates HIF1α/PFKFB3 signaling delaying ß-cell loss at the expense of ß-cell function. Nat Commun. 2019 Jun 18;10(1):2679. PMID: 31213603 DOI: 10.1038/s41467-019-10444-1

3) Nomoto H, Pei L, Montemurro C, Rosenberger M, Furterer A, Coppola G, Nadel B, Pellegrini M, Gurlo T, Butler PC, Tudzarova S. Activation of the HIF1α/PFKFB3 stress response pathway in beta cells in type 1 diabetes. Diabetologia. 2020 Jan;63(1):149-161. Epub 2019 Nov 13. PMID: 31720731 DOI: 10.1007/s00125-019-05030-5

4) Tsutsumi A, Motoshima H, Kondo T, Kawasaki S, Matsumura T, Hanatani S, Igata M, Ishii N, Kinoshita H, Kawashima J, Taketa K, Furukawa N, Tsuruzoe K, Nishikawa T, Araki E. Caloric restriction decreases ER stress in liver and adipose tissue in ob/ob mice. Biochem Biophys Res Commun. 2011 Jan 7;404(1):339-44. Epub 2010 Dec 4. PMID: 21134353 DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.11.120

5) Catrina SB, Okamoto K, Pereira T, Brismar K, Poellinger L. Hyperglycemia regulates hypoxia-inducible factor-1alpha protein stability and function. Diabetes. 2004 Dec;53(12):3226-32. PMID: 15561954 DOI: 10.2337/diabetes.53.12.3226