

肥満糖尿病モデル *db/db* マウスにおける DPP-4 阻害薬とチアゾリジン誘導体の併用による相加的膵 β 細胞保護作用とその分子機構

蛭川 英典

川崎医科大学糖尿病・代謝・内分泌内科学, 〒701-0192 倉敷市松島577

抄録 2型糖尿病の病態とりわけ膵 β 細胞機能低下は経年的に進行するため、いかに細胞機能保護を計るかは長期血糖管理の上で重要な課題である。経口糖尿病治療薬の中でも DPP-4阻害薬と pioglitazone (PIO) は膵 β 細胞保護効果作用を有する。本研究では両薬の併用による相加的な膵 β 細胞保護効果作用とその分子機構について検討した。

肥満糖尿病モデル *db/db* マウス雄性6週齢を ALO, PIO, 併用, コントロールの4群に分け4週間の介入を行った。さらに, 介入後に膵島の形態学的, 機能的解析に加え, laser capture microdissection 法および real-time RT-PCR を用いた膵島コア領域遺伝子発現解析を行った。その結果, 血糖値は全介入群で有意に低下し, 併用群でより顕著であった。インスリン抵抗性は PIO 群と併用群で改善した。膵 β 細胞量はコントロール群に比し ALO 群または PIO 群で増加傾向, 併用群で有意な増加を認め, 膵島インスリン含量とグルコース刺激性インスリン分泌の改善を伴った。膵 β 細胞増殖能は ALO 群, PIO 群で増加傾向, 併用群で有意な増加を示し, アポトーシスは ALO 群, PIO 群で減少傾向, 併用群で有意な減少をみた。遺伝子解析では, *Insulin* 遺伝子発現量は ALO 群と併用群で増加し, PIO 群ではインスリン抵抗性改善を反映し減少傾向を示した。*GLUT2* 遺伝子発現は全実薬群で増加傾向を認め, 併用群でその傾向は強かった。*PDX-1*, *MafA*, *Cyclin D* および *Bcl-2* 遺伝子は ALO 群, PIO 群で増加傾向を示し, 併用群で顕著であった。膵 β 細胞量および機能維持に必須である *IRS-2* 遺伝子の発現量は ALO 群で増加傾向を示し, 併用群で顕著に増幅された。また, *GLP-1R* 遺伝子発現は ALO 群, PIO 群で増加傾向を示し, 併用群で顕著であった。肥満2型糖尿病モデル *db/db* マウスに対する ALO と PIO の併用投与は, 少なくとも一部は GLP-1シグナルを介した *IRS-2* 発現調節により相加的な膵 β 細胞保護効果を発揮する可能性が示された。

doi:10.11482/KMJ-J40(1)13 (平成25年10月8日受理)

キーワード: DPP-4阻害薬, チアゾリジン誘導体, 膵 β 細胞量, 細胞動態

緒言

糖尿病管理の目標は非糖尿病患者と同様の Quality of Life の確保と寿命の延長にあり, 目標達成には良好な血糖管理の維持による血管合併症の抑制が必須である。一方, 2型糖尿病の主たる病態である膵インスリン分泌不全とイン

スリン抵抗性は進行性である¹⁾。とりわけ膵 β 細胞の機能および量は経年的に低下し, 罹病期間が長くなるほど良好な血糖管理の継続は困難となる。従って, 管理目標達成には, 病態の進行阻止が重要であり, 特に膵 β 細胞の機能および量をいかに保持するかは治療上の大きな課

別刷請求先
蛭川英典
〒701-0192 倉敷市松島577
川崎医科大学糖尿病・代謝・内分泌内科学

電話: 086 (462) 1111
ファックス: 086 (462) 1199
Eメール: hirukawa@med.kawasaki-m.ac.jp

題である。

膵β細胞機能不全の機序として、遺伝的素因に加えて慢性の高血糖や高遊離脂肪酸(FFA)血症によって惹起される糖毒性、脂肪毒性が深く関与する。すなわち慢性の高血糖や高FFA血症が引き金となる酸化ストレス²⁾、小胞体ストレス³⁾、オートファジー不全⁴⁾、炎症⁵⁾等の進展が膵β細胞の増殖能を低下させるとともにアポトーシスを進行させ、膵β細胞量の減少をもたらすと考えられている。

当教室では既に血糖降下薬であるチアゾリジン誘導体(TZD)薬^{6,7)}、GLP-1受容体作動薬⁸⁾、および dipeptidyl peptidase-4(DPP-4) 阻害薬⁹⁾が糖尿病モデル動物における耐糖能障害、膵β細胞機能障害の進展を阻止することを報告してきた。TZD薬は核内受容体 peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR)γを活性化する人工リガンドで、末梢組織におけるインスリン感受性を改善する。糖尿病状態において主に糖脂肪毒性の改善によりβ細胞保護作用を発揮すると報告されているが^{6,10)}、PPARγは膵β細胞にも発現しており、GLUT2^{11,12)}や Glucokinase^{12,13)}の発現量を増加させること、さらに直接的に分化・増殖促進、アポトーシス抑制および酸化ストレス抑制に働く可能性が報告されている⁷⁾。DPP-4阻害薬はインクレチンの分解酵素であるDPP-4の活性を阻害し、Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) および Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP)の血中濃度を生理的範囲内で増加させる。GLP-1やGIPは血糖依存性にインスリン分泌を促進させ、GLP-1はグルカゴン分泌抑制作用をあわせ持つことで血糖を改善する。また、膵β細胞に対しては分化・増殖促進作用、アポトーシス抑制作用、酸化および小胞体ストレス抑制作用を持つことが報告されている^{8,9)}。

近年、肥満2型糖尿病モデル *ob/ob* および *db/db* マウスに対する DPP-4 阻害薬 (Alogliptin : ALO) と TZD 薬 (Pioglitazone : PIO) の併用投与が、糖脂肪毒性改善により相加的なグルコース刺激性インスリン分泌反応の改善を示す

ことが報告されている¹⁴⁻¹⁶⁾。これらの結果は両薬剤の併用投与の有効性を示すものであり、両薬剤による膵β細胞保護作用の分子機構に違いがあると考えられるが、その詳細については依然として不明な点が多い。

本研究では、*db/db* マウスに対する ALO と PIO の併用投与による膵β細胞機能保護効果を検討し、さらにその分子機構を解明するために、膵島コア領域の遺伝子発現様式を比較解析する。

材料と方法

実験動物

肥満2型糖尿病モデルマウスとして雄性6週齢 BKS.Cg- + *Leprdb/ + Leprdb/Jcl* (*db/db*) マウス (日本クレア株式会社, 東京) を使用した。マウスは、実験期間を通して室温 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度20~60%、照明時間7~21時のクリーンエリア飼育室で飼育し、固形飼料 (MF, オリエンタル酵母工業, 東京) と水道水を自由摂取させた。本研究は、川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け (No. 10-063), 川崎医科大学動物実験指針に基づき行った。

薬剤投与方法

雄性6週齢 *db/db* マウスは、無作為に ALO 投与群 (ALO 30 mg/kg), PIO 投与群 (PIO 25 mg/kg), 併用投与群 (ALO 30 mg/kg, PIO 25 mg/kg), もしくは0.05%カルボキシメチルセルロース投与 (コントロール) 群 (各群 $n=5$) に分け、1日1回のPM5:00に経口投与を行った。本研究での薬物投与量は、既報^{6,7,17)}に基づき決定した。

体重、摂餌量、生化学データ測定方法

血糖値、体重および摂餌量は6週齢から10週齢まで毎週測定した。採血は尾静脈から6週齢より2週ごとに10週齢まで行った。血糖値は、フリースタイル® (キッセイ薬品工業, 松本) を用い、採血直後に行った。血漿分離した採血試料は -80°C にて保存した。血漿インスリン濃

度、血漿中性脂肪濃度、血漿アディポネクチン濃度、血漿グルカゴン濃度、血漿活性型 GLP-1 測定には、それぞれ超高感度マウスインスリン測定キット（森永生科学研究所、横浜）、トリグリセライド E-テストワコー（和光純薬工業株式会社、大阪）、マウス・アディポネクチン ELSIA キット（サイレックス、長野）、グルカゴン ELISA（矢内原研究所、静岡）、GLP-1 (active) ELISA キット（株式会社シバヤギ、群馬）を用いた。

インスリン負荷試験

4週間介入後に、4時間絶食下においてインスリン（ヒューマリン R® 1.0単位/kg, 日本イライリ株式会社、神戸）をマウス腹腔内に投与した。採血は尾静脈から30分ごとに120分後まで行い、血糖値測定はフリースタイル®を用い、採血直後に行った。

膵島採取と膵島インスリン含量測定

膵島の単離には Kitamura らの方法¹⁸⁾に準じてコラゲナーゼ消化法を用いた。1.5 mg/ml コラゲナーゼ（collagenase P, Roche, Swiss）と10% ウシ胎仔血清を含む HBSS（Hanks' balanced salt solution：137 mM NaCl, 5.36 mM KCl, 0.44 mM KH₂PO₄, 5.55 mM Glucose, 0.03 mM Phenol Red, 0.34 mM Na₂HPO₄, 0.27 mM MgSO₄, 1.26 mM CaCl₂, 5.83 mM NaHCO₃）を、ペントバルビタール（0.05 mg/g）にて腹腔内麻酔を行ったマウスの胆管に27ゲージの注射針で3 ml 注入し、膵管へ逆流させた。コラゲナーゼ注入によって膨張した膵臓を採取し、50 ml コニカルチューブに移し、37°Cで19分間継続的に振とうした。HBSS 30 ml を加えて遠心（1,100 rpm, 2分）を3度繰り返す。最後のペレットに10 ml の HBSS を添加して金属製フィルターに通した。さらに Histopaque-1077（sigma, St. Louis, MO, USA）を用いて遠心（2,500 rpm, 22分）し、内分泌組織と外分泌組織を分離した。中間層を採取し、HBSS を30 ml 入れて遠心（1,100 rpm, 2分）する操作を3度繰り返した。最後に

残った膵島をシャーレに移し実体顕微鏡下で、ピペットを用いて膵島を採取した。インスリン含量測定までは、-80°Cにて凍結保存し、インスリン含量測定は、膵島を酸エタノールで溶解し、前述した超高感度マウスインスリン測定キットにて測定した。

グルコース応答性インスリン分泌反応 (GSIS)

前述した方法で採取した膵島を KRBHEPES バッファー（5 mg/ml BSA 含有 KRBH, pH 7.4）でプレインキュベートし、遠心（10,000 rpm, 1分）後に上清を3.0 mM もしくは16.7 mM グルコースと置換し、60分間インキュベートした。遠心（10,000 rpm, 1分）により得られた上清を用い、前述した超高感度マウスインスリン測定キットにてインスリン濃度を測定した。

膵島の組織学的検討

第11週齢に、ペントバルビタール（0.05 mg/g）にてマウスの腹腔内麻酔を行い、膵臓を摘出し、ホルマリン固定・パラフィン包埋した後、4 μ m の薄切スライド標本を作製した。免疫蛍光染色は、まず膵パラフィン切片をレモゾール®（和光純薬工業株式会社、大阪）、エタノールにて脱パラフィン後 PBS で洗浄し、必要に応じてマイクロウエーブを用いた抗原賦活処置を行った。1次抗体として抗インスリン抗体（Santa cruz, USA）、抗グルカゴン抗体（Santa cruz, USA）、抗 Ki67抗体（abcam, UK）を使用した。PBS にて洗浄後、2次抗体として、Anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 488, Anti-mouse IgG Alexa Fluor 594, Anti-guinea pig IgG Alexa Fluor 488, Anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 594（Carlsbad, USA）を用いた。線維化の評価にはアザン染色を行った。TUNEL アッセイは、DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System（Promega, Madison, WI）を用い、既報¹⁹⁾に基づき行った。

形態学的解析

膵 β 細胞量は膵重量 (mg) \times (% 膵島面積) \times (% 膵 β 細胞数) により算出した。膵重量

は摘出直後に測定し、全膵切片面積および膵島面積の計測には NIH Image (Ver. 1.61) を用いた。インスリン・グルカゴン二重染色によるインスリンおよびグルカゴン陽性細胞数の算出は50個の膵島を用いて目視で判定し、膵島の細胞における β 細胞の割合を%膵 β 細胞数とした。Ki67染色、TUEL アッセイは核が染色されているものを陽性とした。陽性細胞率は、Ki67染色では膵島内のインスリン陽性細胞数を、TUNEL アッセイでは膵島内の全ての細胞数を分母とし、50個の膵島を用いて目視で判定し、平均値を算出した。アザン陽性面積の計測は、NIH Image (Ver. 1.61) を用いた。

LCM 法

膵 β 細胞遺伝子発現を検討するため、既に当教室で確立した膵島コア領域の遺伝子発現解析を可能にする LCM (laser capture microdissection) 法⁷⁾を用いた。ペントバルビタール (0.05 mg/g) にてマウスの腹腔内麻酔を行い、膵臓を採取後、凍結組織包埋剤に入れ凍結保存し、凍結切片をクリオスタットで8 μ m にスライスし、スライドグラスに張り付け、染色まで-80 $^{\circ}$ C にて凍結保存した。スライドを70% エタノール、Diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水にそれぞれ30秒間浸した後、ヘマトキシリンで30秒間染色した。さらに DEPC 処理水、70%、95%、100% エタノールに各30秒間浸した後、キシレンに5分間浸した。組織染色を行った後、PixCell system (Arcturus, Mountain View Ca. USA) を用いて組織切片内の膵島にレーザーを照射し、一頭体につき30個の膵島を専用転写フィルムに採取した。最初に周辺部を採取した後に膵 β 細胞が多く存在する中心部を採取した。

RNA 抽出と Reversed transcription

RNA 抽出には PicoPure RNA Isolation Kit (Arcturus PN 12206-01, Applied Biosystems, Life Technologies. Corp., Carlsbad, CA) を使用した。DNase 処理を追加し、ゲノム DNA のコンタミ

ネーションを回避した。Reversed transcription には TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems N808-0234) を使用し、cDNA 合成のためのプライマーには Random Hexamers を用いた。

Real time-PCR 法

SYBR Green による real-time RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 法を用いた。プライマーは GenBank の nucleotides からダウンロードした mRNA sequence に基づき Primer Express (Applied Biosystems) で設計し、blast を用いてプライマーの相同性について確認した。膵 β 細胞分化、細胞増殖、アポトーシス、酸化ストレス、小胞体ストレス、脂質合成、炎症、線維化に関するプライマーを使用し遺伝子発現プロファイルの解析を行った。サンプル量0.5 μ l、プライマー溶液を1 μ l、SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)、希釈水の混液を9 μ l 入れて最終10 μ l の反応液を作成した。ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems) で55サイクルの Real time-PCR を行った。PCR 条件は50 $^{\circ}$ C 2分、95 $^{\circ}$ C 10分、95 $^{\circ}$ C 15秒、60 $^{\circ}$ C 1分とした。全ての実験において Dissociation curve 分析を行い解離温度、アガロースゲル電気泳動で PCR products の確認を行った。遺伝子発現量の定量化のため、内部コントロールとして18srRNA を用い、2- Δ CT を計算した。

統計学的解析

全てのデータは平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SEM) で記した。群間の比較は ANOVA を、多重比較は Tukey-Kramer 法を用いた。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。統計検定には JMP[®] 9.0.2 (SAS, NC, USA) を使用した。

結果

薬剤介入が代謝に及ぼす影響 (図1, 2)

全ての群で摂餌量に差はなかったが、コントロール群と比較して PIO 群および併用群で体重増加を認めた。空腹時血糖値は薬剤介入全群

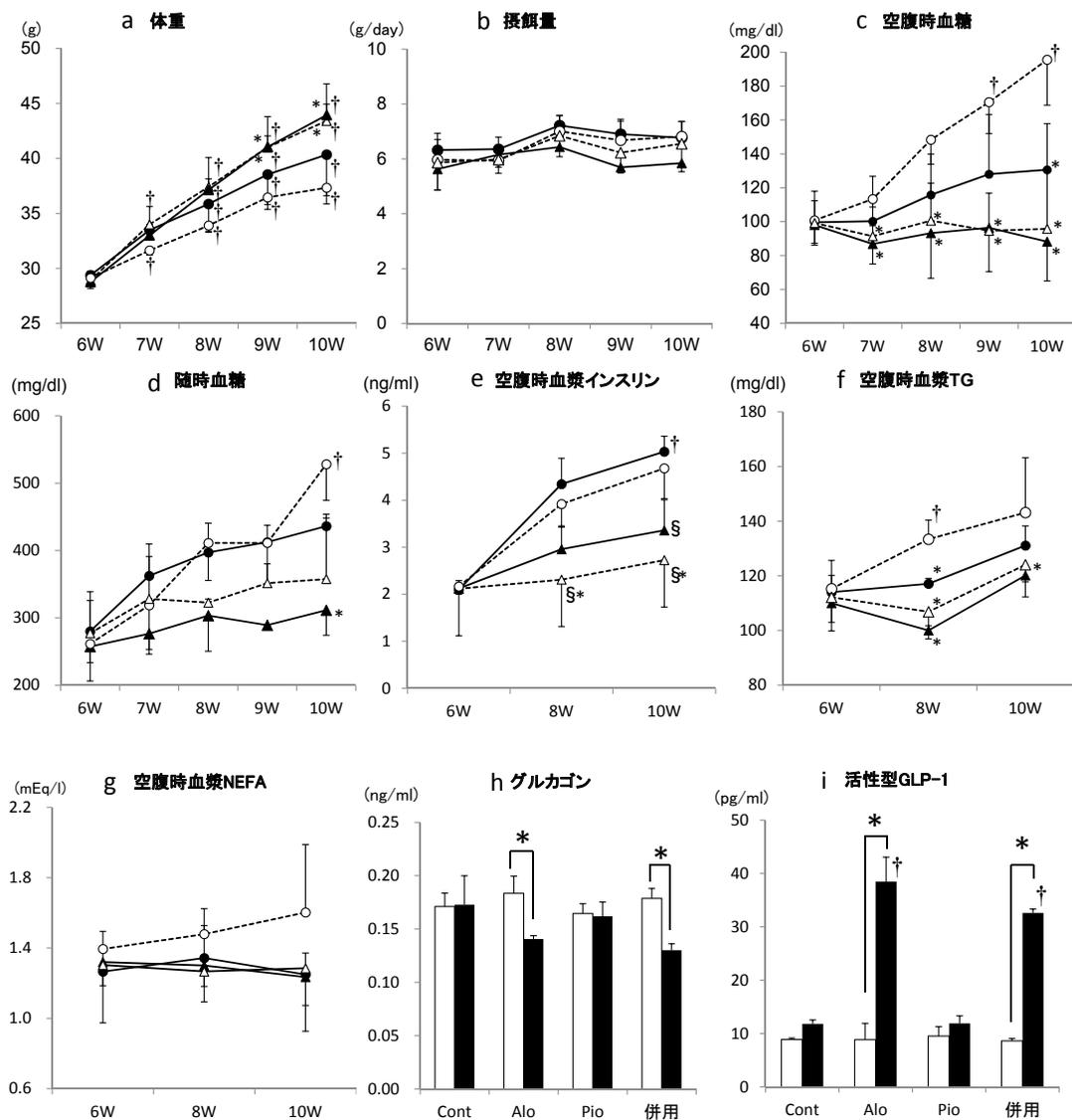


図1 代謝パラメーターの変化

a. 体重の変化. b. 摂餌量の変化. c. 空腹時血糖値の変化. d. 随時血糖値の変化. e. 空腹時血漿インスリン値の変化. f. 空腹時血漿中性脂肪値の変化. g. 空腹時血漿遊離脂肪酸値の変化.

--○-- Cont ●-- Alo --△-- Pio ▲-- 併用

*: P<0.05 vs cont †: P<0.05 vs 6週齢 §: P<0.05 vs Alo

h. 空腹時血漿グルカゴン値. i. 血漿遊離 GLP-1値.

□ 介入前 ■ 介入後

*: P<0.05 †: P<0.05 vs Cont, Pio

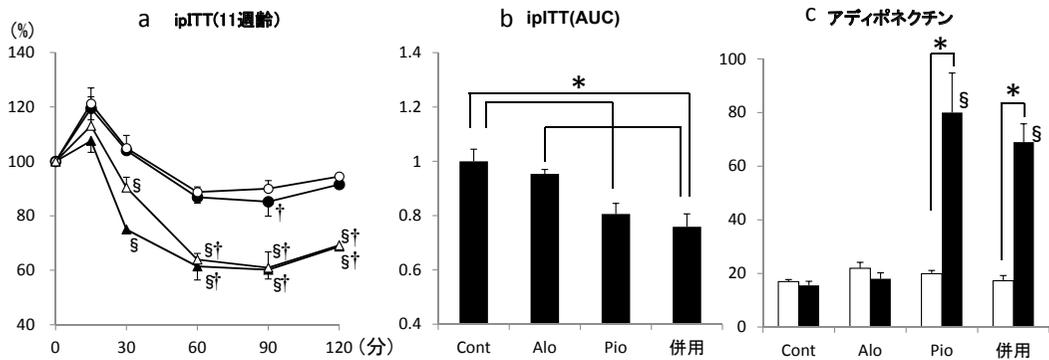


図2 インスリン負荷試験および血漿中アディポネクチン値
a. インスリン負荷試験. b. インスリン負荷試験 (AUC).

○-○- Cont ●-●- Alo △-△- Pio ▲-▲- 併用

*: $P < 0.05$ †: $P < 0.05$ vs 0 min §: $P < 0.05$ vs Cont, Alo

c. 血漿アディポネクチン値

□ 介入前 ■ 介入後

*: $P < 0.05$ §: $P < 0.05$ vs Cont, Alo

で有意に低値であり、PIO群および併用群でその傾向は強かった。随時血糖値はコントロール群と比較し併用群で有意に低値であり、併用による相加効果を認めた。空腹時血漿インスリン値は、6週齢と比較しALO群で有意に増加したのに対し、PIO群では介入4週後においてコントロール群と比較し低値であり、併用群はALO群とPIO群の中間に位置した。インスリン感受性はPIO群および併用群で改善し、アディポネクチン値はPIO群および併用群で高値であった。血漿活性型GLP-1値はコントロール群、PIO群と比較し、ALO群および併用群で高値であり、空腹時血漿グルカゴン値はALO群および併用群で薬剤介入前より有意に低下した。空腹時血漿中性脂肪値は薬剤介入全群で低下する傾向にあり、空腹時血漿NEFA値も同様であった。

薬剤介入が膵島構築およびβ細胞機能へ及ぼす影響 (図3)

薬剤介入によるdb/dbマウスの膵島への影響を明らかにする目的で、まずインスリン・グルカゴン二重染色を行い、膵島構築、膵αおよ

びβ細胞量への影響について検討した。通常、α細胞およびβ細胞の膵島内局在はそれぞれ周辺部および中心部に位置するが、コントロール群ではα細胞の中心部への侵入が多くみられ、その構築の乱れは薬剤介入により改善され、併用群でその改善はより顕著であった。また、膵β細胞量は薬剤介入全群でコントロール群と比較し増加傾向を示し、併用群で有意に増加していた。膵α細胞量は全群で有意な変化を認めなかった。単離膵島内インスリン含量および高濃度グルコース刺激性インスリン分泌反応は、コントロール群と比較し薬剤介入全群で増加し、特に併用群で著明であった。

膵島の組織学的解析 (図4)

次に膵β細胞量調節機構を明らかにするために、組織学的解析を行った。細胞増殖マーカーであるKi67陽性β細胞比率は、ALOまたはPIO群で増加傾向を認め、併用群で有意に増加した。また、アポトーシスマーカーとしてのDNA鎖切断部位検出方法であるTUNELアッセイでは、TUNEL陽性細胞数は、ALOまたはPIO群で減少傾向を認め、併用群で有意に減少

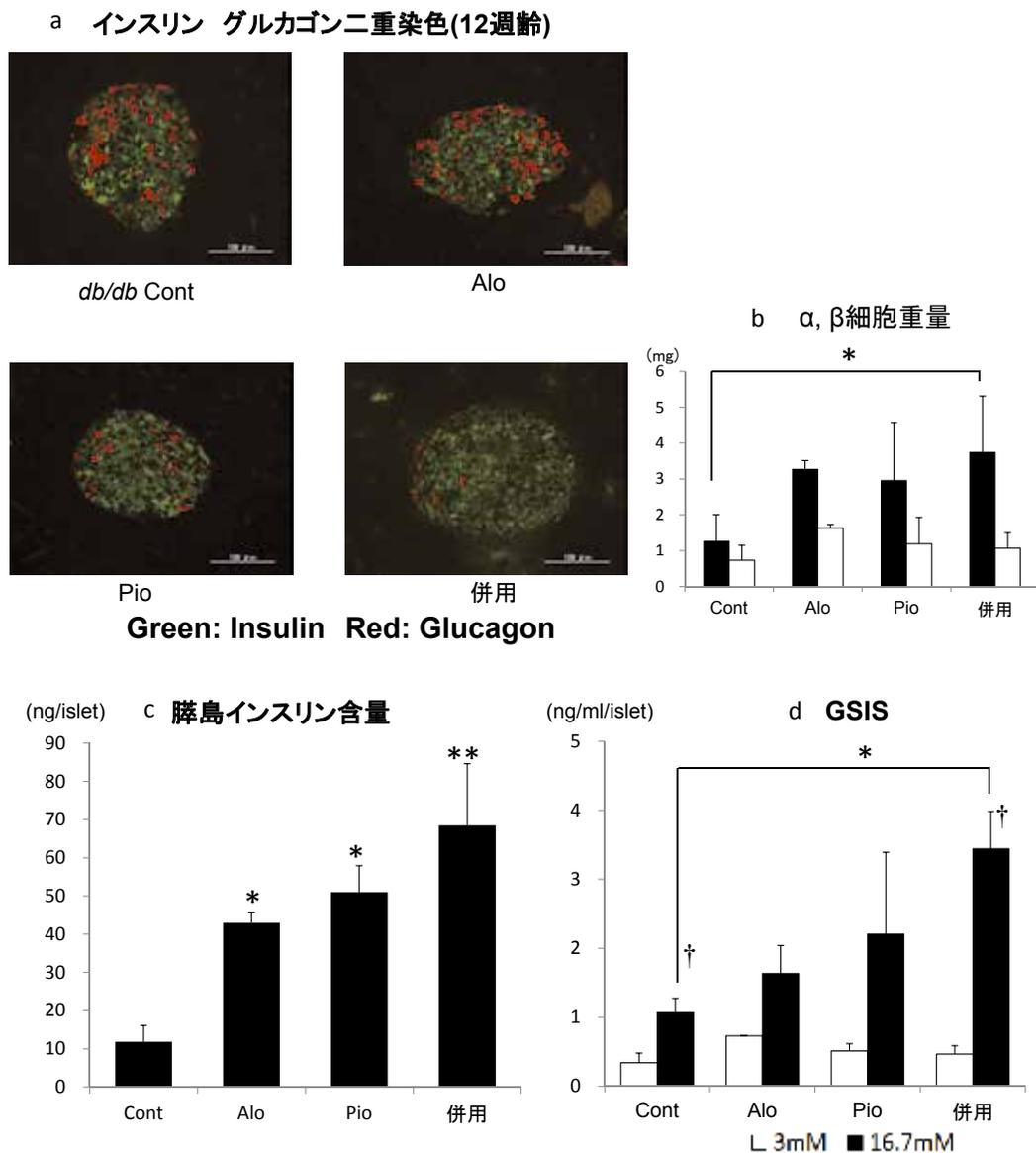


図3 薬剤介入が膵島構築および β 細胞機能へ及ぼす影響

a. インスリン グルカゴン二重染色 (緑: インスリン 赤: グルカゴン). b. 膵 α ・ β 細胞重量 \blacksquare : β 細胞, \square : α 細胞 *: $P < 0.05$. c. 膵ラ氏島インスリン含量 *: $P < 0.05$ **: $P < 0.01$ vs cont. d. 低濃度グルコース (3mM) および高濃度グルコース (16.7mM) によるグルコース応答性インスリン分泌反応 \square : 3mM, \blacksquare : 16.7mM *: $P < 0.05$ †: $P < 0.05$ vs 3mM.

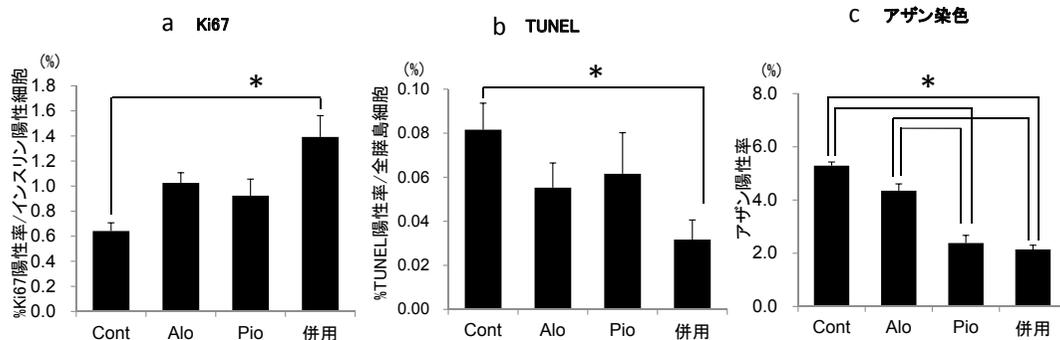


図4 膵島の免疫組織学的解析

a. Ki67陽性細胞率. b. TUNEL 陽性細胞率. c. アザン染色陽性面積率

*: P<0.05

表1

遺伝子	略号	コントロール群	Alo群	Pio群	併用群
インスリン生合成 / 分泌関連遺伝子					
<i>Insulin1</i>	<i>Ins1</i>	1	2.30	0.53	3.43 †
<i>Insulin2</i>	<i>Ins2</i>	1	1.54	0.50 §	2.44
<i>Glucose transporter 2</i>	<i>Glut2</i>	1	3.00	2.37	6.03
分化関連遺伝子					
<i>Homeobox gene HB9</i>	<i>Hlxb9</i>	1	2.11	1.61	9.35* § †
<i>Pancreatic and duodenal homeobox 1</i>	<i>pdx-1</i>	1	2.12	1.38	5.70* § †
<i>Neurogenic differentiation 1</i>	<i>Neurdl</i>	1	3.08	2.55	7.76* †
<i>v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein A</i>	<i>MafA</i>	1	2.94	1.34	15.80* †
<i>Hairy and enhancer of split 1</i>	<i>Hes1</i>	1	0.24*	0.72	0.38
増殖関連遺伝子					
<i>Cyclin D1</i>	<i>Ccnd1</i>	1	7.23	3.41	8.68*
<i>p27</i>	<i>p27</i>	1	0.30*	0.44	0.24*
アポトーシス関連遺伝子					
<i>β-cell leukemia/lymphoma 2</i>	<i>Bcl2</i>	1	5.61	1.99	7.54*
<i>Caspase 3</i>	<i>Casp3</i>	1	0.29	0.72	0.29
炎症線維化関連遺伝子					
<i>nuclear factor kappa B</i>	<i>NFκB</i>	1	0.53	0.15*	0.18
<i>Collagen type 1, alpha 1</i>	<i>Colla1</i>	1	0.46	0.11*	0.03*
<i>Collagen type3, alpha 3</i>	<i>Col3a1</i>	1	0.39	0.14*	0.09*
酸化ストレス関連遺伝子					
<i>Superoxide dismutase 2, mitochondrial</i>	<i>SOD2</i>	1	1.46	2.48	2.35
<i>Glutathione peroxidase</i>	<i>GSHPx</i>	1			
その他					
<i>Glucagon-like peptide 1 receptor</i>	<i>Glp1r</i>	1	3.12	6.74	11.20* §
<i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>	<i>Akt1</i>	1	2.71	2.44	4.50* †
<i>Extracellular signal-regulated kinase-1</i>	<i>ERK1</i>	1	5.43	2.12	5.58*
<i>Insulin receptor substrate 2</i>	<i>IRS2</i>	1	3.00	1.52	4.03*

*: p<0.05 vs コントロール群 § : p<0.05 vs Alo群 † : P<0.05 vs Pio群

した。膵島内線維化の程度は、PIO群および併用群で有意に少なかった。

薬剤介入による膵β細胞遺伝子発現への影響 (表1)

コントロール群と比較して、*Insulin 1*, *Insulin 2* 遺伝子発現量はALO群と併用群で増加傾

向を示し、PIO群で減少傾向を示した。グルコース刺激性インスリン分泌関連 *glucose transporter 2 (GLUT2)* 遺伝子発現は全実験群で増加傾向を認め、併用群でその傾向は強かった。分化促進関連 (*Homeobox gene HB9: Hlxb-9*, *Neurogenic differentiation: Neuro D*, *Pancreatic-duodenal homeobox-1: PDX-1*, *v-maf*

avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A: MafA 遺伝子発現量は、併用群で有意に増加した。分化抑制関連 *Hairy enhancer of split-1 (Hes-1)* 遺伝子発現量は、ALO 群および併用群で低下した。増殖促進関連遺伝子 *cyclinD1* 発現量は PIO 群で増加傾向を示し、ALO 群および併用群で有意に増加した。増殖抑制関連遺伝子 *p27* 発現量は PIO 群で減少傾向を示し、ALO 群および併用群で有意に低下した。アポトーシス抑制関連 *B cell lymphoma protein-2 (Bcl-2)* 遺伝子発現量は PIO 群と ALO 群で増加傾向を示し、併用群で有意に増幅された。アポトーシス促進関連 *Caspase 3* 遺伝子発現量は全介入群で減少した。炎症・線維化促進関連 (*Nuclear factor kappa B: NF κ B*, *Collagen type 1, alpha 1: Col1a1*, *Collagen type 3. alpha1: Col3a1*) 遺伝子発現量は ALO 群で減少傾向を示し、PIO 群および併用群で有意に低値であった。酸化ストレス抑制関連 (*superoxide dismutase 2: SOD2*, *Glutathione peroxidase: GSHPx*) 遺伝子発現量は全介入群で増加する傾向にあった。その他、*GLP-1 receptor: GLP-1R*, *Extracellular signal-regulated kinase-1 (ERK1)*, *V-akt murine thymoma virAloncogene homolog 1 (Akt)* 遺伝子発現量は ALO 群と PIO 群で増加傾向を示し、併用群でさらに増幅された。

膵 β 細胞の生存および機能に必須である *Insulin receptor substrate-2 (IRS-2)* 遺伝子の発現量を検討したところ、ALO 群で増加傾向を示し、併用群で顕著に増幅されていた (表1)。

考 察

既報¹⁴⁻¹⁶⁾と同様に、本研究においても PIO と ALO の併用投与が相加的な膵 β 細胞保護効果を有することが明らかになった。高血糖状態では、膵 β 細胞膜上の GLP-1 受容体発現量が低下するとの報告 (マウス¹⁶⁾、ラット²⁰⁾、INS-1E 細胞²¹⁾) とともに低下しないとの報告 (ラット²¹⁾、ヒト²¹⁾) がある。また脂肪毒性によりインクレチン受容体発現量は低下するとの報告もある²²⁾。既報¹⁴⁻¹⁶⁾では、本研究結果と異なり ALO

単独群では代謝改善効果および膵 β 細胞保護効果を認めなかった。その要因として、単独群では糖毒性による GLP-1 受容体発現量の低下がみられる一方、両薬剤併用群では糖代謝改善によって GLP-1 受容体発現が増加するためと考察している。一方、本研究では、全経過を通して ALO の効果が確認された。薬剤介入後の GLP-1 受容体 mRNA 発現量は、コントロール群と比較し全実験群で高発現しており、糖脂肪毒性の程度の差異が影響しているのかもしれない。

両薬剤の併用で、より顕著な血糖改善効果がえられた原因として、両薬剤による糖尿病の病態改善の作用機構の違いがあげられる。DPP-4 阻害薬はインクレチンの血中濃度を増加させ、血糖依存性インスリン分泌促進作用 (GLP-1 と GIP) とグルカゴン分泌抑制作用 (GLP-1) により血糖を改善する²³⁾。TZD 薬は、主に脂肪細胞を標的臓器とし、核内受容体 PPAR γ に結合し RXR とヘテロダイマーを形成後、PPAR response element (PPRE) に結合し、co-activator の会合により標的遺伝子の転写を促進する²⁴⁾。その結果、インスリン感受性ホルモンであるアディポネクチンの転写が促進され、かつ前駆脂肪細胞から小型脂肪細胞が誘導されることでインスリン抵抗性を改善する²⁴⁾。また、PPAR γ と RXR のヘテロダイマーは、NF κ B 活性を抑制しインスリン抵抗性を惹起する TNF α など炎症性サイトカインの発現・分泌を低下させることによってもインスリン抵抗性を改善する²⁴⁾。本研究で得られた結果は、それぞれの薬剤の作用機序を反映するものであった。

膵 β 細胞量は ALO と PIO の単独介入では増加傾向はみられるものの併用群でのみ有意な増加をみた。Ki67 染色、TUNEL アッセイの結果から、両薬剤ともに β 細胞増殖能の亢進傾向を示すとともにアポトーシス抑制傾向を示すことも明らかであり、両薬剤の作用機構の違いが、 β 細胞量保持における相加効果に寄与していると考えられた。

遺伝子発現解析では、膵 β 細胞の分

化・増殖，アポトーシスに深く関与する phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt 経路や Mitogen-activated protein kinases (MAPK) 経路の下流に存在し発現調節を受ける遺伝子群として，*pdx-1* 遺伝子²⁵⁾，*cyclin D1* 遺伝子²⁶⁾，*bcl-2* 遺伝子^{27,28)} の発現量は，単剤介入で変化傾向を示し，併用投与により有意に変化しており，免疫染色で得られた成績と一致した。

通常，2型糖尿病の病態初期では，インスリン抵抗性の増大とともに代償性に β 細胞過形成やインスリン過剰分泌が起こり，耐糖能異常は軽度に留まる。膵 β 細胞量調節機構において，PI3K-Akt 経路および MAPK 経路は重要であり²⁹⁾， β 細胞特異的インスリン受容体 knockout マウス³⁰⁾，IRS-1 knockout マウス³¹⁾ や IRS-2 knockout マウス³¹⁾ を用いた報告は，インスリンシグナルが β 細胞量および機能の維持に重要であることを示唆している。また，長期間の高血糖暴露により生じた β 細胞内の酸化ストレスは，c-JUN N-terminal kinase (JNK) を活性化することにより Akt リン酸化を抑制し，インスリンシグナルを減弱させ，PDX-1の核外移行を促す³²⁾。また，膵 β 細胞量減少の機序として糖毒性や脂肪毒性の関与は大きい，コントロール群と比較して，薬剤投与群では，特に併用群において血糖や血漿中性脂肪の有意な改善を認めており，併用群での膵 β 細胞量保持に糖脂肪毒性の改善も大きく寄与していると考えられた。

コントロール群に比し，薬剤介入群で膵島インスリン含量の増加とグルコース刺激性インスリン分泌の改善を認め，併用群でより顕著であった。インスリン遺伝子発現およびインスリン生合成に重要な転写因子として PDX-1，MafA があるが³³⁾，薬剤介入群では両遺伝子の発現量が増加し，併用群で顕著に増幅されており，インスリン遺伝子発現およびインスリン含量が増加した要因と考えられた。また *GLUT2* 遺伝子も実薬群で増加傾向を示しており，薬剤によるグルコース刺激性インスリン分泌が改善効果の要因の一つと考えられた。*Insulin* お

よび *GLUT2* 遺伝子の promoter 領域には PDX-1 の認識部位である TAAT motif が存在し^{34,35)}，糖脂肪毒性による PDX-1の核外移行は *Insulin* や *GLUT2*の発現を低下させ，インスリン分泌を低下させる。よって，薬剤介入による膵 β 細胞機能改善の機序として糖脂肪毒性改善の貢献は大きいものと思われる。また，膵 β 細胞の生存にはインスリンが autocrine 的に作用することが重要であり^{36,37)}，膵 β 細胞機能改善は膵 β 細胞の生存，即ち細胞量維持に寄与したと考えられる。

膵 β 細胞量および機能を維持するうえでインスリンシグナルは極めて重要であり，中でも上流に位置する IRS-2は膵 β 細胞の生存に必須と考えられている³¹⁾。INS-1E 細胞³⁸⁾，Glucokinase knockout マウス³⁹⁾，IRS-2 knockout マウス⁴⁰⁾，肥満マウス⁴⁰⁾，streptozotocin 誘発糖尿病マウス⁴⁰⁾に対する IRS-2過剰発現は，膵 β 細胞の増殖，生存およびインスリン分泌を改善することが報告されている。本研究において，*IRS-2* 遺伝子は ALO 群で増加傾向を示し，併用群で有意に増加したが，本遺伝子の相加的な増幅は，膵 β 細胞量と細胞機能維持における併用効果を説明するうえで重要な役割を担うものと考えられる。*IRS-2* は cAMP response element binding protein (CREB) のリン酸化を介し発現調節を受け⁴¹⁾，GLP-1は CREB の活性化を介し *IRS-2* 発現量を増加させる⁴²⁾。ALO と PIO の併用投与は *IRS-2* 遺伝子発現を相加的に増幅した。*GLP-1R* 遺伝子の発現量を確認したところ，併用群で顕著に増幅されており，併用による *IRS-2* 遺伝子発現増加の機序のひとつと考えられた。GLP-1R 発現量は糖脂肪毒性の影響を受けるが，併用群で糖脂肪毒性がより顕著に改善したところが，*GLP-1R* 遺伝子発現の有意な増加をもたらしたと思われた。PIO 群では GLP-1受容体発現の増加傾向はあるものの *IRS-2* 遺伝子発現の増加をみなかった原因として，血漿中活性化型 GLP-1の増加がないため，GLP-1シグナル増幅が不十分であるためと推察された。

本研究結果は，主に膵島中心部の遺伝子解析

によって得られたものである。膵島を構成している細胞の中でも、膵 β 細胞に対する薬剤の影響を検討するため、できる限りその他の細胞 (α 細胞, δ 細胞など) の混入を避けなければならず、LCM 法を採用した。膵 β 細胞量調節作用の分子機構を総合的に理解するには、蛋白の発現および機能に及ぼす影響の検討も含めた包括的な解析が必要であり、今後の課題である。

結 語

肥満2型糖尿病モデル *db/db* マウスに対する Alogliptin と pioglitazone の併用投与は相加的な膵 β 細胞保護作用を有することが示唆された。その機序として、IRS-2発現の相加的な増幅が寄与している可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の立案から論文作成までご指導いただいた川崎医科大学糖尿病・代謝・内分泌内科学教授の加来浩平先生に深甚なる謝意を表します。また実験遂行にあたり、ご助力いただいた同教室員並びに研究補助員の皆様に深謝申し上げます。

なお、本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金 (21591153) および川崎医大プロジェクト研究費 (23-挑5) の援助により行われた。

引用文献

- 1) Kendall DM, Cuddihy RM, Bergenstal RM: Clinical application of incretin-based therapy: therapeutic potential, patient selection and clinical use. *Am J Med* 122: S37-50, 2009
- 2) Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poynter V: Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* 53: S119-124, 2004
- 3) Kim MK, Kim HS, Lee IK, Park KG: Endoplasmic reticulum stress and insulin biosynthesis: a review. *Exp Diabetes Res* 2012: 509437, 2012
- 4) Quan W, Lim YM, Lee MS: Role of autophagy in diabetes and endoplasmic reticulum stress of pancreatic β -cells. *Exp Mol Med* 44: 81-88, 2012
- 5) Donath MY, Boni-Schnetzler M, Ellingsgaard H, Ehses JA: Islet inflammation impairs the pancreatic beta-cell

in type 2 diabetes. *Physiology (Bethesda)* 24: 325-331, 2009

- 6) Kawasaki F, Matsuda M, Kanda Y, Inoue H, Kaku K: Structural and functional analysis of pancreatic islets preserved by pioglitazone in *db/db* mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: 510-518, 2005
- 7) Kanda Y, Shimoda M, Hamamoto S, Tawaramoto K, Kawasaki F, Hashiramoto M, Nakashima K, Matsuki M, Kaku K: Molecular mechanism by which pioglitazone preserves pancreatic beta-cells in obese diabetic mice: evidence for acute and chronic actions as a PPAR γ agonist. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: 278-286, 2010
- 8) Shimoda M, Kanda Y, Hamamoto S, Tawaramoto K, Hashiramoto M, Matsuki M, Kaku K: The human glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide preserves pancreatic beta cells via regulation of cell kinetics and suppression of oxidative and endoplasmic reticulum stress in a mouse model of diabetes. *Diabetologia* 54: 1098-1108, 2011
- 9) Hamamoto S, Kanda Y, Shimoda M, Tatsumi F, Kohara K, Tawaramoto K, Hashiramoto M, Kaku K: Vildagliptin preserves the mass and function of pancreatic β cells via the developmental regulation and suppression of oxidative and endoplasmic reticulum stress in a mouse model of diabetes. *Diabetes Obes Metab* 15: 153-163, 2013
- 10) Campbell IW, Mariz S: Beta-cell preservation with thiazolidinediones. *Diabetes Res Clin Pract* 76: 163-176, 2007
- 11) Kim HI, Kim JW, Kim SH, Cha JY, Kim KS, Ahn YH: Identification and functional characterization of the peroxisomal proliferator response element in rat GLUT2 promoter. *Diabetes* 49: 1517-1524, 2000
- 12) Kim HI, Ahn YH: Role of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in the glucose-sensing apparatus of liver and beta-cells. *Diabetes* 53 1: S60-65, 2004
- 13) Kim HI, Cha JY, Kim SY, Kim JW, Roh KJ, Seong JK, Lee NT, Choi KY, Kim KS, Ahn YH: Peroxisomal proliferator-activated receptor- γ upregulates glucokinase gene expression in beta-cells. *Diabetes* 51: 676-685, 2002
- 14) Moritoh Y, Takeuchi K, Asakawa T, Kataoka O, Odaka H: The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor alogliptin in combination with pioglitazone improves glycemic

- control, lipid profiles, and increases pancreatic insulin content in ob/ob mice. *Eur J Pharmacol* 602: 448-454, 2009
- 15) Moritoh Y, Takeuchi K, Asakawa T, Kataoka O, Odaka H: Combining a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, alogliptin, with pioglitazone improves glycaemic control, lipid profiles and beta-cell function in db/db mice. *Br J Pharmacol* 157: 415-426, 2009
- 16) Kawashima S, Matsuoka TA, Kaneto H, Tochino Y, Kato K, Yamamoto K, Yamamoto T, Matsuhisa M, Shimomura I: Effect of alogliptin, pioglitazone and glargine on pancreatic β -cells in diabetic db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun* 404: 534-540, 2011
- 17) Asakawa T, Moritoh Y, Kataoka O, Suzuki N, Takeuchi K, Odaka H: A novel dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, alogliptin (SYR-322), is effective in diabetic rats with sulfonylurea-induced secondary failure. *Life Sci* 85: 122-126, 2009
- 18) Kitamura T, Kido Y, Nef S, Merenmies J, Parada LF, Accili D: Preserved pancreatic beta-cell development and function in mice lacking the insulin receptor-related receptor. *Mol Cell Biol* 21: 5624-5630, 2001
- 19) Farilla L, Hui H, Bertolotto C, Kang E, Bulotta A, Di Mario U, Perfetti R: Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats. *Endocrinology* 143: 4397-4408, 2002
- 20) Xu G, Kaneto H, Laybutt DR, Duvivier-Kali VF, Trivedi N, Suzuma K, King GL, Weir GC, Bonner-Weir S: Downregulation of GLP-1 and GIP receptor expression by hyperglycemia: possible contribution to impaired incretin effects in diabetes. *Diabetes* 56: 1551-1558, 2007
- 21) Roger B, Papin J, Vacher P, *et al.*: Adenylyl cyclase 8 is central to glucagon-like peptide 1 signalling and effects of chronically elevated glucose in rat and human pancreatic beta cells. *Diabetologia* 54: 390-402, 2011
- 22) Kang ZF, Deng Y, Zhou Y, Fan RR, Chan JC, Laybutt DR, Luzuriaga J, Xu G: Pharmacological reduction of NEFA restores the efficacy of incretin-based therapies through GLP-1 receptor signalling in the beta cell in mouse models of diabetes. *Diabetologia* 56: 423-433, 2013
- 23) van Genugten RE, van Raalte DH, Diamant M: Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and preservation of pancreatic islet-cell function: a critical appraisal of the evidence. *Diabetes Obes Metab* 14: 101-111, 2012
- 24) Nishizuka M, Imagawa M: [PPARgamma target genes and the molecular mechanism of transcriptional control by PPARgamma]. *Nihon Rinsho* 68: 189-193, 2010
- 25) Kitamura T, Nakae J, Kitamura Y, Kido Y, Biggs WH, 3rd, Wright CV, White MF, Arden KC, Accili D: The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic beta cell growth. *J Clin Invest* 110: 1839-1847, 2002
- 26) Friedrichsen BN, Neubauer N, Lee YC, Gram VK, Blume N, Petersen JS, Nielsen JH, Moldrup A: Stimulation of pancreatic beta-cell replication by incretins involves transcriptional induction of cyclin D1 via multiple signalling pathways. *J Endocrinol* 188: 481-492, 2006
- 27) Pugazhenti S, Nesterova A, Sable C, Heidenreich KA, Boxer LM, Heasley LE, Reusch JE: Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem* 275: 10761-10766, 2000
- 28) Costes S, Broca C, Bertrand G, Lajoix AD, Bataille D, Bockaert J, Dalle S: ERK1/2 control phosphorylation and protein level of cAMP-responsive element-binding protein: a key role in glucose-mediated pancreatic beta-cell survival. *Diabetes* 55: 2220-2230, 2006
- 29) Tarabra E, Pelengaris S, Khan M: A simple matter of life and death-the trials of postnatal Beta-cell mass regulation. *Int J Endocrinol* 2012: 516718, 2012
- 30) Kulkarni RN, Bruning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson MA, Kahn CR: Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell* 96: 329-339, 1999
- 31) Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, *et al.*: 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, 2000
- 32) Kawamori D, Kaneto H, Nakatani Y, Matsuoka TA, Matsuhisa M, Hori M, Yamasaki Y: The forkhead transcription factor Foxo1 bridges the JNK pathway and the transcription factor PDX-1 through its intracellular translocation. *J Biol Chem* 281: 1091-1098, 2006
- 33) Kaneto H, Miyatsuka T, Kawamori D, Yamamoto K, Kato K, Shiraiwa T, Katakami N, Yamasaki Y, Matsuhisa M, Matsuoka TA: PDX-1 and MafA play a crucial role in pancreatic beta-cell differentiation and maintenance of

- mature beta-cell function. *Endocr J* 55: 235-252, 2008
- 34) Hay CW, Docherty K: Comparative analysis of insulin gene promoters: implications for diabetes research. *Diabetes* 55: 3201-3213, 2006
- 35) Waeber G, Thompson N, Nicod P, Bonny C: Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 homeobox factor. *Mol Endocrinol* 10: 1327-1334, 1996
- 36) Navarro-Tableros V, Sanchez-Soto MC, Garcia S, Hiriart M: Autocrine regulation of single pancreatic beta-cell survival. *Diabetes* 53: 2018-2023, 2004
- 37) Aikin R, Hanley S, Maysinger D, Lipsett M, Castellarin M, Paraskevas S, Rosenberg L: Autocrine insulin action activates Akt and increases survival of isolated human islets. *Diabetologia* 49: 2900-2909, 2006
- 38) Lingohr MK, Dickson LM, McCuaig JF, Hugl SR, Twardzik DR, Rhodes CJ: Activation of IRS-2-mediated signal transduction by IGF-1, but not TGF- α or EGF, augments pancreatic beta-cell proliferation. *Diabetes* 51: 966-976, 2002
- 39) Terauchi Y, Takamoto I, Kubota N, *et al.*: 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, 2007
- 40) Hennige AM, Burks DJ, Ozcan U, *et al.*: Upregulation of insulin receptor substrate-2 in pancreatic beta cells prevents diabetes. *J Clin Invest* 112: 1521-1532, 2003
- 41) Dalle S, Quoyer J, Varin E, Costes S: Roles and regulation of the transcription factor CREB in pancreatic β -cells. *Curr Mol Pharmacol* 4: 187-195, 2011
- 42) Park S, Dong X, Fisher TL, Dunn S, Omer AK, Weir G, White MF: Exendin-4 uses Irs2 signaling to mediate pancreatic beta cell growth and function. *J Biol Chem* 281: 1159-1168, 2006

The molecular mechanism by which the combination treatment with DPP-4 inhibitor and thiazolidine derivative yields the additive effect on the preservation of pancreatic β -cell mass and function in obese diabetic model *db/db* mice

Hidenori HIRUKAWA

*Department of Diabetes, Endocrinology and Metabolism, Kawasaki Medical School,
577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan*

ABSTRACT This article background is pathophysiology of type 2 diabetes especially pancreatic β -cell dysfunction, and its progression over time. Thereby the preservation of β -cell function is an important tool to obtain a long-term glycemic control. A dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitor and pioglitazone (PIO) are known to protect the β -cell damage in diabetic animals. This study will show the effect of combination treatment with DPP-4 inhibitor (alogliptin: ALO) and PIO on the β -cell mass and function was examined in the diabetic state, additionally its molecular mechanism was analyzed. Six week-old male *db/db* mice were orally received ALO, PIO, ALO+PIO and the vehicle for 4 weeks. After the intervention, effects of 4 regimens on the β -cell mass and function were compared, and the gene expressions for the core area of the islets were also analyzed by using Laser Capture Microdissection and real-time RT-PCR. Blood glucose levels were significantly lower in mice treated with active drugs compared with

the vehicle. PIO and combination with PIO and ALO improved insulin sensitivity. The islet insulin content and β -cell mass were significantly increased in mice treated with PIO and ALO, and these effects were further potentiated by concomitant use of two drugs. In addition, these drugs improved the islet morphology. The immunohistochemical analysis showed the drugs accelerated the β -cell proliferation and suppressed the cell apoptosis. The gene expression analysis demonstrated that ALO and the combination treatment increased the *insulin* mRNA. In contrast, *insulin* mRNA level was decreased in PIO group. The *GLUT2* mRNA was up-regulated by active drug treatment, particularly in the combination with ALO and PIO. Interestingly, the mRNA level of *IRS-2* was significantly amplified in the combination of two drugs. Furthermore, *GLP-1R* mRNA level was up-regulated by PIO and ALO particularly combination treatment, Both ALO and PIO accelerated gene expression related with cell differentiation and proliferation such as *PDX-1*, *MafA*, *Cyclin D*. The *Bcl-2* mRNA was also up-regulated. On the other hand, these drugs suppressed the gene expression levels related with the promotion of cellular apoptosis. These effects by PIO and ALO were more significant in the combination treatment. The presented results strongly suggest that the concomitant administration of ALO and PIO shows the additional effect on the β -cell preservation, Two drugs exert a cooperative action on IRS-2 regulation, which is indispensable to conserve the β -cell mass and function, through, at least, enhancement of GLP-1 signaling.

(Accepted on October 8, 2013)

Key words : Thiazolidine derivative, DPP-4 inhibitor, Pancreatic β -cell mass, Cellular kinetics

Corresponding author

Hidenori Hirukawa

Department of Diabetes, Endocrinology and Metabolism,
Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki, 701-
0192, Japan

Phone : 81 86 462 1111

Fax : 81 86 462 1199

E-mail : hirukawa@med.kawasaki-m.ac.jp