

## 糖尿病病態進展が抗糖尿病薬による膵β細胞保護効果に及ぼす影響 ～糖尿病モデル *db/db* マウスへのピオグリタゾン, リラグルチド短期介入での検討～

木村 友彦

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型糖尿病の病態進展を抑制する上で、膵β細胞機能保持は極めて重要な課題である。PPAR $\gamma$ 作動薬やインクレチン薬は糖尿病モデル動物のβ細胞機能保護に働くが、殆どが発症早期の検討であり、病態進展期での検討は十分でない。本研究では肥満糖尿病モデル *db/db* マウスを用いて、病態の進展が Pioglitazone (PIO) と Liraglutide (LIRA) によるβ細胞保護効果に及ぼす影響を検討した。早期モデルに7週齢を、進行モデルには16週齢を用い、対照(CTL), PIO, LIRA, 併用の4群に分けた。代謝改善による影響を排除し、薬剤の直接的なβ細胞への効果を検討するため2日間介入とした。また laser capture microdissection 法を用いて、膵島コア領域の遺伝子発現解析を行った。早期モデルのLIRA群、進行期の併用群で空腹時血糖の改善傾向をみたが、インスリン値に有意な変動はなかった。進行期モデルで *Insulin*, *GLP-1* 受容体遺伝子発現が低下した。分化・増殖に関わる *Pdx1*, *NeuroD*, *ERK1* は早期モデルのみ上昇がみられ、インスリン転写因子 *Pdx1*, *NeuroD* も同様であった。一方、アポトーシス関連遺伝子 *Caspase3*, *Bcl2* の発現は、両モデルでアポトーシス抑制方向に変動した。これらの効果は併用群でより顕著で統計学的に有意であった。脂質合成、炎症、酸化ストレス、小胞体ストレス関連遺伝子発現は、両モデルで変動しなかった。以上より病態早期ではPIO, LIRAは分化・増殖促進とアポトーシス抑制によるβ細胞保護効果を発揮し、進行期ではその効果は限定的であること、その効果は膵への直接的作用であることが明らかになった。本研究成果は早期からの薬剤介入が糖尿病の病態進展抑制に有効であることを強く示唆する。

doi:10.11482/KMJ-J40(2)77 (平成26年8月27日受理)

キーワード：ピオグリタゾン, リラグルチド, 膵β細胞, 糖尿病の病態進展過程

### 緒言

2型糖尿病は慢性かつ進行性の代謝疾患であり、主な病態はインスリン抵抗性と膵β細胞機能障害によるインスリン分泌不全である。糖尿病合併症予防には、厳格な血糖管理の長期間継続が不可欠であるが、インスリン分泌不全は発症前からすでに進展しており、膵β細胞機

能は糖尿病の診断時点で約50%まで低下している<sup>1)</sup>。β細胞機能不全の機序として、疾患感受性遺伝子の存在という遺伝的要因に加えて、慢性高血糖や高遊離脂肪酸(FFA)血症によって惹起される糖脂肪毒性が関与する<sup>2-5)</sup>。すなわち慢性の高血糖や高FFA血症が引き金となり、酸化ストレス<sup>4)</sup>、小胞体ストレス<sup>6)</sup>、オートファ

別刷請求先  
木村 友彦  
〒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：tomohiko@med.kawasaki-m.ac.jp

ジー不全<sup>7)</sup>、炎症<sup>8)</sup>等が引き起こされ、 $\beta$ 細胞増殖能低下を誘発するとともにアポトーシスを進行させ、膵 $\beta$ 細胞量の減少をもたらすと考えられている。また、慢性高血糖状態がインスリンの生合成や分泌低下をもたらすことがすでに報告されている<sup>9)</sup>。これまでに正常血糖モデル動物では加齢とともに $\beta$ 細胞機能が低下することが報告されてきた<sup>10)</sup>。一方、我々を含め、糖尿病モデル動物においてPPAR $\gamma$ 作動薬やインクレチン関連薬の $\beta$ 細胞機能保護作用について報告がみられるものの<sup>11-14)</sup>、多くは発症早期の検討であり病態進展過程における検討は十分でない。病態進展に伴う抗糖尿病薬の $\beta$ 細胞保護効果の相違性を検証することにより、2型糖尿病のどの段階からの薬物介入が、より効果的であるかを明らかにすることができ、実臨床においても極めて重要な情報となる。本研究の目的は、すでに $\beta$ 細胞保護効果が立証されているPioglitazone(PIO)、Liraglutide(LIRA)を用い、 $\beta$ 細胞保護効果が病態進展過程で異なるか否かを検討することである。

## 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。病態早期モデルとして7週齢マウスを、病態進展モデルとして16週齢マウスを用いた。実験期間を通して室温 $22 \pm 2$  °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. 11-063)、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

両病期マウスともに、PIO群(25 mg/kg/日；経口投与)、LIRA群(0.2 mg/kg $\times$ 2/日；皮下注射)、併用群(Comb)(PIO 25 mg/kg/日 + LIRA 2

mg/kg $\times$ 2/日)、コントロール群(CTL)(0.05% Carboxymethylcellulose；経口投与 + PBS；皮下注射)の4群に群別し(各群n=5)、AM10:00に経口投与、AM10:00、PM5:00に皮下注射を行った。本研究では薬剤のより直接的な $\beta$ 細胞への効果を検討するために、2日間の短期投与を行った。PIO、LIRA投与量は、既報<sup>12,14)</sup>に基づき決定した。

### 体重、生化学データ測定方法

体重、生化学データは7週齢、16週齢のそれぞれ介入前後で測定した。採血は尾静脈から行った。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測定まで $-80$  °Cにて保存した。血漿インスリン濃度測定は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)を、血漿中性脂肪濃度測定はトリグリセライドE-テストワコー(和光純薬工業株式会社、大阪)を用い行った。

### LCM法

膵 $\beta$ 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ラウ氏島の $\beta$ 細胞特異的遺伝子発現解析を可能にするLCM(laser capture microdissection)法<sup>14)</sup>を用いた。ペントバルビタールナトリウム(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 $8 \mu\text{m}$ にスライスし、スライドガラスに貼付、染色するまで $-80$  °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, MountainView, CA, USA)を用いて組織切片内の膵ラウ氏島にレーザーを照射し、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

に隣β細胞が主に存在する中心部を採取した。RNA抽出とReverse transcription RNA抽出にはPicoPure RNA Isolation Kit(Arcturus PN 12206-01, Applied Biosystems, LifeTechnologies. Corp., Carlsbad, CA, USA)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。Reverse 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<sup>®</sup> Green 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。隣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、脂質合成に関する遺伝子群に対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 μl、プライマー溶液を1 μl、SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems)、希釈水の混液を9 μl入れて最終10 μlの反応液を作成した。ABI PRISM 7500(Applied Biosystems)で55サイクルのReal time-PCRを行った。PCR条件は50℃ 2分、95℃ 10分、95℃ 15秒、60℃ 1分とした。全ての実験においてdissociation curve分析により解離温度を確認し、アガロースゲル電気泳動でPCR productsを確認した。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、 $2^{-\Delta CT}$ を計算した。

#### 統計学的解析

全てのデータは平均値±標準誤差(mean ± 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 Institute Inc., Cary, NC, USA)を使用した。

#### 結果

##### 生化学パラメータの変化

体重は、早期モデルではLIRA群でCTL群に比べ有意に低かったが、進行モデルでは有意差はなかった(図1a, f)。空腹時血糖値は、早期モデルではLIRA群、Comb群でCTL群に比し有意に低かった(図1b)。進行モデルではComb群のみ有意に低値であった(図1g)。一方、空腹時血漿インスリン値は両病期ともに群間差をみなかった(図1c, h)。空腹時血漿中性脂肪値は、早期モデルではLIRA群がその他3群に比べて有意に、進行期ではLIRA群、Comb群がCTL群に比べ有意に低下かった(図1d, i)。空腹時血漿遊離脂肪酸(FFA)値は早期モデルでは群間差なく(図1e)、進行モデルではLIRAを投与した2群で低値であった(図1j)。

##### 薬剤介入による隣β細胞遺伝子発現への影響 Insulin 遺伝子

*Insulin 1*, *Insulin 2* 遺伝子発現量は統計学的有意差を認めないものの、早期群では薬剤介入により高値を示す傾向にあった(図2a, b)。一方、進行期ではこれらの発現は早期に比べ明らかに低下しており、薬剤介入によっても変化を認めなかった(図2h, i)。

##### インスリン遺伝子転写因子

隣β細胞機能保持において極めて重要である、インスリン遺伝子転写因子*Pdx1*, *NeuroD*について遺伝子発現を評価した。早期モデルでは、*Pdx1* 遺伝子発現は、統計学的有意差はないものの、薬剤介入によって増加する傾向にあった(図2c)。また、*NeuroD* 遺伝子発現は、早期モデルでは介入群で上昇しており、Comb群では統計学的に有意であった(図2d)。一方、進行期モデルでは薬剤介入による効果は見られなかった(図2j, k)。

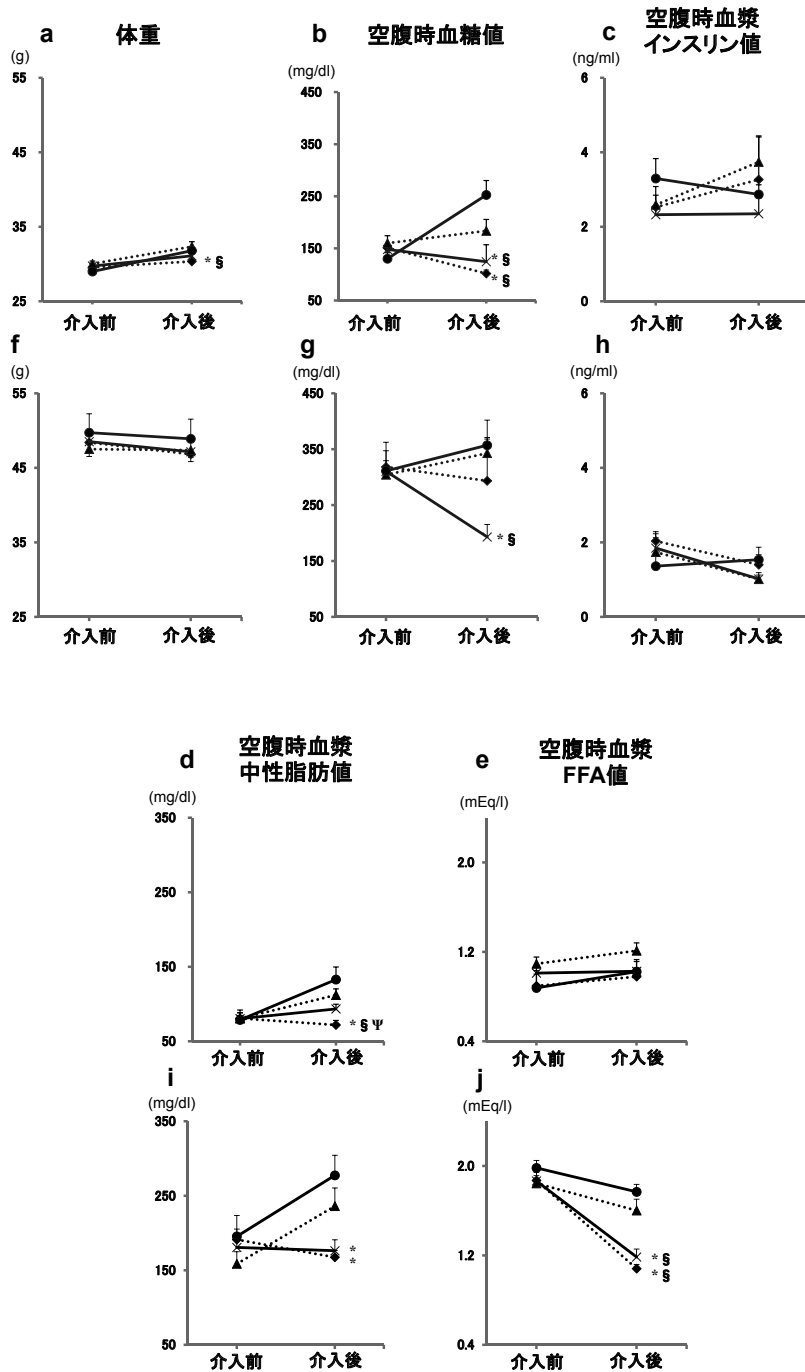


図 1

7 週齢(a-e)および16週齢(f-j)の肥満2型糖尿病モデルマウス (db/db マウス)において、ピオグリタゾン、リラグルチド短期介入前後での代謝パラメータの変化

(a, f) 体重, (b, g) 空腹時血糖値, (c, h) 空腹時インスリン値, (d, i) 空腹時血漿中性脂肪値, (e, j) 空腹時血漿 FFA 値

CTL 群 (circles), PIO 群 (triangles), LIRA 群 (diamonds), Comb 群 (crosses).

Tukey-Kramer method. \*:  $p < 0.05$  vs CTL, §:  $p < 0.05$  vs Pio, Ψ:  $p < 0.05$  vs Comb.

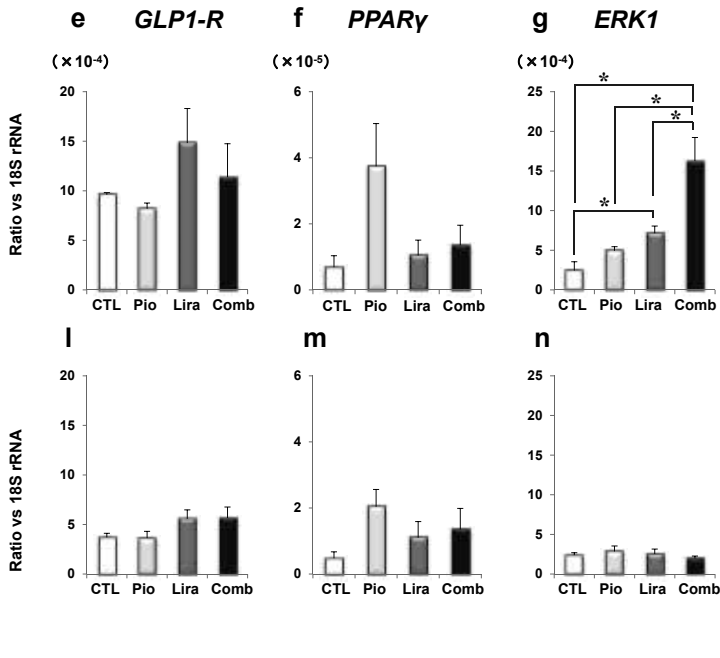
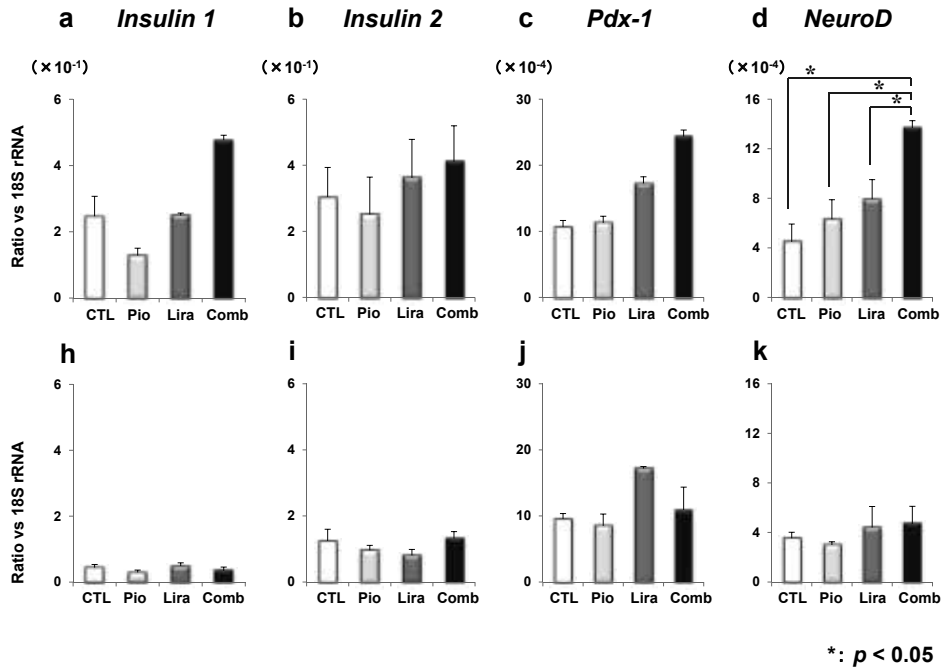


図 2

7週齢(a-g)および16週齢(h-n)の肥満2型糖尿病モデルマウス(db/dbマウス)において、ピオグリタゾン、リラグルチド短期介入前後での、インスリン生成・分泌関連因子、細胞分化・増殖関連因子の比較(a, h) Insulin 1, (b, i) Insulin 2, (c, j) Pdx-1, (d, k) NeuroD, (e, l) GLP-1R, (f, m) PPAR $\gamma$ , (g, n) ERK1. CTL群(white), PIO群(light grey), LIRA群(dark grey), Comb群(black). Tukey-Kramer method. \*:  $p < 0.05$ .

### インスリン分泌関連因子, *PPAR $\gamma$*

インスリン分泌に関与する, *GLP-1* 受容体遺伝子発現は, 早期モデルでは統計学的有意差はないものの, LIRA 群, Comb 群において高い傾向がみられた(図2e). 一方, 進行期モデルでは早期に比べ明らかな発現低下がみられ, 薬剤による反応性も消失していた(図2l). また, *PPAR $\gamma$*  遺伝子発現は両病期ともに介入による群間差はみられなかった(図2f, m).

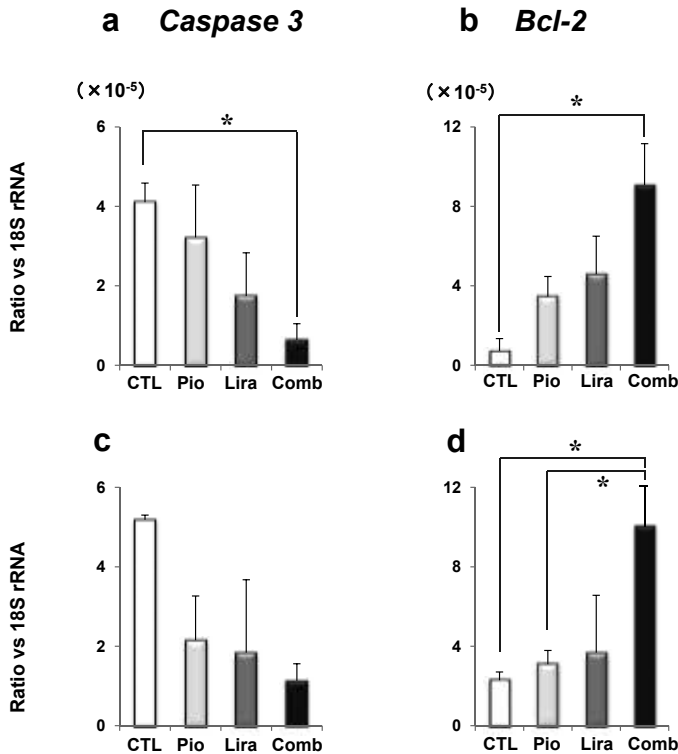
### 分化・増殖関連因子

*Pdx1*, *NeuroD* は細胞分化にも関与していることが知られているが, これらの因子は早期モ

デルにおいてのみ介入による発現亢進がみられた(図2c, d, j, k). 細胞増殖にかかわる *ERK1* 遺伝子発現についても早期モデルにおいてのみ, LIRA 群で CTL 群に比べ, Comb 群では他3群すべてに比し有意な増加がみられた(図2g, n).

### アポトーシス関連因子

アポトーシス促進遺伝子である *Caspase 3* は早期, 進行期の両モデルともに介入群で低値であった(図3a, c). アポトーシス抑制遺伝子である *Bcl2* においても両病期ともに薬剤介入により増加しており, Comb 群では統計学的に有意であった(図3b, d).



\*:  $p < 0.05$

図3

7週齢(a, b)および16週齢(c, d)の肥満2型糖尿病モデルマウス(db/dbマウス)において, ピオグリタゾン, リラグルチド短期介入前後での, 膵ラ氏島コア領域のアポトーシス関連因子の比較  
(a, c) Caspase 3, (b, d) Bcl-2.

CTL 群 (white), PIO 群 (light grey), LIRA 群 (dark grey), Comb 群 (black).

Tukey-Kramer method. \*:  $p < 0.05$ .

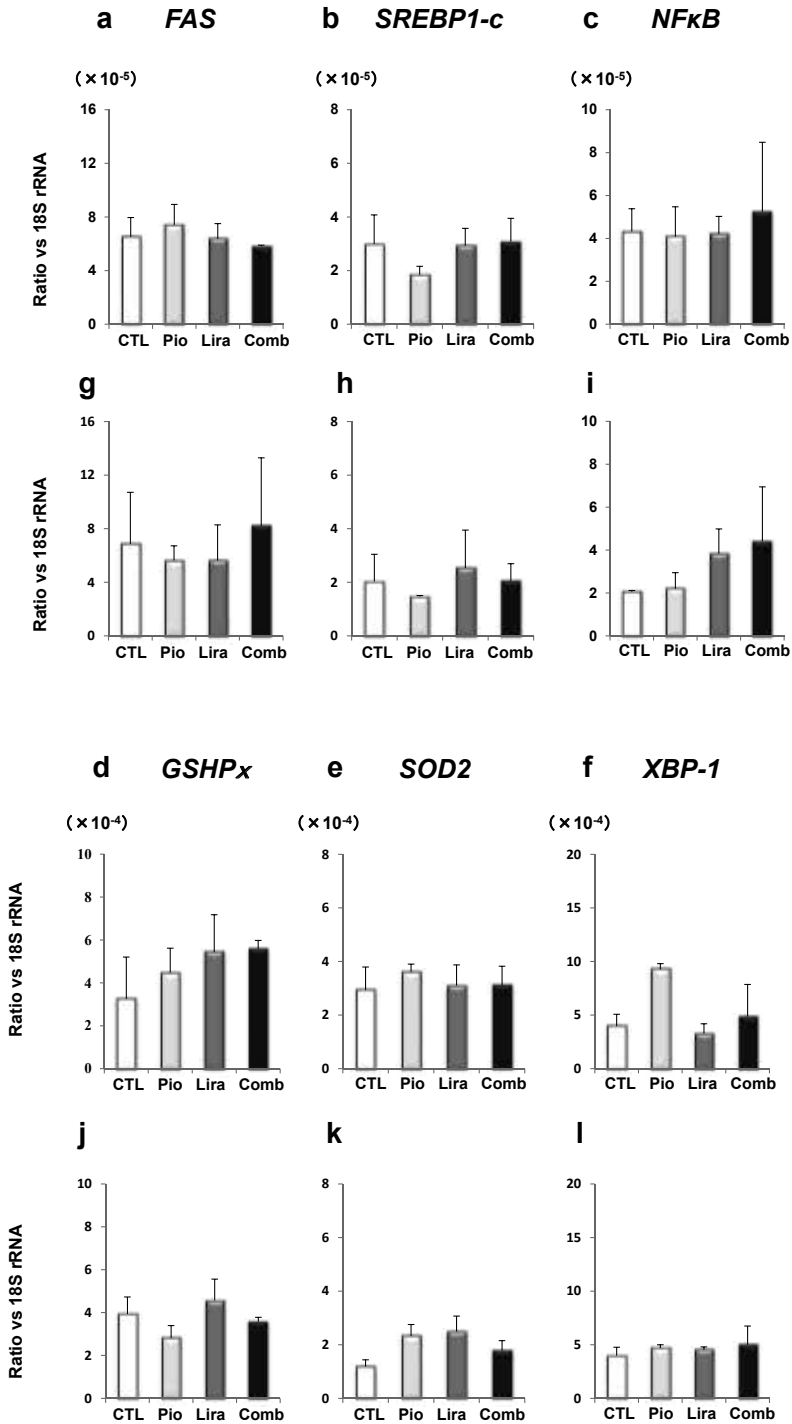


図 4

7週齢(a-f)および16週齢(g-l)の肥満2型糖尿病モデルマウス(db/dbマウス)において、ピオグリタゾン、リラグルチド短期介入前後での、膵ラ氏島コア領域の脂質合成、炎症、酸化ストレス、小胞体ストレス関連因子の比較(a, g)FAS, (b, h)SREBP1-c, (c, i)NFκB, (d, j)GSHPx, (e, k)SOD2, (f, l)XBP-1 CTL群(white), PIO群(light grey), LIRA群(dark grey), Comb群(black)。

### 脂質合成, 炎症, 酸化ストレス, 小胞体ストレス関連因子

脂質合成に関与する *FAS*, *SREBP-1c* 遺伝子発現は早期モデル, 進行期モデルともに介入による変動を認めなかった(図4a, b, g, h). 炎症関連因子である *NFκB* も同様に遺伝子発現の変動は見られなかった(図4c, i). 酸化ストレス除去酵素である *GSHPx*, *SOD2*, さらに小胞体ストレス関連因子である *XBP-1* についても両病期ともに介入による変化は見られなかった(図4d-f, j-l).

### 考察

2型糖尿病モデル動物においてチアゾリジン薬やインクレチン関連薬によるβ細胞保護効果に関する報告は多数ある<sup>11-14)</sup>. しかし, ほとんどの報告は病態早期での検討であり, 病態進行期での効果についてはいまだ明らかではない. 病態進展が抗糖尿病薬による膵β細胞保護機構に及ぼす影響をについて, 本研究では病態早期モデルとして7週齢 *db/db* マウスを, 病態進展モデルとして16週齢 *db/db* マウスを用いた. 一般的なマウスの寿命を2~3年程度と考えると, 病態早期モデルではヒトに換算し「学童期」, 進展モデルにおいても「青年期」にあたりと考えられる. 7週齢マウスの空腹時血糖値に比べ, 16週齢マウスの空腹時血糖値は2倍以上高値であった. 一方, 16週齢における膵β細胞の *Ins1*, *Ins2* 遺伝子発現は7週齢に比し低値であり, 空腹時血中インスリン値も同様のパターンを示した. これはインスリン需要増大に対して分泌が高度に障害されている, 即ちインスリン分泌機構の代償破綻が生じていると捉えられる. 以上より「加齢」ではなく「病態進展」の影響を検討するのに妥当な系であると考え. 本研究では2日間の短期薬剤介入を行い, 代謝改善による二次的な影響を極力排除し, 薬剤のより直接的なβ細胞への影響を検討した. さらに LCM 法を用いて, 膵島を構成している細胞の中でも, β細胞以外の細胞(α細胞, δ細胞など)の混入を避けて, 膵β細胞

に対する薬剤の影響を選択的に検討した. その結果, インスリン生合成と分泌, β細胞分化増殖が糖尿病病態の進展とともに低下するものの, 既報どおり<sup>12,14)</sup>病態早期でのピオグリタゾン, リラグルチド投与はこれらの遺伝子の発現を増加させることが本研究においても明らかとなった. 一方, 病態進展期からの薬剤介入では, これらの遺伝子発現増強効果は減弱した. 病期の違いによりこのような相違が生じた原因として, 病態早期モデルのみインスリン遺伝子転写因子発現が亢進していたことが, 早期モデルでのインスリン生合成と分泌関連遺伝子の増加に関与したと考えられる. また, GLP-1がその受容体に結合するとアデニル酸シクラーゼを介して *Cyclic AMP/Protein Kinase A signal pathway* が活性化される. 高血糖状態では, GLP-1受容体発現が低下することが報告されているが<sup>9,15)</sup>, 本研究においても GLP-1受容体発現は早期に比べ進行期で明らかに低下しており, GLP-1受容体の下流にある PKA シグナルなどのダウンレギュレーションにより, 進行モデルでは LIRA による *Insulin* 遺伝子発現の増加がみられなかったことが推察される. また, 進行期モデルでは空腹時血糖値250 mg/dL 以上と顕著な高血糖にさらされており, 慢性高血糖下ではβ細胞量および機能の維持に重要な *IRS2* の発現低下や *ERK* のリン酸化が低下すること<sup>16)</sup>, また, インスリン分泌の低下から, インスリンシグナルが減弱していることも原因と考えられる.

一方で興味深いことに, アポトーシス関連遺伝子については, 病態進展にかかわらず *Caspase 3*, *Bcl2* ともにアポトーシスを抑制する方向に変動していた. 雄性 *db/db* マウスの加齢性変化を検討した報告では<sup>17)</sup>, 12週をピークに膵ラ氏島重量は低下し, その際, 細胞増殖マーカー Ki-67陽性細胞数の低下を伴うのに対し, アポトーシスマーカーである, *Caspase 3* 陽性細胞には経年的な変化を認めていない. この結果は, 本研究でみられた治療介入が遅れても, 細胞増殖に比べアポトーシスに関しては薬剤の効果がえられるという本研究結果をサポートす



るものである。

脂質合成、炎症に関与する遺伝子の発現は両病期ともに介入による変動を認めなかった。また、酸化・小胞体ストレスは、PI3K シグナルの減弱や Bcl2ファミリー発現調節により、分化・増殖抑制およびアポトーシス促進に寄与すると報告されているが<sup>18)</sup>、短期間薬剤介入した本研究では変動はなかった。酸化・小胞体ストレスへの影響については、代謝改善に伴う二次的効果であることを示唆する報告<sup>12,14)</sup>がなされており、本研究結果は既報とも合致するものである。

インスリン生合成、分化・増殖において両薬剤で併用効果がみられたが、LIRA では GLP-1受容体刺激による PKA の活性化<sup>19)</sup>、また CREB のリン酸化を介し IRS2発現を増加させ<sup>20)</sup>、β細胞内でのインスリンシグナルを亢進させる。PIO によるβ細胞増殖促進の機序については不明な点が多く、今後の検討課題である。アポトーシス関連遺伝子発現についても併用による相加効果がみられた。LIRA が IRS2-PI3K-AKT を介する経路と、CREB を介した Bcl2 の発現亢進経路により Bcl2 遺伝子発現を増加させたと考えられるのに対し<sup>18)</sup>、Bcl2 はプロモーター領域に PPRE 配列を有しており、PIO が直接的に Bcl2 を増加させ、相加的効果が出現した可能性が考えられる。正常血糖モデル動物における膵β細胞の、自然史や加齢が薬剤反応に与える影響を見た報告では、β細胞増殖能は無介入マウスにおいて若年マウスに比べ12ヶ月齢で低下していた<sup>10)</sup>。インクレチン関連薬や、さらに強いβ細胞増殖刺激と考えられるストレプトゾトシン、膵部分切除を行っても、14ヶ月齢では反応が消失している<sup>10)</sup>。これは加齢に伴うβ細胞増殖能低下が原因であると考えられる。db/db マウスのβ細胞自然史を見た報告では、常にアポトーシスが進んでいるのに対し、細胞増殖は12週齢を境に低下することで、結果的に経年的にβ細胞重量が低下していくと結論付けられている<sup>17)</sup>。また、既報からチアゾリジン薬、インクレチン関連薬による db/db, ob/ob, KK-Ay マウスなど様々な糖尿病

モデル動物に対する、膵β細胞保護効果が報告されているものの、多くは8～12週齢のβ細胞増殖能が比較的保持されている時期における検討である<sup>11,12,14)</sup>。この時期における検討では総じて、これらの薬剤が細胞分化増殖の促進に、アポトーシスの抑制に働くことでβ細胞重量を増加させるとしている。一方で、β細胞機能の指標であるグルコース応答性インスリン分泌反応を改善させている報告もみられる。本研究では、病態早期モデルにおける薬剤のインスリン生合成、分化・増殖促進、アポトーシス抑制効果については既報通りであった。しかしながら、16週齢という病態進行期における短期介入では、インスリン生合成、細胞分化・増殖について、いずれの薬剤介入においても効果が見られなかった。一方で興味深いことに、アポトーシス関連遺伝子は早期モデル同様に進行期においても薬剤介入効果がみられた。糖尿病モデル動物において病態進展とともに膵β細胞障害が進むが、膵β細胞保護効果を有するこれらの薬剤は、インスリン生合成・分化増殖といった点では病態早期でのみ有効性がみられるが、アポトーシスへの影響は病態の進展に関わらず抑制的に働くことが、今回初めて実証された。これは臨床における薬物療法を考える際にも、糖尿病発症早期からの薬物介入の重要性を強く示唆するものである。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 Pioglitazone, Liraglutide 投与による膵β細胞保護効果は病態早期でより顕著であり、早期からの積極的な薬剤介入が糖尿病病態進展抑制に、より有効である可能性が示唆された。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、終始御指導、御高閲を賜りました川崎医科大学内科学特任教授、加来浩平先生、御

指導賜りました糖尿病・代謝・内分泌内科学教授、金藤秀明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, 26461350)および川崎医大プロジェクト研究費(22-A53, 23-C5)の援助により行われた。

- 1) U.K. prospective diabetes study 16. Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: a progressive disease. U.K. Prospective Diabetes Study Group. *Diabetes* 44: 1249-1258, 1995
- 2) Kaneto H, Matsuoka TA, Nakatani Y, Kawamori D, Miyatsuka T, Matsuhisa M, Yamasaki Y: Oxidative stress, ER stress, and the JNK pathway in type 2 diabetes. *J Mol Med (Berl)* 83: 429-439, 2005
- 3) Robertson RP: Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem* 279: 42351-42354, 2004
- 4) Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H: Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes* 52: 581-587, 2003
- 5) Weir GC, Laybutt DR, Kaneto H, Bonner-Weir S, Sharma A: Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes* 50 Suppl 1: S154-159, 2001
- 6) Kim MK, Kim HS, Lee IK, Park KG: Endoplasmic reticulum stress and insulin biosynthesis: a review. *Exp Diabetes Res* 2012: 509437, 2012
- 7) Quan W, Lim YM, Lee MS: Role of autophagy in diabetes and endoplasmic reticulum stress of pancreatic  $\beta$ -cells. *Exp Mol Med* 44: 81-88, 2012
- 8) Donath MY, Böni-Schnetzler M, Ellingsgaard H, Ehses JA: Islet inflammation impairs the pancreatic beta-cell in type 2 diabetes. *Physiology (Bethesda)* 24: 325-331, 2009
- 9) Kaneto H, Matsuoka TA: Down-regulation of pancreatic transcription factors and incretin receptors in type 2 diabetes. *World J Diabetes* 4: 263-269, 2013
- 10) Rankin MM, Kushner JA: Adaptive beta-cell proliferation is severely restricted with advanced age. *Diabetes* 58: 1365-1372, 2009
- 11) Hamamoto S, Kanda Y, Shimoda M, Tatsumi F, Kohara K, Tawaramoto K, Hashiramoto M, Kaku K: Vildagliptin preserves the mass and function of pancreatic  $\beta$  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
- 12) 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
- 13) 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: E510-518, 2005
- 14) 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 $\gamma$  agonist. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E278-286, 2010
- 15) 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
- 16) Lingohr MK, Dickson LM, Wrede CE, Briaud I, McCuaig JF, Myers MG, Jr, Rhodes CJ: Decreasing IRS-2 expression in pancreatic beta-cells (INS-1) promotes apoptosis, which can be compensated for by introduction of IRS-4 expression. *Mol Cell Endocrinol* 209: 17-31, 2003
- 17) Dalbøge LS, Almholt DL, Neerup TS, Vassiliadis E, Vrang N, Pedersen L, Fosgerau K, Jelsing J: Characterisation of age-dependent beta cell dynamics in the male db/db mice. *PLoS One* 8: e82813, 2013
- 18) 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
- 19) Buteau J: GLP-1 receptor signaling: effects on pancreatic beta-cell proliferation and survival. *Diabetes Metab* 34 Suppl 2: S73-77, 2008

- 20) 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 short-term intervention of anti-diabetic drugs preserves pancreatic $\beta$ -cells in db/db mice: comparison of their straightforward effects between early and advanced stage of diabetes

Tomohiko KIMURA

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

**ABSTRACT** We compared the protective effects of pioglitazone, PPAR $\gamma$  agonist, and/or liraglutide, GLP-1 receptor agonist, on pancreatic  $\beta$ -cells between early and advanced stage of diabetes. Male *db/db* mice were treated with pioglitazone (PIO) and/or liraglutide (LIRA) for 2 days in an early stage (7 weeks of age) and advanced stage of diabetes (16 weeks of age). We performed biochemical analysis and examined gene expression profiles after such treatment in the early and advanced stage. LIRA and PIO+LIRA treatment ameliorated fasting hyperglycemia in the early stage model, and only PIO+LIRA showed the same effect in the advanced stage model. Fasting serum insulin levels were not different among 4 groups in both the early and advanced stage models. *Insulin* and *GLP-1receptor* mRNA levels were markedly reduced in the advanced stage compared with those in the early stage. Gene expressions of insulin gene transcription factors (*Pdx1* and *NeuroD*) were significantly up-regulated by PIO and/or LIRA in the early stage, but not in the advanced stage. Cell proliferation-related factor *ERK1* gene expression was also up-regulated only in the early stage by drug intervention. By contrast, in both stages, pro-apoptotic factor *caspase3* mRNA level was suppressed and anti-apoptotic factor *Bcl-2* level was up-regulated by drug intervention. These effects on gene expressions were statistically significant only in the PIO+LIRA treatment group. Gene expression levels of various factors related with lipid synthesis, fibrosis, oxidative stress and endoplasmic reticulum stress were not changed by drug intervention.

The present results demonstrated that pioglitazone and liraglutide showed the protective effects on pancreatic  $\beta$ -cells in an early stage of diabetes by stimulating cell differentiation/proliferation and suppressing cell apoptosis. These effects were limited in an advanced stage of disease. Our results strongly suggest that a pharmacological intervention from an early stage of diabetes is more effective to preserve the  $\beta$ -cell mass and function.

*(Accepted on August 27, 2014)*

**Key words : Pioglitazone, Liraglutide, Pancreatic  $\beta$ -cells, Progression of diabetic morbidity**

Corresponding author  
Tomohiko Kimura  
Division of Diabetes, Endocrinology and Metabolism,  
Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki,  
Okayama 701-0192, Japan

Phone : 81 86 462 1111  
Fax : 81 86 462 1199  
E-mail : tomohiko@med.kawasaki-m.ac.jp