



# Liraglutide improves pancreatic beta cell mass and function in alloxan-induced diabetic mice

Tamura, Kanako

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2015-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6463号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006463>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

## 学位論文の内容要旨

Liraglutide improves pancreatic beta cell mass and function  
in alloxan-induced diabetic mice

リラグルチドはアロキサン誘導糖尿病マウスにおいて

膵β細胞の量と機能を改善する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻  
細胞分子医学  
(指導教員：寺島 俊雄教授)

田村 香楠子

## 【背景・目的】

消化管ホルモンであるインクレチンは Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP)と、Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)の二種類が知られており、グルコース応答性にインスリン分泌を促進する。この作用を利用すれば低血糖のリスクが少ない血糖降下薬の開発につながると考えられたが、これらのホルモンはジペプチジルペプチダーゼ-4 (DPP-4)による分解のため、血中半減期が極めて短く、それ自体では治療薬としての有用性は低いと思われた。そこで GLP-1 の類縁物質であるエクセナチドや、GLP-1 のアミノ酸残基を置換し脂肪酸修飾を行ったリラグルチドが開発された。いずれも DPP-4 に対する抵抗性を示し、作用の持続時間が長いことが特徴で、現在、糖尿病治療薬として世界的に広く用いられている。GLP-1 受容体作動薬はグルコース濃度依存的なインスリン分泌促進が主要な作用であるが、げっ歯類では膵β細胞量を増加させる効果も報告されている。膵β細胞量は、その増殖（既存の膵β細胞の自己複製）、新生（幹/前駆細胞からの分化）および細胞死によって規定されているが、GLP-1 受容体作動薬の効果がそれらに対してどのように影響するのか不明な点が多い。特に新生に対する効果は、これを検出できるモデルがなかったために明確な証拠は存在しない。我々は以前、誘導性 Cre/loxP システムを利用して膵β細胞を特異的に標識・追跡できるマウス(Ins2-Cre/R26R-YFP マウス)を作製し、このマウスを用いることで、膵β細胞の増殖と新生を区別できることを実証している。本研究では Ins2-CreER/R26R-YFP マウスを用いて、膵β細胞を選択的に破壊するアロキサンの投与により膵β細胞障害性の糖尿病マウスモデルを作製し、GLP-1 受容体作動薬であるリラグルチドの膵β細胞に対する効果を解析することを目的とした。

## 【方法】

6 週齢の雄性 Ins2-Cre/R26R-YFP マウスに、タモキシフェンを 2 週間で 5 回投与し膵β細胞の YFP 標識を行った。その 10 日後、尾静脈よりアロキサンを 60 mg/kg の用量で投与し、翌日の血糖値が 300 mg/dl 以上のマウスを糖尿病モデルとして実験に用い

た。アロキサン投与翌日を Day 0 とし、体重 1 kg あたり 200  $\mu$ g のリラグチドを 30 日間、一日一回皮下投与した。コントロール群としては生理食塩水を投与した。体重、摂餌量、血糖値、血清インスリン値を継続的に測定するとともに、Day 0、Day 15 および Day 30 で膵臓を摘出して免疫組織化学的検討を行った。また、膵  $\beta$  細胞量、YFP 標識率、細胞増殖、細胞死を組織化学的に解析し定量化した。さらに経口糖負荷試験により膵  $\beta$  細胞の機能の評価を行った。

#### 【結果及び考察】

アロキサン投与後、コントロール群では 30 日間に渡って体重増加が抑制された。リラグチドの連日投与によってもコントロール群と比べ体重に有意な差は生じなかった。一方、摂餌量はリラグチド群でコントロール群に比較すると低下する傾向が認められた。血糖値はコントロール群で持続的に高値を示したが、リラグチド群では 13 日目以降から有意に上昇が抑制された。さらにリラグチド群では血清インスリン値が Day 15 で高い傾向が認められ、Day 30 では有意に高値を示した。経口糖負荷試験の結果、Day 0 では明らかなインスリン分泌反応の低下に伴う耐糖能障害が認められていたが、Day 15 および Day 30 においてリラグチド群ではインスリン分泌の増加に伴う耐糖能の有意な改善が認められた。このことから、本研究で用いたアロキサン糖尿病マウスにおいて、リラグチドは膵  $\beta$  細胞のグルコース応答性のインスリン分泌機能を改善させることが示された。

膵臓の組織化学的解析を行った結果、アロキサン投与により膵  $\beta$  細胞が破壊され、ほぼ全ての膵島で形態異常が認められた。一方リラグチド群では、正常マウスと同様な形態の膵島も多く見られた。また、膵  $\beta$  細胞の機能や量の維持に不可欠な転写因子である Pdx1、FoxO1 の発現は、アロキサン投与翌日の膵島において明らかな低下を認めたがリラグチドの投与によって著明に回復し、見かけ上正常膵島と同様の発現を示した。次に、膵  $\beta$  細胞量を算出したところ、アロキサン投与翌日には膵  $\beta$  細胞量は正常マウスの約 20% にまで減少し、コントロール群では経日的にさらに減少する傾向にあった。

一方リラグチド群ではコントロール群に比べ Day 15 では高い傾向が見られ、Day 30 では有意に高値を示した。これらのことから、リラグチドはアロキサン糖尿病マウスにおいて、膵  $\beta$  細胞の量を維持し、膵島の形態を回復させることが明らかとなった。

膵  $\beta$  細胞量は、増殖、細胞死、新生のバランスによって維持されている。まず、増殖に対するリラグチドの影響を、増殖マーカーである Ki67 の免疫染色によって評価した。膵  $\beta$  細胞での Ki67 陽性率は、健常マウスで約 1% であったのと比較し、アロキサン投与翌日に約 0.3% と有意に減少した。リラグチド群 (Day 30) では Ki67 陽性率は約 0.8% となりコントロール群の約 0.2% に比べ有意に高値を示した。次に TUNEL 法により細胞死の割合を調べたところ、健常マウスでは、TUNEL 陽性膵  $\beta$  細胞は約 0.3% であったが、アロキサン投与により約 2.6% に増加した。リラグチド群 (Day 30) で TUNEL 陽性膵  $\beta$  細胞は約 0.5% となり、コントロール群の約 2.1% と比較して有意に低値を示した。したがってリラグチドは、アロキサン糖尿病マウスにおいて、膵  $\beta$  細胞の増殖を促進し、細胞死を抑制することが明らかになった。また、幹/前駆細胞などの非  $\beta$  細胞からの新生に対するリラグチドの効果を解析するため、YFP で標識された膵  $\beta$  細胞の割合を算出した。アロキサン投与翌日の標識率は約 32.1% であり、コントロール群、リラグチド群ともに Day 30 でも変化が認められなかった。このことから、本研究で用いたアロキサン糖尿病マウスモデルにおいては、リラグチドによって維持された膵  $\beta$  細胞量に対して、新生はほとんど寄与していないと考えられた。

アロキサンは膵  $\beta$  細胞に取り込まれた後、活性酸素種を発生し、酸化ストレスを引き起こすことにより細胞障害を誘発する。その後慢性的な高血糖によりさらに酸化ストレスが発生し、その結果膵  $\beta$  細胞の機能不全や細胞死を引き起こすことが知られている。そこで酸化ストレスマーカーである 4-HNE を免疫染色により調べた結果、アロキサン投与翌日では、膵島における 4-HNE 陽性細胞の割合は有意に増加していることが確認された。しかし、30 日間のリラグチド投与で膵島における 4-HNE 陽性細胞の割合は有意に減少した。したがってリラグチドは、アロキサン糖尿病マウス膵  $\beta$  細胞におけ

る酸化ストレスを低減する効果があることが示された。

さらに、最終投与から2週間休薬後、リラグルチド群では随時血糖値は抑制されたままであることを見出した。経口糖負荷試験の結果、リラグルチド投与群ではインスリン分泌の増加に伴う耐糖能の有意な改善が維持されていた。この時、膵 $\beta$ 細胞量も有意に高値を示した。これらのことより、リラグルチドの効果は休薬後少なくとも2週間は持続することがわかった。

#### 【結論】

リラグルチドは、アロキササンにより傷害された膵 $\beta$ 細胞の機能を回復させ、増殖促進と細胞死抑制によって膵 $\beta$ 細胞量を維持する。リラグルチドによるこれらの効果は、膵 $\beta$ 細胞における酸化ストレスの低減が一つのメカニズムであると考えられる。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 2527 号	氏名	田村 香楠子
論文題目 Title of Dissertation	<p>Liraglutide improves pancreatic beta cell mass and function in alloxan-induced diabetic mice</p> <p>リラグルチドはアロキサン誘導糖尿病マウスにおいて 膵β細胞の量と機能を改善する</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner 平井 みどり</p> <p>副査 Vice-Examiner 南 康博</p> <p>副査 Vice-Examiner 木戸 良明</p>		
審査終了日	平成 27 年 5 月 27 日		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

#### 【背景・目的】

消化管ホルモンである GLP-1 はグルコース応答性にインスリン分泌を促進する。この作用を利用した GLP-1 受容体作動薬は、糖尿病の治療薬として用いられているが、げっ歯類では膵β細胞量を増加させる効果も報告されている。膵β細胞量は、その増殖、細胞死および新生によって規定されているが、GLP-1 受容体作動薬の効果がそれらに対してどのように影響するのか不明な点が多い。本研究では、膵β細胞を選択的に標識・追跡できる Ins2-CreER/R26R-YFP ノックインマウスを用いて、アロキサン誘導糖尿病マウスモデルを作製し GLP-1 受容体作動薬であるリラグルチドの膵β細胞に対する効果を解析することを目的とした。

#### 【方法】

6 週齢の雄性 Ins2-Cre/R26R-YFP マウスに、タモキシフェンを 2 週間で 5 回投与し膵β細胞の YFP 標識を行った。その 10 日後、尾静脈よりアロキサンを 60 mg/kg の用量で投与し、翌日の血糖値が 300 mg/dL 以上のマウスを糖尿病モデルとして実験に用いた。アロキサン投与翌日を Day 0 とし、体重 1 kg あたり 200 μg のリラグルチドを 30 日間、一日一回皮下投与した。コントロール群としては生理食塩水を投与した。体重、摂餌量、血糖値、血清インスリン値を継続的に測定するとともに、Day 0、Day 15 および Day 30 で膵臓を摘出して免疫組織化学的検討を行った。また、膵β細胞量、YFP 標識率、細胞増殖、細胞死を組織化学的に解析し定量化した。さらに経口糖負荷試験により膵β細胞の機能の評価を行った。

#### 【結果及び考察】

アロキサン投与後、コントロール群では 30 日間に渡って体重増加が抑制された。リラグルチドの連日投与によってもコントロール群と比べ体重に有意な差は生じなかった。一方、摂餌量はリラグルチド群でコントロール群に比較すると低下する傾向が認められた。血糖値はコントロール群で持続的に高値を示したが、リラグルチド群では 13 日目以降から有意に上昇が抑制された。リラグルチド群では血清インスリン値が Day 30 で有意に高値を示した。さらに、経口糖負荷試験の結果、リラグルチド群ではインスリン分泌の増加に伴う耐糖能の有意な改善が認められた。

膵臓の組織化学的解析を行った結果、アロキサン投与により膵β細胞が破壊され、形態異常が認められた。また、膵β細胞の機能や量の維持に不可欠な転写因子である Pdx1、FoxO1 の発現は、アロキサン投与翌日の膵島において明らかな低下を認めたがリラグルチドの投与によって著明に回復し、見かけ上正常膵島と同様の発現を示した。次に、膵β細胞量を算出したところ、アロキサン投与翌日には正常マウスの約 20% にまで減少し、コントロール群では経口的にさらに減少する傾向にあった。一方リラグルチド群ではコントロール群に比べ Day 15 では高い傾向が見られ、Day 30 では有意に高値を示し

た。

増殖マーカーである Ki67 の免疫染色を行ったところ、膵β細胞での Ki67 陽性率は、健常マウスと比較し、アロキサン投与翌日に有意に減少したが、リラグルチド群 (Day 30) ではコントロール群に比べ有意に高値を示した。次に TUNEL 法により細胞死の割合を調べたところ、健常マウスでと比較し、アロキサン投与により有意に増加したが、リラグルチド群 (Day 30) でコントロール群と比較して有意に低値を示した。また、新生に対するリラグルチドの効果を解析するため、YFP で標識された膵β細胞の割合を算出した。アロキサン投与翌日の標識率は約 32.1%であり、コントロール群、リラグルチド群ともに Day 30 でも変化が認められなかった。このことから、本研究で用いたアロキサン糖尿病マウスモデルにおいては、リラグルチドによって維持された膵β細胞量に対して、新生はほとんど寄与していないと考えられた。

アロキサンは膵β細胞に取り込まれた後、活性酸素種を発生し、酸化ストレスを引き起こす。その後慢性的な高血糖によりさらに酸化ストレスが発生し、その結果膵β細胞の機能不全や細胞死を引き起こす。そこで酸化ストレスマーカーである 4-HNE を免疫染色により調べた結果、アロキサン投与翌日では、膵島における 4-HNE 陽性細胞の割合は有意に増加していたが 30 日間のリラグルチド投与で膵島における 4-HNE 陽性細胞の割合は有意に減少した。したがってリラグルチドは、アロキサン糖尿病マウス膵β細胞における酸化ストレスを低減する効果があることが示された。

さらに、最終投与から 2 週間休薬後、リラグルチド群では随時血糖値は抑制されたままであることを見出した。経口糖負荷試験の結果、リラグルチド投与群ではインスリン分泌の増加に伴う耐糖能の有意な改善が維持されていた。この時、膵β細胞量も有意に高値を示した。これらのことより、リラグルチドの効果は休薬後少なくとも 2 週間は持続することがわかった。

#### 【結語】

本研究は、リラグルチドがアロキサンにより傷害された膵β細胞の機能を回復させ、増殖促進と細胞死抑制によって膵β細胞量を維持することを初めて証明した報告である。リラグルチドによるこれらの効果は、膵β細胞における酸化ストレスの低減が一つのメカニズムであることを示した点で価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があるものと認める。