

令和元年6月21日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09397

研究課題名(和文) 食後グレリン分泌異常による糖尿病GLP-1分泌不全の解明

研究課題名(英文) Pathophysiological role of ghrelin in impaired GLP-1 secretion in type 2 diabetes

研究代表者

出崎 克也 (Dezaki, Katsuya)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90337329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病ではインスリン分泌促進ホルモンのGlucagon-like peptide-1 (GLP-1) の分泌が低下しており、インスリン分泌不全の一因と考えられているが、その病態生理は未解明である。本研究では、消化管ホルモンのグレリン分泌亢進が糖尿病におけるGLP-1分泌低下の原因であるという仮説の立証を行う。グレリン投与は、OGTT時の血中GLP-1分泌とインスリン分泌を低下させ、血糖上昇を増大させた。グレリンKOマウスやグレリン受容体KOマウスでは、血中GLP-1分泌とインスリン分泌が野生型マウスより亢進していた。以上より、内因性グレリンが生理的GLP-1分泌を抑制していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血中グレリン濃度は、食前に高値を示し食後速やかに低下する。一方、GLP-1はグレリンと正反対の血中動態を示し、食後、小腸から分泌されインスリン分泌を促進する。糖尿病ではGLP-1分泌が低下しており、インスリン分泌不全の一因と考えられているが、その病態生理は未解明である。本研究で、グレリンがGLP-1分泌を抑制していることが示され、糖尿病の病因解明の新たな布石となることが期待される。グレリン阻害によるGLP-1分泌促進とGLP-1作用増強は、GLP-1関連薬の効果を増強する新たなコンセプトによるインスリン分泌促進薬の開発基盤となり得る。

研究成果の概要(英文)：On the basis of intestinal GLP-1 action that potentiates glucose-induced insulin release, incretin-based medicines have been widely used to treat type 2 diabetic patients. Gastric hormone ghrelin, in contrast, attenuates GLP-1-potentiated insulin release and GLP-1 release. GLP-1 and ghrelin are released in a reciprocal pattern. Therefore, the increased ghrelin/GLP-1 ratio in preprandial periods effectively prevents hypoglycemia and induces appetite. In contrast, the decreased ghrelin/GLP-1 ratio in postprandial periods effectively induces satiety and promotes disposal of elevated blood glucose. The interplay of ghrelin and GLP-1 may play a role in the systemic control of feeding and glucose metabolism, providing a novel strategy to treat type 2 diabetes with impaired insulin release and obesity with hyperphagia.

研究分野：糖尿病学、内分泌学

キーワード：インスリン分泌 糖代謝 糖尿病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グレリンは、オーファン受容体である成長ホルモン放出促進因子受容体(GHS-R)の内因性リガンドとして胃から発見された新規ペプチドであり、成長ホルモン放出、摂食促進、脂肪蓄積作用を示すことが報告されている (Nature 402, 1999; Nature 407, 2000; Nature 409, 2001)。申請者は、グレリンと糖代謝に関して世界に先駆けて研究を行い、以下の知見を得ている。

(1)グレリンは、膵細胞特異的シグナル伝達を介してグルコース誘発インスリン分泌および消化管ホルモンの Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 誘発インスリン分泌を抑制する (Diabetes 56, 2007; Diabetes 60, 2011; Diabetes 63, 2014)。

(2)グレリンは胃が最大の産生臓器として知られているが、膵ランゲルハンス島(膵島)にも発現し、分泌され、比較的高濃度で細胞に作用する(Diabetes 53, 2004)。

(3)内因性グレリン作用の薬理的阻害は、分離膵島からのグルコース誘発インスリン分泌と GLP-1 誘発インスリン分泌を促進し、グルコース負荷試験時の血中インスリン分泌を増強する (Diabetes 53, 2004; FEBS Lett. 586, 2012)。

(4)高脂肪食負荷による耐糖能障害が、グレリン KO マウスでは是正されており、これは高いインスリン分泌応答に起因する (Diabetes 55, 2006)。

一連の実験結果から、グレリンは細胞インスリン分泌を抑制する生理的な調節ペプチドであり、インスリン分泌の惹起因子(グルコース)と促進因子(GLP-1)の両作用を抑制することにより糖代謝を制御していると想定される。したがって、グレリン作用の阻害はインスリン分泌促進を介した糖代謝改善作用が期待される。

血中グレリン濃度は、食前に高値を示し食後速やかに低下する。グレリンの発現や分泌制御メカニズムについては未だ不明な点が多く、糖尿病におけるグレリン動態の変化も未解明である。一方、GLP-1 はグレリンとは正反対の血中動態を示し、食後、小腸から分泌されインスリン分泌を促進する。糖尿病では GLP-1 分泌が低下しており、インスリン分泌不全の一因と考えられているが、その病態生理は未解明である。

2. 研究の目的

本研究では、グレリンが GLP-1 作用(インスリン分泌促進)の抑制に加えて、生理的 GLP-1 分泌を抑制しており、グレリン分泌亢進が糖尿病における GLP-1 分泌低下の原因であるという「グレリンの広範な GLP-1 抑制作用」仮説の立証を行う。さらにグレリン阻害による GLP-1 の分泌・作用増強を介した糖尿病治療を検討する。

3. 研究の方法

(1)膵島インスリン分泌測定

グレリン KO マウスおよび GHS-R KO マウス、野生型 C57BL/6J マウスからコラゲナーゼ法により膵ランゲルハンス島(膵島)を分離し、低グルコース(2.8 mM)または高グルコース(8.3 mM)条件下での膵島インスリン分泌を ELISA 法にて測定した。

(2) 細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 測定

単離した細胞に Ca^{2+} 感受性蛍光色素の fura-2/AM を負荷し、蛍光倒立顕微鏡下で細胞内 Ca^{2+} 動態をリアルタイム蛍光画像解析により測定した。 $[Ca^{2+}]_i$ は、340nm および 380nm の励起による 510nm の蛍光強度比 (F340/F380) で表示した。

(3) 細胞イオンチャンネル電流測定

ATP 感受性 K⁺チャンネル阻害剤の Tolbutamide (100 μM) 存在下で、アンホテリシン穿孔パッチクランプ法によりマウス 細胞の全細胞電流を測定した。

(4) グルコース負荷試験

マウスに腹腔内グルコース負荷試験(IPGTT)または経口グルコース負荷試験(OGTT)を行い、血糖値と血中インスリン分泌を測定した。

4 . 研究成果

グレリン受容体として成長ホルモン放出促進因子受容体(GHS-R)が知られているが、膵 細胞でのグレリン作用が GHS-R を介したものであるかは明らかでない。そこで、グレリンの膵 細胞インスリン分泌抑制作用における GHS-R の関与を検討した。さらに、全身糖代謝における 細胞 GHS-R の役割を検討した。野生型マウスでは、グレリンは 8.3mM グルコース刺激による膵島インスリン分泌を抑制したが、GHS-R KO マウスの膵島インスリン分泌は抑制しなかった。膵島インスリン含量は、野生型と GHS-R KO で同程度であった。野生型マウスでは、グレリンは 8.3mM グルコース刺激による 細胞の TRPM2 チャンネル活性化と [Ca²⁺]_i 上昇を有意に抑制したが、GHS-R KO マウスでは抑制作用は認められなかった。野生型マウスへのグレリン投与(10 nmol/kg i.p.)は、IPGTT における血中インスリン分泌を抑制し耐糖能を悪化させた。GHS-R KO マウスでは、グレリンによる血中インスリン分泌低下・耐糖能悪化作用が消失していた。GHS-R KO マウスの膵 細胞に GHS-R 遺伝子を復活させた GHS-R マウスを用いて検討した結果、 GHS-R マウスではグレリンによる血中インスリン分泌低下・耐糖能悪化作用が野生型と同程度まで復活した。以上より、グレリンは膵 細胞の GHS-R を介してインスリン分泌を抑制し、血糖を制御することを明らかにした。

GLP-1 分泌に対するグレリン投与の効果を検討した結果、グレリン i.p. 投与は、OGTT 時の血中 GLP-1 分泌とインスリン分泌を低下させ、血糖上昇を増大させた。GLP-1 分泌における内因性グレリンの役割を検討した結果、グレリン受容体拮抗薬の投与により内因性グレリン作用を阻害すると、マウス OGTT 時の血中 GLP-1 分泌とインスリン分泌が促進し、血糖上昇が抑えられた。さらに、グレリン KO マウスやグレリン受容体 KO マウスに OGTT を行った結果、血中 GLP-1 分泌とインスリン分泌が野生型マウスより亢進していた。以上より、内因性グレリンが生理的 GLP-1 分泌を抑制していると考えられる。

グレリンによる GLP-1 分泌抑制メカニズムを解明するために、GLP-1 分泌細胞において Ca²⁺ 感受性蛍光タンパクを発現する Gcg-GCaMP6 マウスを作出し、in vivo 顕微鏡システムを用いて GLP-1 分泌細胞の細胞内 Ca 測定に成功した。同時に、Gcg-GCaMP6 マウスの膵臓 細胞における GCaMP 蛍光を確認し、GLP-1 分泌制御のみならずグルカゴン分泌制御の解明にも有用であることを示した。今後は、本測定システムを用いて糖尿病態における GLP-1 分泌変調の詳細な病態メカニズムを解明する予定である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

Goswami C, Dezaki K, Wang L, Inui A, Seino Y, Yada T : Ninjin-yoeito activates ghrelin-responsive and unresponsive NPY neurons in the arcuate nucleus and counteracts cisplatin-induced anorexia. *Neuropeptides* 75: 58-64, 2019, 査読有
doi: 10.1016/j.npep.2019.03.001

Iwasaki Y, Sendo M, Dezaki K, Hira T, Sato T, Nakata M, Goswami C, Aoki R, Arai T, Parmila K, Hayakawa M, Masuda C, Okada T, Hara H, Drucker DJ, Yamada Y, Tokuda M, Yada T: GLP-1 release and vagal afferent activation mediate the beneficial metabolic and chronotherapeutic effects of D-allulose. *Nature Commun* 9: 113, 2018, 査読有
doi: 10.1038/s41467-017-02488-y

Ando A, Gantulga D, Nakata M, Maekawa F, Dezaki K, Ishibashi S, Yada T: Weaning stage hyperglycemia induces glucose-insensitivity in arcuate POMC neurons and hyperphagia in type 2 diabetic GK rats. *Neuropeptides* 68: 49-56, 2018, 査読有
doi: 10.1016/j.npep.2018.02.001

Uchida K, Dezaki K, Yoneshiro T, Watanabe T, Yamazaki J, Saito M, Yada T, Tominaga M, Iwasaki Y: Involvement of thermosensitive TRP channels in energy metabolism. *J Physiol Sci* 67: 549-560, 2017, 査読有
doi: 10.1007/s12576-017-0552-x

Ito K, Dezaki K, Yoshida M, Yamada H, Miura R, Rita RS, Ookawara S, Tabei K, Kawakami M, Hara K, Morishita Y, Yada T, Kakei M: Endogenous 2A-adrenoceptor-operated sympathoadrenergic tones attenuate insulin secretion via cAMP/TRPM2 signaling. *Diabetes* 66: 699-709, 2017, 査読有
doi: 10.2337/db16-1166

Loh K, Yan-Chuan Shi YC, Walters S, Bensellam M, Lee K, Dezaki K, Nakata M, Kin C, Chan JY, Gurzov EN, Thomas HE, Waibel M, Cantley J, Thomas WK, Yada T, Laybutt RD, Grey S, Herzog H: Inhibition of Y1 receptor signaling improves islet transplant outcome. *Nature Commun* 8: 490, 2017, 査読有
doi: 10.1038/s41467-017-00624-2

Kakei M, Yoshida M, Dezaki K, Ito K, Yamada H, Funazaki S, Kawakami M, Sugawara H, Yada T: Glucose and GTP-binding protein-coupled receptor cooperatively regulate transient receptor potential-channels to stimulate insulin secretion. *Endocr J* 63: 867-876, 2016, 査読有
doi: 10.1507/endocrj.EJ16-0262

Taguchi M, Dezaki K, Koizumi M, Kurashina K, Hosoya Y, Lefor AK, Sata N, Yada T: Total gastrectomy-induced reductions in food intake and weight are counteracted by rikkunshito by attenuating glucagon-like peptide-1 elevation in rats. *Surgery* 159: 1342-1350, 2016, 査読有
doi: 10.1016/j.surg.2015.12.003

Yamada H, Yoshida M, Ito K, Dezaki K, Yada T, Ishikawa SE, Kakei M: Potentiation of glucose-stimulated insulin secretion by the GPR40-PLC-TRPC pathway in pancreatic -cells. *Sci Rep* 6: 25912, 2016, 査読有
doi: 10.1038/srep25912

Kurashina T, Dezaki K, Yoshida M, Rita R, Ito K, Taguchi M, Miura R, Tominaga M, Ishibashi S, Kakei M, Yada T: The -cell GHSR and downstream cAMP/TRPM2 signaling account for insulinostatic and glycemic effects of ghrelin. *Sci Rep* 5: 14041, 2015, 査読有
doi: 10.1038/srep14041

〔学会発表〕(計 29 件)

出崎克也, 矢田俊彦: 消化管ホルモンによる糖代謝と摂食調節. 日本薬学会第 138 年会, 2018.

出崎克也, 三浦季菜, 矢田俊彦: オキシトシンは Gq-非選択的のカチオンチャネル活性化により細胞インスリン分泌を促進する. 第 94 回日本生理学会大会, 2017.

出崎克也, 三浦季菜, 矢田俊彦: オキシトシンによる膵細胞インスリン分泌促進と耐糖能改善. 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2017.

出崎克也, 三浦季菜, 矢田俊彦: オキシトシン経鼻投与による内因性オキシトシン分泌促進と耐糖能改善. 第 38 回日本肥満学会, 2017.

出崎克也, 倉科智行, 矢田俊彦: 消化管ホルモンによる TRPM2 チャネルを介したインスリン分泌制御. 第 93 回日本生理学会大会, 2016.

出崎克也, 倉科智行, 吉田昌史, 加計正文, 矢田俊彦: グレリンのインスリン分泌・糖代謝作用における膵細胞 vs 全身 GHS-R の役割. 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2016.

出崎克也, 倉科智行, 矢田俊彦: 消化管ホルモンによる TRPM2 チャネルを介したインスリン分泌制御. 第 93 回日本生理学会大会, 2016.

〔図書〕(計 1 件)

稲垣暢也, 出崎克也, 原田直樹, 原田範雄: ホルモンによる膵島機能制御. *Islet Equality* 8, メディカルレビュー社, 5-15, 2019