

令和元年6月20日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18997

研究課題名(和文) DHA・EPA刺激による膵細胞インスリン分泌増強作用における分子機構の解明

研究課題名(英文) Investigations into the mechanisms underlying the increase in glucose-dependent insulin secretion during DHA/EPA stimulation in pancreatic beta cells.

研究代表者

竹田 有加里 (Takeda, Yukari)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：20582159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では膵細胞の長鎖脂肪酸レセプターGPR40刺激によるインスリン分泌増強作用、及び腸管ホルモンGLP-1レセプター(R)との同時刺激によるインスリン分泌相乗作用機序の解明を目的とする。長鎖脂肪酸EPA及びGPR40シグナル伝達系下流因子PKCの活性化薬は、細胞株INS-1のインスリン分泌を増加させた。またGLP-1R(cAMP系)との同時刺激によりインスリン分泌を相乗的に増強させ、その作用はPKA阻害剤で完全に抑制されたことからGLP-1RとGPR40シグナル伝達系のクロストークが示唆された。理論研究の結果IP3Rがそのクロストークターゲットの主要因子であると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

二型糖尿病患者が世界的に増加の一途をたどる中、GPR40刺激が血糖値依存的にインスリン分泌を増強することから、二型糖尿病治療の新たな薬剤標的として近年注目を浴びている。一方で、武田薬品工業が生成したGPR40合成作動薬TAK-875は、肝機能異常を伴うため新たな薬剤の探索が急務であるとされていた。本研究ではIP3Rが二型糖尿病治療の新たな標的となる可能性を示した。また、GLP-1R・GPR40シグナル伝達系の同時刺激によるIP3Rの相乗的な活性化は、魚類などEPAを多く含む食事療法やサプリメントの摂取で実現できる可能性があり、安心・安全な糖尿病治療に貢献できると期待する。

研究成果の概要(英文)：Activation of GPR40 by long-chain fatty acids, EPA and DHA, increase glucose-stimulated insulin secretion from pancreatic beta cells. The current study demonstrated that simultaneous activation of GPR40 and GLP-1 receptor (R) signal transduction cascades (PKC pathway and PKA pathway) synergistically increased insulin secretion from INS-1. The effect was completely abolished by a PKA inhibitor, H-89 alone, suggesting crosstalk between GPR40 and GLP-1R signaling systems. Interestingly, the insulinotropic effect of PKC is also inhibited by H-89. It indicates that pre-phosphorylation of the PKC effector by PKA at a basal cAMP level, is fundamental to the PKC effect. Mathematical analysis suggested that IP3R is the key target effector of the crosstalk between GPR40 and GLP-1 receptor (R) signaling pathways.

研究分野：医歯薬学

キーワード：受容体・細胞内シグナル伝達

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

1. 研究開始当初の背景

膵細胞から分泌されるインスリンは血糖値の恒常性維持を担う重要なホルモンである。**GPR40** (遊離脂肪酸受容体 1) は主に膵細胞で非常に多く発現している G タンパク質共役受容体で、中鎖脂肪酸が結合すると、**G_{αq/11} - phospholipase C (PLC) - DAG · IP₃ - PKC** シグナルカスケードを活性化し、グルコース濃度に依存してインスリン分泌を増強する。そのため、**GPR40** は二型糖尿病治療の新たな薬剤標的として近年注目を浴びているが、インスリン分泌増強作用をもたらす下流シグナル制御機構やグルコース濃度依存性のメカニズムの詳細については、依然として明らかになっていない。一方で、食事摂取に伴い分泌される腸管ホルモン **GLP-1** もまた、グルコース濃度依存性にインスリン分泌を増強する。申請者はこれまで、文献にある実験データを数理細胞モデルに組み込み、理論解析することによって、**cAMP** シグナルカスケードの活性化による **PKA · Epac** を介する **L 型 Ca²⁺チャンネル(LTCC)** やストア感受性カルシウムチャンネル(**SOCC**)の活性化および **ATP 感受性 K⁺チャンネル(K_{ATP})**の抑制が **GLP-1R** 刺激による膜興奮性上昇作用の主要要素であることを見出した。さらに膵細胞の電気生理学実験・カルシウムイメージングで著名な米国 **SU New York Upstate Medical University** の **Holz** 教授との共同(実験と理論の融合)研究によって、**GLP-1R** 刺激による **[Ca²⁺]_i** の上昇作用における **IP₃ レセプター(IP₃R)**の重要性を明らかとした。

これまでの **GPR40** 発現系の実験では、ドコサヘキサエン酸(**DHA**)・エイコサペンタエン酸(**EPA**)共に用量依存的に **GPR40** を活性化し、**[Ca²⁺]_i** を上昇させ、インスリン分泌を増強することが示されている。その経路には、**LTCC** の活性化および開口分泌の直接作用が示唆されている。また、**phospholipase C (PLC) - DAG · IP₃ - PKC** を活性化するため、**IP₃R** の関与も十分に考えられる。このように、**GLP-1** によるインスリン分泌増強作用機序との類似点が多いことから **GLP-1** と **GPR40** の下流シグナル伝達経路のクロストークが示唆される。事実、**IP₃R** の **PKC** を介するリン酸化の程度が、先に **PKA** によってリン酸化されることで、約 3 倍にも増加することが示されている(**Vermassen et al., Biochem Biophys Res Commun., 2004**)。

非常に興味深いことに、生体内の **GLP-1** 分解酵素 **DPP-4** の阻害薬を用いた二型糖尿病治療が、血中 **DHA · EPA** 濃度が高い患者により有効であるとの報告があった(臨床データ; **Iwasaki M. et al., J Diabetes Investig., 2012** 等)。つまり **DHA** や **EPA** が **GLP-1** と共に **GPR40 · GLP-1R** シグナルカスケードを同時に活性化することによって、それぞれ単独の作用よりもさらに効果的にインスリン分泌を増強させると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では膵細胞の長鎖脂肪酸レセプター**GPR40** 刺激によるインスリン分泌増強作用、並びに腸管ホルモン **GLP-1R** との同時刺激によるインスリン分泌相加・相乗作用を検討し、実験と理論の独創的アプローチで、その分子機構を定量的・総合的に解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) インスリン分泌測定

ラット細胞株 **INS-1** 細胞を細胞培養プレートに播種し(**5.0 × 10⁵ cells/ml**)、その二日後に薬理学実験(図 1、2)を行った。薬理学実験では、まず **2 mM** グルコースで **60 分**の **pre-incubation** を行った後、各試薬の負荷(**60 分**)を行い、バッチインキュベーション(**ELISA**)法によって各ウェル(上清)のインスリン濃度を算出した。

(2) 包括的数理β細胞モデルを用いたインスリン分泌制御機構の数理解析

GLP-1R と **GPR40** シグナル伝達経路とのクロストークの主要ターゲット因子を予測し、インスリン分泌相乗作用機序を定量的・総合的に解析するため、**IP₃R** モデル(**Takeda et al., Am J Physiol., 2016**)を新たに実装した包括的数理細胞モデルを構築した(**Microsoft Visual studio**)。

まず **GLP-1R** 系 **PKA · Epac** 介するイオンチャンネル(電位依存性 **K⁺チャンネル(K_v)**、**LTCC**、**SOCC**、**K_{ATP}**、**IP₃R**、**SERCA**(筋小胞体カルシウムポンプ))の修飾作用について文献データを基にモデル化し、**GLP-1R** 単独の刺激による膜興奮性および **[Ca²⁺]_i** の上昇をシミュレーションで検証するとともに、そのメカニズムの定量的解析 **Instantaneous Equilibrium (IE) analysis** (**Takeda et al., AJP, 2016** 参照)を行った。

次に、**GLP-1R** と **GPR40** の同時刺激による膜興奮性および **[Ca²⁺]_i** への作用を検討するため、**GLP-1** 刺激の影響に加え、**GPR40** シグナル伝達系の主要な下流因子である **IP₃** の上昇作用について検討した。

4. 研究成果

(1) **EPA** 及び **GPR40** シグナル伝達系下流因子 **PKC** の活性化薬 **Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)** は、濃度依存的に細胞株 **INS-1** のグルコース依存性インスリン分泌を有意に増加させた(図 1)。また **PMA** 存在下で **GLP-1R** 作動薬 **Exendin-4 (Ex)** 刺激を行うと、それぞれ単独の刺激によるインスリン分泌を相乗的に増強させた。**PMA** のインスリン分泌相乗作用は、**GLP-1R** シグナル伝達系下流因子である **PKA** の阻害剤(**H-89**)および **PKC** 阻害剤(**Ro-31-8220**)で抑制されたことから、**GLP-1** と **GPR40** の下流シグナル伝達系のクロストーク

が示唆される(図2)。興味深いことに、**PMA** 単独の刺激によるインスリン分泌増強作用もまた **H-89** で抑制された(図2)。一方、**Ex** 単独の刺激によるインスリン分泌増強作用は **Ro-31-8220** で抑制されなかった。このことから、シグナル伝達系のクロストークにおける **PKC** の上流に **PKA**(細胞静止状態における **PKA** の作用)が存在する可能性が考えられる。生体内の **GLP-1** 分解酵素 **DPP-4** の阻害薬を用いた二型糖尿病治療が、血中 **DHA・EPA** 濃度が高い患者により有効であるとの臨床データから、**GPR40** と **GLP-1R** のシグナル伝達経路のクロストークの可能性が考えられたが、上記のインスリン分泌実験によってその作用が細胞レベルで検証された。

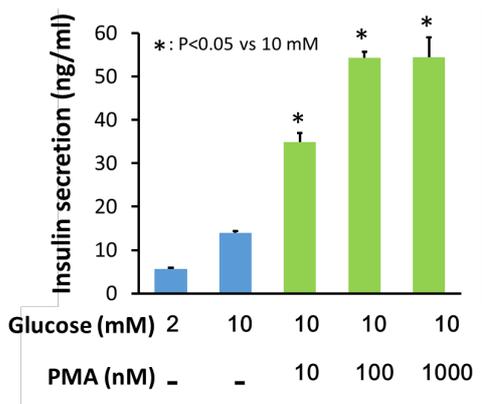


図1. PMA(PKC活性化薬)は濃度依存的にインスリン分泌を増強した。

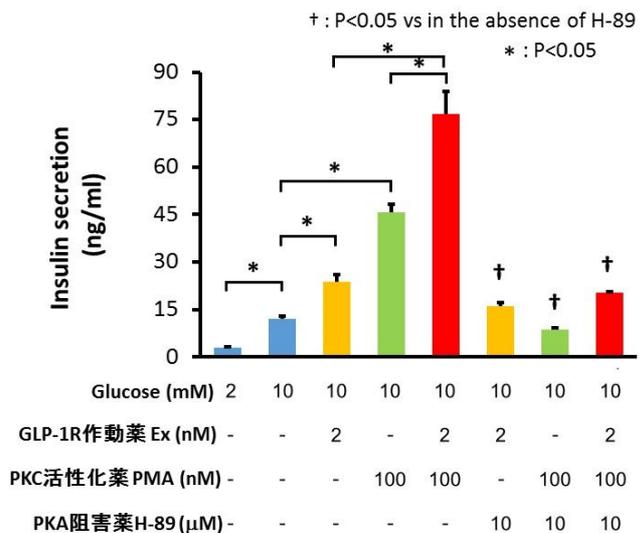


図2. PMAとExとの同時刺激によりインスリン分泌を相乗的に増強させ、その作用はPKA阻害剤で抑制された。

(2) **IP₃R** モデルを新たに実装した包括的数理細胞モデルの数理解析によって **GLP-1R** と **GPR40** シグナル伝達経路とのクロストークの主要ターゲット因子を予測し、インスリン分泌相乗作用機序を定量的・総合的に解明することを試みた。

まず、**GLP-1** 単独の作用を検討するため、**PKA** および **Epac** を介する **VGCC**、**SOCC**、**IP₃R**、**SERCA** の活性化、**K_{ATP}** の非活性化、**K_v** の不活性化をモデル化した結果、**10 mM glucose** で発生するバースト持続時間の延長をシミュレーションで再現することができた(図3)。バースト持続時間の延長とともに **bulk Ca²⁺濃度** (**[Ca²⁺]_{bulk}**)の上昇持続時間も延長することから、インスリン分泌が増強すると考えられる。さらに **IP₃R** 近傍の **Ca²⁺濃度** (**[Ca²⁺]_{nrs}**)の顕著な上昇が認められたことから、細胞膜近傍に存在する小胞体の **IP₃R** が活性化すれば、**IP₃R** を介して流出する **Ca²⁺**が直接インスリン分泌を惹起する可能性があると考えられる。

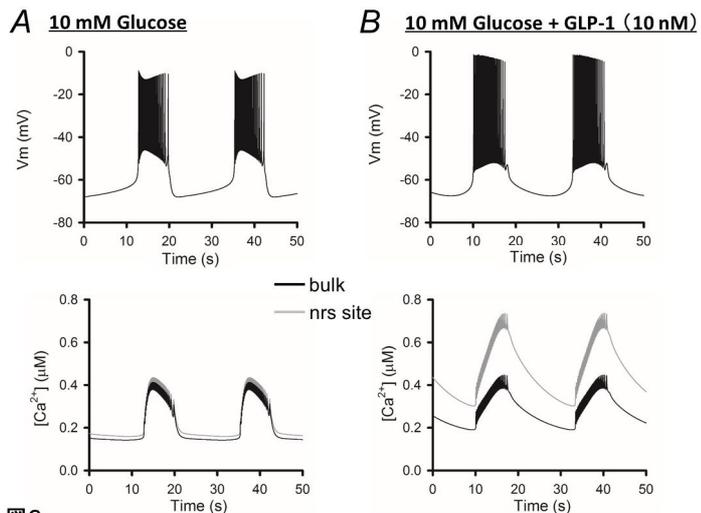


図3. GLP-1R刺激による膜電位および[Ca²⁺]_iへの影響をシミュレーションで再現した(Nrs = near releasing site (IP₃R近傍の小さな[Ca²⁺]_iコンパートメント))。

GLP-1R 刺激による細胞膜電位変化に対するそれぞれのイオンチャネル(包括的数理細胞モデルのすべての変数)の寄与(contribution)を明らかにするため、数理解析(**IE Analysis**)をした結果(図4；主要要素を最下部に表示)、**PKA** を介して **IP₃R** が活性化することでバースト終了時の **bulk Ca²⁺濃度** (**[Ca²⁺]_{bulk}**)の減少速度が緩やかになり、それが **Na⁺/Ca²⁺交換輸送体(NCX)** の非活性化を遅延させ、バースト持続時間を上昇させていることが明らかとなった。また **LTCC** の活性化によって活動電位が発火しやすい状態であることも重要な要因であると示唆される(図4)。

次に **GLP-1R** と **GPR40** の同時刺激による膜興奮性および **[Ca²⁺]_i** への作用を検討するため、**GLP-1** 刺激の影響に加え、**GPR40** シグナル伝達系の主要な下流因子である **IP₃** の作用について検討した。**IP₃** 濃度の上昇は **IP₃R** を活性化し、小胞体 **Ca²⁺濃度** (**[Ca²⁺]_{ER}**)の減少を促進することで **SOCC** を活性化させた。その結果、バースト間隔が短縮し、バースト発生頻度が増加すると共に、**[Ca²⁺]_{bulk}** および **[Ca²⁺]_{nrs}** が上昇する頻度が増加することから、インスリン分泌が増

強すると考えられる(図5)。これらの結果から、**GLP-1** および **GPR40** 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ の増加は、**IP₃R**の活性化が重要な要因であり、また **IP₃R** が **GLP-1R**・**GPR40** シグナル経路のクロストークの主要要素であると示唆された。

二型糖尿病患者が世界的に増加の一途をたどる中、**GPR40** 刺激が血糖値依存的にインスリン分泌を増強することから、二型糖尿病治療の新たな薬剤標的として近年注目を浴びている。一方で、武田薬品工業が生成した **GPR40** 合成作用薬 **TAK-875** は、肝機能異常を伴うため新たな薬剤の探索が急務であるとされていた。本研究では **IP₃R** が二型糖尿病治療の新たな標的となる可能性を示した。また、**GLP-1R**・**GPR40** シグナル伝達系の同時刺激による **IP₃R** の相乗的な活性化は、魚類など **EPA** を多く含む食事療法やサプリメントの摂取で実現できる可能性があり、安心・安全な糖尿病治療に貢献できると期待する。

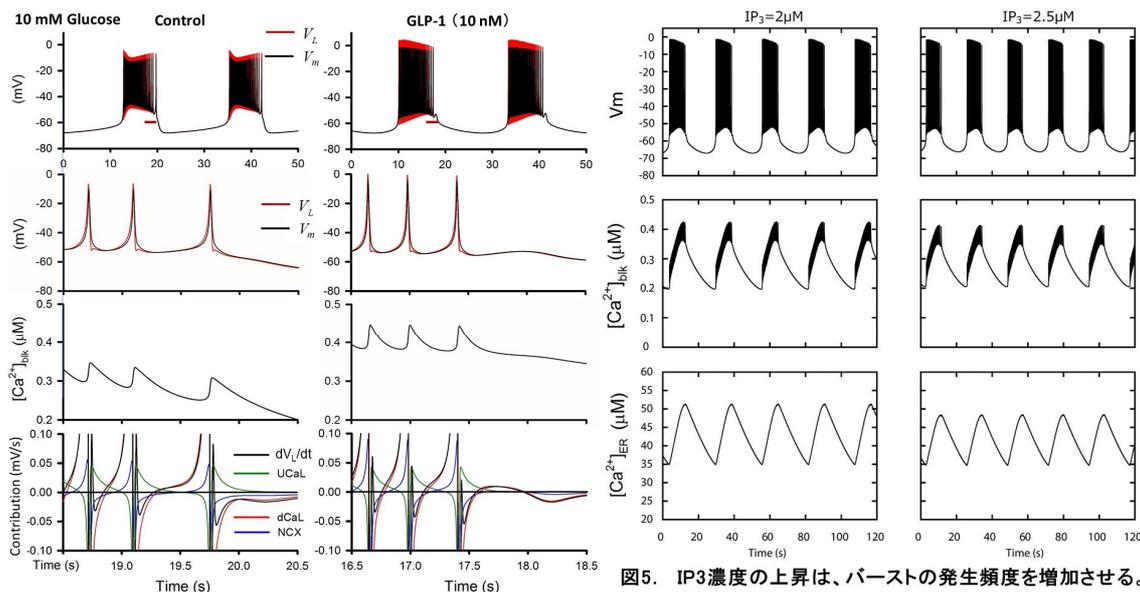


図4. GLP-1R刺激によるバースト持続時間の延長における各イオンチャネルの寄与 (contribution) (V_m =膜電位、 $V_L=V_m$ の各時刻における平衡点、UCaL=LTCCのUゲート、dCaL=LTCCのdゲート、NCX= Na^+/Ca^{2+} 交換輸送体)。

図5. IP₃濃度の上昇は、バーストの発生頻度を増加させる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Takeda Y., Theoretical investigations into the quantitative mechanisms underlying the regulation of $[cAMP]_i$, membrane excitability and $[Ca^{2+}]_i$ during GLP-1 stimulation in pancreatic β cells. *Yakugaku-Zasshi*, 136(3):467-471, 2016 (査読有)

DOI: <https://doi.org/10.1248/yakushi.15-00246-2>

Takeda Y. Theoretical Analysis of the mechanisms underlying incretin-induced amplification of insulin secretion. 「インクレチンによるインスリン分泌増強作用の理論解析」*BIO Clinica, Incretin-Resistant topics* 88-90, 2016 (査読無)

[学会発表](計8件)

Takeda Y, Shimayoshi T, and Holz G.G. Simulation Analysis of GLP-1-Regulated Membrane Excitability And $[Ca^{2+}]_i$ Dynamics In Pancreatic β -Cells. 第95回日本生理学会大会、2018年3月30日、香川県高松市

Takeda Y, Shimayoshi T, and Amano A., and Holz G.G. Quantitative Mechanisms Underlying GLP-1-regulated Membrane Excitability And $[Ca^{2+}]_i$ Dynamics In Pancreatic Beta Cells. *Biophysical Society 62st Annual Meeting* Feb. 19th, 2018, San Francisco, USA

Takeda Y., Shimayoshi T., Leech C.A., Holz G.G. Quantitative Modeling and Simulation Analysis of Membrane Excitability and $[Ca^{2+}]_i$ Dynamics Under the Control of GLP-1 in Pancreatic β -Cells. *The 77th Scientific Sessions American Diabetes Association*. Jun. 11th, 2017, California, USA.

Takeda Y., Shimayoshi T., George G. Holz. 膵 β 細胞におけるGLP-1受容体刺激による膜興奮性及びカルシウム動態制御機構の理論研究第60回日本糖尿病学会年次学術集会 2017年5月20日、愛知県名古屋市

Takeda Y., Shimayoshi T., Leech C.A., Holz G.G. Quantitative Modeling and Simulation Analysis of Membrane Excitability and $[Ca^{2+}]_i$ Dynamics Under the Control of GLP-1 in Pancreatic β -Cells. 18th Servier-IGIS Symposium (招待発表). Mar. 25th, 2017, St Jean Cap Ferrat, France.

Takeda Y., Shimayoshi T., George G. Holz. 膵 β 細胞における膜興奮性および細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 制御機構の理論解析. 第9回BKCバイオインフォマティクス研究会(招待講演) 2017年2月1日、滋賀県草津市

Takeda Y., Shimayoshi T., George G. Holz., Noma A. 膵 β 細胞における GLP-1 受容体刺激によるイノシトール三リン酸受容体を介する Ca^{2+} 動員制御機構の理論研究第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会、2016 年 5 月 21 日、 京都府京都市

Takeda Y., Shimayoshi T., George G. Holz., Noma A. Modeling analysis of IP_3R -mediated Ca^{2+} mobilization under the control of GLP-1 in mouse pancreatic beta cells. Advances & Breakthroughs in Calcium Signaling. Apr. 9th, 2016, Hawaii, USA

〔その他〕

シミュレーションベースの電子教材の作成に貢献し、細胞モデルを公開するとともに基礎研究や臨床研究への応用に向けた講習会を定期的に行っている。

<http://www.eheartsim.com/>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者：なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。