

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01857

研究課題名(和文) 2型糖尿病発症過程におけるインスリン分泌異常と細胞内脂質代謝異常の時系列相関解析

研究課題名(英文) Involvement of DAG metabolism in beta-cell dysfunction during type 2 diabetes

研究代表者

金子 雪子 (Kaneko, Yukiko)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：00381038

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)：I型ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)がインスリン分泌調節分子であること、糖尿病マウス 細胞ではI型DGK発現が低下しているという知見を基に、2型糖尿病発症過程で認められるインスリン過剰分泌や分泌障害にI型DGKの機能低下が関与するという仮説を立て、2型糖尿病発症との関連について検証した。その結果、I型DGK活性低下により、インスリン分泌に対し促進、抑制の二面性を示すことがわかった。また、I型DGK欠損によりインスリン分泌障害や耐糖能障害が認められた。本研究よりI型DGKは細胞内DAG量を適切に保つことで、インスリン分泌を維持する重要な役割を果たしていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満を伴う2型糖尿病発症過程において引き起こされるGLadaptationとGL-toxicityというインスリン分泌異常の一連の流れにtype I DGK機能が関与しているという新たな発想に基づき計画された。本研究より、膵細胞内ではtype I DGKの働きにより細胞内DAG量が適切に調節されていること、これらの調節機能の破綻によりインスリン分泌異常からの糖尿病増悪へと繋がる可能性が明らかとなった。本研究より、細胞内DAGの蓄積を調節し、細胞機能障害からの回復を目的とした、全く新しい作用機序を有する糖尿病治療薬の開発につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：The intracellular DAG level is strictly controlled, primarily by DAG kinase (DGK), an enzyme catalyzing the conversion of DAG to phosphatidic acid. We have previously shown a crucial role of DGK in GSIS. Of the 10 known DGK isoforms, we focused on type-I DGK isoforms (i.e., DGK α , DGK β), which are activated by Ca²⁺. We investigated the effects of DAG accumulated via the reduced activity of type I DGKs on insulin secretion. DAG accumulation through declined type I DGK activity shows a dual effect on insulin secretion depending on the degree of accumulation; a mild DAG accumulation induces a PKC-dependent stimulatory effect on insulin secretion, whereas an excessive DAG accumulation suppresses it in a PKC-independent manner, possibly via attenuation of VDCC activity. Moreover, glucose tolerance was reduced in type I DGK knockout mice. Thus, type I DGKs are likely to play a pivotal role in maintaining appropriate insulin secretion by optimizing DAG levels.

研究分野：薬理学、糖尿病学

キーワード：糖尿病 膵細胞 インスリン分泌 ジアシルグリセロール ジアシルグリセロールキナーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肥満を伴う2型糖尿病発症初期では、インスリン抵抗性と血中遊離脂肪酸の増加により、インスリン分泌機能が一時的に亢進する glucolipoadaptation (GL-adaptation) が生じる。しかし、高血糖状態が持続すると、逆に細胞機能の低下、すなわち glucolipototoxicity が惹起される。GL-adaptation では、グルコースへの感受性が低下する一方で、脂肪酸に対する感受性が高まり、脂肪酸誘発インスリン分泌反応が増大する。このような条件下では遊離脂肪酸により phospholipase D1 (PLD1) 及び phosphatidic acid phosphatase (PAP) の発現が上昇し、細胞内で diacylglycerol (DAG) の生成が亢進すると考えられる。一方、2型糖尿病でのインスリン分泌不全に細胞内への DAG の過剰な蓄積が関与することも指摘されている。すなわち、糖尿病発症過程において細胞内で徐々に蓄積される DAG が GL-adaptation と glucolipototoxicity の両方に関与していると考えられる。生理活性脂質である DAG のシグナリング調節において最も重要な因子のひとつが、DAG をリン酸化し、ホスファチジン酸へと変換する酵素である DAG キナーゼ (DAG kinase: DGK) である。DGK のうち、type I DGK である DGK α 、 β は、Ca²⁺ 結合ドメインである EF hand と、Ca²⁺ センサーとして働く recoverin homology (RVH) ドメインを有しており、細胞内 Ca²⁺ により活性化される。我々は、これまでに type I DGK である DGK α および β が膵細胞に発現し、インスリン分泌調節に関わることを報告している。また、type I DGK 阻害薬や DAG アナログ処置による細胞内 DAG 蓄積がインスリン分泌を低下させることを明らかにしている。すなわち、GL-adaptation および glucolipototoxicity の進展における type I DGK の関与を明らかにすることは、細胞機能障害の進展を阻止する新たな2型糖尿病治療に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

DGK を介した脂質シグナリングによるインスリン分泌調節のメカニズム、およびその破綻と2型糖尿病病態発症との関連について明らかにすること目的とした。具体的には、GL-adaptation および glucolipototoxicity の進展における type I DGK の関与の解明を目指し、DGK α や β の機能低下がインスリン分泌障害を誘発するメカニズムを明らかにするとともに、2型糖尿病病態との関係を検証することで、膵 β 細胞における DAG シグナリングの病態生理学的な意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) インスリン分泌および細胞内 Ca²⁺ 濃度に及ぼす影響

インスリン分泌に対する DGK 阻害薬や DAG アナログに対する影響について検討を行うために、MIN6 細胞を用いパッチインキュベーション法によりサンプルを採取し、RIA により定量を行った。同様に、インスリン分泌と相関することで知られる細胞内 Ca²⁺ 濃度 ([Ca²⁺]_i) 変化に対する DGK 阻害薬の影響について検討を行うため、Ca²⁺ 蛍光指示薬である fura-PE3 を細胞に負荷し、Aquacosmos System (浜松ホトニクス) により画像解析を行った。

(2) パッチクランプ法による全細胞電流測定

MIN6B 細胞における voltage dependent Ca²⁺ channel (VDCC) 電流測定は、Digidata 1440A および pCLAMP 10.2 software (Molecular Devices) で制御されたパッチクランプ用アンプ Axopatch 200B (Molecular Devices) を用いて、amphotericin B 穿孔パッチクランプ法により行った。

(3) DGK KO マウスの耐糖能およびインスリン分泌能の測定

各マウスに glucose (2.0 g/kg, p.o.) を体重 10 g あたり 0.1 ml となるように経口投与した。血糖値は glucose 投与前(0分)、投与後 30分、60分、120分後に測定した。また、マウスよりコラゲナーゼ消化法により膵島を単離し、パッチインキュベーション法により膵島あたりのインスリン分泌量を測定した。

4. 研究成果

(1) グルコース刺激誘発 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応に対する Ⅰ型 DGK 阻害薬 R59949 および DAG アナログ DiC_8 の濃度依存的効果

MIN6 細胞の $[Ca^{2+}]_i$ に対する R59949 の濃度反応関係について検討した。細胞外グルコース濃度を 2.8 mM から 22.2 mM に上昇させると、ほとんどの MIN6 細胞は一過性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇 (第 1 相) と、それに続く $[Ca^{2+}]_i$ オシレーション (第 2 相) を示す。第 2 相において、R59949 の濃度を 1 μ M から 3、10 μ M へと上げたところ、1 および 3 μ M R59949 は $[Ca^{2+}]_i$ オシレーションの振幅を増加させた一方で、10 μ M R59949 は $[Ca^{2+}]_i$ オシレーションを消失させ、さらに $[Ca^{2+}]_i$ は低下した。同様の濃度依存的な二面性の作用は、膜透過性 DAG アナログである DiC_8 (10 ~ 100 μ M) を処置した際にも観察された。すなわち、 $[Ca^{2+}]_i$ に対して、R59949、 DiC_8 はともに、低濃度では興奮性、高濃度では抑制性の二面性の作用を示すことが明らかとなった。

(2) 低濃度 R59949 および DiC_8 による $[Ca^{2+}]_i$ オシレーション増大作用に対する PKC の関与

低濃度 R59949 (1 μ M) および DiC_8 (10 μ M) による 22.2 mM グルコース誘発 $[Ca^{2+}]_i$ オシレーション増大反応に対して、プロテインキナーゼ C (protein kinase C: PKC) が関与するかどうかを、PKC 阻害薬である Ro31-8220 (1 μ M) を用いて検討した。その結果、MIN6B 細胞において、Ro31-8220 (1 μ M) は低濃度 R59949 (1 μ M) および DiC_8 (10 μ M) による 22.2 mM グルコース誘発 $[Ca^{2+}]_i$ オシレーション増大反応を抑制した。以上の結果より、膵細胞において、軽度な Ⅰ型 DGK 阻害による細胞内 DAG の増加は、PKC 依存的にグルコース誘発 $[Ca^{2+}]_i$ オシレーションを増強することが示唆された。

(3) グルコース刺激誘発インスリン分泌反応に対する R59949 および DiC_8 の効果

$[Ca^{2+}]_i$ での結果と同様に MIN6 細胞におけるグルコース誘発インスリン分泌反応 (GSIS) に対して、R59949 および DiC_8 が濃度依存的な二面性作用を示すかどうかを検討した。22.2 mM グルコースで 30 分間刺激することにより誘発されるインスリン分泌は、1 μ M R59949 および 10 μ M DiC_8 により有意に増加した。一方、10 μ M R59949 処置により、グルコース刺激後 30 分間での GSIS は影響されなかったものの、第 2 相のインスリン分泌は有意に抑制されたことから、インスリン分泌反応においても type I DGK 阻害による二面性の作用が確認できた。しかしながら、予想に反し、100 μ M DiC_8 によりインスリン分泌はむしろ有意に増強された。このような違いが生じた原因として、type I DGK 阻害薬による局所的な DAG 増加と DAG アナログによる細胞全体の DAG 量の増加による非特異的なインスリン分泌反応が認められたと予想される。

(4) VDCC 電流に対する高濃度 R59949 および DiC_8 の効果

DAG の蓄積によるインスリン分泌抑制作用への電位依存性 Ca^{2+} チャネル (VDCC) の関与について穿孔パッチクランプ法による全細胞電流測定により検討を行った。その結果、電流電圧関係を示す I-V plot は VDCC 電流に特徴的なベルシェイプ型を示し、これらは 10 μ M R59949 および 100 μ M DiC_8 により減少し、また VDCC のピーク電流は有意に抑制された。以上の結果より、膵細胞における I 型 DGK 阻害を介した細胞内 DAG の蓄積は、VDCC 活性を抑制する結果、 $[Ca^{2+}]_i$ を低下させることが示唆された。

(5) Type I DGK 欠損マウスにおける耐糖能およびインスリン分泌反応への影響

DGK 欠損 (DGK KO) マウスを用いて DGK の血糖調節への影響について検討を行った。その結果、DGK KO マウスの随時血糖値およびインスリン抵抗性に変化は認めら

れなかったが、耐糖能は悪化した。また、DGK hetero KO マウス単離膵島において、グルコース誘発インスリン分泌が野生型マウスと比較して低値を示し、インスリン分泌能が低下していることがわかった。

以上の結果より、I 型 DGK 阻害により蓄積される DAG は、インスリン分泌に対して、軽度な蓄積では PKC の活性化を介してインスリン分泌を促進する一方、過剰な蓄積では PKC 非依存的に VDCC を阻害することでインスリン分泌を抑制するという、蓄積の程度に応じた二面性作用を有することが示された。さらに、2 型糖尿病の進行に伴う I 型 DGK の発現減少により DGK の機能が低下する結果、インスリン分泌能が障害され、糖尿病が増悪することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sawatani Toshiaki, Kaneko Yukiko K., Ishikawa Tomohisa	4. 巻 140
2. 論文標題 Dual effect of reduced type I diacylglycerol kinase activity on insulin secretion from MIN6 - cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 178 ~ 186
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2019.06.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Toshiaki Sawatani, Yukiko K. Kaneko, Isao Doutsu, Ai Ogawa, Tomohisa Ishikawa	4. 巻 316
2. 論文標題 TRPV2 channels mediate insulin secretion induced by cell swelling in mouse pancreatic -cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Physiol Cell Physiol	6. 最初と最後の頁 C434-C443
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpcell.00210.2017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sagara Hiroto, Kanakogi Masaki, Tara Yuki, Ouchi Hitoshi, Kimura Junko, Kaneko Yukiko, Inai Makoto, Asakawa Tomohiro, Ishikawa Tomohisa, Kan Toshiyuki	4. 巻 59
2. 論文標題 Concise synthesis of polymethoxyflavone sudachitin and its derivatives, and biological evaluations	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 1816 ~ 1818
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tetlet.2018.03.064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計31件（うち招待講演 5件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 金子雪子、澤谷俊明、石川智久
2. 発表標題 シンポジウム8 膵 細胞機能の新たなメッセンジャー：その生理と病態：Role of diacylglycerol kinase on the regulation of insulin secretion in pancreatic -cells.
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子雪子
2. 発表標題 Diacylglycerol kinase による 細胞分泌調節と増殖制御研究
3. 学会等名 Islet Biology ' 19 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子雪子、石川智久
2. 発表標題 創薬シンポジウム3 新たな視点からの治療を指向した糖尿病研究の新潮流 細胞内脂質シグナリングによる膵 細胞量の制御
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiaki Sawatani, Yukiko Kaneko, Tomohisa Ishikawa.
2. 発表標題 DAG accumulation due to type 1 DGK inhibition has a contradictory dual effect on Ca ²⁺ signaling in pancreatic β -cells.
3. 学会等名 American Diabetes Association Scientific Sessions 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshiaki Sawatani, Yukiko K. Kaneko, Tomohisa Ishikawa.
2. 発表標題 TRPV2 channels mediate cell swelling-induced insulin secretion in mouse pancreatic β -cells.
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshiaki Sawatani, Yukiko K. Kaneko and Tomohisa Ishikawa
2. 発表標題 Diacylglycerol accumulation due to type-1 diacylglycerol kinase dysfunction has a dual response on insulin secretion in pancreatic β -cells.
3. 学会等名 The 4th International Conference on Pharma and Food (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金子雪子、石川智久
2. 発表標題 Anti-diabetic effects of citrus flavonoids on pancreatic β -cell function.
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芹澤環、金子雪子、戸倉広貴、松浦朋哉、澤谷 俊明、石川智久
2. 発表標題 DGK 欠損による膵 細胞機能への影響の検討
3. 学会等名 第140回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤谷俊明、金子雪子、石川智久
2. 発表標題 膵 細胞におけるDGK および 機能抑制によるDAG蓄積は細胞内Ca ²⁺ 濃度に対して二面性を示す
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshiaki Sawatani, Yukiko Kaneko, Tomohisa Ishikawa
2. 発表標題 Inhibition of Type I DGK Leads to a Dual Response on Ca ²⁺ Signaling in Pancreatic β -Cells.
3. 学会等名 20th International Symposium on Calcium Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease (CaBP20) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	石川 智久 (ISHIKAWA TOMOHISA) (10201914)	静岡県立大学・薬学部・教授 (23803)	