

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16244

研究課題名(和文)代償性インスリン分泌能亢進におけるP2X7受容体の役割

研究課題名(英文) Investigation of P2X7 purinergic receptor role contributing to the compensatory insulin secretion

研究代表者

牧山 智彦 (Makiyama, Tomohiko)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：60733102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠期の母体ではインスリン抵抗性が引き起こされ、その代償として膵細胞はインスリン分泌を亢進させる。代償性インスリン分泌亢進機構は、膵細胞量増加と共に、個々の細胞からのインスリン分泌が重要であると考えられているが、代償性インスリン分泌亢進機構には不明な点が多い。本研究ではP2X7ノックアウトマウスを用いて、膵細胞より分泌されたATPがP2X7受容体シグナリングを介して代償性インスリン分泌を制御していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グルコース刺激に応じて分泌されるATPの受容体であるP2受容体は膵細胞に複数発現しており、ATP感受性の異なる多数のP2受容体がどのようにインスリン分泌を制御しているのか、その詳細は不明である。特に、正常時だけでなく、インスリン抵抗性状態でのP2受容体によるインスリン分泌調整についてはほとんど研究されていない。そのため、妊娠時や肥満状態における膵細胞におけるP2受容体によるインスリン分泌調整機構を解明することは社会的に重要である。また、妊娠糖尿病あるいは2型糖尿病に対する新規治療法の開発、創薬への展開が期待される点で社会的意義もある。

研究成果の概要(英文)：Several factors including hormones are known to be contributed to the insulin resistance in pregnancy. Accordingly, pancreatic beta cells increased insulin secretion, and beta cell mass and increased glucose stimulated insulin secretion are implicated in this mechanism. But, the exact mechanism of this increased insulin secretion remains unknown. In this study, we showed increased insulin secretion in pregnancy is regulated by ATP secreted from glucose stimulated beta cells P2X7 receptor signaling dependently.

研究分野：細胞生化学

キーワード：インスリン分泌 インスリン抵抗性 膵細胞 ATP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

妊娠期の母体ではホルモンバランスの変化によりインスリンが効きにくくなるインスリン抵抗性が引き起こされる。インスリン抵抗性が引き起こされると、その代償のため膵細胞はインスリン分泌を著しく亢進させることでインスリン抵抗性を代償している。この代償性インスリン分泌亢進機構には膵細胞量増加と共に、個々の細胞からのインスリン分泌亢進が重要であると考えられているが、代償性インスリン分泌亢進機構には未だ不明な点が多い。

#### 2. 研究の目的

膵細胞に存在する分泌顆粒内にはインスリン以外にも様々な分子が貯蔵されており、中でも ATP は自己/傍分泌作用により P2 受容体を介してインスリン分泌を制御していることが報告されている。また、妊娠期には細胞外 ATP 濃度が上昇することが、当該研究室を含む多くの研究成果から推測される。

以上のことから、ATP が自身の受容体である P2 受容体を介して妊娠期の代償性インスリン分泌亢進機構を制御していることが考えられる。本研究では、数ある P2 受容体の中でも、ATP 低感受性の P2X7 受容体に着目し、代償性インスリン分泌亢進機構における P2X7 受容体の役割を解明することが目的である。

#### 3. 研究の方法

マウス調製膵島を用いた P2X7 受容体の機能解析:野生型 (WT)、P2X7 受容体ノックアウトマウス (P2X7 KO マウス) から調製した膵島を用いて下記の実験を実施した。1)種々の薬物処置を行い、グルコース刺激応答性のインスリン分泌量を ELISA により測定した。2) インスリン分泌関連蛋白質の発現量を生化学的に解析した。3) 細胞外 ATP 分泌量を、Luciferase による発光を指標に、既知濃度の ATP を元に作成した検量線から算出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 妊娠期代償性インスリン分泌亢進機構における P2X7 受容体の関与確認

妊娠期代償性インスリン分泌亢進機構における P2X7 受容体の関与を明らかにするため、マウス調製膵島からのグルコース刺激応答性インスリン分泌への影響を検討した。P2X7 受容体阻害剤 (BBG, oxATP) は妊娠マウス調製膵島からのグルコース刺激応答性インスリン分泌 (% of total) のみを有意に抑制した。

##### (2) P2X7 KO マウスを用いた妊娠期代償性インスリン分泌量亢進に対する影響解析

WT 及び P2X7 KO マウス調製膵島を用いて、P2X7 KO マウス調製膵島では P2X7 受容体の発現が抑制されていることを Western blotting により確認した。インスリン分泌解析を行った結果、P2X7 KO 妊娠マウス調製膵島では、WT 妊娠マウス調製膵島と比較して、グルコース刺激応答性のインスリン分泌 (% of total insulin content) が有意に抑制されていた。一方で、それぞれのマウス調製膵島当たりのインスリン量 (insulin/islet) には大きな違いが見られなかった。

##### (3) P2X7 KO マウスを用いたインスリン分泌関連蛋白質の発現量解析

WT 及び P2X7 KO マウスより調製した膵島を用いてインスリン分泌関連蛋白質の発現量を Western blotting により解析した。WT 妊娠マウス調製膵島では、非妊娠マウス調製膵島と比較して、インスリン分泌関連蛋白質 (Syntaxin-1, -3, -4, SNAP-23, -25, VAMP2,

Glucokinase, GLUT2, Tubulin, Actin) の発現量に顕著な違いは見られなかった。また、P2X7 KO マウス調製膵島においても、非妊娠群及び妊娠群共に WT マウス調製膵島と比較し、上記の蛋白質発現量に大きな変化は見られなかった。一方で、細胞外 ATP 分解酵素である NTPDase3 の発現量は妊娠調製膵島において上昇していることが確認された。

#### (4) WT マウス調製膵島における細胞外 ATP 分泌量の測定

WT 及び P2X7 KO マウス調製膵島を用いて、グルコース刺激応答性の ATP 分泌量を Luciferase による発光を指標に測定した。WT 妊娠マウス調製膵島では、非妊娠マウス膵島と比較してグルコース刺激応答性の細胞外 ATP 分泌量が上昇していた。また、P2X7 KO 妊娠マウス調整膵島においても P2X7 KO 非妊娠マウス膵島に比べてグルコース応答性の細胞外 ATP 分泌量が上昇していた。WT 妊娠マウスと P2X7 KO 妊娠マウスの調製膵島間におけるグルコース刺激応答性の細胞外 ATP 分泌量に大きな違いは見られなかった。

以上の結果、妊娠期 P2X7 受容体シグナルは個々の細胞からのインスリン分泌能亢進により代償性インスリン分泌を亢進させることがわかった。P2X7 受容体は妊娠時に活性化される Htr3 受容体同様、非選択性のカチオンチャンネルであり、P2X7 受容体シグナルが Htr3a シグナルと同様の機構で調節しているのか、また異なる調節機構があるのかが妊娠期代償性インスリン分泌亢進機構を解明する上で重要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Aoyagi K, Itakura M, Fukutomi T, Nishiwaki C, Nakamichi Y, Torii S, Makiyama T, Harada A, Ohara-Imaizumi M	4. 巻 159
2. 論文標題 VAMP7 regulates autophagosome formation by supporting Atg9a functions in pancreatic beta-cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 3674-3688
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/en.2018-00447.	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 青柳 共太、西脇 知世乃、中道 洋子、福富 俊之、鳥居 征司、牧山 智彦、櫻井裕之、今泉 美佳
2. 発表標題 VAMP7 regulates autophagosome formation by supporting Atg9a functions in pancreatic beta-cells
3. 学会等名 第91回生化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 牧山 智彦、青柳 共太、中道 洋子、西脇 知世乃、小泉 修一、今泉 美佳
2. 発表標題 妊娠期膵 細胞でのP2X7受容体によるインスリン分泌亢進機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----