

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19755

研究課題名（和文）妊娠糖尿病発症メカニズムを基盤とした疾患モデルマウスの開発

研究課題名（英文）Development of disease model in mice on the basis of mechanisms for pathogenesis of gestational diabetes.

研究代表者

石川 智久（Ishikawa, Tomohisa）

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：10201914

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：マウス膵島において、メラトニンMT1及びMT2受容体、セロトニンからN-アセチルセロトニン（NAS）を生成するAANATの発現が認められたが、発現量の雌雄差は認められなかった。また、NASからメラトニンを生成するHIOMTの発現は検出されず、雌マウス妊娠期における発現も認められなかった。一方で、膵細胞でのAANATの発現が細胞内cAMPの上昇により増大することや、NASによりグルコース誘発インスリン分泌が抑制されることを確認した。以上の結果より、膵細胞においてcAMP依存的にNASが産生され、インスリン分泌を抑制することが示唆されたが、妊娠糖尿病との関連を支持する結果は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢体内時計の同調因子として知られる松果体ホルモン・メラトニンは、主に松果体でセロトニンからAANATとHIOMTという2つの酵素を介して生成される。我々は、マウス膵島にAANATが発現していることを見出し、さらにセロトニンが妊娠中期に特異的に生成されることに着目して、膵細胞におけるメラトニン関連シグナルが、発症機序が未だに不明な妊娠糖尿病と関連する可能性を考えた。残念ながら、メラトニン関連シグナルの妊娠糖尿病への関与を示す結果は得られなかったが、メラトニン産生の中途物質であるNASが膵細胞で産生されてインスリン分泌調節に関与する可能性を示し、新たなインスリン分泌調節機構を提唱した。

研究成果の概要（英文）： In mouse pancreatic islets, the expression of melatonin MT1 and MT2 receptors and AANAT, an enzyme that catalyzes production of N-acetylserotonin (NAS) from serotonin, was detected, although sexual differences were not observed in the levels of expression. The expression of HIOMT, an enzyme that catalyzes production of melatonin from NAS, was not detected in mouse pancreatic islets even in female gestation period. We also found that the expression of AANAT in pancreatic cells was increased by the adenylate cyclase activator forskolin and that NAS suppresses glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) via suppressing intracellular Ca<sup>2+</sup> elevation.

In summary, the results obtained here suggest that NAS is produced in pancreatic cells in a cAMP-dependent manner and plays a role as a suppressor in GSIS; however, the evidence supporting the involvement of melatonin-related signaling in gestational diabetes has not been obtained.

研究分野：薬理学

キーワード：糖尿病 細胞 メラトニン

## 1. 研究開始当初の背景

膵細胞では、妊娠期に分泌されるプロラクチンにより tryptophan hydroxylase (TPH) の発現が亢進し、セロトニンが生成される。セロトニンはインスリン顆粒に取り込まれてインスリンと共に分泌され、5-HT<sub>3</sub> 受容体を介してインスリン分泌を促進し、5-HT<sub>2b</sub> 受容体を介して膵β細胞量を増加させることが報告されている。これらの作用は、妊娠期でのインスリン抵抗性状態を代償するものと考えられている。一方で、セロトニンから生成されるメラトニンがインスリン分泌抑制作用を示すことや膵β細胞にメラトニン受容体が発現していることも報告されており、我々もこれらを確認した。ただし、膵β細胞におけるメラトニン受容体を介したインスリン分泌調節は概日リズムとの関連が着目されたものであり、松果体ホルモンとしてのメラトニンの作用を想定していた。興味深いことに、我々は松果体でのメラトニン産生が認められない C57BL6/J マウスの膵島でもメラトニン受容体が発現していることを見出し、セロトニンと同様に、メラトニンが膵β細胞で生成されて分泌される可能性について検討した。その結果、雄性 C57BL6/J マウスの膵β細胞には、セロトニンから *N*-アセチルセロトニン (NAS) を生成する arylalkylamine *N*-acetyltransferase (AANAT) は発現していること、しかし NAS からメラトニンを生成する hydroxyindole-*O*-methyltransferase (HIOMT) は発現していないことを見出した。NAS は、メラトニンよりも親和性は低いものの、メラトニン受容体刺激作用を有することが報告されていたことから、膵β細胞ではメラトニンではなく、NAS が産生されてメラトニン受容体アゴニストとして作用している可能性が予想された。一方で、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) により、妊娠糖尿病の疾患遺伝子関連領域として、メラトニン MT<sub>2</sub> 受容体遺伝子 MTNR1B の変異が報告された。MTNR1B 遺伝子の変異は MT<sub>2</sub> 受容体の発現上昇をもたらす。MT<sub>2</sub> 受容体刺激は、セロトニンによる 5-HT<sub>3</sub> 受容体刺激とは逆に、インスリン分泌抑制効果をもたらす。そこで我々は、膵細胞において妊娠時特異的に産生されるセロトニンとその代謝系であるメラトニン関連シグナルに着目し、メラトニン関連シグナルの変化によりセロトニンと NAS のバランスが崩れると妊娠糖尿病に至るのではないかとという仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

本研究では、雄性、雌性、妊娠マウスの膵細胞におけるメラトニン関連シグナルを検討することで、その膵細胞における生理的意義を確立すること、およびメラトニン関連シグナルの変化と妊娠時の糖尿病発症との関係を検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

- (1) 膵細胞におけるメラトニン関連シグナルの解析：8-10 週齢の雄性及び雌性 C3H/He マウス、妊娠各期の雌性 C3H/He マウスから膵島を単離し、メラトニン関連シグナル分子である AANAT、HIOMT、メラトニン MT1 受容体、MT2 受容体の発現を western blotting により解析した。
- (2) 膵β細胞における AANAT の発現調節の解析：INS-1 細胞における AANAT の発現調節について RealTime-qPCR および western blot により解析した。
- (3) 膵β細胞における NAS のグルコース誘発インスリン分泌に対する作用の解析：雄性及び雌性 C3H/He マウスの単離膵島及び INS-1 細胞におけるグルコース誘発インスリン分泌に対するメラトニン及び NAS の効果を検討した。
- (4) 膵β細胞において生成される NAS の定量：INS-1 細胞を 各種刺激条件下で 14 時間培養した後サンプル回収を行なった。回収したサンプルをソニケーションし、0.2 μm メンブレンフィルターでろ過したる液を HPLC 用サンプルとし、HPLC で NAS を定量した。

### 4. 研究成果

8 - 10 週齢の雄性、雌性 C3H/He マウスの単離膵島において、MT1、MT2 受容体、AANAT の発現が認められたものの、HIOMT の発現は認められなかった。また、妊娠雌性 C3H/He マウスの単離膵島における HIOMT の発現についても検討を行ったが、妊娠期を通して HIOMT の発現は認められなかった。以上の結果から、膵島においてメラトニンは産生されないが、メラトニン前駆体である NAS が産生されていることが示唆された。NAS が MT1、MT2 受容体に親和性があるという報告から、膵β細胞で NAS の合成が行われ、膵β細胞において MT1、MT2 受容体のリガンドとして機能する可能性が示された。また、C3H/He 膵島におけるメラトニン関連分子の発現量に雌雄差は認められなかったが、MT1、MT2 受容体の発現について、雌雄の両方で MT1 受容体発現が MT2 受容体発現量よりも高かった。

膵β細胞において NAS が MT1、MT2 受容体のリガンドとして機能する可能性が示されことから、C57BL/6J マウス単離膵島およびβ細胞株 INS-1 細胞を用いて、NAS が細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 変化及びインスリン分泌に及ぼす効果について解析を行った。16.7 mM グルコース刺激により発生する  $[Ca^{2+}]_i$  オシレーションに対して、NAS は濃度依存的な抑制効果を示した。グルコース誘発インスリン分泌も 30 μM NAS 処置により有意に抑制された。NAS のこれらの作用は、非選択的メラトニン受容体阻害薬である luzindole により抑制され

たが、MT2 受容体選択的阻害薬 4-P-PDOT では luzindole ほどの抑制は認められなかった。これらの機能解析の結果、および前項で示した膵島に主に発現しているメラトニン受容体は MT1 受容体であるという結果から、膵  $\beta$  細胞において、NAS は主にメラトニン MT1 受容体を介してインスリン分泌を抑制することが示唆された。しかしながら、NAS による単離膵島からのインスリン分泌抑制作用に雌雄差は認められなかった。さらに、メラトニンの作用も検討したが、やはりインスリン分泌抑制作用に雌雄差は認められなかった。

次に、膵  $\beta$  細胞における NAS の合成を検討するため、HPLC を用いて INS-1 細胞中の NAS を定量した。しかし、種々の培養条件で検討したものの、INS-1 細胞中の NAS を検出することはできなかった。500  $\mu$ M セロトニン存在下においても、INS-1 細胞中に NAS を検出することはできなかった。そこで、NAS の前駆物質であるセロトニンを培養液に添加してみたが、それでも NAS は検出できなかった。すなわち、NAS が INS-1 細胞で生成されていることを支持する結果は得られなかった。

$\beta$  細胞における NAS 産生酵素である AANAT の発現は確認しているため、NAS 産生のためには何らかの刺激が必要であると考え、種々の刺激条件下における AANAT の発現変化について検討した。そこで、AANAT 発現調節への cAMP の関与について検討するために、アデニル酸シクラーゼ活性化薬である forskolin 存在下での AANAT 発現について解析した。その結果、forskolin 14 時間処置により AANAT の発現が有意に増加することが示された。すなわち、膵  $\beta$  細胞内に存在する NAS 合成酵素の AANAT は、細胞内 cAMP レベルの上昇により発現が増加することが示唆された。しかしながら、HPLC を用いた INS-1 細胞の培養上清中の NAS の検出は、forskolin 存在下でも認められなかった。膵  $\beta$  細胞において NAS が生成されるためには、他の、あるいは複数の条件が必要である可能性が考えられ、さらなる検討の必要が生じた。

本研究では、マウス膵島に AANAT が発現していることを見出し、さらにセロトニンが妊娠中期に特異的に生成されることに着目して、膵  $\beta$  細胞におけるメラトニン関連シグナルが、発症機序が未だに不明な妊娠糖尿病と関連する可能性を考えた。そして、メラトニン産生の中途物質である NAS が膵  $\beta$  細胞で産生されてインスリン分泌調節に関与する可能性を示し、新たなインスリン分泌調節機構を提唱した。しかし、膵  $\beta$  細胞におけるメラトニン関連シグナルのいずれにも雌雄差は認められなかった。妊娠期雌マウスでの検討は、まだ十分な結果が得られていないが、これまでのところ、明らかな違いは見出せていない。また、膵  $\beta$  細胞において NAS が生成されることを直接証明することができていない。メラトニン関

連シグナルの雌雄差や妊娠期における変化が認められなかったことから、本研究の最終目標である、妊娠期にメラトニン関連シグナルが亢進することで、インスリン分泌が低下し、妊娠糖尿病の一因となる、という仮説を証明するためには、さらなる条件を見出すことが必要である。今後は、性ホルモンの影響等を解析している予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Sawatani Toshiaki, Kaneko Yukiko K., Doutsu Isao, Ogawa Ai, Ishikawa Tomohisa   | 4. 巻<br>316               |
| 2. 論文標題<br>TRPV2 channels mediate insulin secretion induced by cell swelling in mouse pancreatic $\beta$ -cells   | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>American Journal of Physiology-Cell Physiology  | 6. 最初と最後の頁<br>C434 ~ C443 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1152/ajpcell.00210.2017  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Sawatani Toshiaki, Kaneko Yukiko K., Ishikawa Tomohisa  | 4. 巻<br>140               |
| 2. 論文標題<br>Dual effect of reduced type I diacylglycerol kinase activity on insulin secretion from MIN6 $\beta$ -cells   | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Pharmacological Sciences   | 6. 最初と最後の頁<br>178 ~ 186   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.jphs.2019.06.001  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Sato Taiji, Ishiwatari Chihiro, Kaneko Yukiko K., Ishikawa Yoko, Kimura Yuki, Watanabe Naoya, Aoshima Ikumi, Matsuda Yukari, Nakayama Takahiro, Chiba Rina, Fujinuki Takahiro, Iwata Kai, Lu Qiang, Usuki Takako, Sakane Fumio, Ishikawa Tomohisa                   | 4. 巻<br>35                |
| 2. 論文標題<br>Diacylglycerol kinase $\beta$ functions as a proliferation suppressor in pancreatic $\beta$ cells  | 5. 発行年<br>2021年           |
| 3. 雑誌名<br>The FASEB Journal   | 6. 最初と最後の頁<br>-           |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1096/fj.202001279RR  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Minami Akira, Fujita Yuka, Shimba Sumika, Shiratori Mako, Kaneko Yukiko K., Sawatani Toshiaki, Otsubo Tadamune, Ikeda Kiyoshi, Kanazawa Hiroaki, Mikami Yasuyo, Sekita Risa, Kurebayashi Yuuki, Takahashi Tadanobu, Miyagi Taeko, Ishikawa Tomohisa, Suzuki Takashi | 4. 巻<br>10                |
| 2. 論文標題<br>The sialidase inhibitor 2,3-dehydro-2-deoxy-N-acetylneuraminic acid is a glucose-dependent potentiator of insulin secretion  | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>-           |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-020-62203-8  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-                 |

〔学会発表〕 計35件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 6件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>金子雪子、石川智久                              |
| 2. 発表標題<br>膵 細胞脂質代謝分子によるインスリン分泌制御および2型糖尿病病態形成への関与 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第141年会（招待講演）                      |
| 4. 発表年<br>2021年                                   |

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>金子雪子、澤谷俊明、石川智久            |
| 2. 発表標題<br>膵 細胞機能の新たなメッセンジャー：その生理と病態 |
| 3. 学会等名<br>第62回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）   |
| 4. 発表年<br>2019年                      |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>金子雪子、石川智久                                       |
| 2. 発表標題<br>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<br>生体機能と創薬シンポジウム2019（招待講演）                         |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Tomohisa Ishikawa, Yukiko Kaneko  |
| 2. 発表標題<br>Diacylglycerol kinase: an intracellular regulator of insulin secretion from pancreatic $\beta$ -cells |
| 3. 学会等名<br>KKU and University of Shizuoka joint symposium on medical and pharmaceutical sciences（招待講演）（国際学会）     |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>金子雪子、石川智久                   |
| 2. 発表標題<br>膵 細胞機能に対するノビレチンの抗糖尿病活性効果の検討 |
| 3. 学会等名<br>第3回ノビレチン研究会                 |
| 4. 発表年<br>2019年                        |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Toshiaki Sawatani, Yukiko Kaneko, Tomohisa Ishikawa   |
| 2. 発表標題<br>DAG accumulation due to type 1 DGK inhibition has contradictory dual effect on Ca <sup>2+</sup> signaling in pancreatic cells |
| 3. 学会等名<br>American Diabetes Association 78th Scientific Sessions (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yukiko Y Kaneko, Misaki Sano, Ami Morioka, Masato Nojiri, Nahoko Kasahara, Tomohisa Ishikawa |
| 2. 発表標題<br>Modulation of DDAH/ADMA/NOS pathway in pancreatic $\beta$ -cells under diabetic condition.   |
| 3. 学会等名<br>18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)                                |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Toshiaki Sawatani, Yukiko Kaneko, Isao Doutsu, Ai Ogawa, Tomohisa Ishikawa                        |
| 2. 発表標題<br>TRPV2 channels mediate cell swelling-induced insulin secretion in mouse pancreatic $\beta$ cells. |
| 3. 学会等名<br>18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)                                     |
| 4. 発表年<br>2018年  |



|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>八木雄也、金子雪子、鴨志田ありさ、石川智久               |
| 2. 発表標題<br>臍 細胞におけるメラトニンシグナリング関連分子の発現および機能解析   |
| 3. 学会等名<br>日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2018 |
| 4. 発表年<br>2018年                                |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|               | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                       | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                | 備考 |
|---------------|---|--------------------------------------|----|
| 研究<br>分担<br>者 | 金子 雪子<br><br>(Kaneko Yuki ko)<br><br>(00381038) | 静岡県立大学・薬学部・講師<br><br><br><br>(23803) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

|         |         |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|