

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08994

研究課題名（和文）糖尿病によるアミノ酸応答性グルカゴン分泌障害機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of amino acid-responsive glucagon secretion in diabetes

研究代表者

小林 雅樹（Kobayashi, Masaki）

群馬大学・生体調節研究所・講師

研究者番号：80373041

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：2型糖尿病では食後の高グルカゴン血症が認められる。我々は糖尿病モデルマウスの単離膵島において分岐鎖アミノ酸（BCAA）応答性のグルカゴン分泌が亢進するとともに、BCAA代謝抑制酵素の遺伝子発現が増加しBCAA代謝産物含量が低下することを明らかにした。糖尿病モデルマウスの膵島においてBCAA代謝抑制酵素を阻害することで、BCAA応答性のグルカゴン分泌亢進は抑えられた。糖尿病モデルマウスの膵島におけるBCAAの代謝障害が、BCAAによるグルカゴン過剰分泌に関与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

糖尿病におけるグルカゴン分泌異常について、アミノ酸に対する分泌応答というこれまでにない視点からの研究である。将来的に、膵細胞を標的とした新しい糖尿病治療法の開発という臨床への応用につながる可能性がある。

近年、食事療法として糖質制限が注目されているが、糖尿病患者において糖質や脂質を抑えるための安易なたんぱく質摂取増加させることは、グルカゴン分泌亢進を介した血糖コントロール不良につながる可能性もあり、本研究課題の成果は糖尿病患者に対する食事療法などにおいても重要な知見を与えると期待される。

研究成果の概要（英文）：Postprandial hyperglucagonemia is observed in type 2 diabetes. In isolated pancreatic islets from diabetic mice, we found that branched-chain amino acid (BCAA)-induced glucagon hypersecretion was enhanced. We also found that the expression levels of BCAA catabolism-related enzymes and their metabolite contents were altered in diabetic islets. Furthermore, BT2, inhibitor of BCAA catabolism-related enzyme BCKDK, suppressed BCAA-induced hypersecretion of glucagon in diabetic islets. Taken together, postprandial hypersecretion of glucagon in the diabetic state is attributable to disordered BCAA catabolism in pancreatic islet cells.

研究分野：糖尿病

キーワード：グルカゴン 細胞 膵臓 糖尿病 アミノ酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病においては食後のインスリン分泌低下に加え、グルカゴン過剰分泌も生じることが知られていた。過剰なグルカゴンは肝臓での糖新生を亢進させ、食後高血糖を増悪させる。近年、糖尿病におけるグルカゴンの重要性が認識されつつあり、糖尿病基礎研究ならびに糖尿病実臨床においてグルカゴンが再注目されていた。しかし、膵細胞研究 (グルカゴン分泌研究) は膵細胞研究 (インスリン分泌研究) に比べ大きく遅れていた。その原因として、以下の原因が考えられた。

「グルカゴン測定系の問題」: 抗体を用いたグルカゴンイムノアッセイの精度が低く、グルカゴンの正確な測定が行われていなかった。

「膵細胞モデルの問題」: 膵ランゲルハンス島における膵細胞の割合は 10~20%と少なく、単離も難しい。グルカゴン分泌調節の研究に適した膵細胞株もないため、グルカゴンの分泌調節機構について細胞レベルでの研究が困難であった。

そこで申請者はグルカゴン測定系の問題を解決するため、イムノアッセイに代わる高精度な測定系として質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いたグルカゴン測定系を開発した (Miyachi, Kobayashi et al. Anal Bioanal Chem 2017)。これにより正確なグルカゴン測定が可能となったため、糖尿病における血中グルカゴン変動についての再検証を行い、その結果、糖尿病マウスはたんぱく質の経口投与によりグルカゴン過剰分泌が生じることを見出した。そのため、糖尿病においては、食事中的たんぱく質に由来するアミノ酸に対する膵細胞のグルカゴン分泌応答が障害されている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

アミノ酸応答性のグルカゴン分泌が糖尿病により障害されるメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1)糖尿病マウスの単離ランゲルハンス島におけるアミノ酸応答性グルカゴン分泌障害の解析
糖尿病マウス (*db/db* マウス、高脂肪食飼育 + 低用量ストロプトゾトシン投与マウスなど) より単離した膵ランゲルハンス島に各種アミノ酸刺激を行い、グルカゴン分泌変化を測定する。生理的な濃度でグルカゴンの分泌亢進を引き起こすアミノ酸を明らかにするとともに、糖尿病マウスのアミノ酸刺激によるグルカゴン過剰分泌の原因が膵外因子によるものではなく、膵ランゲルハンス島に存在することを検証する。

(2)新しい膵細胞株の樹立

温度感受性突然変異 SV40 ラージ T 抗原 (tsSV40T) 遺伝子を導入したラットの細胞は、培養温度を変化させることで tsSV40T 作用を通じて細胞の増殖と分化を制御することが出来る (図 2 参照)。tsSV40T 遺伝子導入ラットの膵ランゲルハンス島を分散培養し、グルカゴン分泌を指標として細胞をクローニングする。その後、細胞の分化誘導後における電子顕微鏡での形態観察、膵細胞の分化や機能に関連する遺伝子 (Arx, Pax6, MafB など) のリアルタイム PCR による発現解析などのデータを基に、新たな膵細胞株を樹立する

(3)アミノ酸によるグルカゴン分泌調節の糖尿病による障害メカニズムの解析

新たに樹立した膵細胞株の分化誘導に、慢性的な高グルコースや糖尿病動物由来の血清添加培地での培養を組み合わせ、アミノ酸刺激によりグルカゴン分泌亢進を呈する糖尿病病態下の膵細胞モデルを作製する。アミノ酸刺激前後の細胞内の変化について網羅的なオミクス解析を行い、アミノ酸刺激によるグルカゴン分泌調節に関わる細胞内シグナル経路を探索する。候補となるシグナル経路を外因的に操作 (関連遺伝子の強制発現やノックダウン、作動薬や阻害剤処理など) した際のグルカゴン分泌への影響を解析する。これらの結果を統合し、アミノ酸によるグルカゴン分泌調節の糖尿病による障害メカニズムを明らかにする

4. 研究成果

糖尿病モデルマウスで各種栄養素 (糖、たんぱく質、脂質) 投与後の血中グルカゴン濃度を測定したところ、たんぱく質投与によりグルカゴン分泌亢進が確認された。次にアミノ酸溶液投与を行った結果、分岐鎖アミノ酸 (BCAA) の投与によってグルカゴン分泌亢進が起きることを確認した。

糖尿病において BCAA 投与後に高グルカゴン血症となる機序を解明するため、糖尿病モデルマウスから単離した膵島に対し BCAA 刺激を行ったところ、単離膵島においても BCAA 刺激により

膵 細胞へのカルシウムイオンの流入が増加すると共に、グルカゴン過分泌が認められた。このグルカゴン過分泌は BCAA 輸送体の阻害により抑制された。これらの結果より、糖尿病モデルマウスの BCAA 刺激によるグルカゴン過分泌は膵島の機能障害に起因していると考えられた。

糖尿病モデルマウス膵島の遺伝子発現量を解析し、BCAA 代謝促進酵素である BCAT2 の遺伝子発現の減少、および BCAA 代謝抑制酵素である BCKDK の遺伝子発現増加を確認した。膵島の BCAA 代謝産物を調べると、BCAA 異化で産生される分岐鎖ケト酸や分岐鎖アシル CoA の含量は減少していた。BCKDK 阻害剤である BT2 を糖尿病モデルマウス膵島に添加したうえで、BCAA 刺激を行ったところ、グルカゴンの過分泌は改善された。これらのことより、糖尿病モデルマウス膵島では BCAA の代謝異常が生じ、グルカゴン過分泌に関与していると考えられた。

本研究課題では、糖尿病によりアミノ酸 答性のグルカゴン分泌が障害されるメカニズムを細胞レベルで明らかにするため、温度感受性突然 異 SV40 ラージ T 抗原 (tsSV40T) 遺伝子を導入したラットの膵島より、培養温度の変化による tsSV40T 作用の制御を通じて細胞の増殖と分化を制御することが可能な、新しい膵 細胞株の樹立を目指した。培養中の膵島細胞において tsSV40T の発現が確認された。しかし、有意な膵島細胞の増殖が確認できなかった。その後、培養液中に 細胞増殖を刺激する L-グルタミンを添加する等の条件検討を行ったが、有意な細胞増殖の確認には至らなかった。

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 Wada Eri, Kobayashi Masaki, Kohno Daisuke, Kikuchi Osamu, Suga Takayoshi, Matsui Sho, Yokota-Hashimoto Hiromi, Honzawa Norikiyo, Ikeuchi Yuichi, Tsuneoka Haruka, Hirano Touko, Obinata Hideru, Sasaki Tsutomu, Kitamura Tadahiro	4. 巻 97
2. 論文標題 Disordered branched chain amino acid catabolism in pancreatic islets is associated with postprandial hypersecretion of glucagon in diabetic mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Nutritional Biochemistry	6. 最初と最後の頁 108811 ~ 108811
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jnutbio.2021.108811	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 和田恵梨, 小林雅樹, 河野大輔, 菊池司, 北村忠弘
2. 発表標題 分岐鎖アミノ酸によるグルカゴン分泌機序と糖尿病病態での破綻機序の解明
3. 学会等名 第63 回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 和田恵梨, 小林雅樹, 河野大輔, 菊池司, 須賀孝慶, 松居翔, 佐々木努, 北村忠弘
2. 発表標題 糖尿病病態での分岐鎖アミノ酸に対するグルカゴン分泌応答障害の検証
3. 学会等名 第62 回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 糖尿病病態における分岐鎖アミノ酸負荷時のグルカゴン分泌応答機序の解明
2. 発表標題 和田恵梨, 小林雅樹, 河野大輔, 菊池司, 北村忠弘
3. 学会等名 日本アミノ酸学会第13 回学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

群馬大学生体調節研究所代謝シグナル解析分野
<https://taisha.imcr.gunma-u.ac.jp/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------