

自己評価報告書

平成23年 5月17日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20390260

研究課題名(和文) イメージング手法を用いた糖尿病における開口放出不全機構の解明

研究課題名(英文) Investigation concerning about the mechanism of impaired insulin exocytosis in diabetes mellitus by imaging techniques.

研究代表者

永松 信哉 (NAGAMATSU SHINYA)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：80231489

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：糖尿病 TIRF 1分子イメージング インスリン分泌 開口放出

1. 研究計画の概要

1800万人を超える日本人糖尿病患者(潜在患者を含む)における糖尿病の主因は、インスリン分泌障害であるが、その成因はまだ不明である。糖尿病は、動脈硬化症を強力に促進する主要因子であるためその解明は急務の課題であるが、現状では膵β細胞からのインスリン開口放出の分子機構すら明らかになっていない。

(1)インスリン開口放出機構の本体を明にかする;私達の研究グループは、生きた膵β細胞における単一インスリン顆粒の動態を時間的・空間的に分析するイメージング手法を確立しており、この手法を innovationすると共に、開口放出に関わる key protein を同定することにより、開口放出の本体を明らかにしたい。

(2)糖尿病におけるインスリン開口放出不全機構の解明;上述した1)の成果を、遺伝子操作により作製した遺伝子改変マウスと組み合わせることにより、開口放出システムのどの部位が機能不全に陥っているかを解明する。

2. 研究の進捗状況

(1)インスリン分泌は、グルコース刺激にて2相性に分泌されているが、PI3K 阻害剤は2相目の分泌を著明に増加させる。従って、PI3K 下流のシグナル分子の何れかが2相目の分泌を支配している可能性があるとの仮説の元に Akt 等のいくつかの分子の dominant-negative 等の Adenovirus の作製により、特定分子の同定を進めている。具体的には、PI3K 遺伝子欠損マウスの膵β細胞を用いた解析を行うことにより、PI3K 及

びその下流分子が、分泌第2相を規定していることを明らかにした。現在 Akt 依存的な newcomer 顆粒の分泌制御機構に関わる分子の同定を行っている。101個ある Akt 基質の中から18個の小胞輸送関連分子、5つの細胞骨格制御分子、30個の細胞内情報伝達に関わる分子の siRNA、及び dominant-negative 又は dominant-active 変異体を作製、これらを neppa-gene システムを用いて、primary 膵β細胞に導入後、インスリン分泌を TIRF 解析、並びに perfusion 解析を行って検討中である。

(2)ゲノムワイド関連解析(GWAS)により糖尿病発症遺伝子が同定され、その中で CDKAL-1 遺伝子に焦点をあて、そのノックアウトマウスの作製、並びに本マウスのインスリン開口放出不全機構を検討した。我々のイメージング手法を用いることにより、インスリン顆粒の膜への結合からの放出機構が障害されていることが解明されたばかりでなく、CDKAL1 の欠損が、細胞内の ATP 産生能に大きく影響を与えていることも明らかとなった。

3. 現在までの達成度

<区分>

③ やや遅れている。

<理由>

(1)インスリン開口放出の本体を解明するために、現有技術を innovationすると共に、新たな開口放出 key 分子を同定する作業は地道な研究を続ける必要があり、必ずしも期待する結果は得られていない。特に、PI3K の下流分子は100程度有り、この中から key 分子を同定するためには、一つ一つつぶし

ていくローラー作戦と共に、別の観点からの作戦をも練らなければならないかもしれない。

(2)糖尿病におけるインスリン分泌不全機構の解明において難しい点は、単一の遺伝子の変異だけでは思ったほどの効果がでないことにある。今回のCDKAL1は幸運なことに、KOマウスにおいて耐糖能異常がみられ、又、docking/fusionの過程の異常も検出できた。今後は、新たな別の遺伝子のKO等を組み合わせた解析が必要と思われる。

4. 今後の研究の推進方策

上述3において述べたように、技術改革は今後も地道な研究を続け、KOマウスを用いた解法方法では、double KO等の方策が必要である。

5. 代表的な研究成果

〔雑誌論文〕(計9件)

①Ohara-Imaizumi M., Yoshida M, Aoyagi K, Saito T, Okamura T, Takenaka H, Akimoto Y, Nakamichi, Takanashi-Yanobu R, Nishiwaki C, Kawakami H, Kato N, Hisanaga S, Kakei M, and Nagamatsu S. Department of Gene Diagnostics and Therapeutics, Research Institute, National Center for Global Health and Medicine, Tokyo, Japan, Deletion of CDKAL1 Affects First-phase Glucose-stimulated Insulin Exocytosis *PLoS ONE* 5, e15553 (2010) (査読有)

②Ohara-Imaizumi M, Aoyagi K, Akimoto Y, Nakamichi Y, Nishiwaki C, Kawakami H, Nagamatsu S: Imaging exocytosis of single glucagon-like peptide-1 containing granules in a murine enteroendocrine cell line with total internal reflection fluorescent microscopy. *Biochem Biophys Res Commun.* Dec 4;390(1):16-20. 2009 (査読有)

③Ohara-Imaizumi M, Aoyagi K, Nakamichi Y, Nishiwaki C, Sakurai T, Nagamatsu S. Pattern of rise in subplasma membrane Ca²⁺ concentration determines type of fusing insulin granules in pancreatic beta cells. *Biochem Biophys Res Commun.* Jul 31;385(3):291-5. 2009 (査読有)

④Akimoto Y, Sawada H, Ohara-Imaizumi M, Nagamatsu S, Kawakami H (2008). Change in long-spacing collagen in descemet's membrane of diabetic Goto-Kakizaki rats and its suppression by antidiabetic agents. *Exp Diabetes Res* 2008: 818341 (査読有)

⑤Okamoto M, Ohara-Imaizumi M, Kubota N, Hashimoto S, Eto K, Kanno T, Kubota T,

Wakui M, Nagai R, Noda M, Nagamatsu S, Kadowaki T (2008). Adiponectin induces insulin secretion in vitro and in vivo at a low glucose concentration. *Diabetologia* 51: 827-35. (査読有)

〔学会発表〕(計13件)

①青柳共太、今泉美佳、西脇知世乃、中道洋子、永松信哉 ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼによるインスリン分泌制御機構の可視化解析. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会、岡山、2010年5月27日-29日

②永松信哉; ホルモン分泌動態の可視化. 日本臨床分子医学会学術総会、東京、2009年4月10-11日

③今泉美佳, 青柳共太, 中道洋子, 西脇知世乃, 永松信哉: 分泌第2相インスリン開口放出におけるアクチン細胞骨格の調節機構. 第52回日本糖尿病学会年次学術集会、大阪、2009年5月21日-24日

④今泉美佳, 永松信哉 :インスリン顆粒の細胞内 trafficking. 第43回糖尿病学の進歩 松本、2月20-21日 2009

⑤永松信哉, 今泉美佳 (シンポジウム): インスリン分泌機構はどこまで解明されたのか (シンポジウム-20) 第51回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、5月22-24日、2008

〔図書〕(計5件)

①青柳共太¹、永松信哉¹ (¹杏林大・医・生化学) インスリン分泌における開口放出機構 糖尿病ナビゲーター 第2版 メディカルレビュー社 東京 p52-53.

②今泉美佳, 永松信哉 (杏林大・医・生化学): インスリン顆粒の細胞内 trafficking (β細胞研究の最前線) 糖尿病学の進歩 2009、(社)日本糖尿病学会編、診断と治療社、東京、pp20-24, 2009

③青柳共太 & 永松信哉. インスリン分泌機構-エバネッセント顕微鏡で見えるもの. *Diabetes J.* 36, 85-93 (2008).

④Nagamatsu S & Ohara-Imaizumi M. Imaging Exocytosis of Single Insulin Secretory Granules With TIRF Microscopy. *Methods in Mol Biol* 440 259-268. 2008