

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08537

研究課題名(和文) 糖尿病膵 細胞糖代謝変換における一次繊毛ヘッジホッグシグナルの重要性

研究課題名(英文) Importance of primary cilia Hedgehog signaling in glucose metabolism of diabetic beta cells

研究代表者

向 英里 (Mukai, Eri)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：60362539

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)：本研究では、Hhシグナルの膵 細胞における糖尿病でのグルコース代謝異常に対する関与およびその分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。グルコース刺激によるインスリン分泌はHhシグナル刺激薬の中でPartial agonistであるCyclopamineでのみ有意に増強された。さらに、CyclopamineはミトコンドリアにおけるATP産生を増加させることでインスリン分泌を増強することが示された。また、Smoothed, Gpr161、AMPK非依存性の未知のcanonical signaling因子がインスリン分泌に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Hhシグナルはこれまで他の臓器と同様に膵臓の発生・分化に関与することは示されているが、成熟膵 細胞における機能やグルコース代謝への関与は検討されていない。それどころか、膵 細胞における一次繊毛シグナルと糖代謝との関係を明らかにする検討はなされておらず、これまでになかった発想であることから学術的独自性が高い。この糖尿病における代謝のスイッチングメカニズムが明らかにされれば、糖尿病の膵 細胞障害の理解において画期的な研究発展となり得る。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the involvement of Hh signaling in glucose metabolism abnormalities in diabetes mellitus and its molecular mechanism.

Glucose-stimulated insulin secretion was significantly enhanced only by cyclopamine, which is a partial agonist among Hh signaling stimulants. Furthermore, it was shown that enhanced insulin secretion by cyclopamine is attributed to increasing mitochondrial ATP production. It was also suggested that Smoothed, Gpr161, and unknown canonical signaling factors independent of AMPK may be involved in insulin secretion.

研究分野：糖尿病学

キーワード：インスリン分泌 糖尿病 一次繊毛 ヘッジホッグシグナル 細胞

## 1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病におけるインスリン分泌不全ではグルコースに対する分泌が選択的に低下している。膵細胞に取り込まれたグルコースは解糖系やTCAサイクルを経てATPを産生するが、このATP産生がインスリン分泌機構において主要な役割を果たしており、糖尿病ではATP産生低下によるインスリン分泌不全が認められる。申請者らは糖尿病の膵細胞において、グルコース刺激によるROS産生が増加していることでATP産生が低下すること、それにはSrcの活性化が関与していることを明らかにした(Diabetologia 2008, Diabetes 2011)。しかし、なぜ糖尿病状態でSrcが活性化しているかは不明である。また一方で、酸化ストレス下にある糖尿病の慢性状態では、Hif1発現上昇による乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)の増加により、乳酸産生が亢進していることを明らかにした(Diabetes 2013)。これは、糖尿病の膵細胞グルコース代謝において、がん細胞でみられるようなWarburg効果が生じていることを初めて示したものであり、慢性的な酸化ストレス下ではグルコース代謝の変換すなわちスイッチングが起こると考えられる。

細胞膜に存在するアンテナのような突起部分である一次繊毛は細胞外シグナルを感知するセンサーとして機能し、細胞内への情報伝達において重要な役割を果たすことが示されている。以前より、一次繊毛関連因子の遺伝子異常は繊毛病を引き起こすことが知られており、バルデー・ピードル症候群(BBS)やアルストレム症候群(ALMS)は糖尿病などの代謝疾患を呈する。近年になり、一次繊毛構造因子Bbs4やIft88を欠損したマウスではインスリン分泌が減少することや、糖尿病GKラットにおける一次繊毛の数の減少や一次繊毛関連遺伝子発現の異常などが示されている(Nat Commun 2014, Nat Commun 2019)。また、糖尿病になりやすいマウスとなりにくいマウス間でのdifferentially expressed geneは1048あり、そのうち327は一次繊毛関連遺伝子であること、297のヒトオマウスとの両方で糖尿病による遺伝子発現変化があったものは81あったことも報告されている(Cell Rep 2019)。このように、一次繊毛と糖尿病発症との関係に関する報告はなされてきているが、その機能不全の分子メカニズムは不明である。

一次繊毛におけるHhシグナルは胚発生における細胞の増殖や分化、形態形成に重要なシグナルとして知られている。HhシグナルはOff stateではPatched1(Ptch1)とGpr161が一次繊毛に局在することで、Smoothered(Smo)を抑制し、Smoの一次繊毛局在を抑制する。On stateでは、Hhシグナルにおける代表的なリガンドであるSonic hedgehog(Shh)がPtch1に結合することでSmoの抑制が解除されてSmoが一次繊毛に局在し、シグナル伝達が起こる。canonical経路は、転写因子Gli1依存的な経路で、遺伝子発現を介したシグナルであり、主に正常な胚発生において重要な役割を担っている。一方、non-canonical経路はGli1非依存的な経路で遺伝子発現を介さないシグナルであり、軸策ガイダンスでSrcファミリーキナーゼの活性化が関与していること(Neuron 2009)、また筋肉および褐色脂肪組織ではAMP-activated protein kinase(AMPK)を介してWarburg様グルコース代謝をもたらすことが報告されており、代謝制御にHhシグナルが関与していることが示されている(Cell 2012)。また最近、Hhリガンドのアンタゴニストとして知られるHedgehog interacting protein(Hhip)が高脂肪食負荷糖尿病マウスにおける膵細胞インスリン分泌不全に関与していることが報告されている(Sci Rep 2019)。これらのことから、Hhシグナルが膵細胞のインスリン分泌機能や糖尿病でのグルコース代謝変化に重要な役割を果たしている可能性が考えられるが、Hhシグナルと膵細胞グルコース代謝との関係は検討されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、膵細胞における正常と糖尿病状態でのグルコース代謝の違いについて、Hhシグナルの関与や一次繊毛との関係を検討し、糖尿病発症における代謝制御変換の基盤分子メカニズムを明らかにする。Hhシグナルはこれまで膵臓の発生・分化に関与することは示されているが、成熟膵細胞の機能やグルコース代謝への関与ならびに膵細胞における一次繊毛との関係を明らかにする検討はなされておらず、これまででない発想であることから学術的独自性が高い。この糖尿病における代謝のスイッチングメカニズムが明らかにされれば膵細胞研究において画期的な研究発展となり得る。

## 3. 研究の方法

下記に示す方法で、糖尿病での膵細胞グルコース代謝変換に対するHhシグナルの関与に関する検討を行った。

マウス膵細胞株であるMIN6細胞を用いた。

インスリン分泌実験：バッチインキュベーション法、ELISA (モリナガ)  
 細胞内 ATP 量の測定：InterCellular ATP 測定キット(東洋ビーネット)  
 乳酸測定：Lactate Assay Kit-WST (同人化学)  
 PDH 測定：Pyruvate Dehydrogenase Activity Assay Kit (Sigma-Aldrich)  
 AMPK リン酸化測定：Western Blotting  
 遺伝子ノックダウン：siRNA 導入  
 定量的リアルタイム PCR

#### 4. 研究成果

まず、Shh の各刺激薬による膵細胞からのインスリン分泌を検討した。Shh (canonical and non-canonical agonist)、Cyclopamine (canonical antagonist and non-canonical agonist)、GSA-10 (non-canonical agonist)、SANT-1 (Hh signal antagonist) を使用したところ、Cyclopamine でのみグルコース刺激によるインスリン分泌を有意に増強した (図 1)。

Cyclopamine によるインスリン分泌増強のメカニズムを検討するために、ATP 産生を測定したところ、Cyclopamine はグルコース刺激による ATP 産生を有意に増強した (図 2)。このことから、Cyclopamine は細胞内代謝に作用することでインスリン分泌を増強することが示された。

さらに、乳酸産生について検討したところ、Cyclopamine は乳酸産生に影響を与えず、また、PDH 活性についても Cyclopamine により変化は認められなかった。これらのことから、Cyclopamine はミトコンドリア代謝に作用することが示唆された。

Non-canonical 経路に AMPK が関与していることが脂肪細胞で報告されていることから、膵細胞における AMPK の関与について検討した。Shh、Cyclopamine、GSA-10、SANT-1 の効果を検討したところ、Shh および Cyclopamine でのみ AMPK リン酸化が有意に増加し、GSA-10 および SANT-1 によっても増加傾向がみられた (図 3)。このことから、AMPK は膵細胞における Non-canonical 経路に関与していることが示された。しかし、Cyclopamine 以外はインスリン分泌に影響をおよぼさなかったことから、AMPK のリン酸化は Cyclopamine によるインスリン分泌増強には関与していないと考えられる。

次に、Cyclopamine によるインスリン分泌増強の上流のメカニズムを調べるために、Smo および Gpr161 の関与について検討した。Smo および Gpr161 をそれぞれ siRNA にてノックダウンし Cyclopamine によるインスリン分泌増強を検討したところ、どちらも有意な変化を与えなかったことから (図 4)、両因子はインスリン分泌増強に関与しないことが示された。

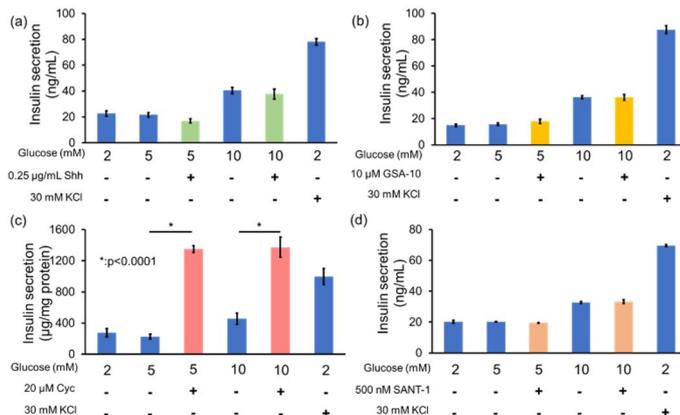


図1. 各Shh刺激薬のインスリン分泌に対する効果

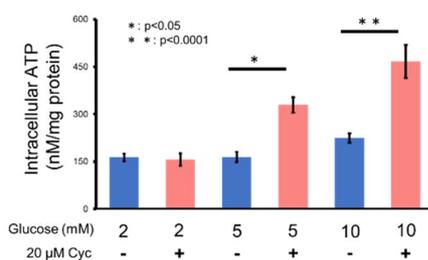


図2. CyclopamineはATP産生を増強する

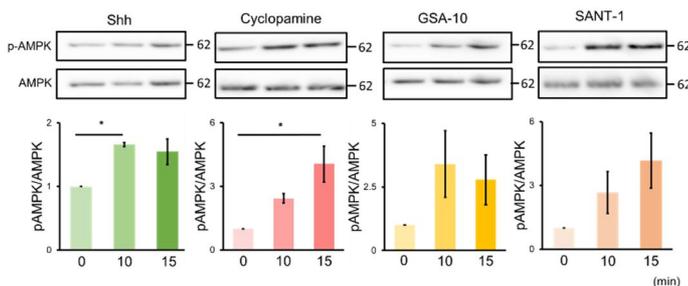


図3. 各Shh刺激薬のAMPKに対する効果

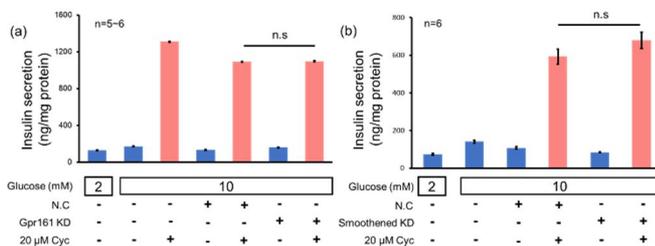


図4. Cyclopamineによるインスリン分泌増強に対するGPR161およびSmoothedの効果

今回用いた刺激薬の中で、Hh シグナルの partial agonist (canonical antagonist/non-canonical agonist) として知られる Cyclopamine のみで GSIS を増強することが示された。そのメカニズムとして、ミトコンドリアでの ATP 産生を増加させることが明らかとなったから、ATP 産生増加の詳細なメカニズムについて今後検討を行う。また、non-canonical 経路として AMPK 活性化の関与は低いと考えられ、それ以外の遺伝子発現を介さない未知のシグナルが関与する可能性が示唆されたことから、今後は他の Hh シグナル制御因子の関与について検討する。今回の検討で、partial agonist である Cyclopamine のみでインスリン分泌に影響があった。このことは、現在 canonical 経路と non-canonical 経路とに分類されているが、それ以外の未知の経路や因子の関与が考えられる。Hh シグナルの全貌の解明にもつなげていきたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mukai E, Fujimoto S, Inagaki N	4. 巻 12
2. 論文標題 Role of reactive oxygen species in glucose metabolism disorder in diabetic pancreatic $\beta$ -cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom12091228	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Kinoshita A, Nagata T, Furuya F, Nishizawa M, Mukai E	4. 巻 9
2. 論文標題 White-skinned sweet potato ( <i>Ipomoea batatas</i> L.) acutely suppresses postprandial blood glucose elevation by improving insulin sensitivity in normal rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e14719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2023.e14719	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Ogawa Y, Kimura H, Fujimoto H, Kawashima H, Toyoda K, Mukai E, Yagi Y, Ono M, Inagaki N, Saji H	4. 巻 52
2. 論文標題 Development of novel radioiodinated exendin-4 derivatives targeting GLP-1 receptor for detection of $\beta$ -cell mass.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 16496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2021.116496	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 Shimada T, Kato F, Dwijayanti R, Nagata T, Kinoshita A, Okuyama T, Nishizawa M, Mukai E	4. 巻 127
2. 論文標題 Bitter melon fruit extract enhances intracellular ATP production and insulin secretion from rat pancreatic $\beta$ -cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 British Journal of Nutrition	6. 最初と最後の頁 377-383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/S0007114521001082	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤優太、横山大輔、吉見友梨、杉本一馬、向英里
2. 発表標題 膵 細胞インスリン分泌における Nrf2 の役割
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤優太、横山大輔、吉見友梨、杉本一馬、向英里
2. 発表標題 膵 細胞インスリン分泌に対する脂肪酸曝露の効果とNrf2の役割
3. 学会等名 第26回日本病態栄養学会年次学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤優太、横山大輔、吉見友梨、杉本一馬、向英里
2. 発表標題 脂肪毒性によるグルコース応答性インスリン分泌減少におけるNrf2の役割
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 成瀬友佳子、小沢大貴、向英里
2. 発表標題 膵 細胞インスリン分泌機構に対するHhシグナルの関与
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉本一馬、成瀬友佳子、向英里
2. 発表標題 膵 細胞および偽膵島からのインスリン分泌に対するSrcの関与
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横山大輔、小山湧也、向英里
2. 発表標題 PKAとPKCによる膵 細胞インスリン分泌増強におけるAKAPの役割
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤優太、横山大輔、吉見友梨、杉本一馬、向英里
2. 発表標題 膵 細胞からのグルコース応答性インスリン分泌におけるNrf2の役割
3. 学会等名 第66回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuta Kato, Daisuke Yokoyama, Yuri Yoshimi, Kazuma Sugimoto, Eri Mukai
2. 発表標題 Role of Nrf2 in glucose-stimulated insulin secretion from pancreatic $\beta$ -cells
3. 学会等名 IDF-WPR Congress 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉部太瑛、向英里
2. 発表標題 膵 細胞からのインスリン分泌に対するHhシグナルの役割
3. 学会等名 第32回日本病態生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuta Kato, Daisuke Yokoyama, Taiyo Yoshibe, Kazuma Sugimoto, Yuri Yoshimi, Eri Mukai
2. 発表標題 Effects of fatty acid exposure on insulin secretion and role of Nrf2 in pancreatic beta cells
3. 学会等名 FAOPS 2023 Congress ( 国際学会 )
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤優太、吉部太瑛、向英里
2. 発表標題 膵 細胞におけるNrf2の抗酸化作用以外の経路への関与
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉部太瑛、加藤優太、向英里
2. 発表標題 膵 細胞からのインスリン分泌に対するHhシグナルの関与
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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