

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月 31日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790860

研究課題名（和文） スルホニル尿素薬の新たな標的としての Epac2 の機能とその役割

研究課題名（英文） The Role of Epac2 as a new target of sulfonylurea drugs

## 研究代表者

高橋 晴美（TAKAHASHI HARUMI）

神戸大学・大学院医学研究科・学術推進研究員

研究者番号：50546489

研究成果の概要（和文）：スルホニル尿素（SU）薬とインクレチン/cAMP シグナルを組み合わせると相乗的に作用し、膵β細胞からのインスリン分泌を増強することが明らかになった。また、この相乗効果には Epac2 シグナルが重要であり、Epac2 およびその下流の Rap1 シグナルの増強がインスリン分泌増強に関与していることが示された。また、この増強効果は Epac2 に対する SU 薬の作用の違いに依存していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Incretin/cAMP signaling and sulfonylurea synergistically augment insulin secretion from pancreatic β-cell. This interacting effect involves the enhancement of Epac2/Rap1 signaling and depends on the action of sulfonylureas on Epac2.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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、インクレチン、スルホニル尿素薬、インスリン分泌、膵β細胞、cAMP

## 1. 研究開始当初の背景

膵β細胞におけるインスリン分泌は食事後の血糖値が上昇することで惹起されるが、食物の刺激によって腸管内分泌細胞から分泌される Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) や Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) などのインクレチンホルモンにより増強される。また、インクレチンは膵β細胞が糖尿病で疲弊した時に、膵β細胞の増殖、アポトーシス抑制、再生等の細胞

保護作用を発揮することが示唆されている。このような作用から、近年インクレチン作用を有する糖尿病治療薬に注目が集まっている。

インクレチンは膵β細胞内の cAMP を産生させ、プロテインキナーゼ A (PKA) 依存性経路と PKA 非依存性経路を介してインスリン分泌を増強する。PKA 非依存性経路には cAMP 結合タンパク質である Epac2 が関与している。Epac2 は C 末端側に 2 つの cAMP 結合領域を、N 末端側には低分子量 G タンパク質 Rap に対

するグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) 領域を有する。最近代表者らは、全長 Epac2 を 2 種類の蛍光タンパク質 CFP および YFP で挟んだ FRET (蛍光共鳴エネルギー転移) プローブを作製し、Epac2 の活性化を FRET 効果の増減で検出するシステムを確立した。このシステムを用いて、Epac2 を活性化する分子の探索を行ったところ、糖尿病治療薬として現在最も広く臨床で使用されているスルホニル尿素 (SU) 薬を同定した。SU 薬の効果を Epac2 欠損マウスから単離した膵ランゲルハンス島 (膵島) を用いて検討したところ、野生型マウスから単離した膵島に比べ、SU 薬によるインスリン分泌が有意に抑制されていた。また、Epac2 欠損マウスにおいて、SU 薬によるインスリン分泌作用や血糖降下作用が有意に低下していた。従来、SU 薬は ATP 感受性  $K^+$ チャネル ( $K_{ATP}$  チャネル) が標的として知られていたが、今回の発見から SU 薬によるインスリン分泌には  $K_{ATP}$  チャネルを介した作用だけでなく、Epac2 を介した作用も重要であることが明らかになった。したがって、Epac2 は SU 薬とインクレチン両方の標的であるといえる。近年、インクレチン関連薬が臨床使用されるようになり、SU 薬との併用の機会が増えていることから、Epac2 を介した SU 薬とインクレチンの相互作用の解明は重要な研究課題であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では SU 薬とインクレチンの相互作用によるインスリン分泌制御機構における Epac2 の役割を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、SU 薬としてグリベンクラミド (GLB)、グリメピリド (GLM) およびグリクラジド (GLC) を、インクレチンとして GLP-1 を用いて検討した。代表者らの以前の研究で、GLB および GLM は Epac2 を活性化するが、GLC は活性化しないことが明らかになっていることから、SU 薬の種類によるインクレチンとの組み合わせ効果の差異を検討した。

(1) インスリン分泌に対する SU 薬とインクレチンの組み合わせ効果

インスリン分泌に対するインクレチンと SU 薬の組み合わせ効果を、マウス単離膵島、単一膵  $\beta$  細胞およびマウス膵臓の各レベルで検討した。

### ①マウス単離膵島からのインスリン分泌

野生型マウスより膵島を単離し、GLB、GLM、GLC の各単独刺激およびこれらの SU 薬と GLP-1 の組み合わせ刺激によるインスリン分泌を検討した。

### ②単一の膵 $\beta$ 細胞におけるインスリン開口分泌

初代培養マウス膵  $\beta$  細胞に蛍光タンパク質 Venus で標識したインスリン (インスリン Venus) を発現させてインスリン顆粒を可視化し、全反射型蛍光顕微鏡 (TIRFM) により GLM と GLP-1 の組み合わせによるインスリン顆粒開口分泌動態を解析した。

### ③マウス膵臓からのインスリン分泌

マウス膵灌流法により種々の SU 薬と GLP-1 によるインスリン分泌動態を検討した。

(2) インクレチンと SU 薬の組み合わせによるインスリン分泌増強における Epac2 シグナルの役割

マウス膵灌流法により野生型マウスと Epac2 欠損マウスのインスリン分泌動態を比較し、SU 薬と GLP-1 の組み合わせによるインスリン分泌増強における Epac2 シグナルの役割を検討した。

(3) 細胞内の Epac2/Rap1 シグナルに対する SU 薬とインクレチンの組み合わせ効果

#### ①Epac2 の活性化

Epac2 の活性化をモニターできる Epac2 FRET センサーをインスリン分泌細胞株 MIN6 に発現させ、SU 薬および cAMP 刺激による FRET 効率の変化を観測した。

#### ②Epac2 の下流シグナル Rap1 の活性化

GST-Ra1GDS を用いた GST プルダウン法により、SU 薬、cAMP 単独または両者の組み合わせ

せにより刺激された MIN6 細胞における Rap1 の活性化を検討した。

### ③インスリン分泌に対する Rap1 シグナル増強の効果

cAMP 非存在下でも Rap1 を恒常的に活性化させる恒常的活性化型 Epac2 (CA-Epac2) を作製して MIN6 細胞に導入し、SU 薬または高濃度グルコース刺激によるインスリン分泌に対する Rap1 活性化の効果を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) インスリン分泌に対する SU 薬とインクレチンの組み合わせ効果

#### ①単離膵島からのインスリン分泌

8.8 mM グルコース存在下、GLB、GLM または GLC と GLP-1 の組み合わせにより、相加的なインスリン分泌の増加が認められた。また、4.4 mM グルコースでは GLP-1 単独ではインスリン分泌を惹起しないが、GLB または GLM との組み合わせにより、GLB または GLM の単独刺激に比べ相乗的なインスリン分泌の増強が認められた。この相乗効果は GLC と GLP-1 の組み合わせでも認められたが、増強の程度は比較的弱かった。

#### ②単一膵β細胞におけるインスリン開口分泌 (TIRFM による解析)

4.4 mM グルコース存在下で GLM 刺激により開口分泌頻度の高い早期相と頻度は低いものの持続する後期相が見られた。また、開口分泌の多くは刺激後に細胞内からリクルートされた顆粒が瞬時に膜融合する restless newcomer によるものであった。一方、GLM と GLP-1 の組み合わせ刺激により、GLM 単独刺激に比べ、早期相および後期相ともに開口分泌頻度が増加した。この増強は、restless newcomer および、刺激後に細胞膜に現れてしばらく留まった後に膜融合する resting newcomer 由来の開口分泌の増加によるものであった。このことから、GLM と GLP-1 の組み合わせにより、細胞内からのインスリン顆粒のリクルートメントおよび細胞膜直下に存在する顆粒の膜融合を促進することが示

唆された。

#### ③マウス膵臓からのインスリン分泌

マウス膵灌流法によりインスリン分泌動態を検討したところ、TIRFM で観察した開口分泌動態と同様に、4.4 mM グルコース存在下、GLB または GLM の単独刺激では刺激後に一過性に分泌が増加する早期相と少量の分泌が持続する後期相が認められた。GLP-1 存在下では早期相および後期相ともに顕著なインスリン分泌の増強が認められた。一方、GLC と GLP-1 の組み合わせでは主に後期相において比較的弱い増強が認められた。

### (2) インクレチンと SU 薬の組み合わせによるインスリン分泌増強における Epac2 シグナルの役割

Epac2 欠損マウスと野生型マウスのインスリン分泌動態を比較した。Epac2 欠損マウスでは、野生型マウスに比べ、主に GLB による早期相のインスリン分泌が減弱していた。一方、GLB と GLP-1 の組み合わせによる分泌増強は、早期相および後期相の両方において著しく低下していた。この Epac2 欠損マウスにおける増強効果の減弱は GLM と GLP-1 の組み合わせにおいても認められた。したがって、インクレチンと SU 薬の組み合わせによるインスリン分泌増強には Epac2 シグナルが重要であることが明らかになった。一方、GLC 単独刺激または GLC と GLP-1 の組み合わせ刺激によるインスリン分泌は野生型マウスと Epac2 欠損マウスで差が認められなかった。

### (3) 細胞内の Epac2/Rap1 シグナルに対する SU 薬とインクレチンの組み合わせ効果

#### ①Epac2 の活性化

Epac2 FRET プローブを導入した MIN6 細胞において、Epac 選択的 cAMP アナログである 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (8-pCPT) は 10 μM では FRET 効率を変化させた。また、10 μM の GLB 単独刺激でも FRET 変化が認められた。一方、それぞれ単独では FRET を変化させない濃度の 8-pCPT と GLB を組み合わせると Epac2 FRET 効率の変化が認められた。したがって、cAMP と GLB は相乗的に Epac2 を活性化させることが明らかになった。

## ②Rap1 の活性化

MIN6 細胞において、Epac2 の下流シグナルである Rap1 は、GLB または 8-pCPT の刺激により活性化されるが、両者の組み合わせにより Rap1 の活性化は増強した。また、Rap1 活性化の増強は、GLM と 8-pCPT の組み合わせでも同様に見られたが、GLC と 8-pCPT の組み合わせでは認められなかった。

## ③Rap1 の活性化によるインスリン分泌増強効果

(3) の①および②より、cAMP と SU 薬の組み合わせにより Epac2/Rap1 シグナルが増強することが明らかになった。そこで、インスリン分泌に対する Rap1 活性化の増強の効果を明らかにするために、CA-Epac2 を発現させた MIN6 細胞を用いてインスリン分泌を検討した。

Epac2 は非活性状態では cAMP 結合ドメインが GEF ドメインを覆う閉鎖型の構造をとるため GEF 活性が抑制されているが、cAMP が cAMP 結合ドメインに結合すると構造変化を起こして GEF ドメインが露出し、Rap に対する GEF 活性を発揮する。CA-Epac2 は N 末端側の二つの cAMP 結合ドメインを欠損させた Epac2 の変異体である。したがって CA-Epac2 では GEF ドメインが露出しているため、cAMP 非存在下でも Rap に対する GEF 活性を有すると考えられる。実際、プルダウン法により確認したところ、CA-Epac2 を発現させた細胞では、cAMP 刺激が無い状態でも強力な Rap1 の活性化が認められた。

次に CA-Epac2 を MIN6 細胞に導入し、インスリン分泌を検討した。GLB、高濃度グルコースまたは高濃度カリウム刺激によって惹起されるインスリン分泌は対照細胞に比べ、CA-Epac2 を導入した細胞で有意に増強した。したがって、Rap1 シグナルの活性化がインスリン分泌増強に寄与することが示唆された。

以上の結果より、インクレチンと SU 薬は相乗的に作用して低濃度グルコースにおいてもインスリン分泌を増強することが明らかになった。また、この増強効果には Epac2/Rap1 シグナルの増強が寄与していることが示唆された。さらに、SU 薬の Epac2 に対する作用の違いでインクレチンとの相互

作用が異なることも示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

英語論文

① Asahara S, Shibutani Y, Teruyama K, Inoue HY, Kawada Y, Etoh H, Matsuda T, Kimura-Koyanagi M, Hashimoto N, Sakahara M, Fujimoto W, Takahashi H, Ueda S, Hosooka T, Satoh T, Inoue H, Matsumoto M, Aiba A, Kasuga M, Kido Y. Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1) regulates glucose-stimulated insulin secretion via modulation of F-actin. *Diabetologia*, 56:1088-1097, 2013. (査読有)

DOI: 10.1007/s00125-013-2849-5

② Seino S, Takahashi H, Takahashi T, Shibasaki T. Treating diabetes today: a matter of selectivity of sulfonylureas. *Diabetes, Obesity & Metabolism Suppl* 1:9-13, 2012. (査読有)

DOI: 10.1111/j.1463-1326.2011.01507.x

③ 高橋晴美、柴崎忠雄、清野 進： 膵β細胞における Epac2A の役割 *Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌* 2012

中外医学社 4-9 2012. (査読無)

④ 高橋晴美、柴崎忠雄、清野 進： 新規標的分子 Epac : インスリン分泌における Epac2A の役割 *Mebio*

メジカルビュー社 Vol.28 No.4 132-139 2011. (査読無)

⑤ 高橋晴美、柴崎忠雄、清野 進： インスリン分泌における Epac2A の役割 *Diabetes Journal*

協和企画 第 39 巻第 4 号 151-157 2011. (査読無)

⑥ Yasuda T, Shibasaki T, Minami K, Takahashi H, Mizoguchi A, Uriu Y, Numata T, Mori Y, Miyazaki J-I, Miki T, Seino S, Rim2  $\alpha$  determines docking and priming

states in insulin granule exocytosis. Cell Metabolism, 12:117-129, 2010. (査読有)  
DOI:10.1016/j.cmet.2010.05.017

⑦高橋晴美、柴崎忠雄、藤本和歌子、清野進：インクレチンの膵β細胞におけるインスリン分泌増強機構

月刊糖尿病 別冊インクレチン 医学出版 第2巻第2号 29-36 2010. (査読無)

⑧高橋晴美、柴崎忠雄、藤本和歌子、清野進：インクレチンの膵島作用：膵β細胞

月刊糖尿病 医学出版 第2巻第7号 18-25 2010. (査読無)

⑨高橋晴美、柴崎忠雄、藤本和歌子、清野進：インクレチンによるインスリン分泌増強機構

医学のあゆみ 医歯薬出版株式会社 第233巻第5号 341-345 2010. (査読無)

[学会発表] (計15件)

①Shibasaki T, Uenishi E, Takahashi H, Hamaguchi H, Seino S: Role of actin dynamics regulated by N-WASP and cofilin in insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells, 第35回日本分子生物学会年会, 2012.12.13、福岡

② Shibasaki T, Uenishi E, Takahashi H, Hamaguchi H, Oiso Y, Seino S: Regulation of actin dynamics by N-WASP and cofilin in pancreatic  $\beta$ -cells and its role in insulin secretion, 9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress/4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes, 2012.11.27, Kyoto

③ Takahashi H, Shibasaki T, Hidaka S, Takahashi T, Ono A, Seino S: Interaction of incretin and sulfonylurea through Epac2 in insulin secretion, 9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress/4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes, 2012.11.27, Kyoto

④ Minami K, Kitanoya H, Takahashi H, Seino S: Induction of gastrointestinal hormones in pancreatic islets of a mouse model of beta cell regeneration, 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, 2012.10.4, Berlin, Germany

⑤高橋利匡、高橋晴美、小野愛夏、柴崎忠雄、清野進：SU薬によるEpac2A活性化機構の解明、第55回日本糖尿病学会年次学術集会、2012.5.19、横浜

⑥高橋晴美、柴崎忠雄、高橋利匡、清野進：インクレチンとSU薬によるインスリン顆粒開口分泌、第55回日本糖尿病学会年次学術集会、2012.5.19、横浜

⑦上西栄太、柴崎忠雄、高橋晴美、濱口ひとみ、大磯ユタカ、清野進：膵β細胞のN-WASPとcofilinによるF-アクチンリモデリングの制御とそのインスリン分泌における役割、第55回日本糖尿病学会年次学術集会 2012.5.17、横浜

⑧Shibasaki T, Uenishi E, Takahashi H, Hamaguchi H, Tatebe M, Oiso Y, Seino S: Role of actin dynamics regulated by Cdc42/N-WASP signaling in insulin secretion, 71st Scientific Sessions, American Diabetes Association 2011.6.26, San Diego, USA

⑨ 高橋晴美、柴崎忠雄、高橋利匡、清野進：インクレチンとSU薬によるインスリン分泌におけるEpac2/Rap1シグナルの役割、第54回日本糖尿病学会年次学術集会 2011.5.20、札幌

⑩Takahashi H, Shibasaki T, Takahashi T, Seino S: Interaction of cAMP and sulfonylurea through Epac2 in insulin secretion, XII Servier-IGIS Symposium, 2011.4.2, Saint-Jean-Cap-Ferrat, France

⑪Shibasaki T, Takahashi H, Yasuda T, Zhang C-L, Seino S: Molecular Mechanisms of Insulin Granule Exocytosis. 第84回日

本薬理学会年次学術集会

2011. 3. 22、横浜

⑫高橋晴美：インクレチンのインスリン分泌増強作用における Epac2 の役割、第 47 回日本糖尿病学会近畿地方会

2010. 11. 13、大阪

⑬ Yasuda T, Shibasaki T, Minami K, Takahashi H, Miyazaki J-I, Miki T, Seino S: Rim2 • determines docking and priming states in insulin granule exocytosis in pancreatic •-cells, Asia Islet Biology & Incretin Symposium,

2010. 7. 31, Kyoto

⑭ Shibasaki T, Zhang CL, Takahashi T, Takahashi H, Seino S: Epac2 is a direct target of both cAMP and sulfonylurea in insulin secretion、第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会

2010. 5. 28、岡山

⑮安田貴雄、柴崎忠雄、三木隆司、高橋晴美、宮崎純一、南幸太郎、清野進：インスリン顆粒の開口放出機構における Rim2 $\alpha$  の役割、第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会

2010. 5. 27、岡山

## 6. 研究組織

研究代表者

高橋 晴美 (TAKAHASHI HARUMI)

神戸大学・大学院医学研究科・学術推進研究員

研究者番号：50546489