

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591320

研究課題名(和文) 組織特異的KOマウスを用いた膵島グレリンによるインスリン分泌・糖代謝制御の解明

研究課題名(英文) Glucose metabolism in ghrelin conditional KO mice

研究代表者

出崎 克也 (Dezaki, Katsuya)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90337329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、膵島特異的グレリン遺伝子欠損マウスの糖代謝機能解析を行う。  
1. Cre/LoxPシステムを用いて、膵細胞および膵細胞特異的グレリンKOマウスを作出した。2. 消化管ホルモンのGLP-1は、ラット分離膵島におけるグルコース誘発cAMP産生および膵島インスリン分泌を促進し、グレリン投与はこれらを抑制した。  
以上より、グレリンはグルコース刺激のみならずGLP-1によるインスリン分泌促進作用に対しても抑制作用を示し、その機序の一つとして細胞内cAMP産生の抑制が明らかになった。膵細胞におけるグレリンとGLP-1の相互作用によるインスリン分泌を介した血糖調節が示唆される。

研究成果の概要(英文)：Ghrelin reportedly restricts insulin release in islet b-cells via Gi-proteins and thereby regulates glucose homeostasis. This study explored whether ghrelin regulates cAMP signaling and whether this regulation induces insulinostatic cascade in islet b-cells. Furthermore, this study aimed to clarify whether ghrelin counteracts effects of GLP-1, a physiological incretin hormone that promote glucose-induced insulin release in rat islet b-cells. Ghrelin directly interacts with b-cells to attenuate glucose-induced cAMP production and PKA activation, which lead to activation of Kv channels and suppression of glucose-induced  $[Ca^{2+}]_i$  increase and insulin release. Ghrelin potently attenuates GLP-1-induced cAMP production,  $[Ca^{2+}]_i$  increases and insulin release in b-cells. These findings indicate that interaction between ghrelin and GLP-1 plays an important role in physiological regulation of glucose-induced insulin release.

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：糖代謝 インスリン分泌 グレリン

## 1. 研究開始当初の背景

グレリンは、オーファン受容体である成長ホルモン放出促進因子受容体(GHS-R)の内因性リガンドとして胃から精製された新規ペプチドであり、成長ホルモン放出、摂食促進、脂肪蓄積作用を示すことが報告されている(Nature 402, 1999; Nature 407, 2000; Nature 409, 2001)。申請者は、グレリンとインスリン分泌・糖代謝に関して以下の知見を得た。

(1)グレリンが膵ランゲルハンス島(膵島)に発現し、分泌され、グレリン受容体 GHS-R も膵島に発現している(Diabetes 51, 2002; Diabetes 55, 2006; Int. J. Pept. 2010)。

(2)内因性グレリン作用の薬理的阻害は、分離膵島からのグルコース誘発インスリン分泌およびグルコース負荷試験時の血中インスリン分泌を増強する(Diabetes 53, 2004; Diabetes 55, 2006; Diabetes 56, 2007)。

(3)高脂肪食負荷による耐糖能障害が、全身性グレリン遺伝子欠損マウスでは抑制されており、これは高いインスリン分泌応答に起因する(Diabetes 55, 2006)。

一連の実験結果から、膵島内因性グレリンは細胞インスリン分泌を抑制する調節ペプチドであると想定される。従って、膵島グレリン作用の阻害はインスリン分泌促進を介した糖代謝改善作用が期待される。国内外の研究動向としては、ヒトを含む種を越えたグレリンのインスリン分泌抑制作用が複数の研究室から報告され確立している。グレリン欠損による糖尿病発症抑制の効果については、米国の Smith らがレプチン受容体異常の肥満 ob/ob マウスにおいてグレリンを欠損させると耐糖能が改善することを報告している(Cell Metab. 3, 2006)。

## 2. 研究の目的

本研究では、膵島内因性グレリンによるインスリン分泌抑制機構とその病態生理的意義の解明を目的とし、Cre/LoxP システムを用いて膵島特異的グレリン遺伝子欠損マウスを作出し糖代謝機能解析を行う。さらに細胞グレリン受容体シグナルの詳細な解明、およびグレリンとインスリン分泌促進ホルモンの Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)の相互作用解析を行う。

## 3. 研究の方法

### (1)膵島インスリン分泌測定

雄性 Wistar ラットまたはグレリン KO マウス、野生型 C57BL/6J マウスからコラゲナーゼ法により膵ランゲルハンス島(膵島)を分

離し、低グルコース(2.8 mM)または高グルコース(8.3 mM)条件下での膵島インスリン分泌を ELISA 法にて測定した。

### (2) 細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 測定

単離した細胞に  $Ca^{2+}$ 感受性蛍光色素の fura-2/AM を負荷し、蛍光倒立顕微鏡下で細胞内  $Ca^{2+}$ 動態をリアルタイム蛍光画像解析により測定した。 $[Ca^{2+}]_i$  は、340nm および 380nm の励起による 510nm の蛍光強度比(F340/F380)で表示した。

### (3) 細胞チャネル電流測定

ATP 感受性  $K^+$ チャネル阻害剤の Tolbutamide (100  $\mu$ M) 存在下で、ナスタチン穿孔パッチクランプ法またはホールセルパッチクランプ法によりラット細胞の全細胞電流を測定した。

### (4)経口グルコース負荷試験

ラットおよびマウスに経口グルコース負荷試験(OGTT)を行い、血糖値と血中インスリン分泌を測定した。

## 4. 研究成果

(1)グレリン遺伝子を loxP で挟んだ Ghrelin-flox マウスおよびインスリンプロモーター制御 Cre マウス (Insulin-Cre マウス)、グルカゴンプロモーター制御 Cre マウス (Glucagon-Cre マウス)の作成に成功し、これらマウスの交配により膵細胞特異的グレリン KO マウス (Ghr-KO マウス)と膵細胞特異的グレリン KO マウス (Ghr-KO マウス)を得た。現在、インスリン分泌・糖代謝に関する基礎的データを解析中であり、今後、*in vivo* および *in vitro* の系を用いて全身糖代謝における膵島グレリンの役割をさらに解明する。

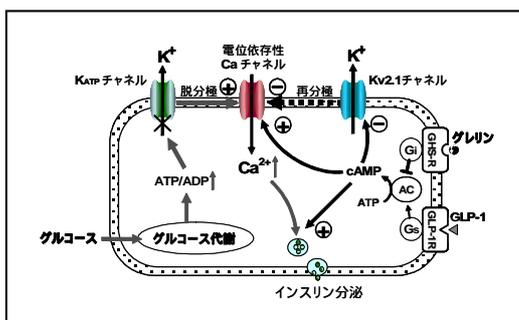
(2)グレリンは、ラット膵島のグルコース誘発 cAMP 産生とインスリン分泌を抑制し、細胞の電位依存性  $K^+$  ( $K_v$ ) チャネル電流を増強しグルコース刺激による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇を抑制した。一方、グレリンは細胞の ATP 感受性  $K^+$ チャネル電流や電位依存性  $Ca^{2+}$ チャネル電流には影響しなかった。cAMP アナログの 6-Phe-cAMP は、細胞  $K_v$  チャネル電流を抑制した。6-Phe-cAMP 存在下では、グレリンによるインスリン分泌抑制作用ならびに  $K_v$  チャネル電流活性化作用、 $[Ca^{2+}]_i$  抑制作用が消失した。以上より、グレリンによるインスリン分泌抑制機構には、細胞内 cAMP シグナルの抑制を介した  $K_v$  チャネルの活性化と  $[Ca^{2+}]_i$  低下が関与すると考えられる。

(3) 消化管ホルモンの GLP-1 は、8.3 mM グルコース存在下でラット分離膵島におけるグルコース誘発 cAMP 産生および膵島インスリン分泌を促進し、グレリン投与はこれら GLP-1 作用を抑制した。

(4) グレリンは、8.3mM グルコース存在下での GLP-1 刺激およびアデニル酸シクラーゼ活性化薬 forskolin 刺激による細胞内  $[Ca^{2+}]_i$  増加作用を濃度依存的に抑制した。

(5) グレリン受容体拮抗薬により膵島内因性グレリンの作用を阻害すると、GLP-1 刺激による膵島 cAMP 産生および膵島インスリン分泌作用が増強した。

(6) ラットおよびマウスへのグレリン投与は、OGTT における血糖上昇を増大させ、血中インスリン分泌を低下させた。一方、グレリン受容体拮抗薬は、OGTT における血糖上昇を低下させ、血中インスリン分泌を増加させた。また、グレリン KO マウスでは野生型マウスと比較して OGTT の血糖曲線が下方シフトし血中インスリン分泌は増加していた。



**図 膵細胞におけるグレリンによるインスリン分泌抑制**

グレリンは、アデニル酸シクラーゼ(AC)阻害により細胞内の cAMP 産生を抑制し、グルコースおよび GLP-1 によるインスリン分泌を抑制する。

以上より、グレリンはグルコース刺激のみならず GLP-1 によるインスリン分泌促進作用に対しても抑制作用を示し、その機序の一つとして細胞内 cAMP 産生の抑制が明らかになった(図)。インクレチン関連薬とグレリン受容体拮抗薬の併用は、インスリン分泌促進作用を介した新たな糖尿病治療法となる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計15件)

Yoshida M, Dezaki K, Uchida K, Kodera

S, Lam NV, Ito K, Rita RS, Yamada H, Shimomura K, Ishikawa SE, Sugawara H, Kawakami M, Tominaga M, Yada T, Kakei M.: Involvement of cAMP-EPAC-TRPM2 activation in glucose- and incretin-induced insulin secretion. Diabetes 2014 [Epub ahead of print], 査読あり

doi: 10.2337/db13-1868

Takei M, Dezaki K, Ishii H, Nishio S, Sato Y, Suzuki S, Yada T, Komatsu M.: A new experimental model of ATP-sensitive  $K^+$  channel-independent insulinotropic action of glucose: a permissive role of cAMP for triggering of insulin release from rat pancreatic  $\beta$ -cells. Endocrine J. 60: 599-607, 2013, 査読あり

<http://dx.doi.org/10.1507/endocrj.EJ12-0388>

Dezaki K, Yada T.: Islet  $\beta$ -cell ghrelin signaling for inhibition of insulin secretion. Methods Enzymol. 514: 317-331, 2012, 査読あり

doi: 10.1016/B978-0-12-381272-8.00020-9

Damdindorj B, Dezaki K, Kurashina T, Sone H, Rita R, Kakei M, Yada T.: Exogenous and endogenous ghrelin counteracts GLP-1 action to stimulate cAMP signaling and insulin secretion in islet  $\beta$ -cells. FEBS Lett. 586: 2555-2562, 2012, 査読あり

doi: 10.1016/j.febslet.2012.06.034

Dezaki K, Damdindorj B, Sone H, Dyachok O, Tengholm A, Gylfe E, Kurashina T, Yoshida M, Kakei M, Yada T.: Ghrelin attenuates cAMP-PKA signaling to evoke insulinostatic cascade in islet  $\beta$ -cells. Diabetes 60: 2315-2324, 2011, 査読あり

doi: 10.2337/db11-0368.

[学会発表](計19件)

出崎 克也: グレリンは GLP-1 のインクレチン効果を抑制する. 第 91 回日本生理学会大会、2014 年 03 月 16~18 日、鹿児島

出崎 克也: Zucker fatty ラットの肥満初期における血中グレリン動態. 第 34 回日本肥満学会、2013 年 10 月 11~12 日、東京

出崎 克也: GLP-1 によるインスリン分泌に対するグレリンの抑制作用. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013 年 05 月 16~18 日、熊本

出崎 克也: グレリン受容体シグナルとしての膵細胞 Kv チャンネル. 第 90 回日本生理学会大会、2013 年 03 月 27~29 日、東京

出崎 克也: グレリンによる細胞 cAMP シグナルを介したグルコース誘発インスリン分泌抑制. 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、2012 年 05 月 17~19 日、横浜

〔図書〕(計2件)

小泉 大、出崎 克也、田口 昌延、安田 是和、矢田 俊彦: 胃全摘と摂食 ラット胃全摘モデルにおける術式と摂食の関係、術後の摂食低下とグレリン感受性の推移 . GI Research、先端医学社、40-47、2013

Dezaki K, Damdindorj B, Kurashina T, Yada T.: Ghrelin's novel signaling in islet  $\beta$ -cells to inhibit insulin secretion and its blockade as a promising strategy to treat type 2 diabetes. Ghrelin in Health and Disease, Humana Press, 51-71, 2012

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

出崎 克也 (DEZAKI, Katsuya)  
自治医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：9 0 3 3 7 3 2 9

### (2)研究分担者

矢田 俊彦 (YADA, Toshihiko)  
自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号：6 0 1 6 6 5 2 7