

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 7日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791028

研究課題名（和文） $\beta$ 細胞における Src の役割と GPCR シグナルとの関連性研究課題名（英文）The role of Src on pancreatic  $\beta$ -cells and its relationship to GPCR signal

研究代表者

向 英里（MUKAI ERI）

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：60362539

研究成果の概要（和文）：糖尿病状態ではチロシキナーゼ Src の活性化により膵 $\beta$ 細胞内の酸化ストレスが増加しインスリン分泌が減少していること、また GPCR リガンドはその Src 活性化を抑制し酸化ストレスを軽減する新たな作用を持つことを今までに明らかにした。今回、 $\beta$ 細胞における Src の役割について、糖尿病状態のみならずグルコースによるインスリン分泌や GPCR リガンドによる増強機構に Src 分子が関与していること、そのメカニズムとしてグルコキナーゼの活性調節を行っていることが明らかとなり、インスリン分泌における Src の重要性が示された。

研究成果の概要（英文）：We have previously showed that Src activation induces ROS production and impaired insulin secretion in diabetic  $\beta$ -cells and GPCR ligand could suppress the Src activation and ROS production. The present study revealed that Src is involved in glucose-induced insulin secretion and its augmentation by GPCR ligand in normal state and the effect of Src is through glucokinase regulation, indicating that Src is important for insulin secretory mechanism of  $\beta$ -cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：エネルギー・糖質代謝異常・糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の2型糖尿病では、グルコースに対するインスリン分泌が選択的に低下しており、インスリン分泌の絶対量は米国のそれと比べておよそ半分であることから、グルコースに対するインスリン分泌能力が低いことが特徴である。したがって、グルコースによるインスリン分泌機構の詳細やその異常を明らかにすることは、我が国における糖尿病の成因や病態の解明に大きな手掛かりを与える。膵 $\beta$ 細胞のグルコースによるインスリン分泌機構においては、グルコースの代謝、すなわち ATP 産生が中心的な役割を果たして

おり、糖尿病状態ではその代謝が障害されていることが明らかにされている。

一方、 $\beta$ 細胞インスリン分泌を増強する細胞内シグナル分子として cAMP がある。ホルモンなどの G タンパク質共役型受容体 (GPCR) のリガンドは、 $\beta$ 細胞膜に存在するそれぞれの GPCR に結合し cAMP を産生する。産生された cAMP は、細胞質内の PKA を活性化することでインスリン分泌機構に対して増強作用を発揮することが以前より知られている。

近年糖尿病治療薬として開発されたインクレチン薬が世界各国で現在非常に脚光を浴びている。インクレチンは食事負荷により

腸管から分泌されるホルモンで、 $\beta$ 細胞に発現する GPCR に作用し、インスリン分泌を増強することが以前より知られている。申請者らは、最近、このインクレチンの $\beta$ 細胞に対する新たな作用ならびにそのメカニズムについて解明した。糖尿病状態では $\beta$ 細胞内の酸化ストレスが増加していること、それにはチロシキナーゼ Src の活性化が関与していること、インクレチンがその Src 活性化を抑制し酸化ストレス増加を抑制することを見出した。 $\beta$ 細胞での特に糖尿病状態における Src の関与については、申請者らが初めて明らかにしたことであり、それに対する有効な薬剤を見出したのは今後の糖尿病治療研究に大きな貢献をもたらし得る。しかしながら、Src が糖尿病状態でどうして活性化しているのか、本来 Src がインスリン分泌機構においてどのような役割を果たしているかは不明である。

## 2. 研究の目的

本研究は、 $\beta$ 細胞における Src の役割を解明することを目的とし、Src に関連するシグナル分子を同定し、糖尿病状態におけるインスリン分泌の障害機構を明らかにする。さらに GPCR シグナルとの関連性についてもより詳細に明らかにし、新たな糖尿病治療薬の開発に結び付ける。

## 3. 研究の方法

### (1) $\beta$ 細胞インスリン分泌に対する Src ノックダウンの効果

$\beta$ 細胞におけるインスリン分泌機構に対し、Src がどのような役割を果たしているかを検討するために、siRNA 法を用いて $\beta$ 細胞内の Src 分子をノックダウンし、グルコースによるインスリン分泌ならびに GPCR リガンドによる分泌増強に対する効果を検討する。

### (2) インスリン分泌機構に対する Src の作用メカニズムの解明

インスリン分泌機構のなかで、どこに Src が作用しているのかを検討するために、ATP 産生や  $Ca^{2+}$  オシレーション、さらには解糖系やミトコンドリア内代謝などグルコース代謝経路に対する Src ノックダウンの効果を順を追って調べることで、Src 作用点を明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) $\beta$ 細胞インスリン分泌に対する Src ノックダウンの効果

Wistar ラットよりコラゲナーゼ法を用いて膵島を単離し、膵島からのインスリン分泌能をバッチインキュベーション法により測定したところ、グルコース刺激により惹起されるインスリン分泌は、あらかじめ Src の

siRNA (si-Src) を導入したもの、すなわち Src をノックダウンしたもので、コントロール siRNA を導入したものに比べて有意に抑制された (図 1)。また、GPCR リガンドによるインスリン分泌増強に対しても Src ノックダウンにより抑制効果を示した。一方、膵島のインスリン含量は Src ノックダウンにより変化しなかったことから、インスリンの生合成には影響がないことが示された。

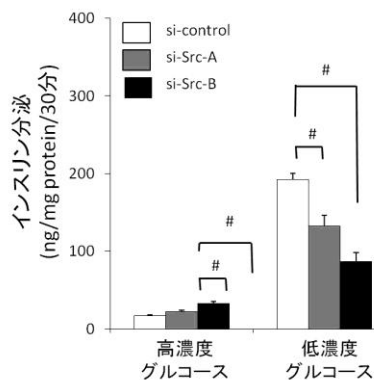


図1 膵島からのインスリン分泌に対するSrcノックダウンの効果

### (2) インスリン分泌機構に対する Src の作用メカニズムの解明

$\beta$ 細胞インスリン分泌に対する Src ノックダウンによる抑制効果において、Src がインスリン分泌機構のどの部分に作用しているかを検討するため、まずインスリン分泌機構に重要な ATP 産生量を測定した。グルコース刺激により膵島の ATP 含量は増加するが、その増加は Src ノックダウンにより抑制された。インスリン分泌は ATP 産生増加により細胞内に  $Ca^{2+}$  が流入することでインスリン分泌が惹起されるが、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を蛍光指示薬を用いて測定したところ、通常ではグルコース刺激により細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の変動 (オシレーション) が認められるのに対し、Src ノックダウンを行うことにより、そのオシレーションの減少が認められた。

次に、Src ノックダウンによる ATP 産生の減少が認められたことに対し、Src の作用点がミトコンドリアなのかどうかを検討するため、ミトコンドリアを単離し、ミトコンドリア基質に対する ATP 産生に対する Src ノックダウンの効果を検討した。その結果、ミトコンドリア ATP 産生に対しては影響を与えなかった。このことより、Src の作用点はミトコンドリアより以前、すなわち解糖系に存在することが示唆された。

Src が解糖系に作用するかどうかを検討するために、放射性標識をしたグルコースを用いて解糖系で産生される  $H_2O$  を測定する glucose utilization を検討した。すると、Src ノックダウンにより glucose utilization は有意に低下した。さらに解糖系の酵素で最も重要なグルコキナーゼの活

性を測定したところ、Src ノックダウンによりその活性は有意に低下していた（図2）。 $\beta$ 細胞のグルコキナーゼの活性調節機構としてインスリン顆粒などの細胞小器官膜に結合することで抑制される、また s-ニトロシル化を受けることで抑制されることが知られているので、それぞれを検討したところ、Src ノックダウンにより細胞質内に存在する非結合のグルコキナーゼが減少していること、またウエスタンブロッティングにより s-ニトロシル化グルコキナーゼが増加していることが認められた。

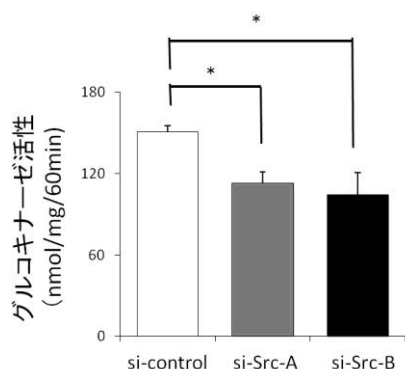


図2 グルコキナーゼ活性に対するSrcノックダウンの効果

以上のことより、 $\beta$ 細胞において Src はグルコースによるインスリン分泌機構に加担していること、また Src ノックダウンによりグルコキナーゼ活性が抑制されることから、Src はグルコキナーゼ活性調節を担っていることが明らかとなった（図3）。また、GPCR によるインスリン分泌増強においても Src は役割を果たしていることが明らかとなり、Src の作用点は複数あり、それらが協調してインスリン分泌機構において重要な役割を担っていることが今回の検討で明らかとなった。さらに糖尿病における Src 活性化の機構については現在検討中であり、これらが解明されれば新たな治療薬の開発につながるものと考えられる。

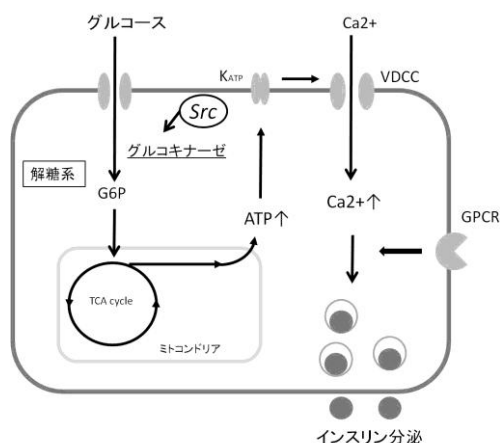


図3  $\beta$ 細胞インスリン分泌機構に対するSrcの役割

## 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4件）

(1) Sasaki M, Fujimoto S, Sato Y, Nishi Y, Mukai E, Yamano G, Sato H, Tahara Y, Ogura K, Nagashima K, Inagaki N. Reduction of reactive oxygen species ameliorates metabolism-secretion coupling in islets of diabetic GK rats by suppressing lactate overproduction. *Diabetes*. 2013. ahead of print. 査読有

<http://diabetes.diabetesjournals.org/content/early/2013/01/17/db12-0903.long>

(2) Fujimoto S, Mukai E, Inagaki N. Role of endogenous ROS production in impaired metabolism-secretion coupling of diabetic pancreatic  $\beta$  cells. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2011. 107(2). 304-310. 査読無  
doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2011.07.013.

(3) Fujimoto H, Toyoda K, Okitsu T, Liu X, Mukai E, Zhuang X, Uemoto S, Mochizuki N, Inagaki N. Three-dimensional ex vivo imaging and analysis of intraportal islet transplants. *Transplant International*. 2011. 24(8). 839-844. 査読有  
doi: 10.1111/j.1432-2277.2011.01271.x.

(4) Nishi Y, Fujimoto S, Sasaki M, Mukai E, Sato H, Sato Y, Tahara Y, Nakamura Y, Inagaki N. Role of Mitochondrial Phosphate Carrier in Metabolism-Secretion Coupling in Rat Insulinoma Cell Line INS-1. *Biochemical Journal*. 2011. 435(2). 421-430. 査読有  
doi: 10.1042/BJ20101708.

〔学会発表〕（計19件）

(1) 向英里、太田毅、河村治清、笹瀬智彦、李恩瑛、森田亜州華、稲垣暢也、岩永敏彦、三木隆司、VEGFシグナル阻害はSDTラットにおける膵島 $\beta$ 細胞障害と糖尿病発症を抑制する、第90回日本生理学会大会、東京、2013(3)

(2) 向英里、太田毅、河村治清、笹瀬智彦、李恩瑛、森田亜州華、稲垣暢也、岩永敏彦、三木隆司、SDTラットでは膵島内のVEGFシグナル亢進が $\beta$ 細胞を障害し糖尿病を引き起こす、第27回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、東京、2013(2)

(3) Mukai E, Ohta T, Kawamura H, Lee EY, Morita A, Inagaki N, Iwanaga T, Miki T. Enhanced VEGF signaling in islets contributes to  $\beta$ -cell injury and consequential diabetes in SDT rats. 9<sup>th</sup> International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress and 4<sup>th</sup> Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes, Kyoto, 2012(11)

(4) Ogura K, Nagashima K, Shoji T, Sato Y, Tahara Y, Yamano G, Sato H, Ogura M, Mukai E, Fujimoto S, Inagaki N. Apple procyanidins improve glucose tolerance in diabetic ob/ob mice. 9<sup>th</sup> International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress and 4<sup>th</sup> Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes, Kyoto, 2012(11)

(5) Sato Y, Fujimoto S, Mukai E, Sato S, Tahara Y, Ogura K, Yamano G, Ogura M, Nagashima K, Inagaki N. Palmitate induces beta-cell dysfunction by activating NADPH oxidase through via the Src kinase signaling. 9<sup>th</sup> International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress and 4<sup>th</sup> Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes, Kyoto, 2012(11)

(6) Zhuang X, Toyoda K, Fujimoto H, Kimura H, Ogawa Y, Mukai E, Ueda M, Temma T, Hirai M, Takagi M, Kon A, Matsuda H, Ono M, Saji H, Inagaki N. Development of 123I-labeled derivative targeting to GLP-1 receptor for insulinoma SPECT imaging. 9<sup>th</sup> International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress and 4<sup>th</sup> Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes, Kyoto, 2012(11)

(7) Sato S, Fujimoto S, Nagashima K, Mukai E, Ogura M, Sato Y, Yamano G, Tahara Y, Ogura K, Sugizaki K, Inagaki N. Src regulates insulin secretion by modulating glucokinase activity in INS-1 cells. 9<sup>th</sup> International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress and 4<sup>th</sup> Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes, Kyoto, 2012(11)

(8) Fujimoto H, Toyoda K, Kimura H, Ogawa Y, Mukai E, Zhuang X, Ueda M, Temma T, Hirai M, Matsuda H, Saji H, Inagaki N. Development of non-invasive PET probe for quantifying pancreatic  $\beta$ -cell mass using

fluorine-18-labeled exendin-4. 9<sup>th</sup> International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress and 4<sup>th</sup> Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes, Kyoto, 2012(11)

(9) 佐々木真弓、藤本新平、西勇一、向英里、佐藤雄一、佐藤広規、田原裕美子、小倉かさね、山野言、長嶋一昭、稲垣暢也、活性酸素種抑制による Warburg 効果改善を介する GK ラットインスリン分泌障害改善効果—癌代謝類似代謝障害制御の重要性—、第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、横浜、2012(5)

(10) 向英里、藤本新平、佐藤広規、小根山千歳、佐藤雄一、佐々木真弓、西勇一、岡田雅人、稲垣暢也、Exendin-4 は GK ラット膵島において Epac 依存性に Src 活性を抑制することにより ROS 産生を減少させる、第 25 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、東京、2011(11)

(11) 藤田義人、細川雅也、藤本新平、Abudukadier Abulizi、小原章央、向英里、小倉雅仁、中村靖彦、長嶋一昭、清野裕、稲垣暢也、eNOS 欠損マウスを用いたメトホルミンによる肝糖新生抑制機序および血糖低下作用機序の解明、第 25 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、東京、2011(11)

(12) Nishi Y, Fujimoto S, Sasaki M, Mukai E, Sato H, Sato Y, Tahara Y, Nakamura Y, Inagaki N. Role of Mitochondrial Phosphate Carrier in Metabolism-Secretion Coupling in Rat Insulinoma Cell Line INS-1. 16<sup>th</sup> Japan-Korea Symposium on Diabetes Mellitus, Tokyo, 2011(10)

(13) Toyoda K, Kimura H, Fujimoto H, Zhuang X, Mukai E, Ogawa Y, Hirao K, Matsuda H, Kawashima H, Ueda M, Temma T, Saji H, Inagaki N. Development of non-invasive PET probe for quantifying pancreatic  $\beta$ -cell mass using fluorine-18-labeled exendin-4. 71<sup>th</sup> Scientific Sessions of American Diabetes Association, San Diego, USA, 2011(6)

(14) Fujimoto H, Toyoda K, Kimura H, Ogawa Y, Mukai E, Zhuang X, Kawashima H, Matsuda H, Hirao K, Saji H, Inagaki N. Non-invasive SPECT imaging of pancreatic islets targeting glucagon-like peptide-1 receptors. 71<sup>th</sup> Scientific Sessions of American Diabetes Association, San Diego, USA, 2011(6)

(15) Shimpei Fujimoto, Eri Mukai, Nobuya Inagaki. Role of endogenous ROS production in metabolism-secretion coupling of pancreatic  $\beta$ -cells. 第54回日本糖尿病学会年次学術集会、札幌、2011(5)

(16) 豊田健太郎、木村寛之、藤本裕之、小川祐、向英里、庄暁桐、河嶋秀和、平尾佳、松田洋和、佐治英郎、稲垣暢也、GLP-1受容体を標的とする非侵襲的イメージングのためのPET用プローブの開発、第54回日本糖尿病学会年次学術集会、札幌、2011(5)

(17) 藤本裕之、豊田健太郎、木村寛之、小川祐、向英里、庄暁桐、河嶋秀和、平尾佳、松田洋和、佐治英郎、稲垣暢也、GLP-1受容体を標的とするSPECT用膵島イメージングプローブの開発、第54回日本糖尿病学会年次学術集会、札幌、2011(5)

(18) 庄暁桐、豊田健太郎、劉喜宝、向英里、藤本裕之、酒井芳紀、古家敷智之、松本邦夫、成宮周、稲垣暢也、マウス同系膵島移植において、ONO-1301はPGI<sub>2</sub>受容体を介する膵 $\beta$ 細胞保護作用によって膵島の生着を改善する、第54回日本糖尿病学会年次学術集会、札幌、2011(5)

(19) 西勇一、藤本新平、佐々木真弓、向英里、佐藤広規、佐藤雄一、田原裕美子、中村靖彦、稲垣暢也、膵 $\beta$ 細胞の代謝分泌連関におけるミトコンドリアリン酸キャリアの役割、第54回日本糖尿病学会年次学術集会、札幌、2011(5)

〔図書〕(計3件)

(1) 向英里、稲垣暢也、低血糖についての新しい知見 1. インクレチン関連薬とスルホニル尿素薬による低血糖、糖尿病学会誌、(社)日本糖尿病学会、査読無、2011、54-12、pp. 874-876

(2) 向英里、稲垣暢也、Clinical Note DPP-4阻害薬とSU薬併用による低血、Diabetes Journal (糖尿病と代謝)、(株)協和企画、2011、39-1、pp. 36-40

(3) 向英里、藤本新平、稲垣暢也、III-5. インクレチン関連薬とSU薬併用時における重症低血糖発症メカニズムとその対策、日本臨床、(株)日本臨床社、2011、69-5 (特集インクレチン関連薬 - 糖尿病治療のパラダイムシフト)、pp. 907-911

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

向英里 (MUKAI ERI)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：60362539

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

