

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2012～2016

課題番号：24229007

研究課題名(和文)メタボロミクスによる膵細胞機能制御機構の解明とその臨床応用

研究課題名(英文)Elucidation of pancreatic beta-cell function by metabolomics and its clinical application

研究代表者

清野 進 (SEINO, Susumu)

神戸大学・医学研究科・特命教授

研究者番号：80236067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 167,600,000円

研究成果の概要(和文)：代謝物の網羅的解析(メタボロミクス)を基にした研究により1)膵細胞のグルタミン酸がインクレチンと呼ばれる腸管ホルモンによるインスリン分泌増強の鍵シグナルであることを発見した。2)膵外分泌細胞由来と線維芽細胞由来のiPS細胞の代謝プロファイルが異なることを示した。3)糖尿病早期診断の新規バイオマーカーの候補として血中のトリプトファンを見出した。また、Epac2Aが糖尿病治療薬スルホニル尿素薬とインクレチンの併用によるインスリン分泌増強に重要であることを明らかにし、さらに、新規糖尿病薬開発につながる可能性のある低分子化合物ジフェニルチオセミカルバジドを同定した。

研究成果の概要(英文)：By metabolomics-based studies, we obtained the following findings: (1) discovery that glutamate acts as a key signal in potentiation of insulin secretion by the gut hormone called "incretin"; (2) difference in metabolic profiling between pancreatic exocrine-derived iPS cells and fibroblast-derived iPS cells; and (3) identification of plasma tryptophan as a candidate biomarker for early diagnosis of type 2 diabetes. In addition, we found that Epac2A in pancreatic beta-cells is critical for the augmenting effect of insulin secretion by combination of anti-diabetic sulfonylurea drug and incretin. We also identified a small molecule diphenylthiosemicarbazide that potentially leads to the development of a novel anti-diabetic drug.

研究分野：代謝学

キーワード：膵細胞 糖・脂質代謝 インスリン分泌 分化・再生 糖尿病 メタボローム解析 代謝シグナル 病態マーカー

1. 研究開始当初の背景

細胞内で生じる代謝反応は、生命活動に必要な化学エネルギーを供給するのみならず、種々の生体反応を引き起こす代謝シグナルを発生させる極めて重要なシステムである。膵細胞では、血糖値の上昇に伴って細胞内に取り込まれるグルコースの代謝によってインスリンを分泌することが最も基本的な細胞機能であることから、インスリン分泌反応における代謝の重要性は明らかである。しかしながら、インスリンの分泌制御、膵細胞の分化・再生、糖尿病の発症や病態において、どのような糖・脂質代謝シグナルがそれらのメカニズムの鍵となっているかは殆ど不明である。

2. 研究の目的

本研究では下記の3つの課題を設定し、特性の異なる膵細胞株、膵島、病態モデル動物やヒトのサンプルを用いて包括的メタボローム解析を行い、上記のメカニズムの鍵となる代謝シグナルを解明する。

1. インスリン分泌における糖・脂質代謝シグナルの同定とその役割の解明
2. 膵細胞分化・再生における糖・脂質代謝シグナルの同定とその役割の解明
3. 糖・脂質代謝シグナルに由来する新たな糖尿病の病態マーカーと治療標的の同定

3. 研究の方法

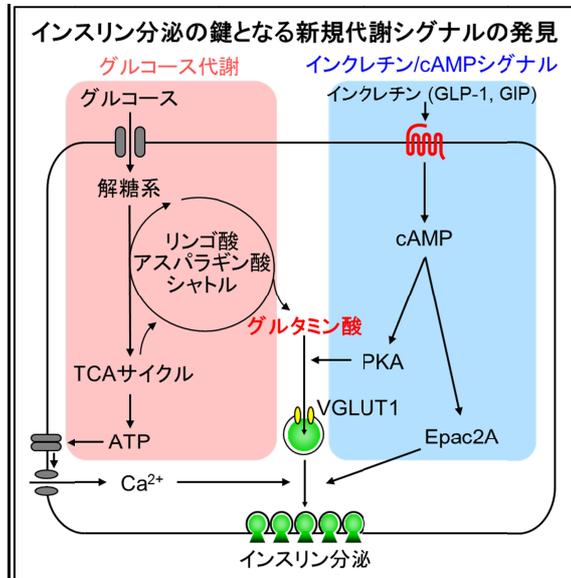
課題1：新たに樹立したインスリン分泌特性の異なる膵細胞株や単離膵島を種々の条件で刺激し、細胞内代謝物の包括的メタボローム解析を行い、新たな代謝シグナルを同定する。さらにシグナル間の相互作用を明らかにし、インスリン分泌における役割を細胞レベル、膵島レベル、個体レベルで解明する。

課題2：任意のタイミングで膵細胞を選択的に標識できるマウスを利用して、正常分化の過程や、病的状態における膵細胞の包括的メタボローム解析を行い、分化・再生における糖・脂質代謝の役割を解明する。

課題3：2型糖尿病の動物モデルおよび正常、境界型、糖尿病のヒトを対象とした包括的メタボローム解析から糖・脂質代謝シグナルに由来する新たな糖尿病の病態マーカーおよび治療標的を同定する。

4. 研究成果

課題1：食事摂取に応じて腸管から分泌されるインクレチン (GLP-1 および GIP) は膵細胞に作用し、cAMP シグナルを介してグルコース濃度依存性にインスリン分泌を増強する。インクレチン/cAMP シグナルは PKA 依存性および Epac2A 依存性経路を介して作用するが、そのグルコース依存性の作用メカニズムは不明であった。本課題では、我々が



確立したインクレチンに応答する膵細胞株 MIN6-K8 とインクレチンに不応答細胞株 MIN6-K20 を用いた比較メタボローム解析により、グルコース依存性にリンゴ酸-アスパラギン酸シャトルを介して産生されるグルタミン酸がインクレチンによるインスリン分泌の鍵となるシグナルであることを発見した (Cell Rep, 2014)。この発見は、長年不明であったインクレチン/cAMP シグナルによるインスリン分泌メカニズムの解明につながるインパクトのある成果であり、メディアでも取り上げられた。

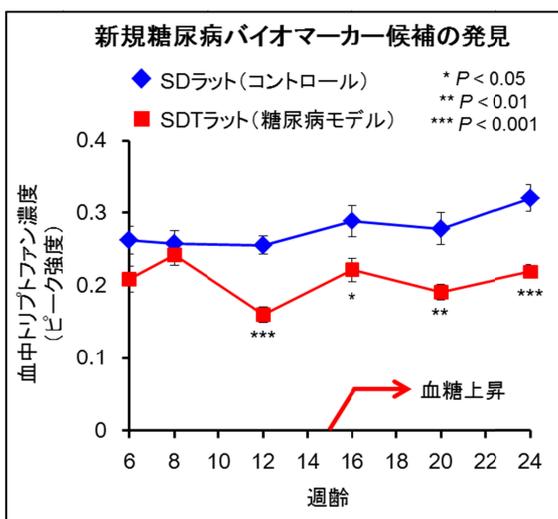
グルタミン酸のインスリン顆粒への取り込みを担うと考えられた膵細胞特異的 VGLUT1 ノックアウトマウスを作製・解析したところ、期待に反してインクレチン応答性インスリン分泌に障害が認められなかった。さらに、本ノックアウトマウスの単離膵島において、VGLUT2 と VGLUT3 遺伝子の発現が見られ、VGLUT1 の欠損を代償している可能性が考えられた。そこで、新規ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システムを用いて VGLUT1, 2, 3 のトリプルノックアウト膵細胞株を作製したところ、インクレチン応答性インスリン分泌がほとんど消失することが判明した (論文投稿中)。この知見は、膵細胞における VGLUTs の役割を明らかにするとともにインクレチン応答性インスリン分泌においてグルタミン酸シグナルが必須であることを示す重要な成果である。

課題2：膵細胞量の変化に関する条件 (タイミング) やメカニズム (増殖か新生か) は殆ど理解されていない。本課題では、我々が開発したタモキシフェンを投与することによって任意のタイミングで膵細胞を標識でき、膵細胞量制御における自己複製 (増殖) と新生 (neogenesis) を区別して解析することができる Ins2-CreER/R26R-YFP ダブルノックインマウスを用いた解析から、糖尿病治療薬として使用されている GLP-1

受容体作動薬が糖尿病状態でダメージを受けた膵細胞機能を正常化するとともに、その増殖を促進し細胞死を抑制するという知見を得た(PLoS One, 2015)。GLP-1受容体作動薬の機能発現に關与する代謝シグナルが明らかになれば、細胞代謝という新たな観点から膵細胞の分化・再生の理解が進み、細胞の質的および量的改善という糖尿病の新規な再生治療に結びつくことが期待される。

また、膵細胞の初期化や分化に伴う代謝変化については不明な点が多い。我々は、再生膵細胞の移植治療への適用を見据えて膵外分泌細胞からiPS細胞を樹立し、線維芽細胞に由来するiPS細胞とは代謝プロファイルと自律的分化能が異なることを見出し、これらの相違には由来細胞のエピジェネティックメモリーが關与する可能性を示した(Genes Cells, 2015)。iPS細胞から膵細胞への効率的な分化を実現するために考慮すべき重要な知見である。

課題3：糖尿病の発症・進展を予防するには、早期の病態を鋭敏に反映するバイオマーカーが必要である。本課題では、日本人を含むアジア人に多いインスリン分泌不全型糖尿病のモデルであるSDTラットを用いた経時的メタボローム解析により、糖尿病発症前から血中のトリプトファンおよびその代謝物が低値を示すことを見出した(Metabolomics, 2015)。血糖値やHbA1c以外の全く新しい糖尿病バイオマーカーとなる可能性があり、糖尿病の発症予防や病態診断のプレイクスルとなるだけでなく、糖尿病の新たな治療標的となるものと期待される。



前述の課題1において発見したインクレチンによるインスリン分泌の鍵となるグルタミン酸シグナルの下流にはPKA依存性およびEpac2A依存性の経路が存在する。以前我々は、Epac2Aが糖尿病治療薬であるスルホニル尿素(SU)薬の直接的な標的であることを発見した(Science, 2009)。本課題では、

Epac2AにおけるSU薬の結合部位を同定し、SU薬とcAMPが協調的にEpac2Aを活性化することを明らかにした(Sci Signal, 2013)。さらに、Epac2Aを介したSU薬とインクレチンの相互作用が両者の併用によるインスリン分泌増強において重要であること、SU薬の種類(構造)によりEpac2Aとの結合様式が異なり、インクレチンとの併用効果に違いがあることも明らかになった(Diabetes, 2015)。SU薬とインクレチン関連薬の併用は、多くの2型糖尿病患者の血糖改善に効果があるが、重篤な低血糖を来す症例も報告されている。一方、SU骨格を持たずEpac2Aを特異的に活性化する化合物は低血糖を誘発しないと考えられることから、Epac2Aを介したインスリン分泌機構の解明は安全かつ有効な糖尿病治療のために極めて重要である。

さらに、インシリコ類似検索と構造活性相関をもとにしたアプローチによりSU骨格を持たずEpac2Aを特異的に活性化する化合物を探索した。その結果、インスリン分泌促進作用を有する新規低分子化合物としてジフェニルチオセミカルバジドを同定し、メタボロミクスによる血中薬物動態の解析から従来のSU薬と異なる特性を有することを明らかにし、新規糖尿病治療薬開発のリード化合物となる可能性を示した(PLoS One, 2016)。

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 84 件)

Sugawara K, Honda K, Reien Y, Yokoi N, Seki C, Takahashi H, Minami K, Mori I, Matsumoto A, Nakaya H, Seino S. A novel diphenylthiosemicarbazide is a potential insulin secretagogue for anti-diabetic agent. **PLoS One** 11:e0164785, 2016 (doi: 10.1371/journal.pone.0164785) (査読有り)

Asahara S, Etoh H, Inoue H, Teruyama K, Shibusaki Y, Ihara Y, Kawada Y, Bartoleme A, Mashimoto N, Matsuda T, Koyanagi-Kimura M, Kanno A, Hirota Y, Hosooka T, Nagashima K, Nishimura W, Inoue H, Matsumoto M, Higgins MJ, Yasuda K, Inagaki N, Seino S, Kasuga M, Kido Y. Paternal allelic mutation at the *Kcnq1* locus reduces pancreatic β cell mass via epigenetic modification of *Cdkn1c*. **Proc Natl Acad Sci USA** 112:8332-8337, 2015 (doi: 10.1073/pnas.1422104112) (査読有り)

Yokoi N, Beppu M, Yoshida E, Hoshikawa R, Hidaka S, Matsubara T, Shinohara M, Irino Y, Hatano N, Seino S. Identification of putative biomarkers for prediabetes by metabolome analysis of rat models of type 2 diabetes. **Metabolomics** 11:1277-1286, 2015 (doi: 10.1007/s11306-015-0784-9) (査読有り)

Nukaya D, Minami K, Hoshikawa R, Yokoi N, Seino S. Preferential gene expression and epigenetic memory of induced pluripotent stem cells derived from mouse pancreas. **Genes Cells** 20:367-381, 2015 (doi: 10.1111/gtc.12227) (査読有り)

Takahashi H, Shibasaki T, Park JH, Hidaka S, Takahashi T, Ono A, Song DK, Seino S. Role of Epac2A/Rap1 signaling in interplay between incretin and sulfonylurea in insulin secretion. **Diabetes** 64:1262-1272, 2015 (doi: 10.2337/db14-0576) (査読有り)

Tamura K, Minami K, Kudo M, Iemoto K, Takahashi H, Seino S. Liraglutide improves pancreatic beta cell mass and function in alloxan-induced diabetic mice. **PLoS One** 10:e0126003, 2015 (doi: 10.1371/journal.pone.0126003) (査読有り)

Gheni G, Ogura M, Iwasaki M, Yokoi N, Minami K, Nakayama Y, Harada K, Hastoy B, Wu X, Takahashi H, Kimura K, Matsubara T, Hoshikawa R, Hatano N, Sugawara K, Shibasaki T, Inagaki N, Bamba T, Mizoguchi A, Fukusaki E, Rorsman P, Seino S. Glutamate acts as a key signal linking glucose metabolism to incretin/cAMP action to amplify insulin secretion. **Cell Rep** 9:661-673, 2014 (doi: 10.1016/j.celrep.2014.09.030) (査読有り)

Takahashi T, Shibasaki T, Takahashi H, Sugawara K, Ono A, Inoue N, Furuya T, Seino S. Antidiabetic sulfonylureas and cAMP cooperatively activate Epac2A. **Sci Signal** 6:ra94, 2013 (doi: 10.1126/scisignal.2004581) (査読有り)

Uenshi E, Shibasaki T, Seki C, Hamaguchi H, Yasuda T, Tatebe M, Oiso Y, Takenawa T, Seino S. Actin dynamics regulated by the balance of neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) and cofilin activities determines the biphasic response of glucose-induced insulin secretion. **J Biol Chem** 288:25851-25864, 2013 (doi: 10.1074/jbc.M113.464420) (査読有り)

Kim M, Platt M, Shibasaki T, Quaggin S, Backx PH, Seino S, Simpson J, Drucker DJ. GLP-1 receptor activation and Epac2 link atrial natriuretic peptide secretion to control of blood pressure. **Nat Med** 19:567-575, 2013 (doi: 10.1038/nm.3128) (査読有り)

[学会発表] (計 156 件)

Seino S. Beta-cell signaling and insulin secretagogues – A path to improved diabetes treatment. Donald Steiner Memorial Lecture, 18th Servier-IGIS

Symposium: Beta-cell signaling revisited (St. Jean-Cap-Ferrat, France) March 25, 2017 (招待講演)

Seino S. Mechanisms of cell signaling in insulin-secretion and its clinical implications. 17th International Congress of Endocrinology (Beijing, People's Republic of China) September 2, 2016 (招待講演・プレナリーレクチャー)

Seino S, Takahashi H. Roles of K_{ATP} channels in brain/islet axis. The 21st European Association for the Study of Diabetes (EASD)–Hagedorn Oxford Workshop (Oxford, United Kingdom) August 7, 2016 (招待講演)

Seino S. Second messenger in potentiating insulin secretion. American Diabetes Association 76th Scientific Sessions (New Orleans, USA) June 13, 2016 (招待講演)

Seino S. Cell signaling in insulin secretion: Novel mechanisms of cAMP action. 2014 Keystone Symposium on Challenges and Opportunities in Diabetes Research and Treatment (Vancouver, Canada) January 16, 2014 (招待講演)

Seino S. The signals that strengthen beta-cells: toward better understanding and treatment of diabetes. 2013 International Diabetes Federation World Diabetes Congress (Melbourne, Australia) December 4, 2013 (招待講演)

Seino S. Mechanisms of cell signaling in insulin secretion. Gordon Research Conferences 2013 (South Hadley, Massachusetts, USA) July 23, 2013 (招待講演)

Seino S. The malate-aspartate shuttle is essential for incretin-induced insulin secretion. Beta-cell Workshop 2013 Kyoto (Kyoto, Japan) April 26, 2013 (招待講演)

[図書] (計 9 件)

Seino S, Shibasaki T, Minami K. β -cell biology of insulin secretion. **International Textbook of Diabetes Mellitus. 4th edition**. DeFronzo RA, Ferrannini E, Alberti KGMM, Zimmet P (eds), Wiley, UK, pp96-107, 2015 (doi: 10.1002/9781118387658)

〔産業財産権〕

出願状況（計 2 件）

名称：新規糖尿病治療剤
発明者：清野 進、菅原健二、森 一郎、松本明郎、壺園良恵
権利者：JCR ファーマ株式会社、国立大学法人神戸大学、国立大学法人千葉大学
種類：物質特許
番号：特願 2016-170346
出願年月日：2016 年 8 月 31 日
国内外の別：国内

名称：質量分析装置を用いたプログラニューリンおよびグラニューリンペプチドの定量分析方法、および分析用プログラム
発明者：松原稔哉、平野一郎、小倉泰郎、清野 進
権利者：株式会社島津製作所、国立大学法人神戸大学
種類：用途特許
番号：特願 2013-121292
出願年月日：2013 年 6 月 7 日
国内外の別：国内

〔その他〕

受賞等

横井伯英：日本糖尿病学会 リリー賞
2015年5月21日

清野 進：第50回エルウィン・フォン・ベルツ賞 1等賞 2013年10月16日

報道等

「血糖値 グルタミン酸が鍵 インスリン分泌促す 神戸大教授ら解明 糖尿病新薬に道」毎日新聞（朝刊）2014 年 10 月 20 日

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/phys1/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

清野 進 (SEINO, Susumu)
神戸大学・大学院医学研究科・特命教授
研究者番号：80236067

(2)研究分担者

横井 伯英 (YOKOI, Norihide)
神戸大学・大学院医学研究科・特命准教授
研究者番号：70311610

(3)連携研究者

南 幸太郎 (MINAMI, Kohtaro)

神戸大学・大学院医学研究科・客員准教授
研究者番号：80334176

柴崎 忠雄 (SHIBASAKI, Tadao)
神戸大学・大学院医学研究科・客員准教授
研究者番号：00323436

矢部 大介 (YABE, Daisuke)
神戸大学・大学院医学研究科・客員准教授
研究者番号：60378643