

平成 27 年 4 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591325

研究課題名(和文) グルコース応答性およびインクレチン促進性インスリン分泌機構における分子機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of molecular mechanism of glucose- and incretin-stimulated insulin secretion

研究代表者

原島 伸一 (Harashima, Shinichi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80444793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：SPHKAPがインスリン分泌に与える影響を検討した。SPHKAPの発現はqRT-PCR法及びウエスタンブロット法により、細胞内局在は免疫染色及び電子顕微鏡解析により検討した。INS-1D細胞と単離膵島を用いてSPHKAPがグルコースおよびエキセンジン-4応答性インスリン分泌に与える影響を評価した。SPHKAPは膵細胞に高発現し、インスリン分泌顆粒に局在していた。INS-1D細胞および単離膵島を用いた検討では、SPHKAPの過剰発現によりグルコースおよびエキセンジン-4応答性インスリン分泌は抑制され、低発現により増強された。以上からSPHKAPは、インスリン分泌を抑制することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We examined the role of SPHKAP in glucose- and exendin-4-stimulated insulin secretion. Quantitative real-time PCR and western blot showed that SPHKAP was highly expressed in beta-cells. Immunoprecipitation showed that SPHKAP interacted with PKA-R1 subunit but not with PKA-R11 subunit in SPHKAP-overexpressed HEK293 and INS-1D cells. Immunohistochemical staining revealed that SPHKAP was localized in beta-cells and not in alpha-cells of islets from Wistar rats, C57BL/6 mice and human. Confocal microscopy and electron microscopy analysis clarified that SPHKAP was co-localized with insulin secretory granules. Overexpression of SPHKAP decreased glucose-stimulated insulin secretion by about 50% and exendin-4-stimulated insulin secretion by about 35%. Knock down of endogenous SPHKAP resulted in about 1.5-fold increase in glucose- and exendin-4-stimulated insulin secretion. These results demonstrate that SPHKAP is localized on insulin secretory granules, and inhibits insulin secretion.

研究分野：糖尿病

キーワード：糖尿病 インスリン分泌 分泌顆粒

## 1. 研究開始当初の背景

経口摂取により誘導される腸管由来のインスリン分泌促進ホルモンをインクレチンという。インクレチンとして gastric inhibitory polypeptide(GIP) と glucagon-like peptide-1(GLP-1)の2つの消化管ホルモンが同定されている。糖尿病では、GIPによるインスリン分泌増強作用が低下していることが明らかとなり、主に GLP-1 の作用を標的とした GLP-1 受容体作動薬や DPP-4 阻害薬が糖尿病治療薬として広く用いられている。京都大学糖尿病・栄養内科では30年以上前から GIP を中心としたインクレチンの研究に携わり、GIP の cDNA(Takeda J. Proc Natl Acad Sci USA 84:7005-8, 1987)や遺伝子の構造決定(Inagaki N. Mol. Endocrinol. 3: 1014-21, 1989)ならびに GIP 受容体の cDNA 構造の決定(Yasuda K. Biochem. Biophys. Res. Commun. 205:1556-62, 1994)、受容体欠損マウスの作製(Miyawaki K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:14843-7, 1999)など、この分野の研究をリードしてきた。しかし今尚、インクレチンが血糖依存性にインスリン分泌を増強する分子機序は十分に解明されていない。マウス臍灌流実験において、グルコース濃度を少しずつ段階的に上昇させてもインスリン分泌はほとんど惹起されないが、GLP-1 存在下ではグルコース濃度の段階的な上昇に伴ってインスリン分泌が惹起される。食事の摂取により血糖値が上昇すると同時にインクレチン濃度も上昇することを考えると、このインクレチンによるグルコース濃度依存性のインスリン分泌誘導は、血糖値の維持に大変重要な役割を担っている。

膵β細胞では、インクレチンはその受容体を介して細胞内 cAMP 濃度を上昇させインスリン分泌を増強するが、PKA と Epac2 が cAMP シグナル伝達の主要分子である。Epac2 は、下流シグナルである Rap1 を介し

てインスリン分泌を増強する。一方、PKA は、SUR1 または VDCC をリン酸化してそれぞれのチャネルの活性を制御したり、細胞外からの  $Ca^{2+}$  の流入を増加させたり、インスリン顆粒開口分泌に関与する蛋白質をリン酸化するなどによりインスリン分泌を調節するとされている。しかし、その分子機序は明らかでない。PKA が様々な作用してインスリン分泌を制御するには、PKA が適切に細胞内に局在することが重要であり、PKA の調節サブユニットと結合する AKAPs(A-kinase anchoring proteins)が、細胞膜、小胞体、エンドソーム、核周囲のマトリックスなど PKA の様々な領域への局在を決定し、PKA の細胞内領域特異的な作用を制御するとされている。しかし、APKAs ファミリーには70分子以上が報告されており、インスリン分泌に関して中心的な役割を果たしている AKAPs は不明である。PKA は2つの調節サブユニットと2つの触媒サブユニットから構成され、調節サブユニットはIとIIの2種類がある。最近、PKA 調節サブユニット I(PKA-RI) を欠損したマウスでは、グルコース応答性インスリン分泌や GLP-1 によるインスリン分泌増強作用が大きく障害されることが報告された(Song WJ. Cell Metabolism 13:308-19, 2011)。ほとんどの AKAPs が PKA 調節サブユニット II(PKA-RII)と結合するのに対し、SPHKAP(SPHK1 interactor, AKAP containing domain)は、その機能は不明だが、ヒトにおいて唯一 PKA-RI と結合する AKAP として報告されている。そこで、本研究では、SPHKAP が、PKA を介するインスリン分泌、特にインクレチンによるインスリン分泌増強に関与しているとの仮説を立て、検証した。

## 2. 研究の目的

本研究では、グルコース応答性およびインクレチン促進性インスリン分泌における PKA 依存性インスリン分泌機構の分子機序を、70分子以上ある AKAPs の中でも唯一 PKA-RI

と特異的に結合する SPHKAP に焦点を当て解明することを目的とした。インスリン分泌に cAMP/PKA 経路が重要であることは長く認識されているが、そのシグナル伝達機序は未だ明らかでない。しかし PKA-RI がインスリン分泌に重要であることが報告されたことから、SPHKAP が PKA 依存性インスリン分泌増強機構に重要な役割を果たしていることが想定された。

### 3. 研究の方法

#### (1) 膵β細胞における SPHKAP の発現

70 分子以上存在するとされている AKAPs の中でも SPHKAP が、他の AKAPs に比し最も多く primary islets、膵β細胞株である INS-1 細胞や RIN-5 細胞に発現している AKAPs であることを、quantitative real time PCR で明らかにした。また、SPHKAP 特異的抗体が市販されておらず蛋白レベルでの発現は実証できないことから、SPHKAP 特異抗体を独自に作成し、primary islets や膵β細胞株での SPHKAP のタンパク発現レベルをウエスタンブロット法にて検討した。さらに、膵島および膵β細胞内における SPHKAP の局在を、作成した抗体を用いて免疫染色法や電子顕微鏡解析により検討した。

#### (2) SPHKAP と PKA の相互作用の検討

上記で作成した抗体を用いて、免疫沈降法により相互作用を確認した。

#### (3) SPHKAP がインスリン分泌に及ぼす影響

SPHKAP がインスリン分泌に与える影響を検討するため、齧歯類 primary islets と同等の SPHKAP 発現レベルを有する INS-1 細胞および RIN-5 細胞において、siRNA を用いて RNA 干渉実験を行い、グルコース応答性インスリン分泌およびインクレチン(エキセソジン-4)促進性インスリン分泌を検討した。次に、同細胞株にプラスミドベクターを用い

て SPHKAP を過剰発現させ、グルコースやエキセソジン-4 によるインスリン分泌反応を検討した。

さらに、ウイルスベクターを用い、より効率的に miRNA により SPHKAP を低発現させたり、あるいは、遺伝子導入により SPHKAP を過剰発現させたりして、INS-1D 細胞でグルコース応答性インスリン分泌やエキセソジン-4 促進性インスリン分泌を検討した。

#### (4) SPHKAP と相互作用する分子群の探索

ヒト SPHKAP は 1700 アミノ酸からなる比較的大きな分子で、PKA 調節性サブユニット結合部位を有するのみでなく、AKAPs の一般的な特徴として他のシグナル分子と結合する部位を有する。SPHKAP は Sphingosine kinase type 1 (SPHK-1) と相互作用する分子とされているが、実際には膵β細胞における相互作用は明らかでなく、また、他の分子と相互作用する可能性がある。そこで、独自に作成した SPHKAP 抗体を用いて免疫沈降法を行い、SPHKAP と結合する分子群を探索した。さらに、Yeast two-hybrid 法により、SPHKAP 結合分子の同定を考慮した。

### 4. 研究成果

(1) 膵β細胞における SPHKAP の発現  
qRT-PCR 法では、INS-1D 細胞とラットおよびマウス膵島で SPHKAP が高発現していた(図 1)。心臓、腎臓、肝臓、筋肉などの他の組織および線維芽細胞などの他の細胞株では SPHKAP の発現は認められなかった。また、ウエスタンブロット法により、蛋白レベルでも同様に SPHKAP が膵島において高発現していることが確認された(図 2)。

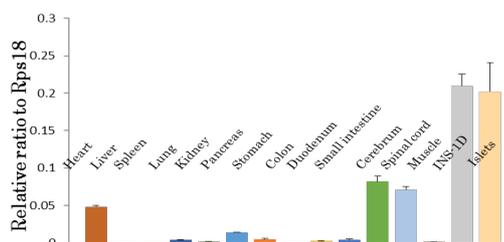


図1 qRT-PCR法によるSPHKAPの発現

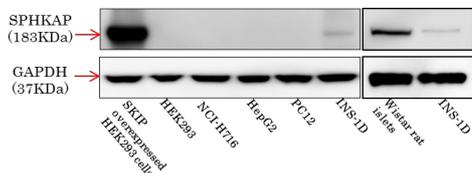


図2 ウェスタンブロット法によるSPHKAPの発現

免疫染色法では、SPHKAPは $\alpha$ 細胞には発現しておらず、 $\beta$ 細胞に特異的に発現していた(図3)。また、電子顕微鏡を用いた解析により、SPHKAPはインスリン分泌顆粒に局在していた(図4)。

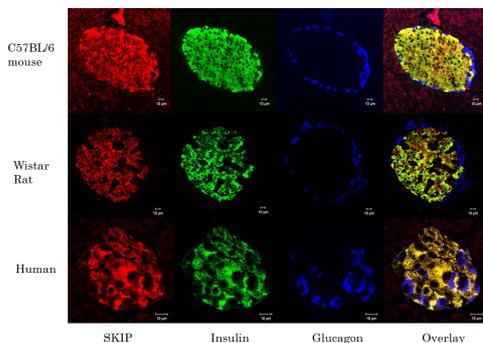


図3 免疫染色

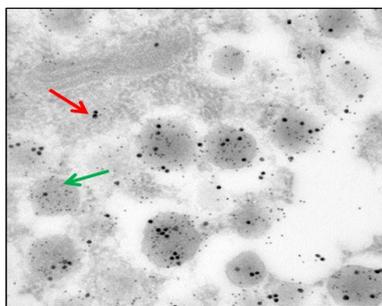


図4 電子顕微鏡解析(2重染色)

## (2) SPHKAPとPKAの相互作用

免疫沈降法により、SPHKAP過剰発現HEK293細胞およびINS-1D細胞にて、SPHKAPとPKA-RIサブユニットの結合が確認された(図5)。一方、PKA-RIIサブユニットへの結合は認められず、SPHKAPはPKA-RIサブユニットに特異的に結合することが確認できた。

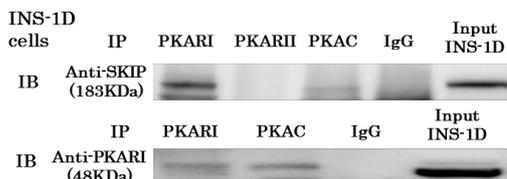


図5 免疫沈降法

## (3) SPHKAPがインスリン分泌に及ぼす影響の検討

SPHKAP発現ベクターを用いてINS-1D細胞にSPHKAPを過剰発現させたところ、コントロール細胞に比べグルコース応答性分泌は約50%、エキセンジン-4応答性インスリン分泌は約60%抑制された(図6)。一方、INS-1D細胞および単離膵島においてRNA干渉法によりSPHKAPの発現をノックダウンしたところ、コントロールに比べグルコース応答性およびエキセンジン-4応答性インスリン分泌が約1.5倍増強された(図7)。ウイルスベクターを用いた検討でも同様の結果であった。このことから、SPHKAPはインスリン分泌を負に調節していることが明らかとなった。

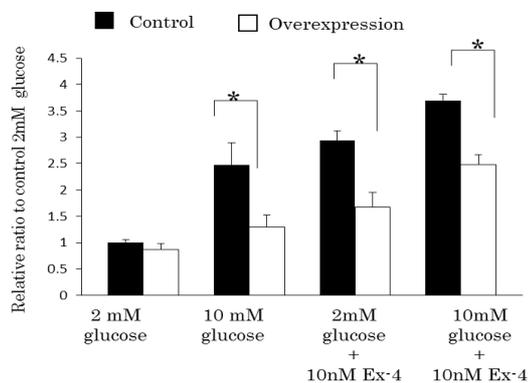


図6 SPHKAP過剰発現によるインスリン分泌

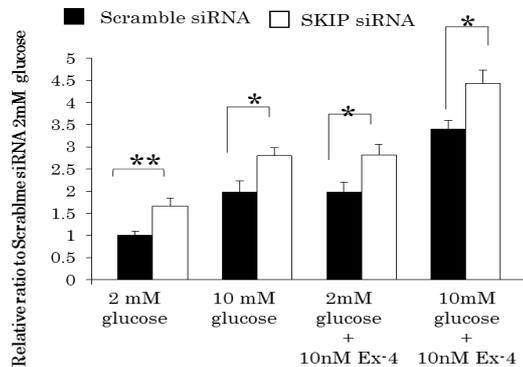


図7 SPHKAP低発現によるインスリン分泌

以上から、SPHKAPは、インスリン分泌顆粒に局在し、グルコース応答性インスリン分泌およびエキセンジン-4応答性インスリン分泌を抑制することが明らかとなった。

(4) SPHKAP と相互作用する分子の検出  
独自に作成した SPHKAP 抗体を用いて免疫沈降法とペプチドシーケンスにより SPHKAP と相互作用する分子の検出を試みたが、われわれの作成できた SPHKAP 抗体は免疫沈降用の抗体としては十分に機能しなかったため、SPHKAP に結合する新規分子の発見はできなかった。そこで、Yeast two-hybrid 法により SPHKAP 結合分子の同定を開始した。

#### 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 10 件)

- 1) Yamamoto T, Horiuchi T, Miyahara H, Yashizawa S, Maehara J, Shono E, Takamura K, Tsujioka K, Kaneko T, Uemura N, Suzawa K, Inagaki N, Umegaki N, Kasamatsu Y, Arinobu Y, Inoue Y, Niuro H, Kashiwagi Y, Harashima S, Tahira T, Tsukamoto H, Akashi K. Hereditary angioedema in Japan: Genetic analysis of 13 unrelated cases. *Am J Med Sci* 2012;343(3):210-214.
- 2) Yamane S, Harada N, Hamasaki A, Muraoka A, Joo E, Suzuki K, Nasteska D, Tanaka S, Ogura M, Harashima S, Inagaki N. Effect of glucose and meal ingestion on incretin secretion in Japanese subjects with normal glucose tolerance. *J Diabetes Invest* 2012;3(1):80-85.
- 3) Harashima S, Ogura M, Tanaka D, Fukushima T, Wang Y, Koizumi T, Aono M, Murata Y, Seike M, Inagaki N. Sitagliptin add-on to low dosage sulphonylureas: efficacy and safety of combination therapy on glycaemic control and insulin secretion capacity in type 2 diabetes. *Int J Clin Pract*. 2012;66(5):465-476.
- 4) Harashima S, Tanaka D, Yamane S, Ogura M, Fujita Y, Murata Y, Seike M, Koizumi T, Aono M, Wang Y, Inagaki N. Efficacy and safety of switching from basal insulin to sitagliptin in Japanese type 2 diabetes patients. *Horm Metab Res*. 2013;45(3):231-218.
- 5) Harashima S, Fukushima T, Sasaki M, Nishi Y, Fujimoto S, Ogura M, Yamane S, Tanaka D, Harada N, Hamasaki A, Nagashima K, Nakahigashi Y, Seino Y, Inagaki N. Self-monitoring of blood glucose (SMBG) improves glycemic control in oral hypoglycemic agents (OHA)-treated type 2 diabetes (SMBG-OHA Study). *Diabetes Metab Res Rev*. 2013;29(1):77-84.
- 6) Hosokawa M, Hamasaki A, Nagashima K, Harashima S, Toyoda K, Fujita Y, Harada N, Nakahigashi Y, Fujimoto S, Inagaki N. Lack of goal attainment regarding the low-density lipoprotein cholesterol level in the management of type 2 diabetes mellitus. *Intern Med*. 2013;52(21):2409-2415.
- 7) Nishimura A, Harashima S, Honda I, Shimizu Y, Harada N, Nagashima K, Hamasaki A, Hosoda K, Inagaki N. Color record in self-monitoring of blood glucose improves glycemic control by better self-management. *Diabetes Technol Ther*. 2014;16(7):447-453.
- 8) Harashima SI, Nishimura A, Osugi T, Wang Y, Liu Y, Takayama H, Inagaki N. Restless legs syndrome in patients with type 2 diabetes: effectiveness of pramipexole therapy. *BMJ Support Palliat Care*. 2014.
- 9) Ikeda K, Fujimoto S, Morling B, Ayano-Takahara S, Carroll AE, Harashima S, Uchida Y, Inagaki N. Social orientation

and diabetes-related distress in Japanese and American patients with type 2 diabetes. PLoS One. 2014;9(10):e109323.

- 10) Ayano-Takahara S, Ikeda K, Fujimoto S, Hamasaki A, Harashima S, Toyoda K, Fujita Y, Nagashima K, Tanaka D, Inagaki N. Glycemic variability is associated with quality of life and treatment satisfaction in patients with type 1 diabetes. Diabetes Care. 2015;38(1):e1-2.

〔学会発表〕(計 7件)

- 1) Wang, Y., Harashima S., Yamane, S., Inagaki, N. SKIP Inhibits Glucose-Stimulated and Incretin-enhanced Insulin Secretion. 9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress / 4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes. 2012/11/25, Kyoto Japan.
- 2) Y. Wang, S. Harashima, S. Yamane, K. Suzuki, N. Harada, N. Inagaki. SKIP inhibits glucose-stimulated and incretin-enhanced insulin secretion. Pancreatic  $\beta$ -cell ~Mini-Symposium~. 2013/1/18, Shiga, Japan.
- 3) 王宇、原島伸一、山根俊介、鈴木和代、原田範雄、稲垣暢也。SKIP はグルコース応答性およびエキセジン-4 促進性インスリン分泌。第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会。2013/5/16, 熊本
- 4) 田中大祐、長嶋一昭、原島伸一、小泉昭夫、稲垣暢也。日本人糖尿病多発家系における、全エクソンシーケンスを用いた糖尿病発症原因遺伝子同定の試み。第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会。2013/5/26, 熊本。
- 5) Y. Wang, S.-I. Harashima, S. Yamane, K. Suzuki, N. Harada, Y.-Y. Liu, N. Inagaki. Sphingosine kinase 1 interacting protein (SKIP) inhibits insulin secretion from beta cells through regulation of protein kinase A activity. 49th EASD Annual Meeting, Barcelona. Sep 26, 2013, Barcelona, Spain.
- 6) Y. Wang, S. Harashima, Y. Liu, S. Yamane, K. Suzuki, N. Harada, N. Inagaki. Sphingosine kinase 1 interacting protein (SKIP) inhibits insulin secretion from beta cells through regulation of protein kinase A activity. 5th Asian Association of the Study for Diabetes. 2013/11/7, Seoul, Korea.
- 7) D. Tanaka, K. Nagashima, S. Harashima, N. Inagaki. Whole exome sequencing in a Japanese family with highly aggregated type 2 diabetes. 5th Asian Association of the Study for Diabetes. 2013/11/8, Seoul,

Korea.

〔図書〕(計 10件)

1. 原島伸一，稲垣暢也。インクレチン関連薬の意義と今後の使い方。Prog Med 2012;32:1791-1797.
2. 原島伸一，稲垣暢也。糖尿病治療戦略の新たな潮流と課題 - インクレチン関連薬を中心に - 。薬局 2012;63:15-22.
3. 原島伸一，稲垣暢也。新薬展望 - 糖尿病治療薬 - 。医薬ジャーナル 2013;49:197-208.
4. 原島伸一，稲垣暢也。インクレチン関連薬 +  $\alpha$ ；インクレチン関連薬の特徴を知る。日本医事新報 2013;4653:8-10.
5. 原島伸一，稲垣暢也。インクレチン関連薬 +  $\alpha$ ；DPP-4 阻害薬・GLP-1 受容体作動薬，どの場面で使うか。日本医事新報 2013;4653:11.
6. 原島伸一，稲垣暢也。インクレチン関連薬 +  $\alpha$ ；エビデンスと今後の展望。日本医事新報 2013;4653:25-28.
7. 原島伸一，稲垣暢也。2 型糖尿病の薬物療法のアルゴリズムと将来展望。Medical Practice 2013;30(5):734-745.
8. 原島伸一。2 型糖尿病；疾患の理解編。Clinical Study 2013;34(7):41-48.
9. 原島伸一。糖尿病治療 Q&A；DPP-4 阻害薬はどのような患者に適していますか？治療 2014;96(6):974-976.
10. 原島伸一，稲垣暢也。インクレチン関連薬の基礎：作用喜寿と臨床効果。月刊糖尿病 2014;6(2):24-30.

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕ホームページ等

[http://metab-kyoto-u.jp/to\\_doctor/achieve\\_2013.html](http://metab-kyoto-u.jp/to_doctor/achieve_2013.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原島伸一 (HARASHIMA, shinichi)

研究者番号：80444793