

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790211

研究課題名(和文) インクレチン刺激による 細胞インスリン分泌制御機構の数理モデル化とその定量的解析

研究課題名(英文) Modeling analysis on the molecular mechanisms underlying insulintropic effects of incretin hormone in pancreatic beta cells.

研究代表者

竹田 有加里 (Takeda, Yukari)

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号：20582159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：膵細胞から分泌されるインスリンは血糖値の恒常性維持を担う重要なホルモンである。腸管ホルモン、glucagon-like peptide-1 (GLP-1) は、インスリン分泌を相乗的に増強するが、その経路には細胞膜および細胞内の多くの要素が複雑に関与しており、総合的なメカニズムの解明は依然として困難である。本研究は、これまで膨大に蓄積された医学生物学研究成果を数理細胞モデルに組み込み、細胞機能をコンピュータ上に再現させた。また、シミュレーション実験や数値解析を行い、GLP-1による活動電位や細胞内Ca²⁺動態の変動に関与する細胞内各要素の役割とその寄与の大きさを定量的・総合的に解析した。

研究成果の概要(英文)：Upon elevation of plasma glucose concentration, pancreatic β -cells generate bursts of action potentials to induce cyclic changes in $[Ca^{2+}]_i$ and regulate pulsatile insulin release. This glucose-dependent insulin secretion is synergistically enhanced by an incretin hormone, GLP-1. To date, it has been well established that GLP-1 increases $[cAMP]$ and subsequently activates PKA and Epac, modulating the activities of ion channels at the plasma membrane and ER, which in turn modify the pattern of burst as well as Ca²⁺ mobilization events. However, because of complex interactions between multiple cellular factors and ion channels or transporters involved in the GLP-1 effects, quantitative aspects of the molecular mechanisms have not yet been determined. In order to overcome this difficulty, we adopted a strategy of modeling analysis; simulation study and mathematical analysis, and quantitatively investigated the mechanisms underlying the GLP-1 effects on cellular functions.

研究分野：医歯薬学

キーワード：受容体・細胞内シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

細胞は血糖濃度に応じて活動電位を発生させ、それに伴う $[Ca^{2+}]_i$ の周期的変動がインスリンの拍動性分泌を調節している。細胞の血糖濃度に対する細胞応答は、様々な神経伝達物質やホルモンの刺激により調整されている。例えば、腸管から分泌されるGLP-1は、細胞膜にあるGタンパク共役受容体を刺激し、ACを活性化させ、cAMP濃度 $[cAMP]$ を上昇させる。 $[cAMP]$ の上昇は、PKAやEpacを活性化し、細胞膜や小胞体に発現する多種のイオンチャンネルの活動を修飾することによって活動電位や $[Ca^{2+}]_i$ 動態に変動を齎し、また、開口分泌に関与するさまざまな蛋白質の活動を直接修飾することで、glucose糖刺激による細胞のインスリン分泌を相乗的に増強させる。GLP-1は二型糖尿病性膵島のインスリン分泌を十分に促進することから、GLP-1補充治療が有効な糖尿病治療法であることが示唆されて以来、GLP-1によるインスリン分泌増強効果の解明にむけて数多くの研究が行われ、これまで膨大な数の実験データが蓄積されてきた。しかし、インスリン分泌機構には、上記一連の細胞内要素が相互に、また複雑に影響しあうため、インクレチン刺激によって惹起された細胞機能変化を齎すそれぞれの要素の役割とその寄与の大きさを、総合的・定量的に解明することは依然として困難であった。

2. 研究の目的

本研究では、これまで膨大に蓄積された医学生物学研究成果をもとに、より正確な数理細胞モデルを完成させ、コンピューターシミュレーションや数値解析法を用いて、GLP-1刺激による活動電位や細胞内 Ca^{2+} 動態の変動に関与する細胞内各要素の役割とその寄与の大きさの定量的・総合的な解明をねらう。

3. 研究の方法

Microsoft Visual studioのプラットフォームで、まず、細胞モデルの精緻化し、GLP-1刺激によるcAMP制御モデルを実装する。次に、(1)PKA・Epacを介するイオンチャンネルの活性修飾をモデリングし、GLP-1刺激による膜興奮性の上昇効果をシミュレーションで検証するとともに、そのイオンメカニズムをリードポテンシャル解析法で解明する。また、(2)PKA・Epacで活性化されるイノシトール三リン酸受容体(IP3R)をモデル化し、簡略細胞モデルをもちいて、GLP-1刺激下で発生するカルシウム動員のメカニズムを分岐解析法やInstantaneous Equilibrium (IE) Analysisで明らかにする。

4. 研究成果

(1)GLP-1シグナル伝達モデルを組み込んだ細胞モデルのL-type Ca^{2+} チャンネル(LTCC、図1)・voltage-dependent K^+ channels

(Kv、図2)のPKA依存性と、ATP-sensitive K^+ channels (KATP)・nonselective cation channel (ISOC)のEpac依存性をモデル化することで(data省略)、GLP-1刺激時におけるバーストの発火頻度と持続時間が上昇する現象を再現した(図3A)。

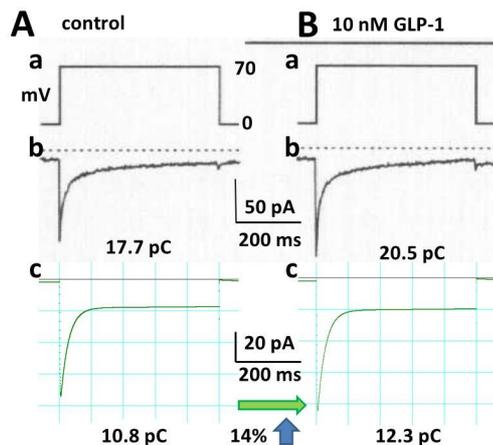


図1 GLP-1 (10 nM) によるLTCCの活性化。
Aa, Ba: LTCCを記録するための実験プロトコル。コントロール(A)またはGLP-1存在下(B)におけるマウス単利細胞のLTCC(b)とそのシミュレーション(c)。

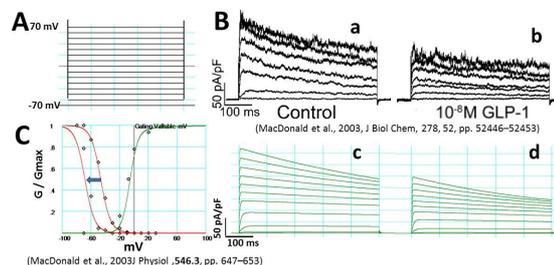


図2 GLP-1 (10 nM) によるKvの抑制。
A: Kvを記録するための実験プロトコル。B: コントロール(a)またはGLP-1存在下(b)におけるマウス単利細胞のKv電流とそのシミュレーション(c, d)。

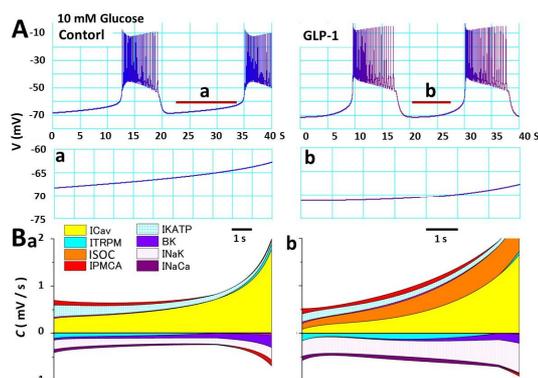
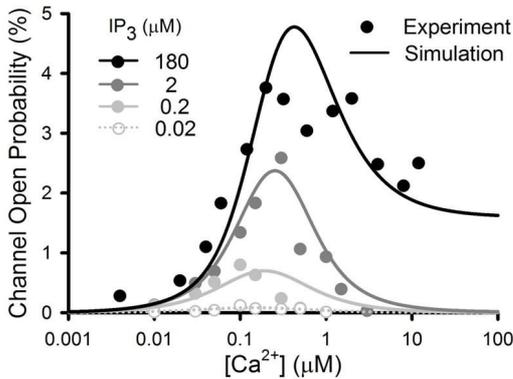


図3 GLP-1 (10 nM) によるKvの抑制。
A: Kvを記録するための実験プロトコル。B: コントロール(a)またはGLP-1存在下(b)におけるマウス単利細胞のKv電流とそのシミュレーション(c, d)。

さらに、リードポテンシャル解析法によって、GLP-1刺激時におけるバースト発火頻度の上昇は、ISOCの活性化(図3Ba, b) また、バースト持続時間の上昇はKATPの抑制(data省略)が引き金となっていることが明らかとなった。

(2) IP₃R 活性 (図4) の動的モデルを構築し、また、その PKA 依存性をシミュレーションすることで、GLP-1 刺激時に発生する Ca²⁺ transient (図5)・Ca²⁺ oscillation (図6) を再現した。



$$\frac{dp_{CaAca}}{dt} = \alpha_{CaA} \cdot P_{CaA} \cdot [Ca^{2+}]_{nrs} - \beta_{CaA} \cdot P_{CaAca}$$

$$\frac{dp_{CaIca}}{dt} = \alpha_{CaI} \cdot P_{CaI} \cdot [Ca^{2+}]_{nrs} - \beta_{CaI} \cdot P_{CaIca}$$

図4 定常状態における IP₃R1 活性の再現。Kaftan モデルをベースに IP₃R モデルを構築し、Ca²⁺・IP₃ 濃度依存的に変化する IP₃R 活性の実験データ (●) を再現したシミュレーション結果 (—)。下式; 動的モデル作成のため、Ca²⁺ の activation (P_{CaAca})・inhibition (P_{CaIca}) sites への結合から IP₃R 活性・抑制に至る分子反応の時間変化を示す上微分方程式。

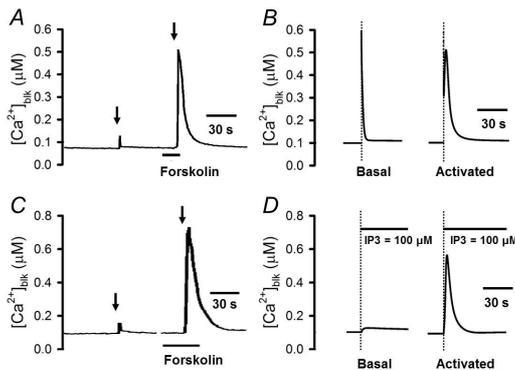


図5 IP₃R を介する Ca²⁺・IP₃ - 誘発 Ca 遊離。

図4に示す IP₃R 動的モデルを簡略細胞モデルに実装し、Forskolin 存在下で誘発される Ca²⁺・IP₃ 依存性 Ca²⁺ transients の実験データ (A, C) を再現したシミュレーション結果 (B, D)。(●) は UV flash photolysis による瞬時的 Ca²⁺ (A)・IP₃ (C) の上昇を示し、シミュレーションでは、Ca²⁺ 注入・細胞内 [IP₃]_i の上昇によって実験条件を再現した。また、Ca²⁺・IP₃ 依存性 Ca²⁺ transients をシミュレーションすることで、コントロール・forskolin 存在下における IP₃R・SERCA の活性 (コントロール (basal); P_{IP₃R} = 13.65 fL ms⁻¹, P_{SERCA} = 0.069 amole ms⁻¹, forskolin (activated via PKA phosphorylation); P_{IP₃R} = 174.72 fL ms⁻¹, P_{SERCA} = 0.23 amole ms⁻¹) を推定した。

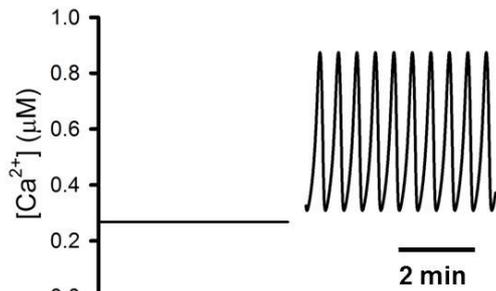


図6 IP₃R を介する Ca oscillation。

図4に示す IP₃R 動的モデルを簡略細胞モデルに実装し、Forskolin 存在下で誘発される Ca²⁺ oscillation を再現したシミュレーション結果。左・右図ともに PKA により活性化されたと推定された P_{IP₃R} (174.72 fL ms⁻¹)・P_{SERCA} (0.23 amole ms⁻¹) でシミュレーションした結果を示す。細胞静止時の細胞内 Ca²⁺ 総量 (左図; ~1.4 amole) では細胞内 Ca²⁺ は安定しているが、細胞内 Ca²⁺ 総量がバースト発生時の値まで上昇すると (右図; ~9.2 amole) [IP₃] を固定した状態でも (2 μM)

さらに、GLP-1 刺激下で発生するカルシウム動員のメカニズムを、分岐解析法や Instantaneous Equilibrium (IE) Analysis で解析した結果 (data 省略)、Ca²⁺ による IP₃R 活性の positive feedback によって Ca²⁺ transient や oscillation が発生し、また Ca²⁺ による非常に遅いチャンネルの不活性化が、Ca²⁺ transient の減衰経過を決定し、さらにそのゆっくりとした変化が、Ca²⁺ oscillation を誘発する決定的要素であることが示唆された。また、GLP-1-cAMP-PKA シグナリングにより IP₃R・SERCA ともにその活性が上昇すること、また、グルコース刺激下によるバースト発生時のように、細胞内 Ca²⁺ が上昇することが Ca²⁺ oscillation を誘発するための細胞内必須条件であることが明らかとなった。

本研究成果は、論文にまとめ、現在 Journal of General Physiology にて査読中である。

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)

[学会発表] (計 7 件)

竹田 有加里、野間 昭典「膵細胞におけるイノシトール三リン酸受容体 (IP₃R) を介する Ca²⁺ 動態のシミュレーション研究とそのメカニズム解析」日本薬学会第 135 年会、兵庫県・神戸市・神戸学院大学、2015 年 3 月 27 日

竹田 有加里、野間 昭典「細胞における GLP-1 によるイノシトール三リン酸受容体 (IP₃R) を介する Ca²⁺ 流動の数値モデル化とそのメカニズムの数学解析」第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会合同大会、

兵庫県・神戸市・神戸国際会議場、2015
年 3 月 21 日

Takeda Y., Horikawa Y. and Inagaki N.
A Modeling Analysis of Inositol
1,4,5-trisphosphate Receptor
(IP3R)-Mediated Ca²⁺ Mobilization
from Intracellular Ca²⁺ Stores in
Pancreatic Beta Cells; 10th IDF-WPR
Congress & 6th AASD Scientific Meeting,
Suntec, Singapore, Nov.21th 2014

竹田 有加里、野間 昭典「膵 細胞に
おけるイノシトール三リン酸受容体
(IP3R)を介する Ca²⁺動態の数理モデル化
及びそのメカニズム解析」第 107 回近畿
生理学会談話会、兵庫県・神戸市・兵庫
医療大学、2014 年 10 月 25 日

竹田 有加里、野間 昭典「膵 細胞に
おけるイノシトール三リン酸受容体
(IP3R)を介する Ca²⁺動態の数理モデル
化とそのメカニズム解析」第 91 回日本
生理学会大会、鹿児島県・鹿児島市・鹿
児島大学、2014 年 3 月 17 日

竹田 有加里、野間 昭典「膵 細胞に
おけるイノシトール三リン酸受容体
(IP3R)を介する Ca²⁺動態の数理モデル化
とそのメカニズム解析」第 106 回近畿生
理学会談話会、奈良県・橿原市・奈良県
立医科大学、2013 年 11 月 2 日

Takeda Y. and Noma A. A simulation
study of the effects of GLP-1 on
membrane excitability in pancreatic
β-cells; International Union of
Physiological society 37th annual
meeting, Birmingham, UK, July.22th
2013

6 . 研究組織

(1)研究代表者

竹田 有加里 (TAKEDA YUKARI)

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号 : 20582159