

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：34318

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460113

研究課題名(和文) 糖尿病発症・進展におけるインクレチンを介したグルカゴン分泌の重要性に関する研究

研究課題名(英文) Study on incretin-mediated glucagon secretion in the onset and development of diabetes mellitus

研究代表者

桂 昌司 (KATSURA, Masashi)

明治国際医療大学・医学教育研究センター・教授

研究者番号：80204452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：消化管ホルモンであるグルカゴン様ペプチド1 (GLP-1) の作用を代替または促進することは、グルコース刺激性インスリン分泌 (GSIS) を治療に有効である。しかし、GLP-1が膵島におけるインスリン分泌を直接作用するかについては明らかではない。本研究では、GLP-1がマウスおよびヒトの膵島におけるインスリン分泌を刺激する機序を検討した。

これまでの高濃度を用いた実験結果より、GLP-1の作用機序はPKA依存性と考えられてきた。しかし、生理的低濃度ではPKC依存性経路によりインスリン分泌を促進することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Strategies aimed at mimicking or enhancing the action of the incretin hormone glucagon-like peptide 1 (GLP-1) therapeutically improve glucose-stimulated insulin secretion (GSIS); however, it is not clear whether GLP-1 directly drives insulin secretion in pancreatic islets. In the present study, we examined the mechanisms by which GLP-1 stimulates insulin secretion in mouse and human islets.

Based on results using high concentration of GLP-1, the mechanism of action of GLP-1 has been considered to be PKA-dependent. But it was revealed that at physiologically low concentration of GLP-1, PKC-dependent pathway promotes insulin secretion.

研究分野：薬理学

キーワード：インスリン分泌 膵島細胞 GLP-1 Aキナーゼ Cキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病患者にグルカゴン分泌異常が認められることは良く知られており、そのため膵細胞の機能を詳細に解明することは、糖尿病の病態を理解するうえで極めて有用である。しかし、膵細胞の大きさは膵細胞に比べて非常に小さいこと、また物理的・化学的刺激に対して脆弱であるため状態の良い材料を得にくいこと、等がその機能解析を困難にする要因の一つとなっている。したがってこの領域の研究は膵細胞と比べて大きく遅れており、基礎的な事象も進んでいないのが現状である。

(2) 膵細胞について現在までに報告されている成績の多くは、電気生理学的手法を用いた成績が根拠になっている。ヒト膵細胞では、グルコース濃度の上昇に伴い、ATP/ADP比が上昇することで K_{ATP} チャンネルが閉じる。これにより、細胞膜の脱分極が起こり、グルカゴン分泌が抑制される。本機構はインスリン分泌機構と同様に、細胞内カルシウム濃度の変化が重要な意味を持っているものと推察されているが、グルコースによる膵細胞内のカルシウム濃度に及ぼす影響については、グルコース濃度上昇により細胞内カルシウムが上昇あるいは低下と相反する成績から推論の域を脱することが出来ない。同様に、他のイオンチャンネル(例えば、 Na^+ , K^+ , K_{ATP})についてもほとんど研究が進んでおらず、より安定した実験系でのデータの構築が望まれている。

2. 研究の目的

(1) 消化管ホルモンの一つである GLP-1 は生理作用として、膵細胞に作用して血糖依存性にインスリン分泌を亢進するほか、膵細胞にも作用してグルカゴン分泌を抑制するため、内因性 GLP-1 効果を増強する DPP-IV 阻害薬および GLP-1 受容体作動薬は新しい作用機序をもつ糖尿病治療薬として良好な治療成績を収めている。しかし、2 型糖尿患者におけるグルカゴン分泌異常に対してこれらの薬物による効果は限定的であることから、グルカゴン分泌の応答性を正常化させることは、今後の糖尿病治療において極めて重要な課題と認識されている。

(2) GLP-1 が生体において極めて低い血中濃度ながら強力な生理活性を有している。これは実験的に DPP-IV 阻害薬によりわずかに数 pM 程度の血中 GLP-1 を上昇させることで、有意な抗糖尿病効果を発揮することから証明されている(文献)。しかし、in vitro の研究で用いられる GLP-1 濃度

(10~100 nM)は、生理的血中濃度から大きく乖離している。研究代表者は、これまでに生理的な血中濃度と考えられている GLP-1 の膵細胞に与える作用について検討を行った結果、pM オーダーの GLP-1 が protein kinase A (PKA)非依存性経路によりインスリン分泌を起こすことを報告している(文献、)。

(3) 本研究では、これらの経路を特定することを目的として、ヒト、マウスの単離膵島を材料とし、インスリン分泌実験および電気生理学的手法、蛍光 probe による細胞内情報伝達物質の動態観察、分子生物学的手法等を用いて検討を行った。

3. 研究の方法

(1) マウス膵臓にコラゲナーゼを注入し組織消化処理を行ったのち、さらにハンドピッキング法にて分取したマウス膵細胞、あるいはマウス由来膵細胞株を用いた。

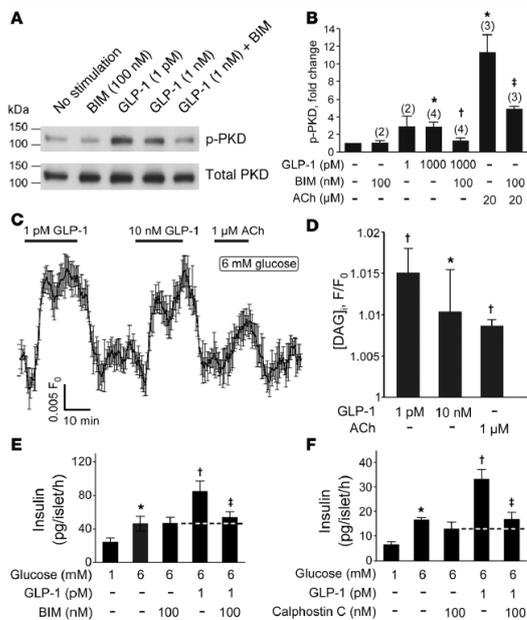
(2) 6 mM ブドウ糖刺激に伴う各種実験(インスリン分泌、細胞内へのカルシウム/ナトリウム流入、膜電位変化、プローベによる細胞内情報伝達物質の動態観察)は、生化学的、電気生理学および分子生物学的手法を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 膵細胞上に存在する GLP-1 受容体の特徴を明らかにする目的で、マウスより調整した膵細胞を用いて検討した。単離したマウス膵細胞に諸種の濃度の GLP-1 作動薬による刺激を行ったところ、GLP-1 作動薬の低濃度側(~数 pM)と高濃度側(~数十 nM)において、protein kinase C (PKC) 系と PKA 系を介した異なる細胞内情報伝達経路の活性化が生じることが確認された。同様の検討を膵細胞についても行ったところ、その活性化機構に連関する細胞内情報伝達経路は膵細胞の場合とは異なること、DPP-IV 阻害薬の有無により GLP-1 刺激に伴うグルカゴン分泌量が異なる系においては、両者の間に中性付近の蛋白質のリン酸化が複雑に関与する可能性を示す成績が得られた。以上の成績より、GLP-1 刺激に伴う膵細胞の機能変化には多面性が存在することが明らかとなった。

(2) 1 pM GLP-1 はインスリン分泌、エクソサイトーシス、細胞内カルシウム流入、膜の活動電位を有意に増加させた。細胞内 cAMP の増加効果は、過去の報告と同様に 1 pM GLP-1 存在下では認められず、1 nM 以上で有意に認められた。PKA 阻害薬

(100 μ M Rp-cAMPS、1 μ M myristoylated protein kinase inhibitor) 存在下では、1 pM GLP-1 はインスリン分泌、細胞内カルシウム流入、膜電位変化、およびプローベによる細胞内情報伝達物質の動態観察を対照群と同様に有意に増加させた。1 pM GLP-1 刺激に伴う PKA 活性測定を行ったが、イメージング、ウエスタンブロットングのいずれにおいても検出感度以下であった。一方、PKC 阻害薬 (100 nM Bisindolylmaleimide、100 nM calphostin C) により、1 pM GLP-1 の作用は完全に抑制された (図 1)。1 pM GLP-1、10 nM GLP-1 いずれもジアシルグリセロールを増加させ、その効果は 1 pM のほうが有意に高かった。1 pM GLP-1 による活動電位は、PLC 阻害薬 (1 μ M U73122) により抑制された。1 pM GLP-1 はリン酸化 protein kinase D を有意に増加させ、その作用は PKC 阻害薬により抑制された。

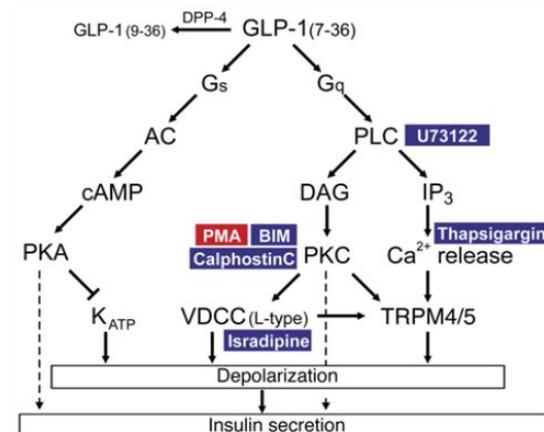


(J Clin Invest, 125(12), 2015, 4714-4728.より引用)

(3) 一般に酵母を用いた組換えシステムでは、GLP-1 受容体の刺激は $G_{\alpha q}$ 依存性機構を介した PLC 活性を誘発するが、膵臓細胞では GLP-1 の pmol 濃度刺激は PKC を直接活性化し、それに続いて PKA-非依存性かつ PKC- ζ /PKC 依存性の細胞膜脱分極とそれに伴う活動電位の上昇によりインスリン分泌を刺激することが判明した。またこの効果は、PKC を活性化する PMA によって再現され、PKA 阻害剤 (例えばミリストイル化された protein kinase inhibitor) あるいは K_{ATP} チャンネル阻害薬 (例えば tolbutamide) の共存により完全に阻害された。この膜電位と電気的活動にける PKC 依存性の効果は、 Na^+ -透過

性 TRPV4 チャンネルの活性化によって生じていること、さらにリソソームの Ca^{2+} 放出チャネルである TPC1 と TPC2 を欠損した細胞では保持された。今回の成績は、GLP-1 による治療に新たな機序の可能性が示され、生理的血中濃度のインクレチンは、細胞に直接作用することによりインスリン分泌を刺激するのに十分であることが判明した。

(4) 生体の生理的濃度に極めて近い pmol 程度の GLP-1 刺激に伴う細胞内情報伝達系の変化は PKC 系の活性化が関与しており、さらに PKA 非依存性かつ PLC 介した PKC の活性化と、それに続く Na^+ 透過型 TRPM4 および TRPM5 チャンネルの活性化を介したタブシガルギン感受性細胞内 Ca^{2+} の動員が起ることを発見された。この成果は、インクレチンホルモンの循環レベルにおいて、膵島細胞に直接作用することによりインスリン分泌を刺激することを示唆する新知見を得た (下図)。



(J Clin Invest, 125(12), 2015, 4714-4728.より引用)

<引用文献>

Shigeto M, Katsura M, Matsuda M, Ohkuma S and Kaku K: Low, but physiological, concentration of GLP-1 stimulates insulin secretion independent of the cAMP-dependent protein kinase pathway, J Pharmacol Sci, 108, 2008, 274-279.

Shigeto M, Katsura M, Matsuda M, Ohkuma S and Kaku K: First phase of glucose-stimulated insulin secretion from MIN6 cells does not always require extracellular calcium influx, J Pharmacol Sci, 101, 2006, 293-302.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Shigeto M, Ramracheya R, Tarasov AI, Cha C-Y, Chibalina MV, Hastoy B,

Philippaert K, Reinbothe T, Rorsman N, Salehi A, Sones WR, Vergari E, Weston C, Gorelik J, Katsura M, Nikolaev VO, Vennekens R, Zaccolo M, Galione A, Johnson PVR, Kaku K, Ladds G, and Rorsman P: GLP-1 stimulates insulin secretion by PKC-dependent TRPM4 and TRPM5 activation. J Clin Invest, 125(12), 2015, 4714-4728.
<http://www.jci.org>

〔学会発表〕（計 1 件）

重藤 誠、Andrei Tarasov、Chae Young Cha、Margarita Chibalina、桂 昌司、加来浩平、Rorsman Patrik：生理的濃度 GLP-1 の PKC 活性化を介した PKA 非依存性インスリン分泌経路の解明。第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会、2016. 5.21、京都

〔図書〕（計 0 件）

〔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
無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桂 昌司 (KATSURA, Masashi)
明治国際医療大学・医学教育研究センター・教授
研究者番号：80204452

(2) 研究分担者

佐藤 公道 (SATO, Masamichi)
京都大学・名誉教授
研究者番号：80025709

(3) 研究協力者

重藤 誠 (SHIGETO, Makoto)
加来 浩平 (KAKU, Kohei)