

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461351

研究課題名(和文) cAMPによるインスリン分泌増強におけるグルタミン酸シグナルの役割の解明

研究課題名(英文) The role of glutamate signaling in amplification of insulin secretion by cAMP

研究代表者

高橋 晴美 (TAKAHASHI, HARUMI)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・特命講師

研究者番号：50546489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：グルコース代謝により産生されるグルタミン酸のインクレチンによるインスリン分泌増強における役割について検討した。インクレチンによりインスリン顆粒内のグルタミン酸含量が増加するが、この増加はプロテインキナーゼA依存性であった。また、小胞型グルタミン酸トランスポーターを介したインスリン顆粒へのグルタミン酸の取り込みがインクレチンによるインスリン分泌増強に必要であった。病態モデル動物由来の膵島を用いた検討からグルコースによるグルタミン酸産生とインクレチンに対する応答性が相関しており、グルタミン酸シグナルが糖尿病の病態生理と密接に関連していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of glutamate signaling in incretin-induced insulin secretion. The increase in glutamate content in insulin granules by GLP-1 was protein kinase A-dependent. Glutamate transport into insulin granules through vesicular glutamate transporter 1 was required for amplification of insulin secretion by incretin/cAMP signaling. Dimethyl-glutamate, a membrane-permeable glutamate precursor, augmented glucose-induced insulin granule exocytosis. The analyses using pancreatic islets from animal models of diabetes and obesity indicated that glutamate production by glucose metabolism is associated with incretin-responsiveness. These results suggest the significant role of glutamate signaling in the pathophysiology of diabetes.

研究分野：医歯薬学

キーワード：糖尿病 インスリン分泌 インクレチン cAMP

## 1. 研究開始当初の背景

膵β細胞から分泌されるインスリンは血糖調節において重要なホルモンであり、その分泌不全は糖尿病の発症・病態と密接に関連している。インスリン分泌は様々な細胞内シグナルによって制御されるが、なかでも cAMP は特に重要である。Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) や Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) などのインクレチンホルモンは食物の摂取によって腸管内分泌細胞から分泌され血行性に膵β細胞に到達すると、特異的受容体に結合して細胞内の cAMP を上昇させることによりインスリン分泌を増強する。インクレチンは血糖(グルコース濃度)に依存してインスリン分泌を増強することが知られており、このような作用を利用して近年開発されたインクレチン関連薬は低血糖のリスクの少ない新たな糖尿病治療薬として注目を集め、国内でも広く臨床使用されている。しかし、グルコース代謝と cAMP シグナルの相互作用については詳しく研究されておらず、インクレチンのグルコース濃度依存性のメカニズムはこれまで全く不明であった。研究代表者らは、最近インクレチン/cAMP 応答性と非応答性のインスリン分泌細胞株を樹立し、これらの比較メタボローム解析からグルコース代謝のリンゴ酸—アスパラギン酸シャトル由来の代謝物であるグルタミン酸がインクレチンによるインスリン分泌増強において重要なシグナルであることを見出した。また、小胞型グルタミン酸トランスポーター (VGLUT1) を介したグルタミン酸のインスリン顆粒への取り込みが必要であることが示唆された。しかしながら、グルタミン酸によるインスリン開口分泌制御機構の詳細は明らかになっていない。このようなグルタミン酸シグナルの解明は、インクレチン作用を理解し病態における代謝シグナルの役割を明らかにする上でも重要である。

## 2. 研究の目的

インクレチンによるインスリン分泌制御ならびに糖尿病の病態生理におけるグルタミン酸シグナルの役割の解明

## 3. 研究の方法

(1) インクレチンによるインスリン分泌制御におけるグルタミン酸シグナルの役割

① インスリン顆粒内へのグルタミン酸取り込みのメカニズム

・グルタミン酸のインスリン顆粒への取り込みがプロテインキナーゼ A (PKA) 依存的か Epac2 依存的かを明らかにするために、各々の選択的アゴニストや阻害剤を用いてインスリン顆粒内のグルタミン酸含量の測定を行った。

・VGLUT1 ノックアウト (KO) マウス由来の膵島および VGLUT1 をノックダウンしたインスリン分泌細胞株 MIN6-K8 を用いてインクレチンによるインスリン分泌を検討した。

・VGLUT を介したグルタミン酸の分泌顆粒への取り込みには V-ATPase の関与が報告されている。V-ATPase に対する阻害剤やノックダウンにより、インクレチンによるインスリン分泌増強における V-ATPase の役割を検討した。

② グルタミン酸シグナルによるインスリン開口分泌動態

マウス初代培養膵β細胞に蛍光標識したインスリン (insulin-Venus) を発現させ、細胞膜透過性のグルタミン酸前駆体であるジメチルグルタミン酸 (dm-Glu) で刺激して全反射型蛍光顕微鏡 (TIRFM) を用いて観察することによりインスリン開口分泌動態に対するグルタミン酸の効果を検討した。

(2) 糖尿病の病態におけるグルタミン酸シグナルの役割

① 病態モデル動物の膵島におけるインクレチン/cAMP シグナルによるインスリン分泌プロファイル

非肥満 2 型糖尿病モデルの Goto-Kakizaki (GK) ラット、肥満モデルの Zucker fatty (ZF) ラットおよび肥満糖尿病モデルの ZFDM ラットから膵島を採取し、インクレチンまたは dm-Glu によるインスリン分泌を検討した。

② 病態モデル動物の膵島におけるグルタミン酸の産生

上記①で用いたモデル動物由来の膵島におけるグルコースによるグルタミン酸産生を質量分析により検討した。

## 4. 研究成果

(1) インクレチンによるインスリン分泌制御におけるグルタミン酸シグナルの役割

① インスリン顆粒内へのグルタミン酸取り込みのメカニズム

・インスリン顆粒内のグルタミン酸含量は GLP-1 濃度依存的に増加した。この GLP-1 による顆粒内グルタミン酸含量の増加は PKA 阻害剤である H-89 により有意に抑制された。

一方、Epac 選択的 cAMP アナログである 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP によって顆粒内グルタミン酸含量の増加は認められなかった。以上の結果から、インスリン顆粒へのグルタミン酸の取り込みは PKA 依存的であると考えられる。

・VGLUT1 KO マウス由来の膵島ではグルコース応答性のインスリン分泌は認められたが、GLP-1 による顕著なインスリン分泌増強は認められなかった。一方 dm-Glu によるインスリン分泌増強は認められた。同様に shRNA により VGLUT1 をノックダウンした MIN6-K8 細胞において、グルコースによるインスリン分泌は対照細胞と同様に認められたがインクレチンによるインスリン分泌増強が有意に抑制された。

・V-ATPase の阻害剤であるバフィロマイシンを用いて検討した。バフィロマイシンはグルコース単独刺激によるインスリン分泌は変化させなかったが、GLP-1 によるインスリン分泌増強を有意に抑制した。一方、dm-Glu によるインスリン分泌増強はバフィロマイシンで抑制されなかった。同様に V-ATPase の ATPase 活性に重要な D サブユニットを siRNA によりノックダウンすると、グルコース単独刺激によるインスリン分泌は変化しないが、GLP-1 によるインスリン分泌が有意に抑制された。

以上の結果から、細胞質のグルタミン酸が PKA 依存的に VGLUT1 を介してインスリン顆粒に取り込まれることがインクレチンによるインスリン分泌増強に必要であることが示唆された。

## ② グルタミン酸シグナルによるインスリン開口分泌動態

野生型マウス由来の初代培養膵 β 細胞に insulin-Venus を導入し、2 日後に TIRFM によりインスリン顆粒の膜融合を観察した。16.7 mM グルコースの単独刺激により、2 相性のインスリン開口分泌が認められた。すなわち、刺激直後に一過性の膜融合頻度の上昇がみられ、その後低頻度の膜融合が持続した。低濃度グルコースでは dm-Glu により膜融合は惹起されないが、高濃度グルコースによって惹起されるインスリン開口分泌は第 1 相、第 2 相ともに dm-Glu 存在下で増加した。また、この増加は主に刺激後に細胞内部から細胞膜近傍にリクルートされる顆粒がそのまま膜融合に至る開口分泌の様式である *restless newcomer* の増加によるものであり、cAMP によるインスリン開口分泌増強と類似していた。これらの結果から、グルタミン酸がイン

スリン顆粒の細胞膜へのリクルートメントや膜融合を促進することが示唆された。

## (2) 糖尿病の病態におけるグルタミン酸シグナルの役割

### ① 病態モデル動物の膵島におけるインクレチン/cAMP シグナルによるインスリン分泌プロファイル

対照となる正常系統のウイスターラット由来の膵島ではグルコース応答性インスリン分泌および GLP-1、GIP によるインスリン分泌増強ともに認められた。また、非肥満 2 型糖尿病モデルの GK ラット膵島は、インスリン分泌は非常に少ないものの、グルコース応答性およびインクレチン応答性ともに認められた。肥満モデルの ZF ラット由来の膵島はグルコース応答性は認められるがインクレチン応答性は認められなかった。一方 dm-Glu の添加によりインスリン分泌は増強した。また、糖尿病発症前の ZFDM ラット膵島においてもグルコース応答性は認められるがインクレチン応答性は認められなかった。

### ② 病態モデル動物の膵島におけるグルタミン酸の産生

ウイスターラット由来の膵島では、高濃度グルコース刺激により膵島内のグルタミン酸含量が増加した。また、安定同位体 <sup>13</sup>C で標識したグルコースを用いた質量分析による解析から、グルコース刺激によって増加するグルタミン酸は主に外部から取り込まれたグルコースの代謝によるものであることが示された。GK ラットの膵島でもグルコース刺激によりグルタミン酸の産生が認められた。一方、ZF ラットおよび ZFDM ラットの膵島ではグルコース刺激によるグルタミン酸の産生がほとんど認められなかった。

以上の結果よりグルコースによるグルタミン酸産生とインクレチン応答性が相関することが示唆された。

本研究により、グルタミン酸のインスリン顆粒への取り込みおよびグルタミン酸によるインスリン開口分泌動態が明らかになった。また、インクレチンに対する応答性とグルタミン酸の産生が相関しており、グルタミン酸シグナルと糖尿病の病態生理が密接に関連していることが示唆された。

## 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 13 件)

英語論文

- ① Yokoi N, Gheni G, Takahashi H, Seino S.  $\beta$ -cell glutamate signaling: Its role in incretin-induced insulin secretion. *J Diabetes Investig.* 査読有. 7, 2016, 38-43.  
DOI: 10.1111/jdi.12468
- ② Sugawara K, Shibasaki T, Takahashi H, Seino S. Structure and functional role of Epac2 (Raggef4). *Gene.* 査読有. 575, 2016, 577-583.  
DOI: 10.1016/j.gene.2015.09.029
- ③ 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.* 査読有. 10, 2015, e0126003.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0126003
- ④ 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.* 査読有. 64, 2015, 1262-1272.  
DOI: 10.2337/db14-0576
- ⑤ Shibasaki T, Takahashi T, Takahashi H, Seino S. Cooperation between cAMP signalling and sulfonylurea in insulin secretion. *Diabetes Obes Metab.* 査読有. 16(1), 2014, 118-125.  
DOI: 10.1111/dom.12343
- ⑥ 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.* 査読有. 9, 2014, 661-673.  
DOI: 10.1016/j.celrep.2014.09.030
- ⑦ 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.* 査読有. 6, 2013, ra94.

DOI: 10.1126/scisignal.2004581

- ⑧ Uenishi E, Shibasaki T, Takahashi H, 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.* 査読有. 288, 2013, 25851-25864.  
DOI: 10.1074/jbc.M113.464420

和文総説

- ⑨ 高橋 晴美, 清野 進, SU 薬 発見と開発の歴史, *Diabetes Strategy*, 査読無、5 巻第 3 号、2015、132-138
- ⑩ 高橋 晴美, 高橋 利匡, 柴崎 忠雄, 清野 進, cAMP とスルホニル尿素薬の相互作用による Epac2A の活性化とそのインスリン分泌における役割, *Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌*, 査読無、2015、5-11
- ⑪ 柴崎 忠雄, 高橋 晴美, 清野 進, インクレチンとスルホニル尿素薬の併用によるインスリン分泌増強における Epac2A シグナルの役割, *最新医学*, 査読無、70 巻、2015、473-479
- ⑫ 高橋 晴美, グブルジャン・ゲニ, 清野 進, インスリン分泌を増強するシグナルのインタープレイとその臨床的示唆, *実験医学*, 査読無、33 巻、2015、124-126
- ⑬ 高橋 晴美, 清野 進, 臍島における GLP-1 受容体シグナルとその異常, *Diabetes Frontier*, 24 巻、2013、655-662

〔学会発表〕 (計 17 件)

- ① 高橋晴美、グブルジャン ゲニ、山口拓郎、横井伯英、清野 進. インスリン分泌におけるグルタミン酸シグナルの役割. 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会、2015.12.3、神戸 (兵庫県)

- ② Takahashi H, Shibasaki T, Hidaka S, Seino S. Combinatorial effects of incretin and sulfonylurea or glinide drugs on insulin secretion. *Incretin* 2015, 2015.7.31, Vancouver (Canada)
- ③ Takahashi H, Shibasaki T, Park J-H, Hidaka S, Takahashi T, Ono A, Song D-K, Seino S. Interplay between incretin and sulfonylurea through Epac2A/Rap1 signaling in insulin secretion. 10th IDF-WPR Congress 2014 and 6th AASD Scientific Meeting, 2014.11.21, Singapore
- ④ Tamura K, Minami K, Takahashi H, Kudo M, Seino S. Effect of liraglutide on beta-cell mass and function in alloxan diabetic mice. 50th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, 2014.9.18, Vienna (Austria)
- ⑤ 高橋晴美、柴崎忠雄、高橋利匡、日高志保美、小野愛夏、清野 進. インクレチンとスルホニル尿素薬の併用によるインスリン分泌増強作用における Epac2A/Rap1 シグナルの役割. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、2014.5.23、大阪
- ⑥ 柴崎忠雄、高橋利匡、高橋晴美、菅原健二、清野 進. スルホニル尿素 (SU) 薬と cAMP の協調作用による Epac2A 活性化. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、2014.5.23、大阪
- ⑦ 田村香楠子、南 幸太郎、高橋晴美、工藤麻耶、北野谷寿人、清野 進. アロキササン糖尿病マウスにおけるリラグルチドの膵β細胞に対する効果. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、2014.5.22、大阪
- ⑧ 高橋晴美、柴崎忠雄、日高志保美、小野愛夏、高橋利匡、清野 進. インクレチンと SU 薬の相互作用における Epac2A/Rap1 シグナルの役割. 第 36 回日本分子生物学会年会、2013.12.4、神戸 (兵庫県)
- ⑨ Shibasaki T, Takahashi T, Takahashi H, Sugawara K, Seino S. Clarification of molecular mechanism underlying Epac2A activation by antidiabetic sulfonylurea drugs. 第 36 回日本分子生物学会年会、2013.12.4、神戸 (兵庫県)
- ⑩ Takahashi H, Shibasaki T, Hidaka S, Takahashi T, Ono A, Seino S. Interaction of incretin and sulfonylurea through Epac2A in insulin secretion. 2013 International Conference on Diabetes and Metabolism & 5th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes, 2013.11.7, Seoul (Korea)
- ⑪ Takahashi H, Shibasaki T, Hidaka S, Ono A, Takahashi T, Seino S. Interaction of incretin and sulfonylurea through Epac2A signaling in insulin secretion. 49th EASD Annual Meeting, 2013.9.25, Barcelona (Spain)
- ⑫ Tamura K, Minami K, Takahashi H, Kudo M, Kitanoya H, Seino S. Evaluation of the effect of liraglutide on beta cell fate in alloxan diabetic mice by tamoxifen-inducible Cre/loxP system. 49th EASD Annual Meeting, 2013.9.25, Barcelona (Spain)
- ⑬ Shibasaki T, Uenishi E, Takahashi H, Oiso Y, Seino S. Critical Role of Actin Dynamics Regulated by N-WASP and Cofilin in the Biphasic Response of Glucose-Induced Insulin Secretion. ADA 73rd Scientific Sessions, 2013.6.23, Chicago (USA)
- ⑭ Takahashi T, Shibasaki T, Takahashi H, Sugawara K, Seino S. Sulfonylurea act as an enhancer of Epac2 activation in cAMP-induced insulin secretion. ADA 73rd scientific sessions, 2013.6.23, Chicago (USA)
- ⑮ Takahashi H, Shibasaki T, Hidaka S, Ono A, Takahashi T, Seino S. Interaction of incretin and sulfonylurea through Epac2A signaling in insulin secretion. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013.5.16、熊本
- ⑯ 工藤麻耶、南幸太郎、田村香楠子、北野谷寿人、家本啓佑、高橋晴美、清野 進.

アロキサン誘導糖尿病マウスの膵  $\beta$  細胞に対するリラグルチドの効果. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013.5.16、熊本

- ⑰ 柴崎忠雄、堰千紘、高橋晴美、清野 進.  
Epac2/Rap1 を介したインスリン分泌における下流シグナルの探索、第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013.5.16、熊本

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

高橋 晴美 (TAKAHASHI, Harumi)  
神戸大学・大学院医学研究科・特命講師  
研究者番号：50546489

### (2)研究分担者

該当なし

### (3)連携研究者

該当なし