

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461367

研究課題名(和文) 新たな膵細胞モデルを用いた1型糖尿病におけるグルカゴン分泌異常メカニズムの解明

研究課題名(英文) Exploring mechanisms of distorted glucagon secretion in type 1 diabetes using a novel alpha-cell model of insulin deficiency

研究代表者

三柴 裕子(村瀬裕子)(Mishiba, Yuko)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：80377415

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)：インスリン作用が慢性的に欠乏している、即ちインスリンレセプターをノックダウンしたTC1-6細胞(IRKD細胞)を作製し、グルカゴン分泌動態や細胞内代謝物をコントロール細胞と比較検討した。その結果、IRKD細胞のグルカゴン分泌は低グルコース時には抑制傾向にあり、高グルコース時に刺激されるという奇異性分泌を呈した。またメタボローム解析等の結果から、タウリンがグルカゴン分泌異常に影響を及ぼしている可能性が示唆された。以上より、1型糖尿病モデル膵細胞は奇異性のグルカゴン分泌動態を示し、その一因として、細胞内タウリンの増加が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the metabolic traits that underlie the distortion of glucagon secretion in insulin deficiency, we generated an TC1-6 cell line with stable knockdown of the insulin receptor (IRKD), i.e., an in vitro -cell model for type 1 diabetes (T1D), which exhibits an abnormal glucagon response to glucose. A comprehensive metabolomic analysis of the IRKD TC1-6 cells (IRKD cells) revealed some candidate metabolites whose levels differed markedly compared to those in control TC1-6 cells. Of these candidates, taurine was remarkably increased in the IRKD cells and was identified as a stimulator of glucagon in TC1-6 cells. These results indicate that the metabolic alterations induced by IRKD in -cells, especially the increase of taurine, may lead to the distorted glucagon response in IRKD cells, suggesting the importance of taurine in the paradoxical glucagon response in T1D.

研究分野：糖尿病内分泌代謝学

キーワード：グルカゴン 膵細胞 1型糖尿病 メタボローム解析

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 内因性インスリン分泌が枯渇した 1 型糖尿病の血糖コントロールには難渋することが多く、その原因の主体は内因性インスリン分泌の枯渇すなわち膵細胞の破壊とされてきた。

(2) 研究代表者は、1 型糖尿病の血糖の不安定性に寄与する新たな要因として膵細胞機能に着目した。

(3) 内因性インスリン分泌が枯渇した環境下にある膵細胞モデルを作製し、グルカゴン分泌動態を検討し、次いで膵細胞内代謝産物の網羅的解析(メタボローム解析)を行い、グルカゴン分泌異常に及ぼす影響のある因子を、膵細胞の細胞内代謝の変化という観点から検討することにより、1 型糖尿病におけるグルカゴン分泌調節異常のメカニズムを解明するという研究を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

(1) In vitro でインスリン作用が慢性的に欠乏した(インスリンレセプターノックダウン)膵細胞モデルを作成し、グルコース応答性のグルカゴン分泌動態について検討する。

(2) 次に、インスリンレセプターをノックダウン膵細胞の細胞内代謝物の網羅的解析を行い、細胞内代謝の変化がグルカゴン分泌異常に与える影響について検討する。

## 3. 研究の方法

(1) インスリンレセプターノックダウン細胞株の作製: マウス膵細胞株である TC1-6 細胞のインスリンレセプター遺伝子を、short hairpin RNA 発現レンチウイルスベクターを用いて安定的にノックダウンした細胞(IRKD 細胞)を作製した。

(2) グルコース濃度に対するグルカゴン分泌反応の検討: IRKD 細胞を継代後、KRB buffer (5.6 mM グルコース濃度)に置換し、その後、グルコース濃度を 1.5 mM、5.6 mM、30 mM とした時のグルカゴン分泌を ELISA 法にて測定し、コントロール TC1-6 細胞(コントロール細胞)と比較した。

(3) 細胞内代謝物のメタボローム解析: イン

スリン受容体をノックダウンすることによる細胞内代謝の変化を検討すべく、IRKD 細胞とコントロール細胞の細胞内代謝産物のメタボローム解析(CE-TOFMS)を行った。

(4) 代謝物候補に関する検討: 解析結果において IRKD 細胞とコントロール細胞間で有意差の得られた物質を抽出し、各物質の細胞内での合成酵素の遺伝子発現と、トリチウムでラベルした各物質の細胞内への取り込みを検討した。また、候補代謝物質の添加によるグルカゴン分泌反応の検討も行った。

## 4. 研究成果

(1) IRKD 細胞の作製: IRKD 細胞ではインスリンレセプターは約 80% ノックダウンされていた。IRKD 細胞のインスリンシグナル伝達に関しては、Akt と Erk の活性が低下していた。また、IRKD 細胞の生存率や増殖能はコントロール細胞に比べると低下していた。

(2) グルコース濃度に対するグルカゴン分泌反応の検討: IRKD 細胞におけるグルカゴン分泌は、コントロール細胞に比し、低グルコース時に抑制傾向にあり、高グルコース時に亢進していた。同様の傾向が単離膵島(インスリンレセプターノックダウン膵島 vs. コントロール膵島)における検討でも認められた(図 1)。

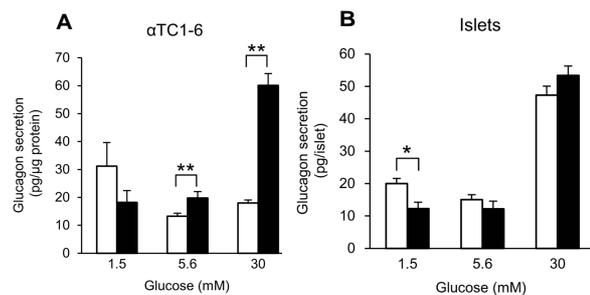


図 1. グルコース濃度の変化に対するグルカゴン分泌の比較(コントロール細胞/膵島 vs. インスリン受容体ノックダウン TC1-6 細胞/膵島)

A: : コントロール TC1-6 細胞、 : インスリン受容体ノックダウン TC1-6 細胞。B: : コントロール膵島、 : インスリン受容体ノックダウン膵島。\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, コントロール細胞/膵島 vs. インスリン受容体ノックダウン TC1-6 細胞/膵島、バーは SEM。

(3) 細胞内代謝物のメタボローム解析: IRKD 細胞とコントロール細胞とで 163 の代謝物に有意差が認められた。IRKD 細胞では、ペントースリン酸回路、TCA 回路、アミノ酸代謝、

プリン・ピリミジン代謝などエネルギー代謝に関与する幾つかの代謝物が有意に低下していた。反対に、タウリンは IRKD 細胞で著明に増加していた。有意な相違が認められた代謝物のうち、グルカゴン分泌に影響を与える可能性があるタウリン、アルギニン、グルタミン、ロイシンを候補代謝物質として抽出し、更なる検討を行った。

(4) 代謝物候補に関する検討：タウリン、アルギニン、グルタミン、ロイシンの、細胞内での合成酵素の遺伝子発現と細胞内への取り込み能を検討した。IRKD 細胞では、タウリン合成酵素の発現と細胞内へのタウリンの取り込みが亢進していた(図2)。一方、IRKD 細胞ではアルギニン合成酵素の発現と、アルギニンの取り込みは低下していた。その他の結果には有意差を認めなかった。これらの結果より、タウリンがグルカゴン分泌に影響を及ぼす可能性が考えられた。10 mM のタウリンを 1.5 mM、5.6 mM、30 mM のグルコース濃度下で IRKD 細胞とコントロール細胞に添加すると、IRKD 細胞でのみ、タウリン存在下で高グルコース時のグルカゴン分泌が刺激された(図3)。インスリンレセプターノックダウン膵島でも同様の検討を行うと、タウリン存在下で高グルコース時のグルカゴン分泌が刺激された。

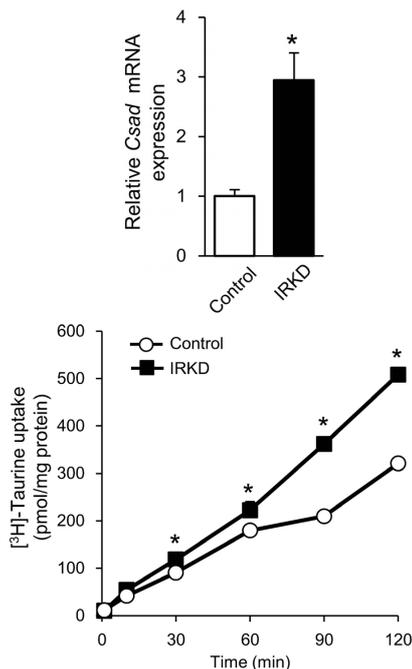


図2. タウリンの合成酵素と細胞内への取り込みの結果(コントロール細胞 vs. インスリン受容体ノックダウン TC1-6細胞)

Csad; Cysteine sulfonic acid decarboxylase.  
\*p < 0.05, コントロール細胞 vs. インスリン受容体ノックダウン TC1-6細胞、バーはSEM。

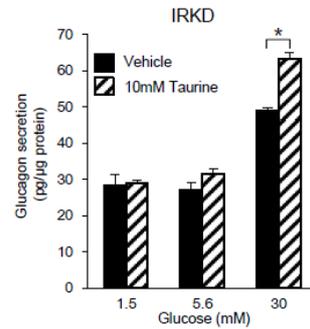


図3. インスリンノックダウン TC1-6細胞におけるタウリンの添加によるグルカゴン分泌の結果(タウリン(-) vs. タウリン10 mM(+))

: タウリン(-)、■: タウリン10 mM(+).  
\*p < 0.05, タウリン(-) vs. タウリン10 mM(+). バーはSEM。

本研究の結果、インスリン作用が慢性的に欠乏した膵細胞においてグルカゴンの奇異性分泌が認められ、その一因として細胞内代謝の変化、とくにタウリンの上昇が関与している可能性が示唆された。タウリンがグルカゴン分泌異常を引き起こすという報告は今までにない。しかしこれまでに、タウリンが膵細胞や筋細胞で  $K_{ATP}$  チャンネル活性を阻害するという報告や、膵細胞においてタウリンの添加により細胞内カルシウム濃度が上昇し、インスリン分泌が亢進したという報告がある。これらのことより、IRKD細胞において、タウリンは  $K_{ATP}$  チャンネル活性の阻害や細胞内カルシウム濃度の上昇を介してグルカゴン分泌を刺激している可能性が考えられる。

インスリンレセプターをノックダウンした膵細胞は、コントロールの細胞と比較して、奇異性のグルカゴン分泌動態を示し、その一因として細胞内タウリンの増加が示唆された。これらの知見は、インスリン分泌が枯渇した1型糖尿病患者の病態解明および治療の一助となる可能性がある。

## 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)

[雑誌論文](計5件)

三柴 裕子、今川 彰久. 1型糖尿病におけるグルカゴン異常. *Diabetes Frontier*. 2016; 27(2):229-3. (査読無)  
Bessho M, Murase-Mishiba Y, Imagawa A, Terasaki J, Hanafusa T. Possible contribution of taurine to distorted glucagon secretion in intra-islet

insulin deficiency: a metabolome analysis using a novel  $\alpha$ -cell model of insulin-deficient diabetes. PLoS One. 2014; 9(11):e113254. doi: 10.1371/journal.pone.0113254. (査読有)

Miyasato M, Murase-Mishiba Y, Bessho M, Miyawaki M, Imbe H, Tsutsumi C, Tanimoto K, Imagawa A, Terasaki J, Hanafusa T. The cytokeratin-18 fragment level as a biomarker of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus. Clin Chim Acta. 2014; 433(10):184-9. doi: 10.1016/j.cca.2014.03.018. (査読有)

Bessho M, Murase-Mishiba Y, Tsutsumi C, Haseda F, Imagawa A, Terasaki J, Hanafusa T. Glycaemic instability correlates with a hyperglucagonaemic response in patients with type 1 diabetes without residual beta-cell function. Diabetes Res Clin Pract. 2013; 102(2):e38-40. doi: 10.1016/j.diabres.2013.09.003. (査読有)

Haseda F, Imagawa A, Murase-Mishiba Y, Terasaki J, Hanafusa T. CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> FoxP3high activated regulatory T cells are functionally impaired and related to residual insulin-secreting capacity in patients with type 1 diabetes. Clin Exp Immunol. 2013; 173(2):207-16. doi: 10.1111/cei.12116. (査読有)

[学会発表](計 20 件)

Bessho-Tachibana M, Murase-Mishiba Y, Imagawa A, Terasaki J, Hanafusa T. Characterization of a pancreatic alpha-cell model of insulin-deficient diabetes by metabolome analysis. The International Diabetes Federation 23rd World Diabetes Congress (IDF 2015). 2015年12月1日. Vancouver (Canada)

Bessho-Tachibana M, Murase-Mishiba Y, Imagawa A, Terasaki J, Hanafusa T. Characterization of a pancreatic alpha-cell model of insulin-deficient diabetes by metabolome analysis: a possible pathogenetic role of taurine. Keystone Symposia Conference: Diabetes: New Insights into Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. 2015年10月26日. ウェスティン都ホテル京都 (京都府

京都市)

三柴 裕子, 橘 恵, 宮里 舞, 堤 千春, 弘田 弘子, 稲葉 惟子, 佐野 寛行, 中辻 文彦, 谷本 啓爾, 金網 規夫, 大西 峰樹, 今川 彰久, 寺前 純吾, 花房 俊昭, インスリン分泌が枯渇した1型糖尿病における食事負荷に対するグルカゴン分泌動態の検討, 第58回日本糖尿病学会年次学術集会, 2015年5月24日, 海峡メッセ (山口県下関市)

佐野 寛行, 長谷田 文孝, 堤 千春, 谷本 啓爾, 金網 規夫, 三柴 裕子, 大西 峰樹, 寺前 純吾, 花房 俊昭, GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 受容体作動薬 exenatideのマウス自己免疫性関節炎に対する効果, 第58回日本糖尿病学会年次学術集会, 2015年5月24日, 海峡メッセ (山口県下関市)

長谷田 文孝, 今川 彰久, 西川 博嘉, 三井 しのぶ, 藤澤 玲子, 堤 千春, 佐野 寛行, 三柴 裕子, 寺前 純吾, 坂口 志文, 花房 俊昭, 劇症1型糖尿病患者急性期血清において高値を認める新規抗体, 第58回日本糖尿病学会年次学術集会, 2015年5月24日, 海峡メッセ (山口県下関市)

大西 峰樹, 寺前 純吾, 三柴 裕子, 花房 俊昭, 2型糖尿病患者におけるSGLT2阻害薬の有用性と食行動の関係, 2015年5月24日, 海峡メッセ (山口県下関市)

宮脇 正博, 堤 千春, 酒井 聡至, 葛谷 実和, 別所 恵, 谷本 啓爾, 佐野 寛行, 金網 規夫, 三柴 裕子, 大西 峰樹, 寺前 純吾, 花房 俊昭, 1型糖尿病合併妊娠2症例におけるSMBGより算出した血糖変動指標と胎児発育についての検討, 第30回日本糖尿病・妊娠学会年次学術集会, 2014年11月28日, 長崎ブリックホール (長崎県長崎市)

兵頭 優佳, 金網 規夫, 岩佐 一生, 中辻 文彦, 堤 千春, 谷本 啓爾, 佐野 寛行, 三柴 裕子, 大西 峰樹, 寺前 純吾, 花房 俊昭, 朝食後の血糖コントロールに難渋した Overt Diabetes In Pregnancyの1例, 第51回日本糖尿病学会近畿地方会, 2014年10月25日, 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

Bessho M, Murase-Mishiba Y, Imagawa A, Terasaki J, Hanafusa T. Possible contribution of taurine to distorted glucagon secretion in insulin deficiency: A metabolome analysis using a novel  $\alpha$ -cell model of type 1 diabetes. 50th European Association for the Study of Diabetes (EASD) Annual

Meeting. 2014年9月16日. Vienna (Austria)

Haseda F, Imagawa A, Mitsui M, Fujisawa R, Tsutsumi C, Sano H, Nishikawa H, Murase-Mishiba Y, Terasaki J, Sakaguchi S, Hanafusa T. A novel autoantibody detected in patients with fulminant type 1 diabetes. 50th European Association for the Study of Diabetes (EASD) Annual Meeting. 2014年9月16日. Vienna (Austria)

Murase-Mishiba Y, Terasaki J, Hanafusa T. Characteristics of a pancreatic alpha-cell model of type 1 diabetes employing metabolome analysis. (シンポジウム)第57回日本糖尿病学会年次学術集会、2014年5月24日、大阪国際会議場(大阪府大阪市)

長谷田 文孝、今川 彰久、堤 千春、佐野 寛行、大西 峰樹、三柴 裕子、寺前 純吾、花房 俊昭、1型糖尿病におけるCD4+CD45RA+FOXP3 low resting制御性T細胞の量的・質的検討、第57回日本糖尿病学会年次学術集会、2014年5月24日、大阪国際会議場(大阪府大阪市)

別所 恵、三柴 裕子、寺前 純吾、今川 彰久、花房 俊昭、内因性インスリン分泌が枯渇した状況下におけるグルコース応答性グルカゴン分泌反応の検討、第57回日本糖尿病学会年次学術集会、2014年5月23日、大阪国際会議場(大阪府大阪市)

堤 千春、稲葉 惟子、佐野 寛行、栗栖 義賢、宮脇 正博、三柴 裕子、今川 彰久、寺前 純吾、中嶋 秀人、花房 俊昭、乳癌を早期に発見し得たStiff-person症候群合併急性発症1型糖尿病(第2報) : GAD抗体による免疫組織学的検討、第57回日本糖尿病学会年次学術集会、2014年5月23日、大阪国際会議場(大阪府大阪市)

三柴 裕子、別所 恵、寺前 純吾、今川 彰久、花房 俊昭、細胞外グルコース濃度が膵細胞に及ぼす影響の検討、第57回日本糖尿病学会年次学術集会、2014年5月22日、大阪国際会議場(大阪府大阪市)

Miyasato M, Murase-Mishiba Y, Bessho M, Shishikura K, Imbe H, Miyawaki M, Nakatsuji F, Tsutsumi C, Haseda F, Sano H, Ohnishi M, Imagawa A, Terasaki J, Hanafusa T. Cytokeratin-18 Fragment Levels as a Biomarker for Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Type 2 Diabetes. World Diabetes Congress 2013

International Diabetes Federation. 2013年12月4日. Melbourne (Australia)

木股 宏恵、中辻 文彦、松浦 峻行、村山 結美、弘田 弘子、三柴 裕子、寺前 純吾、花房 俊昭、下肢切断にて救命し得た壊死性軟部組織感染症の一例、第28回日本糖尿病合併症学会、2013年9月13日、旭川グランドホテル(北海道旭川市)

Miyasato M, Murase-Mishiba Y, Bessho M, Shishikura K, Imbe H, Miyawaki M, Nakatsuji F, Tsutsumi C, Haseda F, Sano H, Ohnishi M, Imagawa A, Terasaki J, Hanafusa T. Cytokeratin-18 fragment levels as a biomarker for nonalcoholic fatty liver disease in type 2 Diabetes. 73th scientific sessions of American Diabetes Association. 2013年6月23日. Chicago (USA)

稲葉 惟子、堤 千春、山根 一志、三柴 裕子、寺前 純吾、中嶋 秀人、花房 俊昭、足趾の有痛性筋痙攣による歩行障害を認めた抗GAD抗体異常高値の急性発症1型糖尿病の1例、第56回日本糖尿病学会年次学術集会、2013年5月18日、ホテル日航熊本(熊本県熊本市)

別所 恵、三柴 裕子、堤 千春、長谷田 文孝、寺前 純吾、今川 彰久、花房 俊昭、内因性インスリン分泌が完全に枯渇した1型糖尿病患者におけるグルカゴン分泌能と血糖不安定性との関連、第56回日本糖尿病学会年次学術集会、2013年5月18日、ホテル日航熊本(熊本県熊本市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三柴 裕子 (Yuko Mishiba)  
大阪医科大学・医学部・助教  
研究者番号 : 80377415

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし