

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461383

研究課題名(和文) KATP非依存性経路とインクレチン相互作用によるインスリン分泌機構の解明

研究課題名(英文) Insight into mechanisms of insulin secretion induced by KATP-independent action and incretin

研究代表者

駒津 光久 (KOMATSU, Mitsuhsa)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：90221978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究期間にインスリン分泌機構に関する以下の2つの成果を得た。

1)ブドウ糖によるインスリン分泌はCa²⁺チャネル阻害薬とATP感受性K⁺チャネル開放薬で抑制されるが、細胞内cAMPを増加させた条件下では、ブドウ糖は急峻なインスリン分泌を惹起した。一方細胞内Ca²⁺濃度は急峻に低下した。2)膵細胞に発現している甘味受容体の特異的阻害薬であるlactisoleが膵細胞からのブドウ糖によるインスリン分泌、[Ca²⁺]_iの上昇、細胞内NADHの上昇を抑制した。これらの結果からlactisoleが膵細胞における甘味受容体の機能解析に有用なツールになることが示された。

研究成果の概要(英文)：In search of mechanisms of glucose-stimulates insulin secretion, we established two different aspects of findings as follows.

1)We demonstrated that glucose could trigger rapid insulin release independent from its action on both KATP channel and voltage-dependent Ca²⁺ channel. Namely, with diazoxide, an opener of KATP channel, and nifedipine, a blocker of L-type voltage-dependent Ca²⁺ channel, glucose triggered insulin secretion from rat pancreatic islets in the presence of forskolin, an activator of adenylyl cyclase. 2)Lactisole, an inhibitor of sweet taste receptor, inhibited insulin secretion induced by sweeteners. It attenuated the elevation of cytoplasmic Ca²⁺ concentrations induced by these sweeteners. It also inhibited action of glucose. These results indicate that lactisole may be useful in assessing the role of the glucose-sensing receptor in pancreatic β -cells.

研究分野：糖尿病学、内分泌学

キーワード：インスリン分泌

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病では膵細胞の機能(インスリン分泌能)が進行性に低下していく。したがって、膵細胞からのインスリン分泌機構の解明は2型糖尿病の病態解明や治療法の開発に重要である。また、消化管から分泌されるインクレチンは膵細胞に作用し、生理的なインスリン分泌制御に関わっており、この経路を利用した治療薬も普及している。しかし、生理的インスリン分泌機構の詳細は不明なことが多い。特に、最も重要なインスリン分泌刺激物質であるブドウ糖がどのようにインスリン分泌を惹起するのか、インクレチンがどのようにインスリン分泌機構に関与するのかについては大きな研究課題である。

2. 研究の目的

ブドウ糖およびインクレチンによるインスリン分泌機構を解明する。本研究期間には2つの異なった観点でアプローチした。1)「インクレチン作用」と「ブドウ糖によるKATPチャネル非依存性作用」は協調して、インスリン分泌を惹起することの証明 2)甘味受容体の特異的阻害薬であるラクチゾールのインスリン分泌に対する効果とその研究ツールとしての有用性

3. 研究の方法

ラットまたはマウスからコラゲナーゼ法で単離した膵ランゲルハンス氏島(ラ島)を用いて2種類のインスリン分泌実験を行った。

インキュベーション実験:試験管内に一定数のラ島をいれ、上清の緩衝液中に一定時間で分泌されるインスリン分泌量を定量する。様々な条件下でのインスリン分泌量を比較出来る利点がある。灌流実験:50個のラ島を独自のチャンバー内に封入し、灌流液を一定速度で流し、フラクションコレクターで時間ごとの灌流液を収集し、そのインスリン濃度を測定することで、インスリン分泌のタイムコースを明らかにできる。細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度($[Ca^{2+}]_i$)をfura2AMなどの蛍光色素を用いて、既報の方法で測定した。一部の実験ではインスリン分泌細胞株を用いてインスリン分泌、 $[Ca^{2+}]_i$ 、細胞内cAMP、細胞内NADHを測定した。

4. 研究成果

本研究期間にインスリン分泌機構に関する以下の2つの成果を得た。さらに、我々の現在までのインスリン分泌機構に関する研究にもとづいてまとめた論文「ブドウ糖によるインシュリン分泌とインクレチン-生理的意義の理解に向けて-」が第50回ベルツ賞2等賞を受賞した^①。

1) 高濃度ブドウ糖(22 mM)によるインスリン分泌は Ca^{2+} チャネル阻害薬(10 μ M ニフェジピン)またはATP感受性 K^+ チャネル開放薬(250 μ M ジアゾキサイド)でそれぞれ完全に抑制された。両者の存在下でも当然ブ

ドウ糖によるインスリン分泌は完全に抑制された。このようにKATPチャネル依存性経路にかかわる2つの重要な部位を抑制した条件下では通常のインスリン分泌は惹起されないが、ここでインクレチン作用を増加する目的でアデニリルサイクラーゼの活性化剤であるフォルスコリン(10 μ M)をあらかじめ添加してcAMPを増加させておくと、10 μ M ニフェジピンおよび250 μ M ジアゾキサイド存在下でもブドウ糖はインスリン分泌を惹起した。このときのブドウ糖によるインスリン分泌のタイムコースを検討すると、刺激直後からの急峻なインスリン分泌(10分間)とそれに続く緩やかな漸増するインスリン分泌が観察された。初期の急峻なインスリン分泌は、通常の高濃度ブドウ糖により惹起される2相性インスリン分泌の第1相に質的、量的に同様であった。一方、同じ条件下で $[Ca^{2+}]_i$ はブドウ糖刺激で急峻に低下し、その後漸増した。したがって、初期の急峻なインスリン分泌は $[Ca^{2+}]_i$ の上昇がなく、むしろ減少している中で惹起されたことになる。この結果は、インクレチン作用があれば、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇とは無関係にブドウ糖がインスリン分泌を惹起できることを示すあらたな証拠を提示した。

2) 膵細胞に甘味受容体が発現していることが報告された。この受容体がブドウ糖によるインスリン分泌機構の一部として関与している可能性を検討することを考えた。そのためには、この経路を薬理的に抑制する手段が必要である。そこで甘味受容体の特異的阻害薬であるlactisoleが膵細胞に与える効果を膵細胞株とマウスラ島を用いて検討した。Lactisoleは濃度依存性に各種甘味物質やブドウ糖によるインスリン分泌を抑制した。 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇、細胞内NADHの上昇もlactisoleは抑制した。しかし細胞内cAMPには影響を与えなかった。これらの結果からlactisoleが膵細胞における甘味受容体の機能解析に有用なツールになることが示された。

<引用文献>

①駒津光久、佐藤吉彦、相澤徹 ブドウ糖によるインシュリン分泌とインクレチン-生理的意義の理解に向けて- 最新医学, 69:128-151 2014

Takei M, Dezaki K, Ishii H, Nishio S, Sato Y, Suzuki S, Yada T, Komatsu M. A new experimental model of ATP-sensitive K(+) channel-independent insulinotropic action of glucose: a permissive role of cAMP for triggering of insulin release from rat pancreatic beta-cells. Endocrine Journal. 2013; 60(5): 599-607. PubMed PMID: 23327802

Hamano K, Nakagawa Y, Ohtsu Y, Li L, Medina J, Tanaka Y, Masuda K, Komatsu M, Kojima I. Lactisole inhibits the glucose-sensing receptor T1R3 expressed in mouse pancreatic beta-cells. The Journal of endocrinology. 2015

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 20 件)

- 1 Ohkubo Y, Sato Y, Nakasone Y, Shirotori K, Oguchi K, Matsushita T, Nishikawa T, Yamazaki Y, Sasano H, Komatsu M, Yamauchi K, Aizawa T. Extraordinarily High Aldosterone, 901.0 ng/dl, in a Patient with Primary Aldosteronism: An Insight into the Underlying Mechanism. *Endocrine Journal* 2016 Feb 29;63(2):127-33. (査読有)
- 2 Takei M, Ishii H, Kawai Y, Kato K, Sato Y, Takeda T, Komatsu M. A case of Type B insulin resistance syndrome associated with systemic lupus erythematosus successfully treated with a combination of glucocorticoid and cyclosporine following rituximab. *Journal of Diabetes Investigation* 2015 Nov; 6(6): 734-738 (査読有)
- 3 Ishii H, Kobayashi Y, Shibata Y, Miyakoshi T, Miyakoshi W, Kitahara J, Kato K, Yokota N, Kawai Y, Komatsu M. The Ratio of Plasma Aldosterone Concentration to Potassium in Adrenocorticotropin Stimulation Test is a Possible New Index for Diagnosis of Aldosterone-producing Adenoma in Patients with Primary Aldosteronism. *The Shinshu Medical Journal* 2015 63(3): 145 -156 (査読有)
- 4 Takei M, Komatsu M, Aizawa T. Intracellular free fatty acid upholds beta-cell glucose competence: The role of peroxisome proliferator-activated receptor delta and mitochondrial metabolism. *Journal of Diabetes Investigation*. 2015 Mar;6(2): 133-6. PubMed PMID: 25802719. Pubmed Central PMCID: 4364846. (査読有)
- 5 Shibata Y, Yamazaki M, Takei M, Uchino S, Sakurai A, Komatsu M. Early-onset, severe, and recurrent primary hyperparathyroidism associated with a novel CDC73 mutation. *Endocrine Journal*. 2015 Jul 31;62(7):627-32. PubMed PMID: 25959515. (査読有)
- 6 Hamano K, Nakagawa Y, Ohtsu Y, Li L, Medina J, Tanaka Y, Masuda, K, Komatsu M, Kojima I. Lactisole inhibits the glucose-sensing receptor T1R3 expressed in mouse pancreatic beta-cells. *The Journal of endocrinology*. 2015 Jul;226(1):57-66. PubMed PMID: 25994004. (査読有)
- 7 Yamazaki M, Hanamura T, Ito K, Uchino S, Sakurai A, Komatsu M. A newly identified missense mutation in RET codon 666 is associated with the development of medullary thyroid carcinoma. *Endocrine journal*. 2014 Nov 28;61(11):1141-4. PubMed PMID: 25319874. (査読有)
- 8 Takeshige K, Sekido T, Kitahara J, Ohkubo Y, Hiwatashi D, Ishii H, Nishio S, Takeda T, Komatsu M, Suzuki S. Cytosolic T3-binding protein modulates dynamic alteration of T3-mediated gene expression in cells. *Endocrine journal*. 2014;61(6):561-70. PubMed PMID: 24646676. (査読有)
- 9 Takei M, Ishii H, Sato Y, Komatsu M. A Case of Marine-Lenhart Syndrome with a Negative TSH Receptor Antibody Titer Successfully Treated with a Fixed, Low Dose of I 2014;2014:423563. PubMed PMID: 25161779. Pubmed Central PMCID: 4137599. (査読有)
- 10 Ohkubo Y, Sekido T, Takeshige K, Ishii H, Takei M, Nishio S, Yamazaki, M, Komatsu M, Kawa S, Suzuki S. Occurrence of IgG4-related hypophysitis lacking IgG4-bearing plasma cell infiltration during steroid therapy. *Internal medicine*. 2014;53(7):753-7. PubMed PMID: 24694491. (査読有)
- 11 Kobayashi Y, Takei M, Ohkubo Y, Kakizawa Y, Matoba H, Kumagai M, Takeda T, Suzuki S, Komatsu M. A somatotropin-producing pituitary adenoma with an isolated adrenocorticotropin -producing pituitary adenoma in a female patient with acromegaly, subclinical Cushing's disease and a left adrenal tumor. *Endocrine journal*. 2014; 61(6):589-95. PubMed PMID: 24705560. (査読有)
- 12 Ishii H, Ohkubo Y, Takei M, Nishio S, Yamazaki M, Kumagai M, Sato Y, Suzuki S, Aoki Y, Miyamoto T, Kakizawa T, Sakuma T, Komatsu M. Efficacy of combination therapy with sitagliptin and low-dose glimepiride in Japanese patients with type 2 diabetes. *Journal of clinical medicine research*. 2014 Apr;6(2):127-32. PubMed PMID: 24578754. Pubmed Central PMCID: 3935521. (査読有)
- 13 Watanabe T, Maruyama M, Ito T, Fujinaga Y, Ozaki Y, Maruyama M, Kodama R, Muraki T, Hamano H, Arakura N, Kadoya M, Suzuki S, Komatsu M, Shimojo H, Notohara K, Uchida M, Kawa S. Clinical features of a new disease concept, IgG4-related thyroiditis. *Scandinavian journal of rheumatology*. 2013;42(4):325-30. PubMed PMID: 23496326. (査読有)
- 14 Takei M, Dezaki K, Ishii H, Nishio S, Sato Y, Suzuki S, Yada T, Komatsu M. A new experimental model of ATP-sensitive K(+) channel-independent insulinotropic action of glucose: a permissive role of cAMP for triggering of insulin release from rat pancreatic beta-cells. *Endocrine Journal*. 2013; 60(5): 599-607. PubMed PMID: 23327802. (査読有)
- 15 Suzuki S, Nishio S, Ishii H, Sekido T, Takeshige K, Ohkubo Y, Hiwatashi D, Takeda T, Komatsu M. Possible roles of the AP-1 site in the cytosolic T3 binding protein promoter and

insights into its physiological significance. Hormone and metabolic research. 2013 Jul;45(7):501-6. PubMed PMID: 23508717. (査読有)

16. Ozawa W, Sato K, Miyakoshi T, Nishio S, Yamazaki M, Suzuki S, Komatsu M. Case report: Beneficial effect of 11beta-hydroxylase inhibitor in the management of an elderly patient with an androgen-producing inoperable adrenal tumor. Geriatrics & gerontology international. 2013 Apr; 13(2): 509-11. PubMed PMID: 23551351. (査読有)

17. Nakajima K, Tamai M, Okaniwa S, Nakamura Y, Kobayashi M, Niwa T, Horigome N, Ito N, Suzuki S, Nishio S, Komatsu M. Humoral hypercalcemia associated with gastric carcinoma secreting parathyroid hormone: a case report and review of the literature. Endocrine journal. 2013;60(5):557-62. PubMed PMID: 23303131. (査読有)

18. Komatsu M, Takei M, Ishii H, Sato Y. Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective. Journal of diabetes investigation. 2013 Nov 27;4(6):511-6. PubMed PMID: 24843702. Pubmed Central PMCID: 4020243. (査読有)

19. Ishii H, Takei M, Sato Y, Ito T, Ito K, Sakai Y, Yumita W, Suzuki S, Komatsu M. A case of severe and recurrent painless thyroiditis requiring thyroidectomy. Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre. 2013;22(4):408-10. PubMed PMID: 23182952. (査読有)

20. 駒津光久、佐藤吉彦、相澤徹 ブドウ糖によるインシュリン分泌とインクレチン-生理的意義の理解に向けて- 特報第50回 2013年度ベルツ賞2等賞受賞論文最新医学, 69:128-151 2014 (査読有)

〔学会発表〕(計2件)

1. Ohkubo Y, Sekido T, Sekido K, Nishio S, Komatsu M. Tri-iodothyronine acts as prospective factor against hyperglycemia mainly via thyroid hormone receptor beta. American Diabetes Association 75th Scientific Session in Boston, 2015
2. Sekido K, Ohkubo Y, Sekido T, Nishio S, Komatsu M. Repression of insulin gene transcription by estrogen receptor in pancreatic beta cell. American Diabetes Association 75th Scientific Session in Boston, 2015

〔図書〕(計10件)

1. 駒津光久 インシュリン分泌能評価法 内分泌・糖尿病・代謝内科 40(1):15-19, 2015
2. 竹重恵子、関戸貴志、駒津光久 内分泌疾患(先端巨大症、クッシング症候群、原

発性アルドステロン症)

別冊プラクティス, :85-92 2014

3. 駒津光久 SU薬のポジショニング SU薬はもういらぬのか 糖尿病診療マスター, 12:156-161 2014
4. 樋渡大、駒津光久 独居高齢者の症例報告 DIABETES UPDATE, 3:28-32 2014
5. 駒津光久 SGLUT2阻害薬の基礎データを見る 編集加来浩平 2型糖尿病治療の新展開~SGLUT2阻害薬登場による新たな可能性~ 先端医学社, :30-43 2014
6. 駒津光久 KATP非依存性ブドウ糖応答性シグナルは生理的に重要か? 内分泌・糖尿病・代謝内科, 39(2):122-127 2014
7. 柴田有亮、河合裕子、駒津光久 GPR40作動薬 糖尿病治療薬はどこまで来たか-新規治療薬開発の現状- 月刊糖尿病, 6(9):49-55 2014
8. 北原順一郎、河合裕子、駒津光久 薬剤による食後高血糖治療:グリニド薬 月刊糖尿病 食後高血糖改善薬による糖尿病治療 医学出版, 5:60-65 2013
9. 駒津光久 糖尿病における急性期管理-糖尿病患者の急性合併症への正しい対応- プラクティス, 30:289 2013
10. 駒津光久 医師・医療スタッフをつなぐスキルと知識の維持と向上を目指して プラクティス, 30:530 2013

6. 研究組織

(1)研究代表者

駒津 光久(KOMATSU, Mitsuhsa)
信州大学・学術研究院医学系・教授
研究者番号: 90221978

(2)研究分担者

鈴木 悟 (SUZUKI, Satoru)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 30222061

西尾 真一 (NISHIO, Shin-ichi)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・講師
研究者番号: 30467146

(3)連携研究者:なし