

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12705

研究課題名(和文)腸管由来メラトニンが食事によるインスリン分泌調節における負の調節因子である可能性

研究課題名(英文)Possible involvement of gut-derived melatonin as a negative regulator of insulin secretion

研究代表者

石川 智久(Ishikawa, Tomohisa)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：10201914

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):メラトニンは、セロトニンからN-アセチルセロトニン(NAS)を経て生成される。膵細胞でNASが生成されることを示唆する結果を得たことから、NASがオートクリンとしてメラトニン受容体に作用するという仮説に変更して検討を行った。その結果、細胞におけるグルコース誘発 $[Ca^{2+}]_i$ オシレーションやインスリン分泌をNASがメラトニンMT2受容体を介して抑制することや、細胞におけるNAS生成が妊娠期に低下することなどが示された。すなわち、細胞で生成されるNASがオートクリンとしてMT2受容体を介してインスリン分泌を制御しており、妊娠期における血糖制御にこの機構が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文):Melatonin derives from serotonin via N-acetylserotonin (NAS). The expression of melatonin receptors in pancreatic β -cells has been demonstrated; however, physiological roles of melatonin receptors or their intrinsic ligands in β -cells remain to be fully elucidated. In this study, we found that AANAT, which converts serotonin to NAS, is expressed in pancreatic β -cells, suggesting that NAS is produced from serotonin in β -cells. We therefore tested the hypothesis that NAS functions as autocrine in β -cells. We showed that NAS inhibits glucose-induced $[Ca^{2+}]_i$ oscillation and insulin secretion in β -cells through the activation of melatonin MT2 receptors, and that the expression of AANAT is significantly decreased in pancreatic islets at gestational day 12. These results suggest that NAS produced in β -cells functions as autocrine, inhibiting insulin secretion via MT2 receptors, and that this mechanism may contribute to the regulation of blood glucose during gestational period.

研究分野: Pharmacology

キーワード: 膵細胞 インスリン分泌 メラトニン受容体 N-アセチルセロトニン

1. 研究開始当初の背景

膵β細胞にはメラトニン MT₁ および MT₂ 受容体が存在しており、松果体から分泌されるメラトニンによる概日リズムの同調を介した膵β細胞機能の調節が提唱されている。我々も、末梢体内時計によるインスリン分泌調節の可能性について解析を行い、メラトニンが膵β細胞からのインスリン分泌を抑制すること、さらにグルコース誘発インスリン分泌よりも、インクレチンである GLP-1 によるグルコース誘発インスリン分泌の促進効果をより強く抑制することを示唆する結果を得た。しかし興味深いことに、松果体におけるメラトニン産生が認められない C57BL/6J マウスの膵島においても、メラトニン産生が認められる C3H/He マウスの膵島と同等レベルの MT₁ および MT₂ 受容体の発現が認められ、さらに、単離した膵島からのインスリン分泌に対するメラトニンの効果にも両者で違いが認められなかった。そこで、松果体以外の部位から分泌されるメラトニンにより膵β細胞からのインスリン分泌が調節されているのではないかと考え、まずは、末梢における主なメラトニン産生部位である腸管に着目して検討を行うこととした。

2. 研究の目的

末梢体内時計の同調因子として知られる松果体ホルモン・メラトニンは、腸管においても産生されることが知られている。そこで、膵β細胞に存在するメラトニン MT₁ および MT₂ 受容体に作用するメラトニンの起源を明らかにすることを目的とし、その候補として腸管の内分泌細胞を想定した。腸管由来のメラトニンが同じく腸管から分泌される GLP-1 と拮抗し、インスリン分泌を巧妙に調節しているという新たなインスリン分泌調節機構の存在を仮定した。メラトニンは主に松果体でセロトニンからメラトニン合成酵素である AANAT (arylalkylamine *N*-acetyltransferase)

および HIOMT (hydroxyindole *O*-methyltransferase) を介して合成される。メラトニンの腸管における産生を解析するにあたって、膵β細胞におけるメラトニン産生の有無についても検証した。その結果、マウス膵島には AANAT は発現しているが HIOMT は発現していないことが示され、膵β細胞においてメラトニンが産生されている可能性は否定された。しかし、AANAT の発現が認められたことから、膵β細胞においてメラトニンの前駆体である *N*-acetylserotonin (NAS) が産生される可能性が新たに生じた。他の細胞では、NAS がメラトニン受容体を刺激することが報告されている。そこで、膵β細胞においても NAS がメラトニン受容体アゴニストとして機能するとすれば、膵β細胞で産生される NAS がオートクリンとしてメラトニン受容体を介してインスリン分泌調節に関与するという、新たなインスリン分泌調節機構の存在が示唆できる。さらに、膵β細胞では、NAS の前駆物質であるセロトニンは妊娠中期に特異的に生成され、妊娠時のインスリン抵抗性状態を代償するための膵細胞量の増大及びインスリン分泌の増加をもたらすことが示唆されており、セロトニンから生成される NAS も妊娠中期に特異的に生成されると予想される。すなわち、膵β細胞においてオートクリンとして働く NAS が、その発症機序が未だに不明な妊娠糖尿病と関連する可能性も考えられた。さらに、近年のゲノムワイド関連解析 (GWAS) により、妊娠糖尿病の疾患遺伝子関連領域として、メラトニン MT₂ 受容体遺伝子 MTNR1B の変異が報告され、妊娠糖尿病患者における MT₂ 受容体の発現上昇が示唆された。そこで、膵β細胞におけるメラトニン受容体アゴニストとしての NAS の可能性と妊娠糖尿病との関係を明らかにすることは、より大きな意義を持つと判断し、目的を変更して解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 膵β細胞における AANAT 及びメラトニン受容体の発現解析: C57BL/6J 雄性及び雌性マウス (妊娠及び非妊娠) から単離した膵島及びβ細胞、マウス由来膵細胞株 MIN6B 細胞、ラット由来膵細胞株 INS-1D 細胞における AANAT、MT₁ 受容体、MT₂ 受容体の発現、及び発現量の変化を RT-PCR、real-time RT-PCR により解析した。

(2) 膵β細胞における NAS の作用解析: インスリン分泌及び細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) に対する NAS の作用を、C57BL/6J 雄性及び雌性マウスの単離膵島及びβ細胞、MIN6B 細胞、INS-1D 細胞を用いて解析した。インスリン分泌は RIA を用いて定量した。[Ca²⁺]_i 変化は、Ca²⁺ 蛍光指示薬 fura-PE3 を用いた画像解析により解析した。

4. 研究成果

(1) 膵細胞におけるメラトニン受容体の発現: 膵細胞におけるメラトニンの機能を検証するために、まずメラトニン受容体の発現をマウス膵島および細胞株を用いて検証した。RT-PCR により、メラトニン MT₁ 及び MT₂ 受容体の発現がいずれの標本においても確認された。なお、マウス膵島や MIN6B 細胞に比べ、INS-1D 細胞においては、MT₂ 受容体の発現が MT₁ 受容体よりも相対的に高いことが確認された。

(2) マウス膵島におけるメラトニン合成酵素の発現: 雄性及び雌性 C57BL/6J マウスから単離した膵島を用いて、AANAT 及び HIOMT の発現を RT-PCR により解析した。その結果、HIOMT の発現は C57BL/6J マウス膵島では認められなかったが、AANAT の発現が雄性及び雌性マウスのいずれの膵島において同程度に認められた。

(3) 膵β細胞株による AANAT の発現変化: 妊娠期マウスの膵島においては、膵島内のセロトニン含量が妊娠 12 日目で増加することが報告されている。そこで、妊娠 12 日目を擬した高濃度セロトニン存在下で MIN6B 細胞を 48 時間培養したところ、10 μM セロトニンにより NAS 合成酵素である AANAT の発現が上昇することが示された。

(4) 妊娠マウスの膵島における AANAT 及びメラトニン受容体の発現変化: 膵β細胞株で示唆された妊娠期の膵島における AANAT の発現変化について *in vivo* で確認した。非妊娠、妊娠 12 日目、15 日目の雌性マウスから単離した膵島を用いて、AANAT の発現を real-time RT-PCR により解析した。その結果、AANAT の発現に違いは認められなかった。すなわち、通常の妊娠期におけるセロトニン濃度の上昇では、AANAT の発現には影響しないことが示唆された。一方、メラトニン MT₁ 及び MT₂ 受容体の発現についても調べたところ、妊娠 12 日目の膵島における MT₂ 受容体の発現が有意に低下していることが示された。すなわち、セロトニンの濃度が上昇する妊娠 12 日目では、メラトニン受容体を介した反応は低下する可能性が示された。

(5) 膵β細胞における NAS の [Ca²⁺]_i 変化に対する作用: マウス初代培養 β細胞を用いて、インスリン分泌の指標となる [Ca²⁺]_i に対する NAS の作用を検討した。インスリン分泌刺激濃度である 11.1 mM グルコース存在下において、膵β細胞では [Ca²⁺]_i オシレーションが誘発される。この状態で、NAS を累積的に処置すると、グルコース誘発 [Ca²⁺]_i オシレーションが濃度依存的に抑制された。この NAS の抑制作用は、非選択的メラトニン受容体拮抗薬である luzindole により消失した。また、MT₂ 受容体選択的拮抗薬である 4-P-PDOT の効果も検討したところ、一部の細胞において

NAS による抑制効果が消失した。INS-1D 細胞及び MIN6B 細胞においても同様の検討を行ったところ、いずれの細胞でも NAS による $[Ca^{2+}]_i$ オシレーション抑制効果が認められた。なお、 MT_2 受容体の発現が相対的に高い INS-1D 細胞において、NAS による抑制効果がより強く現れる傾向が認められた。

(5) 膵 β 細胞における NAS のインスリン分泌に対する作用 : NAS による $[Ca^{2+}]_i$ オシレーション抑制効果が強く認められた INS-1D 細胞を用いて、NAS がグルコース誘発インスリン分泌に及ぼす効果を調べた。16.7 mM グルコースにより誘発されるインスリン分泌を NAS は濃度依存的に抑制した。

以上の結果から、NAS は主にメラトニン MT_2 受容体を介してインスリン分泌を抑制することが示唆され、膵 β 細胞に存在するメラトニン受容体の生理的リガンドが膵 β 細胞で産生される NAS である可能性が示された。高濃度のセロトニンによる膵 β 細胞における AANAT の発現上昇が認められたことから、妊娠中にセロトニン生成が過度に上昇した場合には NAS の生成も上昇する可能性が考えられる。セロトニンは妊娠中期に特異的に膵島内濃度が上昇し、妊娠時のインスリン抵抗性状態を代償するための膵細胞量の増大及びインスリン分泌の増加をもたらすことが示唆されている。一方、NAS はインスリン分泌抑制作用を示したことから、膵 β 細胞でセロトニンから生成される NAS がオートクリンとして MT_2 受容体に作用し、セロトニンの作用に対して抑制的に働く、ネガティブフィードバックの機構として働いている可能性が示された。さらに、膵島内セロトニン濃度が上昇する妊娠 12 日目には、 MT_2 受容体の発現が低下することから、この時期にはセロトニンの作用が NAS の作用よりも優位になることで、妊娠期における血糖上昇を制

御している可能性が示された。当初は、膵 β 細胞のメラトニン受容体に作用する生理的リガンドとして、腸管由来のメラトニンを想定して研究を計画したが、当初の想定とは異なり、膵 β 細胞由来の NAS がオートクリンとして膵 β 細胞のメラトニン受容体に作用するという全く新しい機構の存在を示唆することができた。さらに、妊娠期における血糖調節への関与を示唆する結果も得られたことから、さらなる研究の発展が見込まれ、萌芽的研究として大きな成果を挙げることができた。

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 10 件)

Sato T, Kaneko YK, Sawatani T, Noguchi A, Ishikawa T. Obligatory role of early Ca^{2+} responses in H_2O_2 -induced β -cell apoptosis. Biol Pharm Bull. 2015; 38: 1599-1605. doi: 10.1248/bpb.b15-00396.

Takii M, Kaneko YK, Akiyama K, Aoyagi Y, Tara Y, Asakawa T, Inai M, Kan T, Nemoto K, Ishikawa T. Insulinotropic and anti-apoptotic effects of nobiletin in INS-1D β -cells. J Funct Foods. 2017; 30: 8-15. doi: 10.1016/j.jff.2016.12.037.

Sagara H, Kanakogi M, Tara Y, Ouchi H, Kimura J, Kaneko Y, Inai M, Asakawa T, Ishikawa T, Kan T. Concise synthesis of poly-methoxyflavone sudachitin and its derivatives, and biological evaluations. Tetrahedron Lett. 2018; 59: 1816-1818. doi: 10.1016/j.tetlet.2018.03.064.

[学会発表] (計 50 件)

Tomohisa Ishikawa, Yukiko Kaneko: Role of DGKs in the regulation of insulin

secretion and β -cell mass. The 7th DGK international mini symposium (Kobe), 2017 年 3 月 13 日

石川智久、森岡亜望、佐野実咲、金子雪子：膵細胞における NO 産生調節系と 2 型糖尿病病態との関係．生理学研究所研究会 2017 (愛知) 2017 年 10 月 12 日
鴨志田ありさ、金子雪子、八木雄也、中村哲、石川智久：膵細胞概日リズム形成に関わる分子の発現および機能解析．第 138 回日本薬理学会関東部会(東京) 2018 年 3 月 10 日

〔図書〕(計 1 件)

金子雪子、石川智久：新規 2 型糖尿病治療薬創薬標的としての膵細胞脂質代謝制御．YAKUGAKU ZASSHI 2016; 136: 461-465.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：シアリダーゼ阻害活性を有する化合物を含むインスリン分泌促進剤、血糖値上昇抑制剤、又は糖尿病治療剤

発明者：南彰、鈴木隆、金子雪子、石川智久

権利者：静岡県立大学

種類：特許

番号：特願 2016-114923

出願年月日：2017 年 6 月 9 日

国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/pharmaco/>

(1)研究代表者

石川 智久 (ISHIKAWA TOMOHISA)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：10201914

(2)研究分担者

金子 雪子 (KANEKO YUKIKO)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：00381038