

令和元年6月4日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19540

研究課題名(和文) プリン作動性化学伝達による糖代謝制御

研究課題名(英文) The regulation of glucose metabolism affected by purinergic chemical transmission

研究代表者

坂本 昌平 (sakamoto, shohei)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：90761502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：小胞型ヌクレオチドトランスポーター(VNUT)はATPをホルモン分泌小胞内に充填し、引き続くプリン作動性化学伝達に必須の分子装置である。本研究では糖代謝においてVNUTを介したプリン作動性化学伝達が果たす役割とその分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。申請者らは肝臓においてVNUTがインスリン感受性を制御するメカニズムには肝細胞への直接的な作用と炎症細胞を介した間接的な作用があることを明らかにした。さらに、VNUT阻害薬が膵臓と肝臓に作用し、インスリン分泌および抵抗性を共に改善させ、新たな糖尿病治療薬となり得ることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においてVNUTを介したプリン作動性化学伝達が糖代謝において果たす役割とその分子メカニズムを解明することが出来た。プリン作動性化学伝達による糖代謝制御メカニズムの解明は待ち望まれている新たな糖尿病治療の開発へとつながることが期待され、VNUT阻害作用をもつクロロロン酸が細胞および個体レベルで糖代謝を改善することを本研究で明らかに出来たことは、今後の糖尿病治療の発展に貢献できると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Vesicular Nucleotide Transporter(VNUT) is essential for vesicular storage of ATP and subsequent purinergic chemical transmission. The purpose of this research was to clarify the role and the molecular mechanism of purinergic chemical transmission in glucose metabolism. We revealed that VNUT regulates insulin sensitivity in the liver through the direct action on hepatocytes and indirect action on inflammatory cells. Furthermore, we found that the inhibitor of VNUT affects the pancreas and the liver and these effects lead to the improvement of insulin secretion and insulin sensitivity respectively. These results suggest that the inhibitor of VNUT could be a new therapeutic drug for diabetes mellitus.

研究分野：内分泌・代謝学

キーワード：プリン作動性化学伝達 小胞型ヌクレオチドトランスポーター 糖代謝 ATP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ATP は細胞内で細胞共通のエネルギー源として働く一方で、細胞外に放出された ATP は細胞外でプリン作動性化学伝達を惹起する。神経内分泌細胞はその分泌小胞内に ATP を貯蔵し、分泌刺激によりホルモンと ATP を共に開口放出する (Clintoria RW et al. **Purinergic signal**, 2008) が、代謝調節における細胞外 ATP の役割は不明であった。そこで申請者らは分泌小胞内に ATP を運ぶ輸送体である **Vesicular Nucleotide Transporter (VNUT)** を欠損させたマウスを作製し解析を行った (Sakamoto S et al. **Sci Rep**, 2014、図 1)。VNUT 欠損マウスから単離した膵ラ氏島ではグルコース応答性 ATP 分泌が消失し、インスリン分泌は上昇を認めた。VNUT 欠損マウスでは、空腹時血糖値は有意に低値を示し、糖負荷試験における耐糖能の改善およびインスリン負荷試験でのインスリン感受性亢進を認めた。更に VNUT 欠損マウス肝臓で pAkt の発現亢進を認め、絶食時の肝臓のグリコーゲン分解は抑制されていたことから、肝臓でインスリン受容体シグナルが亢進していることが明らかとなったが、それらの詳細な機序は不明であった。

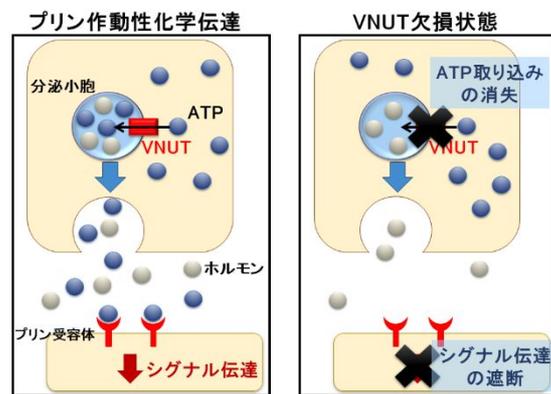


図1. 小胞分泌を介したプリン作動性化学伝達

現在までに申請者らはマウス個体において VNUT の抑制がインスリン分泌とインスリン感受性の両面に働くことを明らかにした。しかしながらその分子機構には未だ不明な点もあり、本研究においてその詳細なメカニズムを解明することが、待ち望まれている新たな糖尿病治療の開発へとつながると期待された。そこで、本研究では VNUT 欠損マウスを用いてインスリン分泌を行う膵β細胞、グルカゴン分泌を行う膵α細胞、およびインスリン標的臓器である肝臓、白色脂肪組織におけるプリン作動性化学伝達の役割を解明することを目的とした。さらに、申請者らが新たに同定した VNUT 阻害薬であるクロドロンの糖尿病治療薬としての蓋然性の高さを明らかにすることを目指した。

### 2. 研究の目的

現在までに申請者らはマウス個体において VNUT の抑制がインスリン分泌とインスリン感受性の両面に働くことを明らかにした。しかしながらその分子機構には未だ不明な点もあり、本研究においてその詳細なメカニズムを解明することが、待ち望まれている新たな糖尿病治療の開発へとつながると期待された。そこで、本研究では VNUT 欠損マウスを用いてインスリン分泌を行う膵β細胞、グルカゴン分泌を行う膵α細胞、およびインスリン標的臓器である肝臓、白色脂肪組織におけるプリン作動性化学伝達の役割を解明することを目的とした。さらに、申請者らが新たに同定した VNUT 阻害薬であるクロドロンの糖尿病治療薬としての蓋然性の高さを明らかにすることを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 膵β細胞、膵α細胞

( ) **インスリン分泌実験**：マウス膵細胞には 8 種類のプリン受容体の存在が報告されている。インスリン分泌に関連するプリン受容体を同定するため、単離膵ラ氏島に種々のプリン受容体作動薬 (ATP、ADP、S) および阻害薬 (P2X 受容体阻害薬; Suramin, P2Y 受容体阻害薬; PPADS、P2Y13 受容体阻害薬; MRS2211 など) を添加し、インスリン分泌を評価した。また膵β細胞内の Ca 動態を明らかにするため、Fluo4 を用いて、**Ca イメージング**を施行した。

( ) **グルカゴン分泌実験**：VNUT 欠損マウスでみられた低血糖反応性グルカゴン分泌の低下のメカニズムを明らかにするため、単離膵ラ氏島実験に対して低濃度 (1mM) グルコース負荷を行い、ATP 分泌量およびグルカゴン分泌量を測定した。生体内の正常血糖値である 5mM グルコースをコントロールとした。

#### (2) 肝細胞

( ) **初代培養肝細胞実験**：マウス肝細胞には 4 種類のプリン受容体の存在が報告され、肝細胞のプリン作動性化学伝達が直接インスリン受容体シグナルを制御している可能性が示唆された (Burnstock G et al. **Purinergic Signal**, 2014)。そこで、インスリン受容体シグナルに影響する受容体を明らかにするため、各マウスから調整した**初代培養肝細胞**を用い、各種受容体阻害薬を用いてインスリン受容体シグナル (mTOR、Akt) をウエスタンブロット法で解析した。

( ) **肝臓のインスリン受容体シグナル解析**：VNUT 欠損マウスの糖代謝改善メカニズムを明らかにするため、各マウスの肝臓のインスリン受容体シグナルをウエスタンブロット法およびリアルタイム PCR 法で解析した。また、マイクロアレイ、メタボローム解析にて遺伝子発現、細胞内代謝変化を網羅的に解析した。

( ) **炎症関連実験**：細胞外 ATP は P2X7R を介して NLRP3 インフラマソームを活性化し、IL-1β を発現し炎症を惹起する (Szabo G et al. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol**, 2015)。誘導された IL-1β は肝臓の Akt リン酸化を抑制し、インスリンシグナルを阻害する (Wen H et al. **Nat Immunol**, 2011)。すなわち VNUT 欠損マウスのインスリン感受性亢進は炎症抑制による間接的な働きも影響している可能性が示唆された。そこで、炎症の評価のため肝臓からマクロファージを分離し、マクロファージの活性化状態をフローサイトメトリーにて評価した。さらに高脂肪食負荷を行い、HE 染色、F4/80 免疫染色、Picrosirius red 染色により肝臓を病理組織学的に評価した。

#### (3) 脂肪細胞

マウス脂肪細胞には 4 種類のプリン受容体の存在が報告されている (Laplante MA et al.

Endocrinology. 2010, Børglum JD et al. Mol. Cell Endocrinol. 1996)。高脂肪食負荷を行った VNUT 欠損および野生型マウスを用いて、脂肪細胞の組織学的検討(HE 染色、F4/80 染色)や脂質代謝および炎症関連遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法で評価した。さらに脂肪細胞の褐色化を組織学的に解析した。

#### (4) VNUT 阻害薬 (クロドロン酸)

クロドロン酸の糖代謝における有効性について豚ラ氏島、マウス個体レベルで検証を行った。具体的には単離豚ラ氏島へクロドロン酸添加 (100 $\mu$ M) 後にインスリン分泌変化を解析した。さらに個体レベルではクロドロン酸 (50mg クロドロン酸/kg 体重) の経静脈注射後に経口糖負荷試験 (2g グルコース/kg 体重) およびインスリン負荷試験 (0.75U ノボリン R/kg 体重) を行い、糖代謝改善効果を評価した。また、有害事象の検討も同時に行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 膵 $\beta$ 細胞、膵 $\alpha$ 細胞

( ) インスリン分泌実験 : 野生型マウス由来の豚ラ氏島におけるインスリン分泌は ATP や ADP $\gamma$ S などのプリン受容体作動薬の投与により有意に抑制された。また、阻害薬添加実験の結果から豚ラ氏島におけるインスリン分泌調節には主に P2Y13 受容体が担っていると考えられた。豚ラ氏島の Ca イメージングでは VNUT 欠損マウスと野生型マウスで有意な差は認めなかった。

( ) グルカゴン分泌実験 : 野生型マウスの豚ラ氏島に対する低濃度グルコース負荷によりみられた ATP 分泌は VNUT 欠損マウスの豚ラ氏島では消失していた。同時に測定したグルカゴンは VNUT 欠損マウス由来の豚ラ氏島において野生型と比較して低下傾向を認めたものの、有意な差は認めなかった。

以上の結果から単離豚ラ氏島を用いた実験のみでは VNUT 欠損マウスの表現型を全て明らかにするには至らず、VNUT を介したプリン作動性化学伝達によるインスリンおよびグルカゴン分泌制御機構を明らかにするためにはマウス  $\beta$  細胞株である MIN6 細胞やマウス  $\alpha$  細胞株である  $\alpha$ TC 細胞を用いた in vitro 実験が必要であると考えられた。

#### (2) 肝細胞

( ) 初代培養肝細胞実験 : 野生型マウス由来の初代培養肝細胞では ATP がグルコース依存性に分泌されたが、VNUT 欠損肝細胞ではグルコース刺激による ATP 分泌が認められなかった。さらに、VNUT 欠損肝細胞ではインスリン受容体シグナルの下流に存在する mTOR および Akt のリン酸化が増加しており、インスリン受容体シグナルの亢進が示唆された。また、各種プリン受容体阻害薬の投与実験において、野生型肝細胞では P2Y13 受容体阻害薬投与でインスリン受容体シグナル亢進がみられたが、VNUT 欠損マウス由来の初代培養肝細胞では有意な変化を認めなかった。以上の結果から、VNUT は肝細胞レベルでグルコース応答性に P2Y13 受容体を介してインスリン受容体シグナルを抑制していることが示唆された。

( ) 肝臓のインスリン受容体シグナル解析 : VNUT 欠損マウスにおいて、Akt のリン酸化亢進によるグルコキナーゼの発現増加がみられた。さらに mTOR のリン酸化亢進によると考えられる酸化ストレスの亢進およびオートファジーの抑制、FGF21 のタンパク質発現亢進および血中 FGF21 濃度の増加がみられた。また、肝臓のメタボローム解析では解糖系分子には有意な差は認めなかったが、VNUT 欠損マウスで cAMP の有意な上昇が認められ、Gi 共役受容体である P2Y13 受容体シグナル低下の影響と考えられた。

( ) 炎症関連実験 : 通常食摂餌下のマウス肝臓のフローサイトメトリーにおいて、VNUT 欠損マウスでは Ly6c high の炎症性マクロファージの減少が認められた。HFD 負荷 1 年後の野生型マウスの肝臓では組織学的検討において、炎症・線維化亢進による非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) 様変化がみられたが、VNUT 欠損マウスの肝臓では炎症細胞浸潤や線維化は有意に抑制され、IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカイン発現が低下していた。さらにマイクロアレイにおける GO 解析では MHC クラス 関連分子群の発現が有意に低下していた。以上の結果から VNUT を介したプリン作動性化学伝達はマクロファージを介した炎症を促進し、NASH 発症を誘導することが明らかとなった。

#### (3) 脂肪細胞

肝臓の解析から FGF21 の肝組織および血中濃度の増加が明らかとなったため、HFD 負荷 1 年後の白色脂肪組織における既知の FGF/FGFR 受容体の下流に存在する分子の遺伝子発現をウエスタンブロット法で評価したが、有意な差は認めなかった。また、脂質代謝関連遺伝子として ppar $\gamma$  や UCP1 には有意な差を認めなかったが、VNUT 欠損マウスではアディポネクチンの発現の有意な増加を認め、VNUT 欠損マウスにおけるインスリン感受性亢進にはアディポネクチンの関与も考えられた。次に炎症の評価のため、western diet 負荷 12 週間後に白色脂肪組織の解析を行った。体重、精巣上体脂肪の組織重量、平均脂肪細胞面積に有意な差は認めなかったが、VNUT 欠損マウスでは野生型と比較して鼠径部皮下脂肪重量および平均脂肪細胞面積の有意な増加を認めた。一方で、F4/80 染色ではいずれの脂肪組織においても F4/80 陽性細胞が少なく組織学的な定量は困難であったが、鼠径部皮下脂肪における F4/80 および炎症性サイトカインである TNF $\alpha$  の遺伝子発現は抑制傾向であった。UCP1 染色では UCP1 陽性細胞に有意な差を認めなかったが、白色脂肪組織の褐色化の評価には  $\beta$  agonist や寒冷刺激試験などの追加が必要と考えられた。以上の結果から、VNUT 欠損マウスにおけるインスリン感受性

の亢進は肝臓における局所でのプリン作動性化学伝達だけでなく、脂肪細胞における炎症抑制に伴うアディポネクチンの増加も影響している可能性が示唆された。

#### (4) VNUT 阻害薬(クロドロン酸)

クロドロン酸添加により豚ラ氏島からのグルコース応答性 ATP 分泌は有意に抑制されたが、インスリン分泌に関しては上昇傾向となったものの有意な差を認めなかったため、今後は投与条件の検討が必要と考えられた。次に生理食塩水投与をコントロールとし、クロドロン酸の耐糖能に与える影響をクロスオーバー法にて解析した。生理食塩水もしくはクロドロン酸静注 1 時間後の経口糖負荷試験において、野生型マウスではクロドロン酸投与時に有意な血糖値低下とインスリン値上昇を認めた(図 2)が、VNUT 欠損マウスではクロドロン酸投与による血糖変化はみられなかった。インスリン負荷試験では、野生型、VNUT 欠損マウスいずれもクロドロン酸投与による血糖値の変化は認めなかった。VNUT 欠損マウスにおけるインスリン感受性改善が長期阻害の結果である可能性を考え、生理食塩水もしくはクロドロン酸を連日皮下注射し、2 週間後に耐糖能を評価した。経口糖負荷試験は単回投与時と同様の結果であったが、インスリン負荷試験ではクロドロン酸投与により血糖値は有意に低下した。予想されたようにインスリン感受性の改善には一定期間の VNUT の阻害が必要であると考えられた。

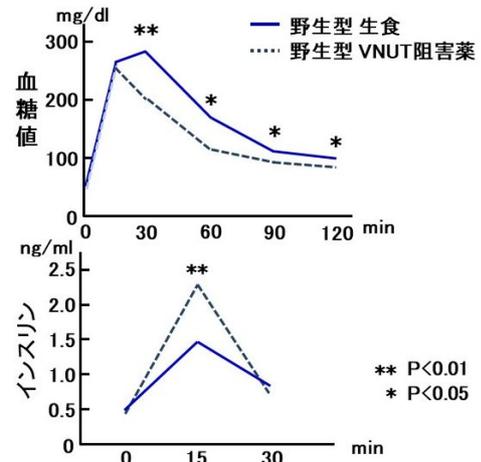


図2. 経口糖負荷試験

以上の結果からプリン作動性化学伝達による豚ラ氏島におけるインスリン分泌制御機構については引き続き検討が必要であると考えられたが、肝臓における VNUT を介したプリン作動性化学伝達は肝細胞レベルでは主に P2Y13 受容体シグナルを介して直接インスリン受容体シグナルを調節するだけではなく、組織レベルでは炎症を介して間接的にもインスリン受容体シグナルを制御していることが明らかとなった(図 3)。

また、クロドロン酸が豚ラ氏島において ATP 分泌抑制を介してインスリン分泌を上昇することか個体レベルでの血糖値低下につながっている可能性が示唆された。さらに VNUT の一定期間の阻害がインスリン感受性を改善したことから、クロドロン酸は豚 β 細胞と肝細胞に直接・間接的に作用し、インスリン分泌、インスリン抵抗性を共に改善させる、**新たな糖尿病治療薬となり得ると考えられた。**

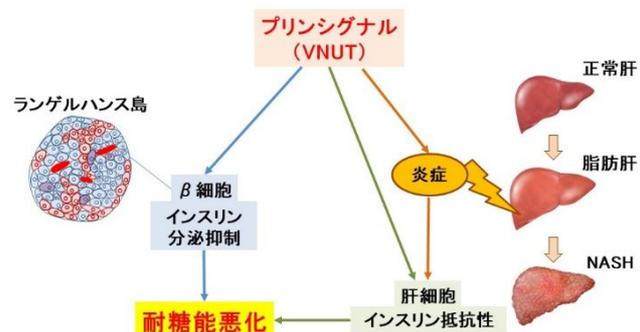


図3. プリン作動性化学伝達による糖代謝調節機構

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

- Umeguchi H, Takenoshita H, Inoue H, Kurihara Y, Sakaguchi C, Yano S, Hasuzawa N, **Sakamoto S**, Sakamoto R, Ashida K. Autoimmune-Related Primary Hypoparathyroidism Possibly Induced by the Administration of Pembrolizumab: A Case Report. *J. Oncol. Pract.* 14(7): 449-451, 2018
- Yano S, Ashida K, Nagata H, Ohe K, Wada N, Takeichi Y, Hanada Y, Ibayashi Y, Wang L, **Sakamoto S**, Sakamoto R, Uchi H, Shiratsuchi M, Furue M, Nomura M, Ogawa Y. Nivolumab-induced thyroid dysfunction lacking antithyroid antibody is frequently evoked in Japanese patients with malignant melanoma. *BMC Endocr. Disord.* 18:36, 2018
- Moriyama Y, Hiasa M, **Sakamoto S**, Omote H, Nomura M. Vesicular nucleotide transporter (VNUT): appearance of an actress on the stage of purinergic signaling. *Purinergic Signal.* 13:387-404, 2017.
- Kitajima K, Ashida K, Wada N, Suetsugu R, Takeichi Y, **Sakamoto S**, Uchi H, Matsushima T, Shiratsuchi M, Ohnaka K, Furue M, Nomura M. Isolated ACTH deficiency probably induced by autoimmune-related mechanism evoked with nivolumab. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 47(5): 463-466, 2017

[学会発表](計 3 件)

**坂本昌平**、緒方大聖、寺田英季子、野村政壽、小川佳宏

Vesicular Nucleotide Transporter (VNUT)による糖代謝調節機構

第 33 回日本糖尿病肥満動物学会年次学術集会、一般口演、2019 年 3 月 15-16 日

坂本昌平、辰島啓太、蓮澤奈央、野村政壽、小川佳宏

プリン作動性化学伝達による脂肪肝炎および脂質代謝調節機構

第 22 回アディポサイエンスシンポジウム、一般口演、2017 年 8 月 19 日

坂本昌平、辰島啓太、蓮澤奈央、緒方大聖、野村政壽、小川佳宏

プリン作動性化学伝達は肝臓のインスリン感受性を制御する

第 90 回日本内分泌学会学術総会、若手研究奨励賞審査講演、2017 年 4 月 20-22 日

〔産業財産権〕

○取得状況（計 1 件）

名称：小胞型ヌクレオチドトランスポーター活性阻害剤

Inhibitor of activity of vesicular nucleotide transporter

発明者：森山芳則、宮地孝明、野村政壽、表弘志、加藤百合、辰島啓太、坂本昌平

権利者：同上

種類：特許

番号：WO2017126700A1

取得年：出願日 2017 年 1 月 20 日、国際公開日 2017 年 7 月 27 日

国内外の別：国内と国外

〔その他〕

ホームページ：<http://www.intmed3.med.kyushu-u.ac.jp/labo/detail/i/1/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名：野村 政壽

ローマ字氏名：Nomura Masatoshi

研究協力者氏名：辰島 啓太

ローマ字氏名：Tatsushima Keita

研究協力者氏名：蓮澤 奈央

ローマ字氏名：Hasuzawa Nao

研究協力者氏名：緒方 大聖

ローマ字氏名：Ogata Masatoshi

研究協力者氏名：寺田 英李子

ローマ字氏名：Terada Eriko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。