

機関番号 : 32202

研究種目 : 基盤研究 (B)

研究期間 : 2008 ~ 2010

課題番号 : 20390061

研究課題名 (和文) グレリンの膵ホルモン立証、インスリン分泌・糖代謝制御機構解明と糖尿病治療への展開

研究課題名 (英文) Ghrelin: its status as a pancreatic hormone, mechanisms by which it regulates insulin release and glucose metabolism, and its application for treating diabetes.

研究代表者

矢田 俊彦 (YADA TOSHIHIKO)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 60166527

研究成果の概要 (和文) :

膵島β細胞のグレリン受容体は他の臓器同様 GHSR であった。グレリンは膵島β細胞 GHSR を介して、グルコースによる cAMP 産生を抑制し、その結果 Kv チャネルを活性化し、グルコース誘発細胞内 Ca²⁺増加・インスリン分泌を抑制した。糖尿病 GK ラットでは、グレリン遺伝子発現が亢進しており、インスリン分泌不全の一因である可能性が示唆された。グレリン受容体拮抗薬長期投与により糖負荷試験時のインスリン分泌応答が亢進し耐糖能が改善し、抗糖尿病作用が示された。

研究成果の概要 (英文) :

The effect of ghrelin on islet β-cells was mediated by GHSR, similarly to other organs. Ghrelin, via interacting with GHSR, attenuated glucose-induced cAMP production, which in turn activated Kv channels and attenuated glucose-induced increases in cytosolic Ca²⁺ and insulin secretion. In type 2 diabetic GK rats, ghrelin mRNA expression was elevated and infusion of GHSR receptor antagonist enhanced insulin release and decreased blood glucose levels, indicating an anti-diabetic effect.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2009 年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野 : 生理学、内分泌代謝学

科研費の分科・細目 : 基礎医学・生理学一般

キーワード : グレリン、cAMP、Kv チャネル、インスリン分泌、糖代謝、膵島、GHS-R、GK ラット

1. 研究開始当初の背景

グレリンはアミノ酸 28 個からなるペプチドであり、N 端 3 番目のアミノ酸のアシル化により活性化され、主として胃から放出され、成長ホルモン放出促進因子受容体 (GHS-R) に作用して、成長ホルモン放出、摂食亢進、脂肪蓄積作用を起す (Nature 402,656-1999; Nature 407,908-2000; Nature 409, 194-2001)。

申請者はグレリンとインスリン分泌・糖代謝に関して世界に先駆けて以下の研究を行ってきた。まず、グレリンの生理的機能として、(1)グレリンは膵β細胞グルコース誘発インスリン分泌を抑制し、その機序として、他の標的細胞と全く異なるシグナル伝達 (抑制性 GTP 結合蛋白サブタイプ Gα_{i2}、遅延整流性の電位依存性 Kv2.1 チャネル活性化) を介す

ること (Dezaki, Kakei, Yada. *Diabetes* 56:2319-, 2007)、(2) グレリン阻害剤投与により血漿インスリンが上昇し血糖値が低下すること、(3) グレリンが膵島細胞に局在し膵から放出されており、(4) 分離膵島のグルコース誘発インスリン分泌はグレリン阻害剤・中和抗体・遺伝子欠損により著明に増加すること (Dezaki, Yada, et al. *Diabetes* 53:3142-, 2004; Dezaki, Nakata, Yada, et al. *Diabetes* 55:3486-, 2006) から、グレリンが膵島内因性のインスリン分泌抑制・血糖上昇ホルモンであることを明らかにした。次いで、グレリンと糖尿病との関係に関して、(5) グレリン遺伝子欠損マウスでは、高脂肪食による糖尿病発症が抑制され、その機序としてインスリン分泌の亢進により耐糖能が正常に保たれること (Dezaki, Nakata, Yada, et al. *Diabetes* 55:3486-, 2006) を示した。これらの結果は、グレリンが新たな膵島ホルモンであること、新規作用機構により β 細胞インスリン分泌を抑制すること、グレリン操作が2型糖尿病の予防・治療法に有効であることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、申請者のこれまでの成果を一段と発展させ、グレリンを新規膵島ホルモンとして立証し、インスリン分泌抑制の β 細胞シグナル伝達機構を解明し、グレリンおよびその作用機構を操作することによる新規インスリン分泌促進・糖尿病治療薬の開発基盤を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

- ① ラット、マウスにグルコース負荷試験を行い、血漿インスリン、グルコース濃度を測定した。
- ② ラット、マウスから膵島を分離し static incubation によりインスリン分泌を測定した。またグレリン mRNA 発現を測定した。
- ③ 分離膵島から β 細胞を単離し、fura-2 蛍光画像解析により細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定し、パッチクランプ法により Kv チャネル電流を測定した。
- ④ Prepro-Ghrelin-flox マウスを作成し、インスリンプロモーター制御 Cre トランスジェニックマウスとの交配により、 β 細胞特異的グレリン欠損マウスを作成した。

4. 研究成果

グレリンによるインスリン分泌抑制の β 細胞シグナル伝達機構

- ① 摂食中枢や下垂体細胞でグレリン作用を仲介するグレリン受容体である GHS-R の遺伝子欠損マウスにおいて、グレリンのインスリン分泌抑制作用が消失して

いたことから、 β 細胞におけるグレリン作用も GHS-R を介することが判明した。② グレリンは、グルコースによる膵島 cAMP 産生を抑制した。これは、グレリンがグルコース刺激インスリン分泌に拮抗する主要な機序であると考えられる。

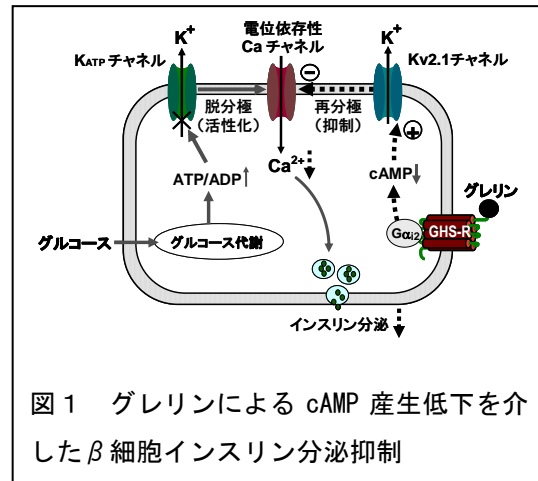


図1 グレリンによる cAMP 産生低下を介した β 細胞インスリン分泌抑制

- ③ ラット膵島には Kv2.1 チャネルが発現しており、Kv2.1 チャネルブロッカーはラット分離膵島からのグルコース誘発インスリン分泌を促進し、 β 細胞 Kv 電流を抑制した。
- ④ Kv2.1 チャネルブロッカー存在下では、グレリンによる Kv 電流活性化とグルコース誘発インスリン分泌抑制が消失した。以上より、膵 β 細胞では Kv2.1 チャネルが β 細胞グルコース誘発インスリン分泌の制御因子として機能しており、グレリンによるグルコース誘発インスリン分泌抑制作用には、 β 細胞における Kv2.1 チャネルの活性化が関与すると考えられる。

グレリンの膵島ホルモンとしての検証、糖尿病病態への関与と糖尿病治療への応用

- ① 自然発症2型糖尿病 GK ラットは、正常 Wistar ラットと比較して膵島におけるグレリン遺伝子発現が亢進していた。また、食後の血中グレリンレベル低下が GK ラットでは減弱しており、これらが GK ラットのインスリン分泌不全の一因である可能性が示唆された。
- ② 浸透圧ポンプを用いて GK ラットに対するグレリン受容体拮抗薬長期投与の効果を検討した結果、GK ラットの随時血糖が低下し、さらにグルコース負荷試験時のインスリン分泌応答が亢進し耐糖能の改善を認めた。
- ③ β 細胞特異的グレリン欠損マウスを作成した。今後これを戻し交配し、固体および膵島レベルのインスリン分泌の変

化を解析し、 β 細胞グレリンのインスリン分泌制御における役割を検討する準備が整った。

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 18 件)

1. Nakata M., Manaka K., Yamamoto S., Mori M., Yada T.: Nesfatin-1 enhances glucose-induced insulin secretion by promoting Ca^{2+} influx through L-type channels in mouse islet β -cells. *Endocr. J.* 58:305-313, 2011. 査読有
2. Uchida K., Dezaki K., Damdindorj B., Inada H., Shiuchi T., Mori Y., Yada T., Minokoshi Y., Tominaga M.: Lack of TRPM2 impaired insulin secretion and glucose metabolisms in mice. *Diabetes* 60:119-126, 2011. 査読有
3. Nakata M., Shintani N., Hashimoto H., Baba A., Yada T.: Intra-islet PACAP protects pancreatic β -cells against glucotoxicity and lipotoxicity. *J. Mol. Neurosci.* 42:404-410, 2010. 査読有
4. Yoshida M., Nakata M., Yamato S., Dezaki K., Sugawara H., Ishikawa S., Kawakami M., Yada T., Takei M.: Voltage-dependent metabolic regulation of Kv2.1 channels in pancreatic β -cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396:304-309, 2010. 査読有
5. Koizumi M., Dezaki K., Hosoda H., Damdindorj B., Sone H., Ming L., Hosoya Y., Sata N., Kobayashi E., Kangawa K., Nagai H., Yasuda Y., Yada T.: Reconstruction-dependent recovery from anorexia and time-related recovery of regulatory ghrelin system in gastrectomized rats. *International J. Peptides* 2010:10page, 2010. 査読有
6. Yoshida M., Dezaki K., Yamato S., Aoki A., Sugawara H., Toyoshima H., Ishikawa S., Kawakami M., Nakata M., Yada T., Takei M.: Regulation of voltage-gated K^+ channels by glucose metabolism in pancreatic β -cells. *FEBS Lett.* 583: 2225-2230, 2009. 査読有
7. Dezaki K., Sone H., Yada T.: Ghrelin is a physiological regulator of insulin release in pancreatic islets and glucose homeostasis. *Pharmacol. Ther.* 118:239-249, 2008. 査読有

[学会発表] (計 27 件)

1. 出崎克也, 矢田俊彦: グレリンによる膵ランゲルハンス島 β 細胞の新しいインスリン分泌制御. 第88回日本生理学会大会 第116回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会, 2011. 3.28-29, 横浜

2. Yoshida M., Dezaki K., Aoki A., Toyoshima H., Ishikawa S., Kawakami M., Nakata M., Yada T., Takei M.: Kv2.1-channel currents are mediated by phosphorylation of the channels during glucose stimulation. The American Diabetes Association 70th scientific sessions, Orlando, USA, June 25-29, 2010. Abstracts: *Diabetes*:59(suppl. 1)A454, 2010
3. 出崎克也, Damdindorj Boldbaatar, 加計正文, 矢田俊彦: グレリンによる β 細胞Kv2.1チャネル活性化を介したグルコース誘発インスリン分泌抑制. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会, 2010. 5.27-29, 岡山
4. 加計正文, 吉田昌史, 出崎克也, 青木厚, 菅原斉, 豊島秀男, 石川三衛, 川上正舒, 中田正範, 矢田俊彦: 膵 β 細胞Kv2.1チャネルの代謝依存性調節機構. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会, 2010. 5.27-29, 岡山
5. 出崎克也, Damdindorj Boldbaatar, 加計正文, 矢田俊彦: グレリンによるインスリン分泌制. 第87回日本生理学会大会, 2010. 5.19-20, 盛岡
6. 内田邦敏, 出崎克也, Damdindorj Boldbaatar, 森泰生, 箕越靖彦, 矢田俊彦, 富永真琴: TRPM2とインスリン分泌. 第87回日本生理学会大会, 2010. 5.19-20, 盛岡
7. Damdindorj B., Dezaki K., Sone H., Yaguchi T., Takei M., Yada T.: Ghrelin receptor antagonist improves glucose intolerance in type 2 diabetic GK rats. 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto, Japan, March 26-30, 2010.
8. Damdindorj B., Dezaki K., Sone H., Yaguchi T., Takei M., Yada T.: Ghrelin receptor antagonist enhances glucose-induced insulin release in type 2 diabetic GK rats. The 2009 International Symposium on Ghrelin, Tokyo, Japan, November 18-20, 2009.
9. Dezaki K., Damdindorj B., Yoshida M., Takei M., Yada T.: Ghrelin activates voltage-dependent K^+ channels by modulation of cAMP/PKA signaling in islet β -cells. The 2009 International Symposium on Ghrelin, Tokyo, Japan, November 18-20, 2009.
10. Dezaki K., Damdindorj B., Ando A., Yoshida M., Takei M., Yada T.: Excessive expression and activity of Kv2.1 channels in islet β -cells of type 2 diabetic GK rats. 45th EASD Annual Meeting, Vienna, Austria, September 29-October 2, 2009.
11. Dezaki K., Damdindorj B., Takei M., Yada T.: Kv2.1 channel blockers enhance glucose-induced cytosolic Ca^{2+} increases and insulin release in islet β -cells of type 2 diabetic rats. The 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS), Kyoto, Japan, July 27- August 1, 2009.

12. Damdindorj B., Dezaki K., Sone H., Kakei M., Yada T.: Ghrelin receptor antagonist potentiates glucose-induced insulin release in diabetic GK rats. The 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS), Kyoto, Japan, July 27- August 1, 2009.

13. 出崎克也, Damdindorj Boldbaatar, 加計正文, 矢田俊彦: グレリンによるβ細胞 K_v チャネル活性化を介したグルコース誘発インスリン分泌抑制. 第51回日本糖尿病学会年次学術集会, 2008. 5.22-24, 東京

[図書] (計5件)

1. 出崎克也, 中田正範, 矢田俊彦: インスリン分泌におけるカルシウムシグナリングの役割. In 糖尿病ナビゲーター 第2版. 門脇孝(編), メディカルビュー社, 50-51, 2010

2. 出崎克也, 曾根英行, 矢田俊彦: 糖尿病学 グレリンによるインスリン分泌. 診断と治療社, 85-91, 2008

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 組成物、保護/再生促進組成物、及び Camp 産生促進組成物

発明者: 矢田俊彦(届出・代表)、出崎克也

権利者: 自治医科大学

種類: 特願

番号: 2009-127901

出願年月日: 2009年5月27日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

http://www.jichi.ac.jp/physio2/physiol_new_HP2008/index.htm

○新聞掲載報告

下野新聞・朝刊 平成21年11月4日

(水)掲載

○掲載ホームページ名、URL

<http://www.iza.ne.jp/news/newsarticle/natnews/science/320306/> (産経新聞)

http://svr.sanyo.oni.co.jp/news_k/news/d/2009110301000308/ (山陽新聞)

<http://osaka.yomiuri.co.jp/university/research/20091119-0Y08T00659.htm>

(読売新聞)

<http://kyoto-np.jp/article.php?mid=P2009110400017&genre=G1&area=Z10>

(京都新聞)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢田 俊彦 (YADA TOSHIHIKO)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号: 60166527

(2) 研究分担者

出崎 克也 (DEZAKI KATSUYA)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 90337329

中田 正範 (NAKATA MASANORI)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 10305120

加計 正文 (KAKEI MASAFUMI)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90214270