

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670435

研究課題名(和文) 膵細胞におけるインクレチンおよびPACAP受容体の発現制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the regulation of expression of receptors for incretin and PACAP in pancreatic beta cells

研究代表者

寺内 康夫 (Terauchi, Yasuo)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40359609

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)：グルコースシグナルやAMPKを介したインクレチン受容体の発現および膜移行制御機構を検討した。細胞外グルコース濃度上昇により単離膵島においてインクレチン受容体の発現が上昇した。また、グルコースシグナルを増強するGKAによっても膵島におけるインクレチン受容体の発現は上昇した。さらに、グルコース濃度上昇およびグルコキナーゼ活性化薬添加のどちらにおいてもAMPKが脱リン酸化されることも確認した。一方、単離膵島においてAMPK阻害薬により、インクレチン受容体の発現が上昇した。以上の成績より、グルコースシグナルによりAMPKの脱リン酸化を介して、インクレチン受容体の発現を上昇させることが想定された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of glucose and AMPK in the regulation of incretin receptors expression in pancreatic islets. The expression of incretin receptors in bell-shaped response to glucose; Expression of the incretin receptors in the isolated islets showed higher levels under a medium glucose concentration (11.1 mM) than that under a low glucose concentration (2.8 mM), but was suppressed under a high glucose concentration (22.2 mM). The phosphorylation of AMPK in the mouse islets was decreased by increasing glucose concentrations. Both treatment with an AMPK inhibitor and DN-AMPK expression produced a significant increase of the incretin receptors expression under a low glucose concentration. Taken together, AMPK is involved in the regulation of incretin receptors expression in pancreatic islets under a low glucose concentration.

研究分野：糖尿病学

キーワード：膵細胞 インクレチン

1. 研究開始当初の背景

日本人の糖尿病の90%以上を占める2型糖尿病の発症・進展を膵細胞の調節異常という観点から捉えると、その発症前から膵細胞の機能低下に加えて、膵細胞量の減少が認められ(Rhodes CJ. Science, 2005)、膵細胞の量および機能の向上を目指す治療法開発が求められている。インクレチンであるGLP-1およびGIPや神経・消化管ペプチドであるPACAPは、膵細胞においてインスリン分泌を促進し、さらに膵細胞保護作用も報告されている。インクレチンは既に、DPP-4阻害薬およびGLP-1受容体作動薬として臨床応用されており、また神経・消化管ペプチドであるPACAPもDPP-4の基質であるとともに、PACAPの受容体であるVPAC2の受容体アゴニストが新規糖尿病薬として開発されている。2型糖尿病においてはインクレチンの分泌が減少していないにもかかわらず、その反応性が低下していることが知られている。この原因として膵細胞におけるインクレチン受容体の発現低下が寄与していると予想される。しかし、インクレチン受容体やPACAP受容体の膵細胞における発現制御機構については明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、インクレチン受容体およびPACAP受容体発現制御の分子機構を解明し、膵細胞においてペプチドホルモン受容体の発現を上昇させることにより、インクレチンやPACAPへの膵細胞の反応性を上昇させることによる新たな糖尿病治療を目指す。

具合的には、以下の項目について研究した。

(1) グルコースシグナルやAMPKを介したインクレチン受容体の発現および膜移行制御機構

(2) 膵細胞におけるグルコースシグナルを介したPACAP受容体の発現制御

(3) 糖尿病モデルマウスにおけるインクレチンおよびPACAP受容体の発現変化とその病態

(4) 膵細胞におけるインクレチンおよびPACAP受容体の発現上昇による糖尿病治療法開発

(5) メトホルミンによる直接的な膵島保護作用

3. 研究の方法

(1) グルコースシグナルやAMPKを介したインクレチン受容体の発現および膜移行制御機構

マウス単離膵島を用いてグルコースシグナルやインスリンシグナル、およびAMPKによる受容体発現制御機構を解析した。

インクレチン受容体の細胞膜上への移行機構をフローサイトメトリーにより解析した。インスリンシグナルの受容体発現における役割を解析するため、IRS-1欠損膵島、IRS-2欠損膵島およびshRNAによるインスリ

ンシグナル分子群をノックダウンした膵島を用いて、インクレチン受容体発現変化を検証した。

(2) 膵細胞におけるグルコースシグナルを介したPACAP受容体の発現制御

マウス単離膵島を用いてグルコースシグナルによる受容体発現制御機構を検討した。

(3) 糖尿病モデルマウスにおけるインクレチンおよびPACAP受容体の発現変化とその病態

db/dbマウスの膵島で、AMPK阻害によるGLP-1受容体およびGIP受容体やVPAC2の発現を検討した。単離膵島を慢性的に高濃度のグルコース存在下で培養した際のインクレチン受容体の発現を検討した。

(4) 膵細胞におけるインクレチンおよびPACAP受容体の発現上昇による糖尿病治療法開発

膵細胞特異的グルコキナーゼ欠損マウスや糖尿病モデルマウスにおける膵細胞のグルコースシグナルおよびAMPKの制御による糖尿病治療の可能性を検証した。糖尿病モデルマウスにグルコキナーゼ活性化薬(GKA)を投与した時のPACAP受容体(VPAC1およびVPAC2)の発現変化を検証した。糖尿病モデルマウスにおいて、これらペプチドホルモン受容体の発現を変化させた前後における、生体内でのGLP-1受容体作動薬、GIPや、PACAP、VIP、VPAC2受容体アンタゴニストのインスリン分泌や膵細胞増殖および膵細胞アポトーシスへの効果を解析した。

(5) メトホルミンによる直接的な膵島保護作用

メトホルミンはマウス単離膵島においてインクレチン受容体の発現を上昇させる。しかし、Metによるインクレチン受容体の発現制御機構、膵細胞における影響は明らかではない。高脂肪食負荷マウスを用いてMetが膵細胞に及ぼす影響を、さらにMetによる直接的な膵島保護作用、なかでも膵島移植生着率に寄与する膵島細胞中心壊死に与える効果を検討した。

4. 研究成果

(1) グルコースシグナルやAMPKを介したインクレチン受容体の発現および膜移行制御機構

細胞外グルコース濃度上昇により単離膵島においてインクレチン受容体の発現が上昇した。また、グルコースシグナルを増強するGKAによっても膵島におけるインクレチン受容体の発現は上昇した。さらに、グルコース濃度上昇およびグルコキナーゼ活性化薬添加のどちらにおいてもAMPKが脱リン酸化されることも確認した。一方、単離膵島においてAMPK阻害薬により、インクレチン受容体の発現が上昇した。以上の成績より、グルコースシグナルによりAMPKの脱リン酸化を介して、インクレチン受容体の発現を上昇させることが想定された。

(2) 膵 細胞におけるグルコースシグナルを介した PACAP 受容体の発現制御

単離膵島において GKA によるグルコキナーゼ活性化により、VPAC1 の発現は有意に上昇するものの、VPAC2 の発現は逆に有意に低下し、2つの受容体がグルコースシグナルにตอบสนองし、全く異なる挙動を示した。

(3) 糖尿病モデルマウスにおけるインクレチンおよび PACAP 受容体の発現変化とその病態

慢性的に過剰な高血糖や脂質、サイトカインに暴露されている糖尿病状態では膵 細胞における各種ホルモンの受容体発現が変化していることが予想され、実際、肥満糖尿病モデルの db/db マウスの膵島では、AMPK の阻害による GLP-1 受容体および GIP 受容体の発現上昇が抑制され、また VPAC2 の発現が低下していた。これらの糖尿病状態における受容体発現低下の分子機構を、AMPK のリン酸化およびその下流のシグナルの発現、インスリンシグナル分子や、インスリン分泌・細胞増殖に関わる転写因子の発現を解析し検討した。

(4) 膵 細胞におけるインクレチンおよび PACAP 受容体の発現上昇による糖尿病治療法開発

AMPK 活性化薬であり糖尿病薬として使用されているピグナナイド薬のメトホルミンをマウスに投与し、生体内においても AMPK のリン酸化状態とインクレチン受容体の間に相関関係があることを見いだした。膵 細胞特異的グルコキナーゼ欠損マウスや糖尿病モデルマウスにおける膵 細胞のグルコースシグナルおよび AMPK の制御により、インクレチン受容体の発現を上昇させる糖尿病治療を検証した。糖尿病モデルマウスに GKA を投与した時の PACAP 受容体 (VPAC1 および VPAC2) の発現変化を検証した。

(5) メトホルミンによる直接的な膵島保護作用

高脂肪食(HF)負荷前の C57Bl/6J マウスに Met を 48 時間経口投与した結果、単離膵島では GLP-1 受容体発現は有意に増加、GLP-1 によるグルコース応答性インスリン分泌 (GSIS)も促進。一方、マウス単離膵島に Met を直接添加したところ、高グルコース (200 mg/dl) 存在下で GLP-1 受容体発現は低下。高脂肪食 8 週間負荷マウスでは、Met 投与でインスリン抵抗性は改善、耐糖能は維持されたが、膵 細胞代償性過形成およびインスリン分泌亢進は Met 非投与群と比較して抑制。膵島における GLP-1 受容体発現は、高脂肪食負荷により有意に増加、Met 投与で抑制された。GLP-1 による GSIS は両群とも同等。高脂肪食 60 週負荷マウスでは、Met 投与により、体重、随時血糖、膵 細胞量、単離膵島の GSIS に影響なし、インスリン抵抗性は有意に改善、高脂肪食負荷による GLP-1 受容体発現の増加を抑制。

C57Bl/6J マウス単離膵島 (150 μ m) を

高グルコース (400 mg/dl) 下で 24、48 時間培養すると、膵島細胞中心壊死を認めたと、Met の直接添加により有意に抑制。AMPK 活性化薬 AICAR 添加にて、高グルコース下の膵島細胞中心壊死が有意に抑制された。

高血糖やインスリン抵抗性存在下では、Met は膵 細胞に対する代償性反応を抑制。全身インスリン抵抗性が改善された結果、膵 細胞機能も保護していることが示唆された。Met は高血糖下での膵島細胞中心壊死を抑制し、直接的な膵 細胞保護作用を有している可能性が示唆された。

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 6 件)

Nakamura A, Terauchi Y. Present status of clinical deployment of glucokinase activators. *J Diabetes Investig*, 査読有, 6: 124-132, 2015.
doi: 10.1111/jdi.12294.

Shirakawa J, Okuyama T, Yoshida E, Shimizu M, Horigome Y, Tuno T, Hayasaka M, Abe S, Fuse M, Togashi Y, Terauchi Y. Effects of the antitumor drug OSI-906, a dual inhibitor of IGF-1 receptor and insulin receptor, on the glycemic control, β cell functions, and β cell proliferation in male mice. *Endocrinology*, 査読有, 155(6): 2102-11, 2014.
doi: 10.1210/en.2013-2032.

Togashi Y, Shirakawa J, Orime K, Kaji M, Sakamoto E, Tajima K, Inoue H, Nakamura A, Tochino Y, Goshima Y, Shimomura I, Terauchi Y. β cell proliferation after a partial pancreatectomy is independent of IRS-2 in mice. *Endocrinology*, 査読有, 155(5), 1643-52, 2014.
doi: 10.1210/en.2013-1796.

Orime K, Shirakawa J, Togashi Y, Tajima K, Inoue H, Ito Y, Sato K, Nakamura A, Aoki K, Goshima Y, Terauchi Y. Trefoil factor 2 promotes cell proliferation in pancreatic β cells through CXCR-4-mediated ERK1/2 phosphorylation. *Endocrinology*, 査読有, 154(1): 54-64, 2013.
doi: 10.1210/en.2012-1814.

Shirakawa J, Togashi Y, Sakamoto E, Kaji M, Tajima K, Orime K, Inoue H, Kubota N, Kadowaki T, Terauchi Y. Glucokinase activation ameliorates ER

stress-induced apoptosis in pancreatic β cells. *Diabetes*, 査読有, 62(10): 3448-58, 2013.
doi: 10.2337/db13-0052.

Tajima K, Shirakawa J, Togashi Y, Inoue H, Sato K, Orime K, Ito Y, Kaji M, Sakamoto E, Nakamura A, Aoki K, Goshima Y, Atsumi T, Terauchi Y. AMPK is involved in the regulation of incretin receptors expression in pancreatic islets under a low glucose concentration. *PLoS One*. 査読有, 22;8(5):e64633, 2013.
doi: 10.1371/journal.pone.0064633.

[学会発表](計 11 件)

Yoshida E, Shirakawa J, Okuyama T, Kyohara M, Togashi Y, Kimura A, Hirano H, Terauchi Y. Isolation of target genes of liraglutide, a GLP-1 receptor agonist, in pancreatic islets by using nano-LC-MS/MS system. 50th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes September 15-19, 2014, Vienna, Austria.

Inoue H, Shirakawa J, Orime K, Togashi Y, Tajima K, Terauchi Y. The role of S100A8 and S100A9 in inflammatory interaction between pancreatic islets and macrophages. 50th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes September 15-19, 2014, Vienna, Austria.

Shirakawa J, Terauchi Y: Characterization of target genes of glucokinase activator (GKA) in pancreatic islets. 73rd American Diabetes Association (ADA) meeting, June 21-25, 2014, Chicago, USA.

Inoue H, Shirakawa J, Orime K, Togashi Y, Terauchi Y: Coordinated effects of macrophages and free fatty acids on the inflammatory gene expression in pancreatic islets. 49th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes September 23-27, 2013, Barcelona, Spain

Togashi Y, Shirakawa J, Orime K, Inoue H, Nakamura A, Terauchi Y. Partial pancreatectomy facilitated β cell proliferation in glucokinase haploinsufficient mice and IRS-2 deficient mice. 73rd American Diabetes Association (ADA) meeting, June 21-25,

2013, Chicago, USA.

Inoue H, Shirakawa J, Orime K, Togashi Y, Terauchi Y: Macrophages and free fatty acids coordinately induced inflammatory gene expression in pancreatic islet. Beta Cell Workshop 2013 Kyoto, April 23-26 2013, 京都国際会館 (京都府京都市) .

Terauchi Y: Impact of glucokinase activation on proliferation and apoptosis of pancreatic beta cells. Beta Cell Workshop 2013 Kyoto, April 23-26 2013 京都国際会館 (京都府京都市) .

Shirakawa J, Terauchi Y: Glucokinase activation ameliorates ER stress-induced apoptosis in pancreatic β cells. Beta Cell Workshop 2013 Kyoto, April 23-26 2013, 京都国際会館 (京都府京都市) .

Togashi Y, Shirakawa J, Terauchi Y: β cell proliferation in glucokinase haploinsufficient mice and IRS-2 deficient mice after a partial pancreatectomy. Beta Cell Workshop 2013 Kyoto, April 23-26 2013, 京都国際会館 (京都府京都市) .

Tajima K, Shirakawa J, Togashi Y, Terauchi Y: AMPK is involved in the regulation of incretin receptors expression in pancreatic islets under low and medium glucose concentrations. Beta Cell Workshop 2013 Kyoto, April 23-26 2013, 京都国際会館 (京都府京都市) .

Orime K, Shirakawa J, Togashi Y, Tajima K, Terauchi Y: Trefoil factor 2 promotes cell proliferation in pancreatic β cells. Beta Cell Workshop 2013 Kyoto, April 23-26 2013, 京都国際会館 (京都府京都市) .

[その他]

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~nai3naib/wp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

寺内 康夫 (TERAUCHI, Yasuo)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号 : 4 0 3 5 9 6 0 9