

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08176

研究課題名(和文) Noc2によるインクレチン分泌制御の分子機構

研究課題名(英文) The role of Noc2 in incretin secretion

研究代表者

柴崎 忠雄 (Shibasaki, Tadao)

神戸大学・医学研究科・客員准教授

研究者番号：00323436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：インクレチンは栄養素の摂取により腸管内分泌細胞から分泌され、血糖依存的に膵細胞からのインスリン分泌を増強する。このインクレチン作用を利用した糖尿病治療薬が近年開発され現在広く利用されている。Noc2は神経伝達物質やホルモンの分泌において重要なRab3のエフェクターとして同定された分子であるが、Noc2を欠損したマウスではインクレチンの分泌が顕著に低下しており、腸管内分泌細胞における分泌顆粒の局在に異常が認められた。Noc2欠損マウスと腸管内分泌細胞株を用いた詳細な解析から、Noc2はインクレチンの分泌顆粒を適切に局在させることでインクレチン分泌を正常に制御する重要な因子であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Incretins, which are secreted from enteroendocrine cells upon nutrient ingestion, potentiate insulin secretion from pancreatic β -cells in a glucose-dependent manner. Incretin-related drugs are now widely used for treatment of type 2 diabetes. Previously we have identified Noc2 as an effector molecule for small GTPase Rab3, a molecule important for exocytosis. Noc2 deficient mice exhibited markedly reduced incretin secretion after meal ingestion and abnormal localization of secretory granules in enteroendocrine cells. From analyses using Noc2 deficient mice and incretin-secreting enteroendocrine cell line, we found that Noc2 is involved in the proper localization of secretory granules, thereby plays an important role for normal regulation of incretin secretion.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：インクレチン 糖尿病 GLP-1 GIP 腸管内分泌細胞 インスリン 分泌顆粒

1. 研究開始当初の背景

インクレチンは食事摂取された栄養素の刺激により腸管内分泌細胞から分泌され、血糖依存的にインスリン分泌を増強するホルモンの総称であり、これまでに GIP (Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide) と GLP-1 (Glucagon-Like Peptide-1) が確認されている。食事摂取後に膵β細胞から分泌されるインスリンの約60%がインクレチンの作用に依存するとされている。最近、このようなインクレチン作用を標的としたインクレチン関連薬が糖尿病治療薬として上市され、広く使用されている。GIPは近位小腸に存在するK細胞から、GLP-1は遠位小腸と大腸に存在するL細胞から、グルコースを含めた種々の炭水化物、アミノ酸、ペプチド、脂肪酸などによって分泌される。また、迷走神経からの入力によっても制御される。このような多様な刺激で活性化される腸管内分泌細胞は、神経細胞のようにCa²⁺が主要なシグナルではなく、複数の細胞内シグナルによって活性化されると考えられているが、そのメカニズムは未だ解明されていない。さらに、これらのシグナルによるインクレチン開口分泌の分子機構はほとんど分かっていない。代表者らの研究室では以前に開口分泌に重要な低分子量Gタンパク質Rab3のエフェクター分子としてNoc2を同定した。Noc2は神経内分泌細胞および内分泌細胞に広く発現している。Noc2欠損マウスを用いた解析から、Noc2は膵β細胞からのインスリン分泌を正常に維持させることに重要であることが明らかになった。また、同欠損マウスの膵外分泌腺、唾液腺、胃腺の分泌細胞では分泌顆粒の異常な蓄積が認められ、さらに膵酵素の分泌不全を示した。したがって、Noc2は内分泌細胞、外分泌細胞での開口分泌制御において鍵となる分子として機能すると考えられる。また、未発表ではあるが、Noc2欠損マウスに対して食餌負荷試験を行ったところ、明らかなインスリン分泌障害が認められたが、経口糖負荷試験では耐糖能障害やインスリン分泌不全が軽度であったことから、食餌中の栄養素刺激によるインクレチン分泌がNoc2欠損マウスでは障害されていることが推測された。また、Noc2と同様にRab3のエフェクター分子であるRim2αを欠損するマウスでも食餌負荷により明らかな耐糖能障害とインスリン分泌障害を示すとともに、GIP分泌が著しく低下することを見出している。これらの結果を合わせて考えると、腸管内分泌細胞におけるRab3のエフェクター分子の欠損や機能不全は血糖制御に大きな影響

を与えると推測される。しかしながら、腸管内分泌細胞の開口分泌機構についてはほとんど明らかになっていないことから、種々の栄養素の刺激ごとに細胞内シグナルが異なるのか、また、分泌関連分子に選択性はあるのか、さらに刺激の組み合わせや順序は分泌に影響するのかなど、基本的な特性について未解明な点が極めて多い。

2. 研究の目的

Noc2によるインクレチン分泌制御の分子機構を明らかにすることで、インクレチン分泌における「刺激分泌連関」の全容解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) インクレチンによる血糖制御における Noc2 の重要性の解明

Noc2 欠損マウスの食餌負荷試験による耐糖能障害が腸管内分泌細胞からのインクレチン分泌不全によるものであるかを明らかにするために、Noc2 欠損マウスを用いて糖負荷試験および食餌負荷試験を行い、血糖値、インスリン、血漿 GIP、GLP-1 値を測定して比較した。

(2) 腸管内分泌細胞における GIP 顆粒 GLP-1 顆粒の局在と Noc2 の関係の解明

形態学的手法により腸管内分泌細胞における Noc2 およびインクレチン顆粒の局在を検討した。また、Noc2 欠損マウスにおけるインクレチン顆粒の局在を検討した。

(3) 腸管内分泌細胞株を用いた Noc2 によるインクレチン分泌制御機構の解明

腸管内分泌細胞株 GLUTag における開口分泌関連分子の発現を検討した。また、Noc2 をノックダウンした GLUTag 細胞を用いたインクレチン分泌実験、全反射型蛍光顕微鏡 (TIRFM) を用いたバイオイメージング技術によるインクレチン顆粒動態の解析を行った。

4. 研究成果

(1) インクレチンによる血糖制御における Noc2 の重要性の解明

Noc2 欠損マウスを用いて糖負荷試験および食餌負荷試験を行ったところ、野生型マウスに比べ、Noc2 欠損マウスで血漿 GIP および GLP-1 値が有意に低下していた。一方、膵β細胞における GIP または GLP-1 応答性が障害されているかどうかを明らかにするために、

GIP または GLP-1 負荷下で糖負荷試験を行ったところ、野生型マウスと Noc2 欠損マウスで耐糖能およびインスリン反応に差は認められなかった。したがって、腸管内分泌細胞からの GIP 分泌と GLP-1 分泌が障害されていることが示された。

(2) 腸管内分泌細胞における GIP 顆粒 GLP-1 顆粒の局在と Noc2 の関係の解明

野生型マウスを用いて腸管内分泌細胞である K 細胞および L 細胞における GIP 顆粒および GLP-1 顆粒の局在を抗 GIP 抗体および抗 GLP-1 抗体による免疫組織化学的解析により検討したところ、いずれの顆粒も血管側に存在することを確認した。また、これらの細胞における Noc2 の局在を、抗 Noc2 抗体を用いて検討したところ、K 細胞、L 細胞ともに Noc2 は血管側において分泌顆粒と共局在していることが明らかになった。一方、Noc2 欠損マウスの K 細胞および L 細胞における GIP および GLP-1 顆粒は、いずれも細胞内で散在していた。これらの結果から Noc2 欠損マウスにおけるインクレチン分泌障害は K 細胞や L 細胞における分泌顆粒の局在の異常に起因する可能性が示唆された。

(3) 腸管内分泌細胞株を用いた Noc2 によるインクレチン分泌制御機構の解明

マウス腸管内分泌細胞株 GLUTag 細胞における開口分泌関連分子の発現を定量 PCR 法にて検討した。今回、Rab3A、Rab3B、Rab3C、Rab3D、Rab27A、Rab27B、Noc2、Rim2 α 、Rabphilin、Granuphilin の発現を解析した。このうち、Rab タンパク質では Rab3A が、エフェクター分子では Noc2 が主要な開口分泌関連分子であることが明らかになった。したがって、腸管内分泌細胞からのインクレチン分泌には Rab3A/Noc2 が重要であることが示唆された。

上記 (2) の野生型マウスの腸管内分泌細胞における検討と同様に、GLUTag 細胞においても Noc2 と GLP-1 顆粒の共局在が認められた。そこで、siRNA により Noc2 をノックダウンした GLUTag 細胞を用いて GLP-1 分泌実験を行った。細胞を 2%ペプトンで刺激して GLP-1 分泌を測定したところ、コントロール細胞に比し、Noc2 ノックダウン細胞で GLP-1 分泌が有意に障害されていた。この結果から、Noc2 はペプトン刺激によるインクレチン分泌において重要な役割を有することが示された。プレプログルカゴン遺伝子の mRNA の発現および GLP-1 ペプチドの発現はコントロール細胞

と Noc2 ノックダウン細胞で差が認められないことから、Noc2 は GLP-1 の発現・生合成には関与しないことが示唆された。一方、全反射型蛍光顕微鏡を用いた解析から、細胞膜に局在する GLP-1 分泌顆粒数は Noc2 をノックダウンした GLUTag 細胞において低下していた。さらに、高濃度カリウム刺激による GLP-1 分泌が Noc2 ノックダウン細胞で低下していた。したがって、Noc2 のノックダウンにより細胞内の分泌顆粒の分布が変化し、強制脱分極による開口分泌の低下がもたらされていると考えられた。

(1)~(3)の結果より、Noc2 は腸管内分泌細胞においてインクレチン分泌顆粒を適切に局在させることでインクレチン分泌を正常に制御する重要な因子であることが明らかになった。本研究の成果はインクレチン分泌における刺激分泌連関の全容解明に貢献するものであり、インクレチン分泌促進を標的とした糖尿病治療法の確立にも繋がるのが期待され、臨床的にも意義が大きい。

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)

- ① Takahashi H, Hidaka S, Seki C, Yokoi N, Seino S. Characteristics of repaglinide effects on insulin secretion. *Eur J Pharmacol.* 2018. 828, 52-59. 査読有. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.03.025
- ② Murao N, Yokoi N, Honda K, Han G, Hayami T, Ghenni G, Takahashi H, Minami K, Seino S. Essential roles of aspartate aminotransferase 1 and vesicular glutamate transporters in β -cell glutamate signaling for incretin-induced insulin secretion. *PLoS ONE*, 2017, 12, e0187213. 査読有. DOI: 10.1371/journal.pone.0187213
- ③ Seino S, Sugawara K, Yokoi N, Takahashi H. β -Cell signalling and insulin secretagogues: A path for improved diabetes therapy. *Diabetes Obes Metab.* 2017. 19, 22-29. 査読有. DOI: 10.1111/dom.12995

- ④ Sugawara K, Honda K, Reien Y, Yokoi N, Seki C, Takahashi H, Minami K, Mori I, Matsumoto A, Nakaya H, Seino S. A novel diphenylthiosemicarbazide is a potential insulin secretagogue for anti-diabetic agent. PLoS ONE. 2016. e0164785. 査読有.
DOI: 10.1371/journal.pone.0164785
- ⑤ Sugawara K, Shibasaki T, Takahashi H, Seino S. Structure and functional roles of Epac2 (RAPGEF4). Gene. 2016. 575, 577-583. 査読有.
DOI: 10.1016/j.gene.2015.09.029
- ⑥ Yokoi N, Ghani G, Takahashi H, Seino S. β -cell glutamate signaling: Its role in incretin-induced insulin secretion. J Diabetes Investig. 2016. Suppl 1, 38-43. 査読有.
DOI: 10.1111/jdi.12468
- ⑦ 中久木優子, 松本卓也, 玉置久, 柴崎忠雄, 須永泰弘, 横田秀夫. 膵臓 β 細胞内インスリン顆粒動態シミュレーション・モデル. 電気学会論文誌C 135巻, 2016年, 963-970. 査読有.
- ⑧ Tamura K, Minami K, Kudo M, Takahashi H, Seino S. Liraglutide improves pancreatic Beta cell mass and function in alloxan-induced diabetic mice. PLoS ONE. 2015. e0126003. 査読有.
DOI: 10.1371/journal.pone.0126003
- ⑨ 高橋晴美, 清野進. SU薬 発見と開発の歴史. Diabetes Strategy. 5巻. 2015年, 132-138. 査読無.
- ⑩ 柴崎忠雄, 高橋晴美, 清野進. インクレチンとスルホニル尿素薬の併用によるインスリン分泌増強におけるEpac2Aシグナルの役割. 最新医学 増刊号 糖尿病と合併症 (前篇)糖尿病. 70巻, 2015年, 473-497. 査読無.
- [学会発表] (計 22 件のうち 16 件を掲載)
- ① 速水智英, 横井伯英, 本田洸平, マヒラ アシム, 高橋晴美, 清野進. ZFDMラットにおけるインクレチン応答性インスリン分泌障害機序—オミクス解析による検討. 第32回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会. 2017年.
- ② マヒラ アシム, 横井伯英, グブルジャン ゲニ, 星川律子, 高橋晴美, 清野進. 膵 β 細胞間相互作用によるインクレチン応答性獲得に關与する新規分子の同定. 第40回日本分子生物学学会年会. 2017年.
- ③ Takahashi H, Sugawara K, Yokoi N, Seino S. Insulin secretagogues and their signaling mechanisms. 第60回日本糖尿病学会年次学術集会. 2017年.
- ④ 横井伯英, 村尾直哉, 高橋晴美, 清野進. Incretin and beta-cell metabolic signaling. 第60回日本糖尿病学会年次学術集会. 2017年.
- ⑤ グブルジャン ゲニ, 横井伯英, 波多野直哉, 韓桂榮, 高橋晴美, 清野進. インクレチン応答性インスリン分泌増強機構の解明:インスリン顆粒内グルタミン酸の役割. 第60回日本糖尿病学会年次学術集会. 2017年.
- ⑥ マヒラ アシム, 横井伯英, 星川律子, グブルジャン ゲニ, 高橋晴美, 清野進. 膵 β 細胞間相互作用によるインクレチン応答性獲得に關与する分子の同定. 第60回日本糖尿病学会年次学術集会. 2017年.
- ⑦ 韓 桂榮, グブルジャン ゲニ, 横井伯英, 村尾直哉, 高橋晴美, 清野裕, 清野進. グルタミンによるインスリン分泌増強機構の解明. 第60回日本糖尿病学会年次学術集会. 2017年.
- ⑧ Oduori OS, Minami K, Yokoi N, Takahashi H, Maejima Y, Shimomura K, Herrera PL, Seino S. Impaired insulin secretion and severe glucose intolerance caused by deleting β -cell specific KATP channels. The 9th Scientific Meeting of Asian Association for the Study of Diabetes. 2017.
- ⑨ Takahashi H, Sugawara K, Honda K, Yokoi N, Mori I, Nakaya H, Seino S. Approaches to identification of novel small molecules that can be insulin secretagogues. 2nd Joint Meeting of the

EASD Islet Study Group & Beta Cell Workshop. 2017.

- ⑩ Oduori OS, Minami K, Yokoi N, Maejima Y, Takahashi H, Herrera PL, Shimomura K, Seino S. Deletion of β -cell specific KATP channels causes severe glucose intolerance with impaired insulin secretion and enhanced incretin secretion. 52nd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes. 2016.
- ⑪ Hashim M, Yokoi N, Ghani G, Hoshikawa R, Takahashi H, Seino S. Mechanisms of the induction of incretin/cAMP responsiveness in insulin secretion: study by pseudoislets. 52nd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes. 2016.
- ⑫ Seino S, Takahashi H. Roles of KATP channels in brain-islet axis. 21st EASD-Hagedorn Oxford Workshop. 2016.
- ⑬ マヒラ アシム、横井伯英、グプルジャンゲニ、星川律子、高橋晴美、清野進. 膵 β 細胞間相互作用によるインクレチン応答性獲得機構の解明 -偽膵島を用いた検討-. 第59回日本糖尿病学会年次学術集会. 2016年.
- ⑭ 中久木優子、松本卓也、玉置久、柴崎忠雄、須永泰弘、横田秀夫. テンソル場を用いた膵臓 β 細胞内インスリン顆粒動態シミュレーションモデル. 第59回システム制御情報学会発表講演会. 2015年.
- ⑮ 高橋晴美、グプルジャンゲニ、山口拓郎、横井伯英、清野進. インスリン分泌におけるグルタミン酸シグナルの役割. 第38回日本分子生物学科年会 第88回日本生化学会大会 合同大会. 2015年.
- ⑯ Takahashi H, Shibasaki T, Hidaka S, Seino S. Combinatorial effects of incretin and sulfonylurea or glinide drugs on insulin secretion. Incretin 2015. 2015.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴崎 忠雄 (SHIBASAKI, Tadao)
神戸大学・大学院医学研究科・客員准教授
研究者番号：00323436

(2) 研究分担者

高橋 晴美 (TAKAHASHI, Harumi)
神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員
研究者番号：50546489

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし