

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09384

研究課題名(和文) 分泌顆粒特異的分子SKIPがインスリン分泌とインクレチン分泌を調節する意義

研究課題名(英文) Significance of simultaneous secretion of insulin and incretin regulated by SKIP molecule

研究代表者

原島 伸一 (Harashima, Shinichi)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：80444793

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)：sphingosine kinase 1-interacting protein (SKIP)のインスリン分泌に及ぼす影響をSKIP欠損(SKIP-mCherryノックイン、SKIP^{-/-})マウスを作製し検討した。SKIPは膵細胞に発現し、細胞には発現していなかった。また、SKIP分子の欠損によりグルコース応答性インスリン分泌(GSIS)は増強し、血糖値は有意に上昇した。分子機序の解明では、cAMP、PDE、SPHK非依存性にGSISを増強していることが明らかとなった。以上から、SKIPは、これまで報告されている経路とは独立した経路を介してGSISを調整することが考えられた。

研究成果の概要(英文)：We find here that sphingosine kinase 1-interacting protein (SKIP, also called Sphkap) is highly expressed in pancreatic b-cells but not in a-cells. Intraperitoneal glucose tolerance test showed that plasma glucose levels were decreased and insulin levels were increased in SKIP^{-/-} mice compared to SKIP^{+/+} mice, but exendin-4-enhanced insulin secretion was masked. GSIS was amplified more in SKIP^{-/-} but exendin-4-enhanced insulin secretion was masked compared to that in SKIP^{+/+} islets. The ATP and cAMP content were similarly increased in SKIP^{+/+} and SKIP^{-/-} islets; depolarization-evoked, PKA and cAMP-mediated insulin secretion were not affected. Inhibition of PDE activity equally augmented GSIS in SKIP^{+/+} and SKIP^{-/-} islets. These results indicate that SKIP modulates GSIS by a pathway distinct from that of cAMP-, PDE- and sphingosine kinase-dependent pathways.

研究分野：代謝・内分泌

キーワード：インスリン分泌 インクレチン分泌 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病発症の原因は、肥満やインスリン抵抗性は重要な補助因子であるが、肥満では20%程度しか糖尿病を発症しないことから膵細胞不全が主因と考えられている(Meier JJ. *Diabetes Care* 2013;36:S113-9)。しかし、細胞不全の主因が、細胞機能障害なのか細胞量の減少なのか結論に至っていない。京都大学糖尿病・内分泌・栄養内科では、この問題を明らかにするための膵島イメージングプロジェクトで世界をリードしている(Fujimoto H. *Transpl Int* 2011;24:839-44, Kimura H. *Bioorg Med Chem* 2014;22:3270-8)。細胞の機能障害が主因であるならば、機能を改善する治療が重要となり、われわれはその観点で基礎的研究を重ねてきた。例えば、1 型糖尿病の自己抗原である IA-2 (Miura J. *Diabetologia* 2003;46:1024-5)は、膵細胞のインスリン分泌顆粒に発現し、インスリン分泌顆粒形成を促進することでインスリン分泌を増加させることを報告した(Harashima S. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;14:8704-9. Hu YF. *Diabetologia* 2005;48:2576-81)。IA-2 がインスリン分泌を正に調節することから糖尿病治療への応用も考慮されたが、IA-2 は膵細胞ならず、副腎髄質や下垂体などの他の内分泌細胞にも発現しており、ドーパミン分泌においても重要な役割を担うことが明らかとなったこと(Nishimura T. *Mol Cell Endocrinol* 2010;315:81-6)や IA-2 の過剰発現が細胞死をもたらすこと(Harashima S. *Clin Exp Immunol* 2007;150:49-60)から、上記の目的を達成し得なかった。一方、腸管ホルモンでインスリン分泌を促進するインクレチンは、gastric inhibitory polypeptide(GIP)と glucagon-like peptide-1 (GLP-1)の2つが同定されている。それぞれ腸管 K 細胞および L 細胞から分泌される。当教室では30年以上前から GIP を中心としたインクレチンの研究に携わり、GIP の cDNA (Takeda J. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7005-8, 198)や遺伝子の構造決定(Inagaki N. *Mol. Endocrinol.* 3: 1014-21, 1989)ならびに GIP 受容体の cDNA 構造の決定(Yasuda K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205:1556-62, 1994)、受容体欠損マウスの作製(Miyawaki K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:14843-7, 1999)などこの分野の研究をリードしてきた。最近でも、GIP の発現調節には regulatory factor X 6 (Rfx6)が重要であること(Suzuki K. *J Bio Chem* 2013;288:1929-38)や、GIP を恒常的に欠損させることで高脂肪食負荷でのインスリン抵抗性改善や肥満を軽減することを報告している(Nasteska D. *Diabetes* 2014;63:2332-43)。さらに、インクレチン、特に GLP-1 が細胞死を抑制することも報告した(Kawasaki Y. *Horm Metab Res.* 2010;42:311-7. Yamane S. *J Diabetes Investig.* 2011;2:104-10)。インク

レチンは細胞保護効果を示しインスリン分泌も促進することから、既に糖尿病治療に応用され、十分に効果も認められ(Harashima S. *Int J Clin Pract* 2012;66:465-76. Harashima S. *Horm Metab Res* 2013;45:231-8)、インクレチン関連薬の中で DPP-4 阻害薬は、経口血糖降下薬の第1選択薬になっている。そこで、日本人やアジア人に適した次の糖尿病治療戦略として、インクレチン分泌とインスリン分泌を同時に促進させる薬剤の開発が候補として挙がっている。われわれも、細胞と K 細胞または L 細胞に共通して存在する新規分子の存在を検討した。当時に、インクレチンがインスリン分泌を増強する機序の一つとして protein kinase A (PKA)が挙げられているが、PKA の作用を調整する A-kinase anchoring protein (AKAP)に着目し、インスリン分泌に影響する AKAP の同定を行っていた。GIP ノックインマウスを作成し検討していた過程で、sphingosine kinase-1 interacting protein (SKIP) を同定することができた。PCR による予備的な検討では、SKIP は、K 細胞と L 細胞に発現し、他の腸管上皮には発現を認めなかった。また、ヒト膵島においても細胞に発現することが示唆された。そこで本研究では、SKIP がインスリン分泌およびインクレチン分泌を調節するのか詳細に検討し、糖尿病治療への応用が可能か検討することを目的とした。

2. 研究の目的

本研究は、膵細胞と腸管 K 細胞および L 細胞に特異的に多く存在する分泌顆粒特異的分子 SKIP (sphingosine kinase-1 interacting protein)が、インスリン分泌およびインクレチン分泌を調節するメカニズムを詳細に解明した。

インスリン分泌を増強するインクレチン関連薬は、現在最も使用頻度の高い糖尿病治療薬となっている。そのため、次の段階の糖尿病治療として、インスリン分泌のみならずインクレチン分泌も同時に促す薬剤の開発が求められている。膵細胞およびインクレチン分泌細胞である K 細胞・L 細胞に共通に存在する SKIP 分子は、分泌顆粒に特異的に存在することから、両ホルモンの分泌を調節できる分子の候補になると考えられ、本研究の遂行は極めて重要である。

3. 研究の方法

(1) SKIP の発現組織・細胞の検討

C57BL/6 マウスおよび Wister ラットから組織・細胞を単離し、RT-PCR 法ならびにウエスタンブロット法で、SKIP の発現を検討した。PCR プライマーは、SKIP に特異的であることを確認した。また、抗 SKIP 抗体は、独自に3種類の抗体を作成し、SKIP 分子に特に特異的に結合する SKIP 抗体を選択し、以下の実験に使用した。

(2) SKIP-mCherry ノックインマウスの作成
SKIP を mCherry に置換するノックインマウスを作成し、SKIP の局在を明らかにする。また、腹腔内ブドウ糖負荷試験 (iPGTT) に対するインスリン分泌およびインクレチン分泌の変化を検討する。さらに、単離膵島を用いて、グルコース応答性インスリン分泌やインクレチン応答性インスリン分泌を検討する。

(3) SKIP がグルコース応答性インスリン分泌を制御する分子機序の解明
単離膵島を用いて、インスリン分泌に関わる惹起経路および増幅経路の分子群について詳細に検討した。

4. 研究成果

(1) SKIP が発現する組織・細胞の検討 (図 1)
C57BL/6 マウスおよび Wistar ラットから組織・細胞を単離し、RT-PCR 法およびウエスタンブロット法にて SKIP の発現を検討した。その結果、膵細胞に比較的特異的に発現することを確認した。

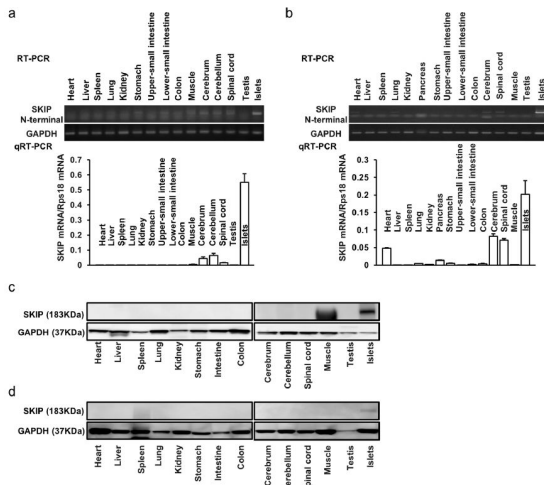


Figure 1. SKIP expression in various tissues. (a-d) mRNA expression of SKIP in several tissues from C57BL/6 mice (a) or Wistar rats (b) detected by RT-PCR and qRT-PCR; protein expression of SKIP in several tissues from C57BL/6 mice (c) or Wistar rats (d) detected by western blot with anti-mouse SKIP (c) and anti-rat SKIP antibody (d), respectively. The membrane was re-probed with anti-GAPDH antibody as control. All gels were run under the same experimental conditions. Uncropped images of blots/gels are shown in Supplemental Figures 2-4. (a-d) 12-week-old animals were used for experiments, n = 4.

(2) SKIP 欠損マウスの作成 (図 2)
SKIP が膵細胞に特異的に発現し、インスリン分泌に関与することが想定されたことから、SKIP を蛍光タンパクである mCherry に置換したスキップノックインマウス (SKIP(-/-)マウス)を作成した(図 2)。SKIP はノックインマウスで約 80%の発現減少が認められ、mCherry はノックインマウス膵島でのみ発現が認められた。

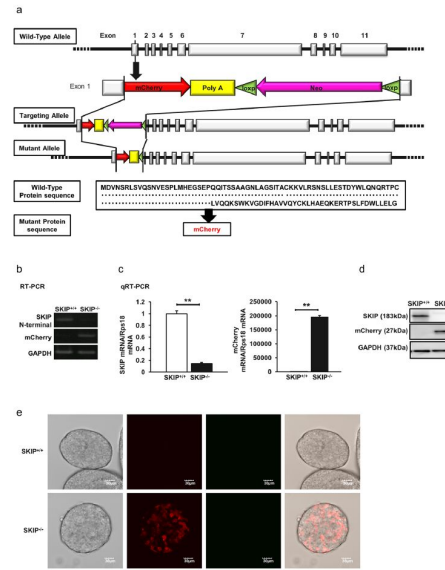


Figure 2. Generation of SKIP-mCherry knock-in (KI) mice. (a) Construct of SKIP-mCherry KI mice. mCherry-poly(A)-loop-Neo-loops was inserted into exon 1 of wild-type SKIP gene, and later, loxp-Neo was deleted to generate the mutant allele. In the mutant protein sequence, SKIP expression was deleted by mCherry expression. mRNA expression of SKIP and mCherry in isolated islets from homo SKIP-mCherry KI (SKIP^{-/-}) mice and wild type (SKIP^{+/+}) mice detected by RT-PCR (b) and qRT-PCR (c); data are expressed as average \pm standard error of the mean (SEM). **p < 0.005 SKIP^{-/-} vs SKIP^{+/+}, significance was determined by student's t-test. (d) Protein expression of SKIP in isolated islets from SKIP^{-/-} mice and SKIP^{+/+} mice detected by western blot with anti-mouse SKIP antibody. The membrane was re-probed with anti-mCherry antibody, and re-probed with anti-GAPDH antibody as control. All gels were run under the same experimental conditions. Uncropped images of blots/gels are shown in Supplemental Figure 5. (e) Expression of mCherry in isolated islets from SKIP^{-/-} mice and SKIP^{+/+} mice. Living islets were observed by incubator two-photon excitation microscopy. Two-photon excitation was effected at 1040 nm, the fluorescence of mCherry and negative controls were measured at 575-650 nm and at 460-495 nm, respectively. (b-e) n = 4-6 mice per group and 3 samples per group. 12-week-old mice were used for experiments.

(3) SKIP 分子の局在 (図 3)
次に、SKIP 分子の膵島における局在を検討した。SKIP に対する抗体は、免疫染色には特異性が必ずしも高くなかったことから、SKIP(-/-)マウスを用いて SKIP プロモーター下に発現する mCherry をターゲットに検討した。その結果、mCherry (SKIP)はインスリン発現細胞と共在し、グルカゴン発現細胞とは共在していなかった。

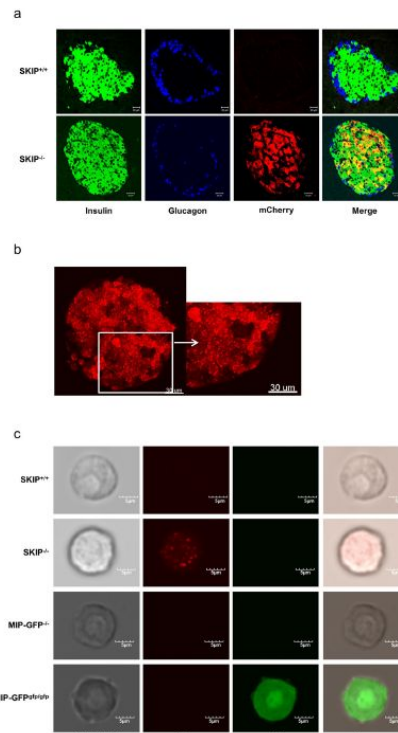


Figure 3. Localization of SKIP in the islets. (a) Immunohistochemical images in the pancreas from SKIP^{-/-} mice and SKIP^{+/+} mice; green, anti-insulin; blue, anti-glucagon; and red, anti-mCherry. (b) 3D imaging by incubator two-photon microscopy in isolated islets from SKIP^{-/-} mice. (c) Incubator two-photon excitation microscopy images of living β -cells from SKIP^{-/-} (SKIP-mCherry KI) mice and MIP-GFP mice; left column, bright field; second column, mCherry; third column, GFP; right column, merged images. 12-week-old mice were used for the experiments, n = 3.

(4) SKIP 欠損がグルコース応答性インスリン分泌に及ぼす影響の検討 (図 4)

SKIP が膵 細胞に特異的に発現することから、インスリン分泌に及ぼす影響を検討した。SKIP(-/-)マウスに iPGTT を行ったところ、2g/kg グルコースにおいて、SKIP(-/-)マウスで血糖値の低下とインスリン分泌の増強を認めた。また、SKIP(-/-)マウス単離膵島では、コントロールマウス膵島に比べ、グルコース濃度に依存したインスリン分泌の増幅が認められた。このことから、SKIP はその欠損によりグルコース応答性インスリン分泌が増強することが示された。

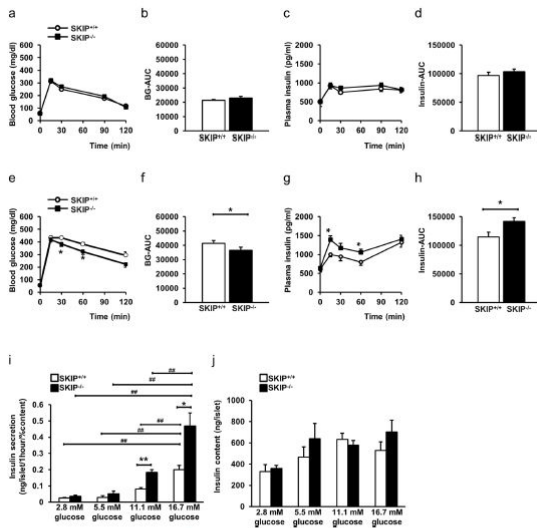


Figure 4. SKIP-regulated glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). (a-d) Blood glucose levels (a), BG-AUC (b), plasma insulin levels (c) and insulin-AUC (d) during 1g/kg body weight iPGTT. (e-h) Blood glucose levels (e), BG-AUC (f), plasma insulin levels (g) and insulin-AUC (h) during 2g/kg body weight iPGTT. (i-j) GSIS in islets from SKIP^{+/+} mice and SKIP^{-/-} mice. Insulin secretion was measured at 2.8 mM, 5.5 mM, 11.1 mM, 16.7 mM glucose. (j) Insulin content in the islets from SKIP^{+/+} mice and SKIP^{-/-} mice. (a-j) 12-week-old mice were used for the experiments. (a-h) n=7-8 mice per group. **p<0.05 vs SKIP^{+/+}, significance was determined by student's t-test. (i) n=7-8 mice per group and 5-6 samples per group, with 10 islets per sample. *p<0.05, **p<0.005 vs SKIP^{+/+}, *p<0.05, **p<0.005 for different glucose conditions in the same genotype mice of insulin secretion, significance was determined by one way ANOVA with Tukey test. All data are expressed as average ± SEM.

(5) インクレチン効果の検討 (図 5)

次に、SKIP(-/-)マウスにおけるインクレチン効果を検討した。GLP-1 受容体作動薬であるエキセンジン-410mg/kg を iPGTT30 分前に投与した。結果は、コントロールマウスと比べ、エキセンジン-4 によるインスリン分泌の増強は認められなかった。また、単離膵島を用いた検討でも、コントロールマウスおよび SKIP(-/-)マウスでは、10nM エキセンジン-4 によるインスリン分泌の増強は認められなかった。さらに、ラットインスリノーマ細胞である INS-1D 細胞に SKIP 分子を過剰発現し、グルコース応答性インスリン分泌およびエキセンジン-4 によるインスリン分泌を検討した。グルコース応答性インスリン分泌は、SKIP 欠損とは対照的に SKIP 過剰発現で減少したものの、エキセンジン-4 によるインスリン分泌の影響は認められなかった。

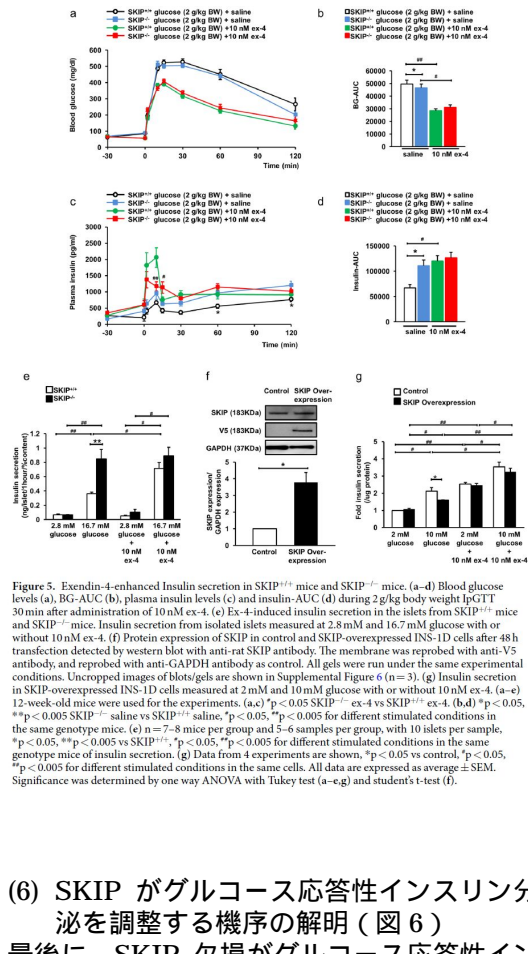


Figure 5. Exendin-4-enhanced Insulin secretion in SKIP^{+/+} mice and SKIP^{-/-} mice. (a-d) Blood glucose levels (a), BG-AUC (b), plasma insulin levels (c) and insulin-AUC (d) during 2g/kg body weight iPGTT 30 min after administration of 10 nM ex-4. (e) Ex-4-induced insulin secretion in the islets from SKIP^{+/+} mice and SKIP^{-/-} mice. Insulin secretion from isolated islets measured at 2.8 mM and 16.7 mM glucose with or without 10 nM ex-4. (f) Protein expression of SKIP in control and SKIP-overexpressed INS-1D cells after 48 h transfection detected by western blot with anti-rat SKIP antibody. The membrane was reprobed with anti-V5 antibody, and reprobed with anti-GAPDH antibody as control. All gels were run under the same experimental conditions. Uncropped images of blots/gels are shown in Supplemental Figure 5 (n=3). (g) Insulin secretion in SKIP-overexpressed INS-1D cells measured at 2 mM and 10 mM glucose with or without 10 nM ex-4. (a-e) 12-week-old mice were used for the experiments. (a,c) *p<0.05 SKIP^{-/-} ex-4 vs SKIP^{+/+} ex-4. (b,d) *p<0.05, **p<0.005 SKIP^{-/-} saline vs SKIP^{+/+} saline, *p<0.05, **p<0.005 for different stimulated conditions in the same genotype mice. (e) n=7-8 mice per group and 5-6 samples per group, with 10 islets per sample. *p<0.05, **p<0.005 vs SKIP^{+/+}, *p<0.05, **p<0.005 for different stimulated conditions in the same genotype mice of insulin secretion. (g) Data from 4 experiments are shown. *p<0.05 vs control, **p<0.05, ***p<0.005 for different stimulated conditions in the same cells. All data are expressed as average ± SEM. Significance was determined by one way ANOVA with Tukey test (a-e,g) and student's t-test (f).

(6) SKIP がグルコース応答性インスリン分泌を調整する機序の解明 (図 6)

最後に、SKIP 欠損がグルコース応答性インスリン分泌を増強する分子機序を検討した。まず、SKIP は、スフィンゴシンキナーゼ結合タンパクと報告されているため、グルコース濃度による膵島でのスフィンゴシンキナーゼ活性を評価したが、コントロールと SKIP 欠損で差が認められなかった。次に、代謝されないグルコースである 3-OMG を用いてインスリン分泌を検討したところ、グルコース代謝が必須であった。しかし、グルコキナーゼの発現量に、コントロールマウスと SKIP(-/-)マウスで差が認められなかった。さらに、カリウム刺激によるインスリン分泌、グルコースおよびカリウムによる細胞内カルシウム流入、グルコースおよびエキセンジン-4 刺激による cAMP 含有量、EPAC 活性化剤、PKA 阻害剤、PDE 阻害薬である IBMX によるインスリン分泌には、コントロールマウス膵島と SKIP 欠損膵島で差が認められなかった。以上から、SKIP はその欠損により、cAMP、PDE、SPHK 非依存性に GSIS を増強した。つまり、これまで報告されている惹起経路や増幅経路とは独立した経路を介してグルコース応答性インスリン分泌を調整することが考えられた。

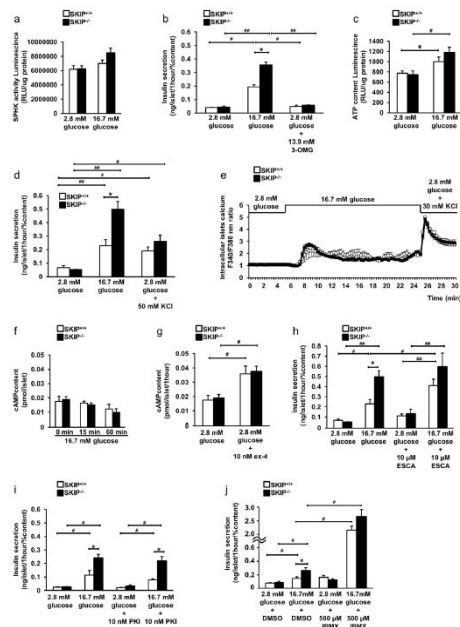


Figure 6. The mechanism of SKIP-involved insulin secretion. (a) Sphingosine kinase activity from isolated islets measured at 2.8 mM and 16.7 mM glucose. (b) Insulin secretion measured at 2.8 mM, 16.7 mM glucose and 2.8 mM with 13.9 mM non-metabolic glucose (3-OMG). (c) ATP content from isolated islets measured at 2.8 mM and 16.7 mM glucose. (d) Potassium-evoked insulin secretion in isolated islets from SKIP^{-/-} mice. Insulin secretion measured at 2.8 mM, 16.7 mM glucose and 2.8 mM with 50 mM KCl. (e) Calcium influx measured in islets from SKIP^{+/+} and SKIP^{-/-} mice. (f) cAMP content in isolated islets from SKIP^{+/+} and SKIP^{-/-} mice stimulated at 16.7 mM glucose for 0 min, 15 min, 60 min. (g) cAMP content in isolated islets from SKIP^{+/+} and SKIP^{-/-} mice at 2.8 mM glucose with or without 10 nM cAMP. (h) Epac2 selective activator (ESCA)-stimulated insulin secretion in islets from SKIP^{+/+} and SKIP^{-/-} mice. Insulin secretion measured at 2.8 mM or 16.7 mM glucose with or without 10 μM ESCA in the isolated islets. (i) PKA-dependent insulin secretion in islets from SKIP^{+/+} and SKIP^{-/-} mice. Insulin secretion from isolated islets measured at 2.8 mM or 16.7 mM glucose with or without 10 nM PKI. (j) GIS treated with 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) in islets from SKIP^{+/+} and SKIP^{-/-} mice. Insulin secretion was measured at 2.8 mM or 16.7 mM glucose with or without 500 μM IBMX in the isolated islets. (a-j) 12-week-old mice were used for the experiments. *p < 0.05, **p < 0.005 vs SKIP^{+/+}, †p < 0.05, ††p < 0.005 for different stimulated conditions in the same genotype mice of insulin secretion. (a-d, h-i) n = 7-8 mice per group and 5-6 samples per group, 10 islets per sample. (e) n = 3 mice per group and 3 samples per group, 12-20 islets per sample. (f-g) n = 6-7 mice per group and 5-6 samples, 25 islets per group. Data are expressed as average ± SEM. Significance was determined by one way ANOVA with Tukey test (a-d, f-i) and student's t-test (e).

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 1 件)

Wang Y, Harashima SI, Liu Y, Usui R, Inagaki N. Sphingosine kinase 1-interacting protein is a novel regulator of glucose-stimulated insulin secretion. *Scientific Rep.* 査読あり. 2017; 779. 10.1038/s41598-017-00900-7

〔学会発表〕(計 2 件)

Yu Wang, Shin-ichi Harashima, Yanyan Liu, Ryota Usui, Nobuya Inagaki. Sphingosine kinase 1-interacting protein (SKIP) is a novel regulator of glucose-stimulated insulin secretion. 9th Asian Association for the Study of Diabetes (国際学会) 2017年, 5月, 名古屋

Yanyan Liu, Shin-ichi Harashima, Yu Wang, Nobuya Inagaki. Depletion of sphingosine kinase 1-interacting protein (SKIP) induces metabolically healthy obesity. 9th Asian Association for the Study of Diabetes (国際学会) 2017年, 5月, 名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原島伸一 (HARASHIMA, Shinichi)
京都大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 80444793

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

細田公則 (HOSODA, Kiminori)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 40271598

富田 努 (TOMITA, Tsutomu)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 50402897

真下知士 (MASHIMO, Tomoji)
京都大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 80397554

(4) 研究協力者