

令和元年6月3日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09749

研究課題名(和文) 膵細胞保護におけるEpac2A/Rap1シグナルの役割とその機序の解明

研究課題名(英文) The role of Epac2A/Rap1 signaling in the protection of pancreatic beta-cell

研究代表者

高橋 晴美 (TAKAHASHI, Harumi)

神戸大学・医学研究科・特命講師

研究者番号：50546489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：膵細胞保護作用におけるインクレチン/cAMPシグナルおよびEpac2/Rap1シグナルの役割を解明することを目的として研究を行った。膵細胞において、酸化ストレスによる活性酸素種の産生が、インクレチンやEpac2シグナルの活性化によって抑制され、cAMP/Epac2シグナルが酸化ストレスを軽減することが示唆された。また、Epac2欠損膵細胞株の作製およびその解析から、これまで知られていなかったEpac2アイソフォームが膵細胞に発現していることが明らかになり、膵細胞保護などのインスリン分泌以外の細胞機能制御への関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インクレチンは食餌の摂取によって腸管から分泌され、膵細胞からのインスリン分泌を促進するなど、糖代謝改善作用を有する。この作用を利用したインクレチン関連薬は現在2型糖尿病治療に広く用いられており、その作用機序や未知の効果を明らかにすることは臨床上的意義が大きい。また、糖尿病の病態には各種細胞ストレスなどによる膵細胞機能の障害が深く関与しており、このような病態の解明により新規糖尿病治療法の開発にも繋がる可能性があることから本研究の意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The roles of incretin/cAMP signaling and Epac2/Rap1 signaling in the protection of pancreatic β -cells were investigated. In a β -cell line, the activation of cAMP and Epac2 signaling suppressed production of reactive oxygen species (ROS) induced by alloxan and palmitate stimulations, suggesting that the role of cAMP and Epac2 signaling in the reduction of oxidative stress in pancreatic β -cells. From the generation and analyses of Epac2 deficient cell lines, we found a new isoform of Epac2 expressed in pancreatic β -cells, which may be involved in cellular functions other than insulin secretion such as the protection of β -cell against cellular stresses including oxidative stress.

研究分野：代謝学

キーワード：膵細胞 糖尿病 インクレチン cAMP Epac2

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食事の摂取によって消化管から分泌されるインクレチンは、膵β細胞に作用し、グルコース濃度依存的にインスリン分泌を増強する。この作用を利用して近年インクレチン関連薬が開発され、2型糖尿病の薬物療法として現在広く使用されている。インクレチンとして知られる GLP-1 (glucagon-like peptide-1) や GIP (glucose-dependent insulintropic polypeptide) は膵β細胞膜の特異的受容体に結合して細胞内の cAMP 産生を促し、プロテインキナーゼ A (PKA) および Epac2A (cAMP-GEFII と呼ばれる) を介してインスリン分泌を増強する。Epac2A はその下流シグナルである低分子量 G タンパク質 Rap を介して種々の細胞機能を制御する。研究代表者らは、これまでにインクレチンや糖尿病治療薬であるスルホニル尿素薬によるインスリン分泌における Epac2A/Rap1 シグナルの生理的、病態生理的な重要性について明らかにしてきた。

一方、近年インクレチン関連薬の膵β細胞保護作用が注目されている。最近の代表者らの研究では、GLP-1 受容体作動薬のリラグルチドが、薬剤誘発性糖尿病マウスの膵β細胞の機能を改善し、β細胞量を維持することが明らかになった。また、この作用にはβ細胞の増殖促進および細胞死の抑制、さらに酸化ストレスの軽減が関与していることが明らかになった (Tamura et al., PLoS One, 2015)。

Epac/Rap1 シグナルは様々な組織・細胞において種々の細胞機能を制御することが知られており、膵β細胞においても細胞増殖促進や細胞死抑制および活性酸素種の産生抑制などへの関与が報告されている。また代表者らの研究で、Epac2A 欠損マウスは高脂肪食により肥満を誘導すると顕著なインスリン分泌障害を認めた (Takahashi et al., Diabetes 2015)。これらのことから Epac2/Rap1 シグナルは、高血糖状態や肥満状態において、酸化ストレスの軽減により膵β細胞不全の進展を抑制ことが示唆される。このように Epac2A/Rap1 シグナルを介する様々なβ細胞機能が存在することは Rap1 の下流に種々の標的が存在することを示している。しかしながら、膵β細胞における Epac2A/Rap1 シグナルの下流因子については不明な点が多く、それらの役割については殆ど明らかにされていない。

2. 研究の目的

膵β細胞保護 (増殖促進、細胞死抑制、酸化ストレス抑制) における Epac2A/Rap1 シグナルに焦点をあてそのメカニズムの解明ならびに病態生理学的役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

膵β細胞保護作用における Epac2A/Rap1 シグナルの役割を明らかにするために、以下の検討を行った。

- (1) 膵β細胞の ROS 産生に対する cAMP の効果
酸化ストレスを誘発する刺激による活性酸素種の産生を ROS 指示薬を用いて測定し、さらに ROS 産生に対する cAMP シグナルの効果を検討した。
- (2) Epac2 欠損膵β細胞株の作製
膵β細胞保護作用における Epac2 の役割をより詳しく調べるために、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集技術により、Epac2 欠損膵β細胞株 (Epac2 KO 細胞) を作製した。
- (3) Epac2/Rap1 シグナルの下流因子の探索
膵β細胞保護作用における Epac2A/Rap1 の下流シグナルを明らかにするために、免疫沈降法により Rap1 と相互作用する分子を検討した。

4. 研究成果

- (1) 膵β細胞の ROS 産生に対する cAMP の効果

膵β細胞株 MIN6-K8 細胞を用いてアロキサンまたはパルミチン酸により産生された活性酸素種 (ROS) の量を、ROS 産生指示薬である CM-H₂DCFDA を用いて測定した。1~10 mM のアロキサンで1時間刺激することにより濃度依存的に ROS が産生された。また、40時間のパルミチン酸刺激により、0.05~1 mM の範囲で濃度依存的な ROS の産生が認められた。これらの ROS 産生は、GLP-1 受容体作動薬である exendin-4 で同時刺激することにより抑制する傾向が認められた。また、Epac 選択的 cAMP アナログとの同時刺激により ROS 産生が顕著に抑制された。以上のことから、膵β細胞において cAMP シグナルおよび Epac2 シグナルがアロキサンおよびパルミチン酸刺激による ROS の産生を抑制することが示唆された。

(2) Epac2 欠損膵β細胞株の作製

CRISPR/Cas9 システムを用いて、MIN6-K8 細胞を親株として Epac2 欠損膵β細胞株 (Epac2 KO 細胞) を作製した。マウス Epac2 は、これまで3つのアイソフォームが同定されている (図)。膵β細胞には主に Epac2A が発現しているが、Epac2A および Epac2B が両方とも発現しないように、Epac2 遺伝子 (Rapgef4) の各々の翻訳開始点付近のエクソン2とエクソン5をそれぞれ標的とする2つのガイドRNAペアをMIN6-K8細胞に導入し、複数の単一クローン株を取得した。ゲノムDNA中の変異を確認し、最終的に機能的なEpac2を発現しないと考えられる4クローンを樹立した。ウェスタンブロット解析により、これら Epac2 KO 細胞には、Epac2A が発現していないことが確認できたが、抗 Epac2 抗体で認識されるタンパク質のバンドが認められ、これが Epac2 に対する siRNA によって発現抑制されたため、Epac2A および Epac2B とは異なる Epac2 アイソフォームであることが示唆された。

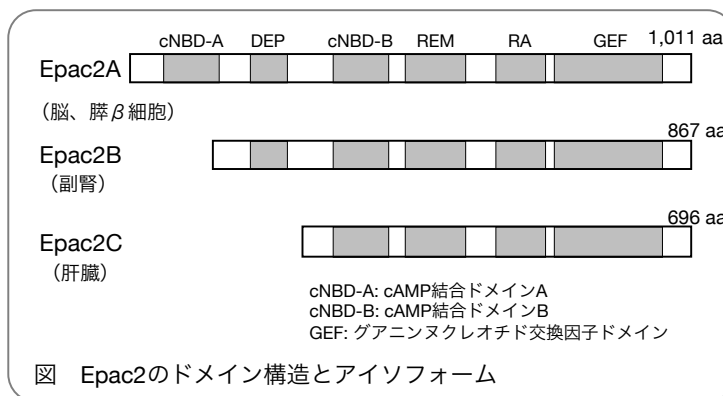


図 Epac2のドメイン構造とアイソフォーム

Epac2 KO 細胞において、Epac 選択的 cAMP アナログである 8-pCPT や GLP-1 によるインスリン分泌増強効果は減弱していたが、8-pCPT による Rap1 の活性化は認められた。これは他の Epac2 アイソフォームが KO 細胞にも残存しているためと考えられる。また、Epac2 KO 細胞において、この新規アイソフォームのノックダウンで 8-pCPT によるインスリン分泌増強効果がほとんど変化しなかったことから、新規アイソフォームが酸化ストレス軽減を含む膵β細胞保護作用などのインスリン分泌以外の細胞機能制御に関与している可能性が考えられる。

(4) Epac2/Rap1 の下流因子の探索

MIN6-K8 細胞を過酸化水素やパルミチン酸などの酸化ストレスを誘発する薬剤および 8-pCPT で刺激して細胞を回収し、抗 Rap1 抗体を用いて免疫沈降を行い、Rap1 と Rap1 結合タンパク複合体の精製を行った。既知の Rap1 下流因子のうち、膵β細胞での発現が認められる Krit1、Tiam1、Arap3 などの分子について、ウェスタンブロットにより確認したところ、Rap1 との結合が刺激により変化する分子が認められた。したがって、Rap1 と Rap1 下流因子の相互作用が酸化ストレスによって変化する、さらに cAMP シグナルによって制御される可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Carmean CM, Yokoi N, Takahashi H, Oduori OS, Kang C, Kanagawa A, Kirkley AG, Han G, Landeche M, Hidaka S, Katoh M, Sargis RM, Seino S. Arsenic modifies serotonin metabolism through glucuronidation in pancreatic β -cell. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2019, 316, E464-E474
DOI: 10.1152/ajpendo.00302.2018.
- ② Kondo M, Tanabe K, Amo-Shiinoki K, Hatanaka M, Morii T, Takahashi H, Seino S, Yamada Y, Tanizawa Y. Activation of GLP-1 receptor signalling alleviates cellular stresses and improves beta cell function in a mouse model of Wolfram syndrome. *Diabetologia.* 2018, 61, 2189-2201.
DOI: 10.1007/s00125-018-4679-y
- ③ Hashim M, Yokoi N, Takahashi H, Ghani G, Okechi OS, Hayami T, Murao N, Hidaka S, Minami K, Mizoguchi A, Seino S. Inhibition of SNAT5 Induces Incretin-Responsive State From Incretin-Unresponsive State in Pancreatic β -Cells: Study of β -Cell Spheroid Clusters as a Model. *Diabetes.* 2018, 67, 1795-1806.
DOI: 10.2337/db17-1486
- ④ Takahashi H, Hidaka S, Seki C, Yokoi N, Seino S. Characteristics of repaglinide effects on insulin secretion. *Eur J Pharmacol.* 2018, 828, 52-59.
DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.03.025

- ⑤ 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. PLoS One. 2017, 12, e0187213.
DOI: 10.1371/journal.pone.0187213
- ⑥ 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(Suppl 1), 22-29.
DOI: 10.1111/dom.12995. Review
- ⑦ Sugawara K, Shibasaki T, Takahashi H, Seino S. Structure and functional roles of Epac2 (RAPGEF4). Gene. 2016. 575, 577-583.
DOI: 10.1016/j.gene.2015.09.029
- ⑧ 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. 11, e0164785.
DOI: 10.1371/journal.pone.0164785
- ⑨ Yokoi N, Ghenni G, Takahashi H, Seino S. β -Cell glutamate signaling: Its role in incretin-induced insulin secretion. J Diabetes Investig. 2016. Suppl 1, 38-43.
DOI: 10.1111/jdi.12468

[学会発表] (計 23 件)

- ① 速水 智英, 横井 伯英, 本田 洗平, 高橋 晴美, 神谷 英紀, 溝口 明, 中村 二郎, 清野 進. 肥満2型糖尿病における肥大膵島は未分化細胞や癌細胞に類似した代謝様式に変化し、インクレチン応答性障害を呈する. 第33回糖尿病・肥満動物学会. 2019年
- ② 横井 伯英、速水 智英、吉田 舞、高橋 晴美、清野 進. 肥満2型糖尿病では肥大した膵島における糖代謝異常と O-GlcNAc 化の亢進がインクレチン応答性インスリン分泌障害を引き起こす. 第41回日本分子生物学会年会. 2018年
- ③ Okechi S. Oduori, Kohtaro Minami, Norihide Yokoi, Harumi Takahashi, Takashi Miki, Yuko Maejima, Kenju Shimomura, Susumu Seino. Enhanced Gs- and Gq-signals in β -cells contributes to normalization of glucose tolerance and insulin secretion in β -cell specific Kir6.2. Keytstone symposium. 2018
- ④ Norihide Yokoi, Tomohide Hayami, Shihomi Hidaka, Ayako Kawabata, Harumi Takahashi, Susumu Seino. The mechanism of impaired incretin responsiveness in the pancreatic islets of obese type 2 diabetes: A study of the ZFDM rat. The 54th EASD Annual Meeting. 2018
- ⑤ マヒラ アシム、横井 伯英、グブルジャン ゲニ、金川 章子、星川 律子、高橋 晴美、清野 進. 膵 β 細胞のインクレチン応答性獲得におけるアミノ酸トランスポーターSNAT5の役割. 第61回日本糖尿病学会年次学術集会. 2018年
- ⑥ 韓 桂栄、横井 伯英、グブルジャン ゲニ、村尾 直哉、高橋 晴美、清野 裕、木戸 良明、清野 進. グルタミン-グルタミン酸シグナルによるインスリン分泌増強機構の解明. 第61回日本糖尿病学会年次学術集会. 2018年
- ⑦ 速水 智英, 横井 伯英, 日高 志保美, 川畑 綾子, グブルジャン ゲニ, マヒラ アシム, 高橋 晴美, 神谷 英紀, 清野 裕, 中村 二郎, 清野 進. 肥満糖尿病の膵島におけるインクレチン応答性障害-オミクス解析による検討-. 第61回日本糖尿病学会年次学術集会. 2018年
- ⑧ Oduori S. Okechi, Harumi Takahashi, Norihide Yokoi, Kohtaro Minami, Yuko Maejima, Kenju Shimomura, Susumu Seino. GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors both normalize diabetes caused by deletion of β -cell KATP channels in mice. 第61回日本糖尿病学会年次学術集会. 2018年
- ⑨ 速水 智英, 横井 伯英, マヒラ アシム, 高橋 晴美, 清野 進. 肥満糖尿病におけるインクレチン応答性インスリン分泌障害機序の解明. 第39回日本肥満学会. 2018年
- ⑩ Harumi Takahashi, Kenji Sugawara, Norihide Yokoi, Susumu Seino. Insulin secretagogues and their signaling mechanisms. 第60回日本糖尿病学会年次学術集会. 2017年
- ⑪ 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
- ⑫ グプルジャン 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
 - ⑬ マヒラ アシム、横井 伯英、星川 律子、グプルジャン 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関与する分子の同定. 第60回日本糖尿病学会年次学術集会. 2017年
 - ⑭ Harumi Takahashi, Kenji Sugawara, Kohei Honda, Norihide Yokoi, Ichiro Mori, Haruaki Nakaya, Susumu Seino. 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
 - ⑮ Okechi S. Oduori, Kohtara Minami, Norihide Yokoi, Harumi Takahashi, Yuko Maejima, Kenju Shimomura, Pedro Luis Herrera and Susumu Seino. 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
 - ⑯ 韓 桂榮、グプルジャン 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
 - ⑰ 速水 智英、横井 伯英、本田 洗平、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
 - ⑱ 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に関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
 - ⑲ 高橋 晴美、日高 志保美、堰 千紘、清野 進. レパグリニドとインクレチンによるインスリン分泌動態の解析. 第59回日本糖尿病学会年次学術集会. 2016年
 - ⑳ 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
 - ㉑ Susumu Seino, Harumi Takahashi. Roles of KATP channels in brain-islet axis. 21st EASD-Hagedorn Oxford Workshop. 2016
 - ㉒ Mahira Hashim, Norihide Yokoi, Ghupurjan Ghani, Ritsuko Hoshikawa, Harumi Takahashi, Susumu Seino. 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
 - ㉓ Okechi S. Oduori, Kohtaro Minami, Norihide Yokoi, Yuko Maejima, Harumi Takahashi, Pedro L. Herrera, Kenju Shimomura, Susumu Seino. 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

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

該当なし

※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。