

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：16K09751

研究課題名(和文) 膵細胞グルタミン酸シグナルの生理学的・病態生理学的役割の解明

研究課題名(英文) The physiological and pathophysiological roles of glutamate signaling in pancreatic beta-cell

研究代表者

艾尼 吾甫尔江 (GHENI, Ghupurjan)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：70750488

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)：膵細胞グルタミン酸シグナルの生理的・病態生理的役割およびそのインスリン分泌促進機構の解明を目的として研究を行った。インスリン顆粒のプロテオーム解析からグルタミン酸によるインスリン開口分泌に関与する候補分子を同定した。ゲノム編集技術を用いて作製した小胞型グルタミン酸トランスポーター(VGLUT)欠損膵細胞の解析から、インクレチンによるインスリン分泌におけるVGLUTの重要性が明らかになった。さらに、偽膵島形成によるインクレチン応答性誘導のメカニズムの解析より、インクレチン応答性におけるグルタミン酸シグナルの役割が明らかになり、その病態生理学的重要性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インクレチン関連薬は、現在2型糖尿病治療において広く使用されている。インクレチンの主な作用は膵細胞からのインスリン分泌促進作用であるが、その詳細な作用機序については未だ不明な部分も多い。また、臨床的にはインクレチン関連薬に対する反応性の低下がしばしば見られ問題となっている。インクレチンによるインスリン分泌において膵細胞内のグルタミン酸がインスリン顆粒開口分泌を促進する機序は学術的にも興味深い。一方、本研究の成果はインクレチン不応性の背景にある病態の一端を説明しうるものであり、臨床的にも意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The physiological and pathophysiological roles of β -cell glutamate and the mechanism of insulin secretion by glutamate signaling were investigated. Proteome analysis of purified insulin granule identified the candidate molecules involved in insulin granule exocytosis induced by glutamate. The analysis of β -cell lines deficient for vesicular glutamate transporter (VGLUT) generated by genome editing system revealed the importance of VGLUT in incretin-induced insulin secretion. Furthermore, in the study of induction of incretin responsiveness by formation of islet-like spheroid cluster (SC) using incretin-unresponsive β -cell line, we found the elevated cellular glutamate level in incretin-responsive SC and the involvement of reduced expression of amino acid transporter which regulates glutamine transport in the induction of incretin-responsiveness, suggesting the pathophysiological significance of the regulation of cellular glutamate in pancreatic β -cell functions.

研究分野：代謝学

キーワード：インクレチン 膵細胞 糖尿病 グルタミン酸 インスリン分泌

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

膵β細胞からのインスリン分泌は、様々な細胞内シグナルによって精密に調節され、血糖を正常範囲内で維持する。インスリン分泌障害は糖尿病の発症および病態生理に寄与しその治療の標的である。インクレチン（GLP-1, GIP）は、食事摂取に応じてそれぞれ腸内分泌細胞から分泌され、膵β細胞のcAMPシグナルを介してインスリン分泌を増強することにより、食後高血糖を抑制するために重要である。最近、血糖に依存してインスリン分泌を促進するというインクレチンの作用を利用してインクレチン関連薬が開発され、2型糖尿病の治療薬として広く使用されるようになった。しかし、何故インクレチンが血糖依存的にインスリン分泌を促進するか、さらにインクレチン刺激下に膵β細胞内でグルコース代謝とcAMPシグナルがどのように相互作用するのかについては全く明らかにされていなかった。これらの問題を明らかにすることは生理的条件下でのインクレチンによるインスリン分泌増強機構を解明するのみならず臨床でしばしばみられる糖尿病患者における内因性インクレチンの反応性の低下やインクレチン関連薬に対する不応性（non-responder）の機序を解明するために極めて重要な研究課題である。最近、研究代表者らは、インクレチン応答性の膵β細胞株と非応答性の膵β細胞株を利用し、グルコースの安定同位体である[U-¹³C]グルコースを用いた比較メタボローム解析を行い、グルコース刺激により解糖系に共役するリンゴ酸-アスパラギン酸（MA）シャトルを介して細胞質で産生されるグルタミン酸が、インクレチン/cAMPシグナルによるインスリン分泌増強に必須のシグナルであることを発見した。しかも、細胞質のグルタミン酸が小胞型グルタミン酸トランスポーター（VGLUT1）を介してインスリン顆粒内に取り込まれることがインスリン分泌の増強に必要であることを明らかにした（Gheni et al., Cell Reports, 2014）。しかし、インスリン顆粒内に取り込まれたグルタミン酸がどのようにしてインスリン分泌を増強するのかは依然として不明である。

2. 研究の目的

本研究では、網羅的プロテオミクスの手法やCRISPR/Cas9システムにより代表者らが樹立した小胞型グルタミン酸トランスポーターノックアウトβ細胞株を用いた解析により、膵β細胞のグルタミン酸シグナルによるインスリン分泌を増強する機構を明らかにし、その生理的ならびに病態生理学的意義を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) グルタミン酸シグナルの標的分子の同定とその役割の解明

低濃度や高濃度グルコース及びインクレチン等で刺激した膵β細胞株から分画したインスリン分泌顆粒を用いて、網羅的プロテオミクス解析を行い、グルタミン酸シグナルの標的分子を同定した。

(2) グルタミン酸トランスポーターの in vitro における生理的役割の解明

小胞型グルタミン酸トランスポーター1及び2（VGLUT1及びVGLUT2）のノックアウトβ細胞株を用いて、グルタミン酸トランスポーターのインクレチンによるインスリン分泌の役割を検討した。

(3) グルタミン酸シグナルの病態生理学的役割の解明

偽膵島形成によるインクレチン応答性誘導機構の解析により、糖尿病の病態やインクレチン応答性と細胞内グルタミン酸シグナルの関連について検討した。

4. 研究成果

(1) グルタミン酸シグナルの標的分子の同定とその役割の解明

膵β細胞株 MIN6-K8 細胞を、安定同位体標識したアミノ酸でラベルし、高濃度グルコースやcAMP、インクレチン等の刺激後に細胞を回収してインスリン顆粒画分を回収した。これらのサンプルを用いて質量分析により、刺激によって量的変動のあったタンパク質を解析した。GLP-1やcAMP、ジメチルグルタミン酸の刺激により、それぞれおよそ40~140程度のタンパク質の増減が認められた。そのうち、小胞輸送や、開口分泌等に関連するタンパク質について、siRNAによるノックダウンの効果を検討したところ、インクレチンに対するインスリン分泌がノックダウンにより抑制される分子が認められた。また、小胞型プロトンポンプ（V-ATPase）はグルコース刺激によるインスリン分泌の過程で、インスリン顆粒の酸性化に関与するが、重要なサブユニットのノックダウンによって特にインクレチン応答性が減弱することから、インクレチンによるインスリン分泌にも関与していることが示唆されている。このV-ATPaseのいくつかの

サブユニットも今回のプロテオーム解析でインスリン顆粒中の変動が認められたことから、グルタミン酸によるインスリン顆粒の開口分泌への関与が示唆される。

(2) グルタミン酸トランスポーターの in vitro における生理的役割の解明

CRISPR/Cas9 システムを用いて小胞型グルタミン酸トランスポーター (VGLUT) の欠損膵β細胞株 (VGLUT KO 細胞) を作製した。まず、膵β細胞で主に発現している VGLUT1 のノックアウト細胞を作製したところ、GLP-1 によるインスリン分泌は野生型の MIN6-K8 細胞に比べて減弱しているものの若干の応答性が認められた。この VGLUT1 KO 細胞では VGLUT2 の発現が MIN6-K8 細胞よりも増加していたことから、他のアイソフォームによる代償機構が考えられたため、さらに VGLUT1、VGLUT2 および VGLUT3 を欠損したトリプルノックアウト細胞 (TKO 細胞) を作製した。この TKO 細胞では、GLP-1 または GIP によるインスリン分泌増強効果はほぼ消失した。また、VGLUT1 または VGLUT2 の導入により、GLP-1 によるインスリン分泌の回復が認められた。さらに細胞膜透過性のグルタミン酸前駆体であるジメチルグルタミン酸刺激によりインスリン分泌が増強した。これらの結果から、インクレチンによるインスリン分泌における VGLUT を介したグルタミン酸のインスリン顆粒内への取り込みの重要性が明らかになった。

(3) グルタミン酸シグナルの病態生理学的役割の解明

リンゴ-アスパラギン酸シャトルを介した細胞質グルタミン酸産生において重要なアスパラギン酸アミノ基転移酵素のノックアウト細胞 (AST1 KO 細胞) も上記 (2) の方法で作製したところ、KO 細胞でグルコース刺激による細胞質グルタミン酸産生が消失しており、インクレチンによるインスリン分泌が顕著に低下していた。インクレチン応答性が低下している肥満モデルラットなどの膵島でグルコースによるグルタミン酸産生が低下していることから、インクレチン応答性における細胞内グルタミン酸シグナルの重要性が示唆される。

研究代表者らは以前に、インクレチン非応答性の膵β細胞株である MIN6-K20 細胞を用いて膵島様の細胞凝集塊 (ここでは偽膵島とする) を形成するとインクレチン応答性が誘導されることを見出した。今回、MIN6-K20 細胞の単層培養と偽膵島を用いてメタボローム解析およびトランスクリプトーム解析を行った。偽膵島では単層培養に比べ各種代謝物が全体的に増加しており、グルコースによるグルタミン酸も顕著に亢進していた。一方、グルコースによるグルタミン酸産生を認めない上記の AST1 KO 細胞を用いて作成した偽膵島では、インクレチンによるインスリン分泌が低下していた。MIN6-K20 細胞の偽膵島では単層培養に比べ、グルタミンの輸送に関与するアミノ酸トランスポーター、SNAT5 の発現が顕著に低下していた。SNAT5 は、野生型のマウス膵島において発現が非常に低いが、インクレチン応答性が障害されている db/db マウスや KK-Ay マウスの膵島では発現上昇していることを見出した。MIN6-K20 において SNAT5 のノックダウンや阻害剤により SNAT5 の機能を阻害すると細胞内グルタミン酸産生の増加およびインクレチン応答性インスリン分泌の誘導が認められた。また、db/db マウスおよび KK-Ay マウスの膵島において、SNAT5 の阻害剤によりインクレチン応答性インスリン分泌の改善が認められた。以上の結果から、SNAT5 は細胞内のグルタミンおよびグルタミン酸含量を制御することにより病態モデル動物におけるインクレチン応答性障害に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① 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
- ② Hashim M, Yokoi N, Takahashi H, Gheni 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
- ③ Murao N, Yokoi N, Honda K, Han G, Hayami T, Gheni 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

- ④ 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

- ⑤ Yokoi N, Gheni 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 20 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. *Keystone 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 桂榮、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 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
- ⑪ 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
- ⑫ 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
- ⑬ 速水 智英、横井 伯英、本田 洗平、山口 拓郎、グブルジャン ゲニ、マヒラ アシム、星川 律子、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-ZFDMラット膵島を用いた検討-. 第60回日本糖尿病学会年次学術集会. 2017年
- ⑭ 村尾 直哉、横井 伯英、韓 桂榮、グブルジャン ゲニ、清野 進. 膵 β 細胞グルタミン酸シグナルのインスリン分泌における役割の解明 -CRISPR/Cas9による遺伝子改変膵 β 細胞株

を用いた検討-。第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会。2017 年

- ⑮ 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
- ⑯ 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
- ⑰ 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
- ⑱ 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
- ⑲ Mahira Hashim, Norihide Yokoi, Ghupur jan Gheni, 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
- ⑳ Ghupur jan Gheni, Norihide Yokoi, Takuro Yamaguchi, Kohei Honda, Mahira Hashim, Kanako Tamura, Susumu Seino. Impaired incretin-induced insulin secretion in enlarged pancreatic islets in a novel animal model of obese type 2 diabetes. 11th IDF-WPR Congress and 8th AASD Scientific Meeting. 2016

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：高橋 晴美

ローマ字氏名：TAKAHASHI, Harumi

所属研究機関名：神戸大学

部局名：大学院医学研究科

職名：特命講師

研究者番号（8 桁）：50546489

(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。