

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18416

研究課題名(和文) 糖尿病発症時の膵細胞に発現するグルタミン酸受容体活性化シグナルの解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism for activation of glutamate receptor in pancreatic beta-cells

研究代表者

室富 和俊 (Murotomi, Kazutoshi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：40635281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、インスリン分泌に関与するグルタミン酸受容体活性化機構を明らかにすることを目的とした。膵細胞株MIN6におけるグルタミン酸受容体NMDA受容体サブユニット発現量を比較した結果、NR1およびNR2Dサブユニットの発現が高かった。しかし、NR2C/2D特異的遮断薬を用いてもインスリン分泌は変化しなかった。一方、NR2B特異的遮断薬によってインスリン分泌量は増加し、その増加は、脱リン酸化阻害剤によって抑制された。以上の結果、NMDA受容体NR2Bサブユニットを介してインスリン分泌が亢進することが明らかとなり、その分泌過程にタンパク質リン酸化が関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳に豊富に存在するNMDA受容体NR2Bサブユニットを介して、血糖降下ホルモンであるインスリン分泌が促進されることを明らかにした。そのため、NR2Bおよびその活性化に関わるリン酸化シグナルは、新規糖尿病の治療標的となる可能性がある。今後、NR2Bやリン酸化シグナルを標的とする薬が、マウスやヒトの糖尿病に対する有効か否かを検証することで、新規糖尿病治療薬開発に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated a mechanism for activation of glutamate receptor, which is involved in secretion of insulin, in pancreatic beta-cells. At first, we measured expression levels of NMDA receptor subunits in murine beta-cell line MIN6 by qRT-PCR. NR1 and NR2D expression levels were higher than that of NR2B and NR2C in MIN6 cells. However, a NR2C/2D specific antagonist PPDA had no effect of insulin secretion in MIN6 cells. Rather, a NR2B specific antagonist Ro 25-6931 significantly increased insulin secretion. In addition, the increased insulin secretion were inhibited by treatment of phosphatase inhibitor. These results indicate that insulin is secreted by NMDA receptor NR2B subunit expressed in pancreatic beta-cells and protein phosphorylation may be involved in the process of insulin secretion mediated by NR2B.

研究分野：薬理学、分子生物学

キーワード：NMDA受容体 NR2サブユニット リン酸化 インスリン 糖尿病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性的な高血糖状態である糖尿病のうち約 95%を占める 2 型糖尿病は、インスリン抵抗性とインスリン分泌低下が原因で発症する。これらの原因を標的とした糖尿病治療薬は多数開発されているが、低血糖や体重増加等の副作用が少なく、膵臓 β 細胞死を抑制し、長期間に渡ってインスリン分泌能を十分に維持できるような治療薬の開発が望まれている (Rentnakaran et al., Diabetes Care, 2014)。

グルタミン酸受容体は、中枢神経系の興奮性シナプ스에多数発現しており、陽イオンを透過させるイオンチャンネル型受容体と G タンパク質共役型の代謝調節型受容体に大別される。イオンチャンネル型受容体のうち、主にカルシウムイオンを透過させる NMDA 受容体は、受容体活性を調節する NR1 と NR2、NR3 サブユニットで構成され、臓器や細胞種に応じて発現するサブユニットや機能が異なる。NMDA 受容体は、中枢神経系疾患の治療標的として古くから注目されており、NMDA 受容体遮断薬は疼痛やアルツハイマー病の治療薬として用いられている。近年、糖尿病治療標的として、膵臓に発現しているグルタミン酸受容体が注目されており、Marquard らの報告では、NMDA 受容体遮断により、サイトカイン誘発膵 β 細胞死の抑制、インスリン分泌の促進、さらに耐糖能異常が軽減されると報告された (Marquard et al., Nat Med., 2015)。しかし、糖尿病症状に及ぼすグルタミン酸受容体の影響を解析した報告は少なく、糖尿病発症時の NMDA 受容体活性の調節に関わるサブユニットや受容体を活性化する上流のシグナル伝達機構については明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、NMDA 受容体活性を調節するリン酸化シグナルに着目し、インスリン分泌時の NMDA 受容体サブユニットリン酸化部位とその上流のキナーゼの同定、リン酸化阻害による糖尿病病態への影響を明らかにする。さらに、当該シグナル伝達機構が、糖尿病治療標的となる可能性があるのかを検証する。

3. 研究の方法

(1) 膵臓細胞を用いた高グルコース負荷時の NMDA 受容体のキャラクタリゼーション

● NMDA 受容体サブユニット発現レベル及び局在の解析

NMDA 受容体いずれのサブユニットが、膵臓の内分泌系細胞 (α や β 細胞) に発現し、インスリン分泌に関与する可能性が高いか検証する。そのため、マウス膵 β 株化細胞 (MIN6) あるいは膵 α 株化細胞 (α TC) に、高グルコース負荷を施した際の受容体サブユニットの発現レベルを qPCR で測定した。

● NMDA 受容体サブユニットリン酸化レベルの解析

高グルコース負荷後、発現が確認されたサブユニットのリン酸化度を測定するために、NMDA 受容体サブユニット特異的リン酸化抗体や免疫沈降を行い、ウエスタンブロッティングで標的タンパク質の測定を試みた。

(2) 高グルコース負荷後の膵臓細胞における NMDA 受容体活性化機構の解明

● NMDA 受容体リン酸化シグナル遮断によるインスリン分泌への影響解析

膵 β 細胞のインスリン分泌量は、培養液中に放出されたインスリン量を ELISA で測定することで決定した。NMDA 受容体サブユニット特異的遮断薬あるいはキナーゼ阻害剤を添加した後、インスリン分泌量を測定した。さらに、タンパク質脱リン酸化阻害剤を用いて、受容体サブユニット特異的遮断薬によるインスリン分泌が、タンパク質のリン酸化による影響を受けるのか解析した。

● NMDA 受容体遮断後の細胞内カルシウムイオン濃度測定

NMDA 受容体は陽イオンチャンネル型受容体で、活性化されると細胞内にカルシウムイオンを流入させる。NMDA 受容体遮断時の細胞内カルシウムイオンをカルシウム指示薬 Fluo-4 を用いて測定した。

(3) インスリン抵抗性改善に及ぼす NMDA 受容体の影響解析

● PPAR γ 発現に及ぼす NMDA 受容体遮断の効果

PPAR γ はインスリン抵抗性改善薬の開発の標的分子であり、その発現量が増加すると、インスリン抵抗性が改善させる可能性がある。NMDA 受容体を介してインスリン抵抗性が改善されるかを検証するために、マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 に NMDA 受容体遮断薬、ポジティブコントロールとして PPAR γ 活性化薬であるピオグリタゾン及びリノール酸由来脂質酸化物 HODE を添加し、PPAR γ 発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) 膵 α 細胞あるいは β 細胞に発現するグルタミン酸受容体サブユニットの解析

マウス膵 β 細胞株 MIN6 を用いて、NMDA 受容体サブユニット NR1、NR2A、NR2B、NR2C、NR2D の発現量を qPCR で比較した。マウス大脳皮質における各遺伝子発現量を 1 とした場合、MIN6 における各遺伝子発現量は、NR1 = 0.7, NR2A = 0.0008, NR2B = 0.0015, NR2C = 0.003, NR2D = 0.2 であった。この結果、いずれのサブユニットも MIN6 に発現していたが、その発現量には大きな差が認められた。並行して、マウス膵臓における発現解析を試みたが、RNA 分解が著しく、目的の解析を行うことができなかった。同様に、グルカゴンを分泌するマウス膵 α 細胞株 α TC における NMDA 受容体サブユニット発現量を比較した結果、NR1 = 0.85, NR2A = 0.155, NR2B = not detectable, NR2C =

0.015, NR2D = 0.48 となり、膵臓の α 細胞と β 細胞とでは、発現する NMDA 受容体の構成が異なることが明らかとなった。

(2) NMDA 受容体特異的遮断薬によるインスリン分泌への影響

MIN6 細胞は高濃度のグルコースに晒されると、培養液中にインスリンを分泌する。そこで、NMDA 受容体を介してインスリン分泌が促進されるかを検討するために、MIN6 に NMDA 受容体遮断薬 MK-801 あるいは NR2 サブユニット特異的遮断薬を添加し、培養液中のインスリン濃度を測定した。その結果、MK-801 添加によりインスリン分泌量は約 8 倍増加した。さらに、NR2A、NR2B 及び NR2C/2D に特異性の高い各遮断薬 TCN201、Ro 25-6981 及び PPDA を各々 MIN2 に添加したところ、Ro 25-6981 のみインスリン分泌量が約 10 倍増加した。この結果より、膵 β 細胞は NR2B サブユニットを介してインスリン分泌を調節することが明らかとなった。同様に、 α TC 細胞のグルカゴン分泌に及ぼす NMDA 受容体の影響を検討したところ、MK-801 添加によってグルカゴン分泌は上昇する傾向であった。

(3) NMDA 受容体を介したインスリン分泌に及ぼすタンパク質リン酸化の影響

中枢神経系では NMDA 受容体 NR2 サブユニットを介して細胞内にカルシウムイオンの流入が生じ、NR2 サブユニットの活性は、リン酸化シグナルによって調節される。従って、NR2B を介したインスリン分泌には、NR2B のリン酸化が関与すると推測された。そこで、タンパク質脱リン酸化阻害剤を MIN6 に添加し、Ro 25-6981 を加えたところ、NR2B を介したインスリン分泌が約半分にまで抑制された。また、免疫沈降及び NR2B のセリン/チロシン特異的リン酸化抗体で、NR2B のリン酸化度合の測定を試みたが、MIN6 に発現しているタンパク質量が著しく少なく、リン酸化レベルを測定することはできなかった。

(4) NMDA 受容体遮断後の細胞内カルシウムイオン濃度の測定

高濃度のグルコースに暴露されると、膵 β 細胞ではカリウムイオンチャネルの閉口、細胞膜の過分極によって、電位依存性のカルシウムイオンチャネルが開口し、細胞内カルシウムイオンが上昇する。一方、NMDA 受容体活性化によって、神経細胞の細胞内カルシウムイオン濃度が上昇する。しかし、NR2B 遮断はインスリン分泌を促すため、細胞内カルシウムイオン濃度に対してどのような影響を与えているか不明である。そこで、MIN6 に高グルコースおよび Ro 25-6981 添加した後の細胞内カルシウムイオン濃度をタイムラプスイメージングで測定した。その結果、いずれの場合でも細胞内カルシウムイオン濃度が上昇した。従って、MIN6 では神経細胞とは異なり、NR2B 遮断によって細胞内カルシウム濃度が上昇する可能性が示唆された。

(5) PPAR γ 発現に及ぼす NMDA 受容体遮断の効果

糖尿病の治療には、インスリン分泌促進だけでなく、インスリン抵抗性改善も有効である。グルタミン酸は、インスリン抵抗性にも関与することが示唆されているため (Palomo-Buitrago et al., Acta Diabetol., 2019)、インスリン抵抗性改善薬の標的となる PPAR γ 発現量に及ぼす NMDA 受容体の関与を qPCR で測定した。しかし、マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 にグルタミン酸や NMDA 受容体遮断薬を添加したが、PPAR γ 発現は変化しなかった。一方、本実験において対照として用いた PPAR γ アゴニスト hydroxyoctadecadienoic acid (HODE) では、HODE 異性体 (位置異性体、幾何異性体、立体異性体) 間で PPAR γ 結合活性およびアゴニスト活性に差異が認められ、PPAR γ 受容体活性の強さは、HODE 構造の違いに依存することが明らかとなった (図 1; Umeno et al., Biosci Rep., 2020)。

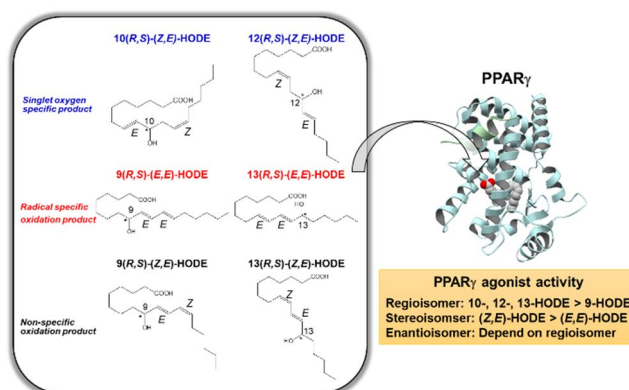


図 1 HODE 異性体間の PPAR アゴニスト活性の違い

以上の結果、NMDA 受容体はインスリン抵抗性には関与せず、血糖値調節ホルモンであるインスリンおよびグルカゴン分泌を調節する機能を有することが示唆された。今後、NR2B 遮断薬が糖尿病モデル動物の症状を改善させるのか、どのようなタンパク質のリン酸化を介して NR2B によるインスリン分泌が上昇し、細胞内カルシウムイオン濃度上昇が生じるのか、について詳細に検討し、糖尿病治療標的としてのグルタミン酸受容体の可能性を提示したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Aya Umeno, Mami Sakashita, Sakiko Sugino, Kazutoshi Murotomi, Tsugumi Okuzawa, Naoki Morita, Kentaro Tomii, Yuko Tsuchiya, Kazuhiko Yamasaki, Masanori Horie, Kentaro Takahara, Yasukazu Yoshida	4. 巻 40
2. 論文標題 Comprehensive Analysis of PPAR Agonist Activities of Stereo-, Regio-, and Enantio-Isomers of Hydroxyoctadecadienoic Acids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience Reports	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BSR20193767.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kazutoshi Murotoni, Norio Takagi, Kouichi Tanonaka
2. 発表標題 Transient cerebral ischemia induces NADPH oxidase-mediated oxidative damage to proteins in the postsynaptic density
3. 学会等名 Neuroscience2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----