

機関番号：32202

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591070

研究課題名 (和文) 膵β細胞グレリン受容体シグナル制御による新規糖尿病治療薬の開発

研究課題名 (英文) Effective strategy to treat type 2 diabetes by blockade of ghrelin signaling in islet β-cells

研究代表者

出崎 克也 (DEZAKI KATSUYA)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90337329

研究成果の概要 (和文)：本研究では、新規インスリン分泌抑制ホルモン『グレリン』について、膵β細胞グレリン受容体シグナルをターゲットとしたインスリン分泌促進作用による新たな糖尿病治療法の開発基盤を構築することを目的とし、以下の成果を得た。(1) グレリンがβ細胞のcAMPを低下させてインスリン分泌を抑制することを明らかにした。(2) 自然発症2型糖尿病GKラットは、食後の血中グレリンレベル低下が減弱しており、GKラットにグレリン受容体拮抗薬を投与すると、グルコース負荷試験時のインスリン分泌応答が亢進し耐糖能の改善を認めた。以上、β細胞グレリン受容体阻害によるインスリン分泌増強および耐糖能障害・2型糖尿病の抑制に関する学術的、治療的基盤を提出した。

研究成果の概要 (英文)： Ghrelin, an acylated 28-amino acid peptide, was isolated from the stomach as the endogenous ligand for growth hormone-secretagogue receptor (GHS-R). In addition to its unique role in regulating mealtime hunger and lipid metabolism, we have reported the physiological role of ghrelin in the regulation of insulin release and glucose metabolism. In this study, we uncovered that the signal transduction mechanisms of ghrelin in islet β-cells are very unique, being distinct from those utilized for growth hormone release. In type 2 diabetic GK rats, blockade of β-cell ghrelin receptor enhanced insulin release and prevents impaired glucose tolerance. Thus, manipulation of insulinostatic function of ghrelin-GHS-R system in islets could optimize the amount of insulin release to meet the systemic demand, providing a potential therapeutic application to prevent type 2 diabetes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：細胞生理学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：生理学、糖尿病、インスリン分泌、シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

グレリンは、オーファン受容体である成長ホルモン放出促進因子受容体(GHS-R)の内因性リガンドとして胃から精製された新規ペプチドであり、成長ホルモン放出、摂食促進作用を持ち、循環機能にも関与することが報告されている。一方、GHS-Rは全身組織に広く分布していることから、より広範な生理機能が推察される。これまでに申請者は、胃と視床下部に存在が知られていたグレリンが膵ランゲルハンス島(膵島)でも発現し、分泌され、GHS-Rも膵島細胞に発現していることを見出した。さらに、薬理的解析およびグレリン遺伝子欠損動物を用いた検討により、内因性グレリン作用を阻害するとグルコース誘発インスリン分泌が増強することを示した。一連の実験結果から、膵島内因性グレリンはβ細胞に作用しインスリン分泌を抑制する調節ペプチドであると想定される。さらに、グレリン遺伝子欠損マウスでは、高脂肪食負荷による耐糖能障害が改善しており、これは高いインスリン分泌応答に起因することを明らかにしている。従って、β細胞におけるグレリン作用の阻害は、インスリン分泌促進を介した糖代謝改善作用が期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、膵β細胞グレリン受容体シグナルをターゲットとしたインスリン分泌促進作用による新たな糖尿病治療法の開発基盤を構築することを目的とする。

## 3. 研究の方法

- (1) ラット、マウスにグルコース負荷試験を行い、血漿インスリン、グルコース濃度を測定した。
- (2) ラット、マウスから膵島を分離しインスリン分泌を測定した。また膵島 mRNA 発現を定量 PCR 法にて測定した。
- (3) 分離膵島からβ細胞を単離し、fura-2 蛍光画像解析により細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度を測定し、パッチクランプ法により Kv チャネル電流を測定した。

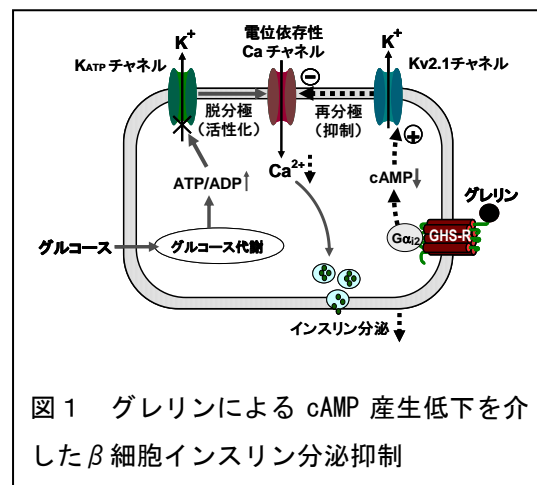
## 4. 研究成果

### (1) 膵β細胞選択的GHS-R拮抗薬の開発

- ①膵島グルコース誘発インスリン分泌に対するグレリン短鎖ペプチド(A、B、C、D、E)の効果を検討した結果、全て弱いインスリン分泌抑制作用を示した。
- ②グレリン誘導体(F)および(I)はグルコース誘発膵島インスリン分泌を有意に

増強し、低グルコース(2.8 mM)条件下での基礎インスリン分泌には影響しなかった。

- ③FとIは、外来性グレリン投与によるインスリン分泌抑制作用を阻害した。
- ④FとIは、グルコース8.3 mM存在下での膵β細胞内 $Ca^{2+}$ 動態には影響しなかったことから、FとIは膵β細胞に直接作用せずグレリンによるインスリン分泌抑制作用を阻害することによりインスリン分泌を促進すると考えられる。



以上、インスリン分泌促進作用を示す新規グレリン受容体拮抗薬の候補物質としてグレリン誘導体FとIを見出した。

### (2) 膵β細胞グレリン受容体シグナルの解明

- ①膵β細胞におけるグレリン受容体シグナル伝達を詳細に検討した結果、グレリンがβ細胞のcAMPを低下させることによりインスリン分泌を抑制することが明らかになった(図1)。

### (3) 糖尿病態におけるグレリン機能変化

- ①インスリン分泌不全を呈する自然発症2型糖尿病Goto-Kakizaki(GK)ラットにおけるKv2.1の発現を免疫組織化学的に検討した結果、GKラットでは正常Wistarラットと比較してβ細胞Kv2.1の発現が増大していた。
- ②GKラットはWistarラットと比較してβ細胞Kv2.1のmRNA発現が増大していた。一方、ATP感受性 $K^+$ チャネルサブユニットKir6.2および電位依存性 $K^+$ チャネルKCNQ1の膵島発現レベルは、GKラットとWistarラットで同程度であった。
- ③β細胞Kvチャネル活性を電気生理学的に

検討した結果、GKラットではβ細胞Kvチャネル電流が増強しており、Kv2.1チャネルブロッカーのGuangxitoxin-1E存在下では、GKラットβ細胞Kvチャネル電流の増強が観察されなかった。

④Guangxitoxin-1Eは、GKラットβ細胞におけるグルコース刺激による細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を増加させ、分離膵島からのグルコース誘発インスリン分泌を促進した。

⑤GKラットは、正常Wistarラットと比較して膵島におけるグレリン遺伝子発現が亢進していた。また、食後の血中グレリンレベル低下がGKラットでは減弱していた。

以上より、2型糖尿病ラットβ細胞では、Kv2.1チャネル機能亢進およびグレリン発現・分泌制御破綻が2型糖尿病におけるインスリン分泌不全に関与する可能性が示唆された。

#### (4) グレリン受容体阻害薬による糖尿病治療

①浸透圧ポンプを用いてGKラットに対するグレリン受容体拮抗薬長期投与の効果を検討した結果、GKラットの随時血糖が低下し、さらにグルコース負荷試験時のインスリン分泌応答が亢進し耐糖能の改善を認めた。

②グレリン受容体拮抗薬とインスリン分泌促進ホルモンのGLP-1を各々単独作用の無い用量で共投与すると、GKラットの分離膵島におけるグルコース誘発インスリン分泌およびグルコース負荷試験時の血中インスリン分泌が亢進し、GKラットの耐糖能障害が改善した。

#### 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. Uchida K, Dezaki K, Damdindorj B, Inada H, Shiuchi T, Mori Y, Yada T, Minokoshi Y, Tominaga M. Lack of TRPM2 impaired insulin secretion and glucose metabolisms in mice. *Diabetes* 60:119-126 (2011)
2. Koizumi M, Dezaki K, Hosoda H, Damdindorj B, Sone H, Ming L, Hosoya Y, Sata N, Kobayashi E, Kangawa K, Nagai H, Yasuda Y, Yada T. Reconstruction- dependent recovery from anorexia and time-related recovery of regulatory ghrelin system in gastrectomized rats. *Int J Pept* :pii365416 (2010)

3. Yoshida N, Maejima Y, Sedbazar U, Ando A, Kurita H, Damdindorj B, Takano E, Gantulga D, Iwasaki Y, Kurashina T, Onaka T, Dezaki K, Nakata M, Mori M, Yada T. Stressor-responsive central nesfatin-1 activates corticotropin-releasing hormone, noradrenaline and serotonin neurons and evokes hypothalamic- pituitary-adrenal axis. *Aging* 2:775-784 (2010)
4. Yoshida M, Nakata M, Yamato S, Dezaki K, Sugawara H, Ishikawa SE, Kawakami M, Yada T, Kakei M. Voltage-dependent metabolic regulation of Kv2.1 channels in pancreatic β-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 396:304-309 (2010)
5. Maejima Y, Sedbazar U, Suyama S, Kohno D, Onaka T, Takano E, Yoshida N, Koike M, Uchiyama Y, Fujiwara K, Yashiro T, Horvath TL, Dietrich MO, Tanaka S, Dezaki K, Oh-I S, Hashimoto K, Shimizu H, Nakata M, Mori M, Yada T. Nesfatin-1-regulated oxytocinergic signaling in the paraventricular nucleus causes anorexia through a leptin-independent melanocortin pathway. *Cell Metab* 10:355-365 (2009)
6. Yoshida M, Dezaki K, Yamato S, Aoki A, Sugawara H, Toyoshima H, Ishikawa SE, Kawakami M, Nakata M, Yada T, Kakei M. Regulation of voltage-gated K<sup>+</sup> channels by glucose metabolism in pancreatic β-cells. *FEBS Lett* 583:2225-2230 (2009)
7. Dezaki K, Sone H, Yada T. Ghrelin is a physiological regulator of insulin release in pancreatic islets and glucose homeostasis. *Pharmacol Ther* 118:239-249 (2008)
8. Yada T, Dezaki K, Sone H, Koizumi M, Damdindorj B, Nakata M, Kakei M. Ghrelin regulates insulin release and glycemia: Physiological role and therapeutic potential. *Curr Diabetes Rev* 4:18-23 (2008)
9. Dezaki K, Kageyama H, Seki M, Shioda S, Yada T. Neuropeptide W in the rat pancreas: potentiation of glucose-induced insulin release and Ca<sup>2+</sup> influx through L-type Ca<sup>2+</sup> channels in β-cells and localization in islets. *Regul Pept* 145:153-158 (2008)
10. Kohno D, Nakata M, Maejima Y, Shimizu H, Sedbazar U, Dezaki K, Yoshida N, Onaka T, Mori M, Yada T. Nesfatin-1 neurons in

paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus coexpress oxytocin and vasopressin and are activated by refeeding. *Endocrinology* 149:1295-1301 (2008)

[学会発表] (計 7 件)

1. 出崎 克也. Ghrelin is a physiological regulator of insulin release in islet  $\beta$ -cells. 第 87 回日本生理学会大会 (2010 年 5 月 21 日、盛岡)
2. 出崎 克也. グレリンによる  $\beta$  細胞 Kv2.1 チャネル活性化を介したグルコース誘発インスリン分泌抑制. 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2010 年 5 月 28 日、岡山)
3. 出崎 克也. Kv2.1 channel blockers enhance glucose-induced cytosolic  $Ca^{2+}$  increases and insulin release in pancreatic  $\beta$ -cells of type 2 diabetic rats. The XXXVI International Congress of Physiological Sciences (2009 年 7 月 30 日、京都)
4. 出崎 克也. Excessive expression and activity of Kv2.1 channels in islet  $\beta$ -cells of type 2 diabetic GK rats. The 45th EASD Annual Meeting (2009 年 9 月 30 日、Vienna)
5. 出崎 克也. グレリンによる  $\beta$  細胞 Kv チャネル活性化を介したグルコース誘発インスリン分泌抑制. 第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2008 年 5 月 23 日、東京)
6. 出崎 克也. Kv2.1 channel blockers potentiate glucose-induced insulin release in islets of type 2 diabetic rats. The 44th EASD Annual Meeting (2008 年 9 月 8 日、Rome)
7. 出崎 克也. 2 型糖尿病ラット臍島における Kv2.1 チャネルブロッカーによるインスリン分泌促進. 第 82 回日本薬理学会年会 (2009 年 3 月 17 日、横浜)

[図書] (計 1 件)

1. 出崎 克也、曾根 英行、矢田 俊彦. グレリンによるインスリン分泌制御 In 糖尿病学 2008 (診断と治療社) 85-91 (2008)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：組成物、保護/再生促進組成物、及び cAMP 産生促進組成物

発明者：矢田俊彦(届出・代表)、出崎 克也

権利者：自治医科大学

種類：特願

番号：2009-127901

出願年月日：2009 年 5 月 27 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ：

([http://www.jichi.ac.jp/physio2/physiol\\_new\\_HP2008/index.htm](http://www.jichi.ac.jp/physio2/physiol_new_HP2008/index.htm))

6. 研究組織

(1) 研究代表者

出崎 克也 (DEZAKI KATSUYA)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90337329

(2) 研究分担者

矢田 俊彦 (YADA TOSHIHIKO)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：60166527