

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2012

課題番号：21790154

研究課題名（和文）糖尿病薬物治療標的としての膵β細胞脂質シグナリング制御に関する基礎的研究

研究課題名（英文）Study on the regulation of lipid signaling in pancreatic β-cells and the pathogenesis of diabetes mellitus

研究代表者

金子 雪子 (KANEKO YUKIKO)

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：00381038

研究成果の概要(和文) : Diacylglycerol kinases (DGK) は、脂質シグナル分子である diacylglycerol (DAG) をリン酸化することで、細胞内 DAG 量を制御する酵素である。マウス膵β細胞において、タイプ I DGK の発現が確認され、その特異的阻害薬はβ細胞からのインスリン分泌および細胞内 Ca^{2+} 上昇を抑制した。さらにタイプ I DGK のダブルノックダウンによりインスリン分泌が低下したこと、膜透過性 DAG アナログは細胞内 Ca^{2+} 濃度を低下させたことから、タイプ I DGK の機能不全により、細胞内 DAG の蓄積がもたらされた結果、インスリン分泌障害が引き起こされたと考えられる。

研究成果の概要(英文) : Diacylglycerol kinases (DGK) phosphorylate diacylglycerol (DAG) to phosphatidic acid and strictly regulate the intracellular level of these lipid molecules. The expression of type I DGK (DGK α and γ) was detected in mouse pancreatic islets and the β -cell line MIN6. A specific type I DGK inhibitor inhibited insulin secretions and Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in MIN6 cells. Moreover, DGK α and γ doubleknockdown by siRNA led to significant decreases in insulin secretions. A membrane permeable DAG analog also inhibited $[Ca^{2+}]_i$ elevations in MIN6 cells. These results suggest that DGK α and γ are present in β -cells, and that DAG accumulation in β -cells resulting from hypofunction of these DGK isoforms leads to a decrease in $[Ca^{2+}]_i$, thereby reducing insulin secretion. Type I DGK could be a novel therapeutic target for diabetes mellitus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	0	0	0
2012 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：糖尿病、ジアシルグリセロールキナーゼ、ジアシルグリセロール、インスリン分泌、膵β細胞、プロテインキナーゼC、ホスファチジン酸

1. 研究開始当初の背景

膵 β 細胞において、受容体刺激や遊離脂肪酸代謝により産生される diacylglycerol (DAG) は、protein kinase C 活性化やインスリン開口放出における膜融合調節タンパク質に結合し、インスリン分泌を制御する。さらに、DAG が diacylglycerol kinases (DGK) によりリン酸化されたホスファチジン酸も、インスリン顆粒を細胞質から細胞膜へと輸送し、分泌促進性に制御する。つまり、DGK は細胞内 DAG や PA を量的に厳密に制御し、細胞内局所的な DAG 枯渇/PA 増大シグナリングに重要な役割を果たしていると考えられる。近年、骨格筋において、DGK δ の発現・活性の低下による DAG/PA バランスの崩壊が、脂質代謝異常やインスリン抵抗性による 2 型糖尿病病態形成の一因であるという興味深い報告がなされた (Cell, 132, 375-386, 2008)。すなわち糖尿病時に、こういった脂質シグナリングバランスの崩壊が起こっており、 β 細胞においても例外ではないと考えられる。しかしながら、これまでに膵 β 細胞における DGK を介した脂質シグナリング制御についての報告はほとんどなされておらず、また、糖尿病病態形成時における DGK を介した脂質シグナリングの機能変化についても不明である。

2. 研究の目的

本研究では、2 型糖尿病における膵 β 細胞インスリン分泌障害に関わる新たなインスリン分泌調節因子としてジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) に着目し、DGK による DAG の細胞内における量的調節による脂質代謝シグナリング制御とインスリン分泌調節との関係を明らかにする。具体的には膵 β 細胞におけるタイプ I DGK の活性化経路およびインスリン分泌促進反応への寄与について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) タイプ I DGK の発現と局在の検討

マウス膵島および MIN6 細胞に発現している DGK アイソフォームの発現とその局在を RT-PCR、ウェスタンブロッティ

ング法、免疫染色法により同定した。

(2) インスリン分泌および細胞内 Ca^{2+} 濃度に及ぼす影響

インスリン分泌に対する DGK 阻害薬に対する影響について検討を行うために、MIN6 細胞を用いたバッチインキュベーション法によりサンプルを採取し、RIA により定量した。同様に、インスリン分泌と関連することで知られる細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 変化に対する DGK 阻害薬の影響について検討を行うため、 Ca^{2+} 蛍光指示薬である fura-PE3 を細胞に負荷し、Aquacosmos System (浜松ホトニクス) により画像解析を行った。

(3) タイプ I DGK 活性化に関わる分子の同定

タイプ I DGK である DGK α および γ は、活性化に伴って細胞質から細胞膜へ移行することが知られている。そこで、生細胞を用いたライブイメージングによる細胞膜移行を活性化の指標として、薬物処置による細胞膜移行の有無により、DGK 活性化が起こる機序の解明を行った。また、検討には GFP 融合 DGK α , γ 過剰発現 MIN6 細胞を用い、インスリン分泌刺激による細胞質から細胞膜への移行を観察した。細胞は顕微鏡下 37°C で還流し、還流液を交換することで薬物処置を行った。解析には、共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss LSM510) を用いた。

(4) インスリン分泌へ影響を及ぼす DGK 分子の特定

タイプ I DGK アイソフォームの中で、膵島に発現している 2 つのアイソフォーム (DGK α および γ) に着目し、どちらのアイソフォームが実際にインスリン分泌調節に寄与しているのかを特定するために、DGK α および γ をそれぞれターゲットとして siRNA 法により、膵 β 細胞内タイプ I DGK 分子をノックダウンし、インスリン分泌反応に対する影響を検討した。

4. 研究成果

(1) タイプ I DGK の発現と局在の検討

RT-PCR による発現検討から、マウス膵島および MIN6 細胞において、タイプ I DGK である DGK α , β , γ すべての mRNA の

発現が認められた。中でも DGK α , γ が高発現していたことから、これらについて western blotting および免疫染色による発現検討を行った。その結果、膵 β 細胞において、DGK α , γ とも膵 β 細胞質に局在していた。

(2) インスリン分泌および細胞内 Ca^{2+} 濃度に及ぼす影響

MIN6 細胞において、グルコースおよび高濃度 K^+ により誘発されるインスリン分泌及び $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応は、I 型 DGK 阻害薬である R59949 の処置により抑制された。膜透過型 DAG アナログである DiC8 の処置によっても、グルコースおよび高濃度 K^+ 誘発 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応は抑制された。これらの $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応抑制効果に対し、PKC 阻害薬である Ro31-8220 は影響を与えなかったことから、膵 β 細胞内で DAG が蓄積することにより PKC 非依存的に $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応が抑制され、インスリン分泌が減少することが明らかとなった。また PA を脱リン酸化し DAG を産生する酵素 phosphatidic acid phosphatase の阻害薬である propranolol は、高濃度グルコース応答性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応に対して促進効果を示した。したがってタイプ I DGK は細胞内の DAG 量や PA 量を調節し、 $[Ca^{2+}]_i$ を制御する事が示唆された。

(3) タイプ I DGK 活性化に関わる分子の同定

GFP 融合 DGK α , γ の画像解析の結果、DGK α および γ は高濃度 K^+ 刺激により、細胞質から細胞膜へゆっくりとした移行が観察された。一方、DGK γ を直接活性化することで知られるホルボールエステルの一種である PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) の処置により、GFP-DGK γ は細胞質から細胞膜へ迅速かつ不可逆的に移行した。一方 DGK α に関しては、PMA の処置による変化は認められなかった。

(4) インスリン分泌へ影響を及ぼす DGK 分子の特定

DGK α あるいは γ をノックダウンしたところ、高濃度グルコースおよび高濃度 K^+ 誘発インスリン分泌は有意に抑制されたものの、その抑制の割合は R59949 によるインスリン分泌抑制作用と比較し小

さかった。そこで、DGK α , γ をダブルノックダウンした結果、R59949 と同程度のインスリン分泌抑制作用が認められた。以上の結果から、膵 β 細胞において、DGK α と γ は共にインスリン分泌調節に寄与していることが明らかとなった。

以上の研究成果より、膵 β 細胞において、DGK α および DGK γ は、細胞内 DAG 量を制御することで $[Ca^{2+}]_i$ を調節し、インスリン分泌に対し促進的に働く分子であることが明らかとなった。これらの分子の機能不全が糖尿病病態時におけるインスリン分泌機能の低下に結びつく可能性が示された。今後、2 型糖尿病病態形成時における DGK の機能変化を伴うインスリン分泌機能障害について更なる検証が必要である。

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 3 件)

- ① 金子雪子. エストロゲンはどのように 2 型糖尿病を防ぐのか. *ファルマシア* 48(3):243(2012) 査読無
- ② Masahiro Takada, Akiko Noguchi, Yurie Sayama, Yukiko Kaneko, Tomohisa Ishikawa: Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-mediated initial Ca^{2+} mobilization constitutes a triggering signal for hydrogen peroxide-induced apoptosis in INS-1 β -cells. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 954-958 (2011) 査読有
https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/34/7/34_7_954/_article
- ③ Kaneko Y., Kimura T, Taniguchi S, Souma M, Kojima Y, Kimura Y, Kimura H, Niki I. Glucose-induced production of hydrogen sulfide may protect the pancreatic beta-cells from apoptotic cell death by high glucose. *FEBS Letters*, 583, 377-382 (2009) 査読有
DOI: 10.1016/j.febslet.2008.12.026

[学会発表] (計 31 件)

- ① 金子雪子、元木啓介、宮川昌子、石川智久：膵 β 細胞インスリン分泌調節における type I ジアシルグリセロールキナーゼ

の役割 日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 29 日、(横浜)

- ② 千葉里菜、金子雪子、藤貫貴大、石川智久：2 型糖尿病による膵β細胞ジアシルグリセロールキナーゼδの発現および細胞内局在変化の検討日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 29 日、(横浜)
- ③ Yukiko Kaneko, Miki Takii, Yumiko Kojima, Hiroko Yokosawa, and Tomohisa Ishikawa. Structure-dependent effects of green tea catechins on insulin secretion from INS-1 cells. The 1st International Conference on Pharma and Food. 2012 年 11 月 15 日 (静岡)、
- ④ 金子雪子、野尻雅人、笠原七帆子、石川智久：膵β細胞における構成型 NO 合成酵素 (cNOS) 活性調節に対する高血糖の影響 第 126 回日本薬理学会関東部会、2012 年 7 月 13 日 (東京)
- ⑤ 金子雪子、石川智久：ジアシルグリセロールキナーゼの膵β細胞脂質シグナリング制御機能と糖尿病治療標的としての可能性 特別シンポジウム OS05 「次世代に向けた新たなストラテジー」日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 29 日 (札幌)
- ⑥ 元木啓介、金子雪子、小林洋輔、中田邦人、坂根郁夫、白井康人、石川智久：Type I ジアシルグリセロールキナーゼは細胞内脂質シグナリング調節によりインスリン分泌を促進性に制御する 第 54 回日本糖尿病学会年次学術大会、2011 年 5 月 21 日 (札幌)
- ⑦ Yukiko Kaneko, Yosuke Kobayashi, Keisuke Motoki, Takahiro Fujinuki, Kunihito Nakata, Tomohisa Ishikawa Functional roles of diacylglycerol kinases on insulin secretion from pancreatic β-cells. 70th scientific sessions, American Diabetes Association, June 25-29, 2010 (Orlando, FL, USA)
- ⑧ 金子雪子、小林洋輔、元木啓介、藤貫貴大、石川智久 (2010 年 6 月 5 日) 脂質シグナル調節分子ジアシルグリセロールキナーゼの膵β細胞における発現・機能解析 第 122 回日本薬理学会関東部会 (静岡)
- ⑨ 金子雪子、小林洋輔、元木啓介、白井康人、坂根郁夫、石川智久 (2010 年 3 月

30 日) 膵β細胞インスリン分泌調節におけるタイプ I ジアシルグリセロールキナーゼの役割 日本薬学会第 130 年会 (岡山)

- ⑩ 金子雪子、小林洋輔、石川智久 (2009 年 8 月 24 日) 膵β細胞におけるジアシルグリセロールキナーゼの機能と役割の解明 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2009 (東京)

[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

<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/~pharmaco/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 雪子 (KANEKO YUKIKO)
静岡県立大学・薬学部・助教
研究者番号：00381038

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

()
研究者番号：