

## 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6月 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010年度～2012年度

課題番号：22590991

研究課題名（和文）グレリンによるインスリン分泌抑制機序の解明

研究課題名（英文）The Mechanism of Inhibition of Insulin Secretion by Ghrelin

研究代表者 西 理宏（NISHI MASAHIRO）

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90228148

研究成果の概要（和文）：グレリンは成長ホルモン分泌刺激、摂食亢進など多彩な作用を有するホルモンであるが、インスリン分泌を抑制することが判明している。我々はIA-2 $\beta$ がグレリンのインスリン分泌抑制機構に関与していることを報告し(Doi A. et al. PNAS 103:885,2006)、以後グレリンによるインスリン分泌制御機構について研究を進めてきた。本研究課題においてIA-2 $\beta$ 以外の経路としてAMPK-UCP2経路の関与につき検討し、グレリンはAMPK活性化を通じてUCP2発現を亢進させ、その結果インスリン分泌を抑制すること、また、IA-2 $\beta$ とAMPK-UCP2経路は互いに独立していることを明らかにした(FEBS Letters 584:1503-1508, 2010)。さらに、AMPK-UCP2経路は酸化ストレスに対してはむしろ防御的に働くことが想定されるため、グレリンの膵 $\beta$ 細胞の酸化ストレスに対する防御作用に関しても検討し、グレリンがMIN6細胞において過酸化水素による酸化ストレスに対し増殖能改善、アポトーシス抑制作用を有することを証明した。しかしながら、当初の予想とは異なり、これらの効果はAMPK-UCP2経路を介したのではなく、MAPKおよびPI3K両者が関与していることが判明した(投稿準備中)。本研究によりグレリンのインスリン分泌抑制の新たな機序が明らかになったのみならず、グレリンは膵 $\beta$ 細胞の増殖に関してはよい影響を与える可能性が示唆され、グレリンの糖尿病に対する影響についてはこれら両者のバランスを考慮する必要があると考えられる。今後は両者の作用機構を明らかにし、インスリン分泌抑制なしに、 $\beta$ 細胞増殖に関与する経路が明らかになれば、新たな糖尿病治療薬の開発につながるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Ghrelin has been reported to show various effects including the secretion of growth hormone or the stimulation of appetite etc. Ghrelin has also been reported to inhibit insulin secretion. We have reported that ghrelin could inhibit insulin secretion via induction of IA-2 $\beta$  (Doi A. et al. PNAS 103:885,2006). In this study, other than IA-2 $\beta$ , involvement of AMPK/UCP2 pathway in this ghrelin's effects on the inhibition of insulin secretion was identified (Wang Y et al. FEBS Lett 584:1503,2010). Since UCP2 has protective effects against oxidative stress, the protective effects of ghrelin on cell proliferation and apoptosis against oxidative stress were investigated, and ghrelin, dose-dependently, ameliorated decreased cell proliferation and increased apoptosis induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in MIN6 cells. However, unexpectedly, this ghrelin's effects was not via AMPK-UCP2 pathway, but MAPK and PI3K pathways. Therefore, ghrelin has complicated effects on beta cells and glucose metabolism. Ghrelin does inhibit insulin secretion, bad for glucose metabolism, however, ghrelin also showed protective effects against oxidative stress, good for glucose metabolism. Further clarification of these ghrelin's effects on beta cells will be necessary.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成23年度	800,000	240,000	1,040,000
平成24年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：糖尿病、インスリン分泌、グレリン、IA-2 $\beta$ 、AMPK、UCP2、酸化ストレス、シグナル伝達

### 1. 研究開始当初の背景

グレリンは成長ホルモン分泌亢進作用を有する新規ホルモンであるが、強力な摂食亢進作用を有し、レプチンの摂食抑制作用に拮抗する。また、インスリン分泌抑制作用も有し、グレリンやその下流のシグナルが肥満症や糖尿病の病態に関与している可能性は高い。しかし、グレリン受容体 (GHS 受容体) 以後のシグナルは明らかではない。本研究代表者らはグレリンのシグナル伝達機構解明の第一歩としてグレリンにより誘導される遺伝子を解析し、1型糖尿病の自己抗原であり、 $\beta$ 細胞や神経細胞における分泌顆粒蛋白の IA-2 $\beta$  を同定した。一方 IA-2 $\beta$  の類似分子である IA-2 はグレリンでは誘導されなかった。インスリン分泌に関しては培養インスリンノーマ細胞においてグレリンはインスリン分泌を抑制したが、IA-2 $\beta$  過剰発現により同様のインスリン分泌抑制が認められ、IA-2 過剰発現では認められなかった。また siRNA により IA-2 $\beta$  発現を抑制するとグレリンによるインスリン分泌抑制効果は減弱した。以上の結果よりこれまでその機能が全く不明であった IA-2 $\beta$  のグレリンによる誘導

やインスリン分泌への関与が判明し、Proc Natl Acad Sci USA 103:885-890, 2006 に掲載された。

### 2. 研究の目的

グレリンは成長ホルモン分泌作用以外に摂食亢進など種々の作用を有する新規ホルモンであり、臨床応用が期待されている。グレリンのインスリン分泌抑制作用に関して、我々は IA-2 $\beta$  を介するという世界で始めて同定し、報告している (PNAS2006)。本研究ではグレリンによるインスリン分泌抑制機構の詳細を解析するため、(1) グレリンによるインスリン分泌抑制における IA-2 $\beta$  以外の因子の関与 (特に AMPK-UCP2 経路の関与について)、(2) IA-2 $\beta$  標的分子の同定、(3) グレリンによる IA-2 $\beta$  誘導機序の解明、などを行い、グレリンの肥満、糖尿病など生活習慣病における意義を明らかにする。

なお、当初の計画には含まれていなかったが、AMPK-UCP2 経路の関与が明らかとなり、UCP2 は酸化ストレスに対する防御機構にも関与しているため、(4)  $\beta$ 細胞におけるグレリンの酸化ストレスに対する保護効果について

も検討を行った。

### 3. 研究の方法

グレリンによるインスリン分泌抑制機序に関して(1) IA-2 $\beta$ 以外の因子の関与については AMPK-UCP2 経路を中心に解析する。具体的には MIN6 細胞を用い、グレリンによる AMPK 活性化や UCP2 発現亢進を検討する。さらに AMPK 活性化薬 AICAR の UCP2 発現、IA-2 $\beta$  発現、インスリン分泌への影響検討、UCP-2 過剰発現、siRNA による検討を行う。(2) IA-2 $\beta$  の標的の同定では、種々の IA-2 $\beta$  変異体 (リン酸化、ホスファターゼ活性、細胞内局在) や IA-2 $\beta$ ・IA-2 キメラの影響を検討する。また各種シグナル伝達系の関与についても検討する。(3) グレリンによる IA-2 $\beta$  発現調節機構に関しては IA-2 $\beta$  のプロモータ解析を行い、グレリン反応性部位を同定する。(4) グレリンによる酸化ストレス保護作用に関しては過酸化水素で処理した MIN6 細胞における増殖、アポトーシスに対するグレリンの効果を検討する。また、保護効果のシグナル伝達経路を各種刺激薬、阻害薬を用いて検討する。

### 4. 研究成果

(1) グレリンのインスリン分泌抑制機序の一つとして、グレリンが AMP キナーゼ-UCP2 経路を介してインスリン分泌細胞株 MIN6 細胞のインスリン分泌を抑制することを証明し、報告した (FEBS Letters 584:1503-1508, 2010)。  
(2) IA-2 $\beta$  の標的分子に関しては残念ながら十分な検討は行えなかった。  
(3) IA-2 $\beta$  のプロモーター領域の解析は 2.5kb までの範囲でグレリンによる発現誘導に関与する領域を同定できなかった。さらに広範囲

の領域の検討が必要である。

(4) 酸化ストレスに対する防御作用に関しては、グレリンは単独で MIN6 細胞の増殖能を亢進させ、過酸化水素による増殖能低下、アポトーシス増加に対して、グレリンは抑制効果を示した。これらの効果のシグナル伝達系に関しては当初の予想と異なり AMP キナーゼ-UCP2 経路の関与は否定的で、MAPK、PI3K 経路によるものと判明した。以上の検討よりグレリンはインスリン分泌に関しては抑制するものの膵 $\beta$ 細胞の増殖に関してはよい影響を与える可能性が示唆され、グレリンの糖尿病に対する影響についてはこれら両者のバランスを考慮する必要があると考えられる。今後は両者の作用機構を明らかにし、インスリン分泌抑制なしに、 $\beta$ 細胞増殖に関与する経路が明らかになれば、新たな糖尿病治療薬の開発につながるものと期待される。

### 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 1 件)

① Ying Wang, Masahiro Nishi, Asako Doi, Takeshi Shono, Yasushi Furukawa, Takeshi Shimada, Hiroto Furuta, Hideyuki Sasaki, Kishio Nanjo  
Ghrelin Inhibits Insulin Secretion through AMPK-UCP2 Pathway in  $\beta$  Cells  
FEBS Letters (査読有) 584:1503-1508, 2010.

[学会発表] (計 6 件)

① Masahiro Nishi, Wang Ying, Tatsuya Ishibashi, Asako Doi, Hiroto Furuta, Hideyuki Sasaki, Kishio Nanjo, Takashi Akamizu  
Ghrelin Protect Beta Cells From Oxidative Stress Via Both MAPK And PI3K Pathways.

American Diabetes Association' s 73rd Scientific Sessions, 2013年6月21-25日, Chicago, Illinois, USA

②西 理宏、王 穎、石橋達也、土井麻子、古田浩人、佐々木秀行、南條輝志男、赤水尚史

グレリンは酸化ストレスによる $\beta$ 細胞障害を防止する

第56回日本糖尿病学会年次学術集会 2013年5月16-18日 熊本

③ Masahiro Nishi, Ying Wang, Tatsuya Ishibashi, Asako Doi, Hiroto Furuta, Hideyuki Sasaki, Kishio Nanjo, Takashi Akamizu

The Effects of Ghrelin on Beta Cells -Inhibitor of Insulin Secretion or Lifesaver from Oxidative Stress-

$\beta$  Cell Workshop 2013 2013年4月23-26日 Kyoto, Japan

④ Masahiro Nishi, Ying Wang, Tatsuya Ishibashi, Asako Doi, Hiroto Furuta, Hideyuki Sasaki, Kishio Nanjo, Takashi Akamizu

Ghrelin Restores Decreased Cell Viability of Beta Cell Line by Oxidative Stress

9<sup>th</sup> International Diabetes Federation-Western Pacific Region Congress/4<sup>th</sup> Asian Association for Study of Diabetes 2012年11月24-27日 Kyoto, Japan

⑤ Masahiro Nishi, Ying Wang, Asako Doi, Hiroto Furuta, Hideyuki Sasaki, Kishio Nanjo, Takashi Akamizu

Ghrelin Inhibits Insulin Secretion via AMPK-UCP2 Pathway

International Symposium "Computational Physiology of Cardiac Myocytes and Pancreatic  $\beta$ -cells; Interaction between Energy Metabolism and Membrane

Excitability"

2011年1月30日 Kyoto, Japan

⑥ Ying Wang, Masahiro Nishi, Asako Doi, Takeshi Shono, Yasushi Furukawa, Takeshi Shimada, Hiroto Furuta, Hideyuki Sasaki, Kishio Nanjo

Ghrelin Activates AMPK-UCP2 Pathway and Inhibits Insulin Secretion in  $\beta$  Cells

American Diabetes Association' s 70th Scientific Sessions 2010年6月25-29日 Orland, USA

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西 理宏 (NISHI MASAHIRO)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90228148