

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590369

研究課題名(和文) GWASで得られた2型糖尿病感受性遺伝子のインスリン開口放出への関与

研究課題名(英文) Deletion of CDKAL1 affects first-phase glucose stimulated insulin exocytosis

研究代表者

今泉 美佳 (Ohara-Imaizumi, Mica)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：40201941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：CDKAL1遺伝子変異はインスリン分泌障害を介して2型糖尿病の一要因を成していると考えられるが、その分子機構は不明である。本研究ではCDKAL1欠損マウスにおけるグルコース応答性インスリン分泌機構を解析した。欠損細胞ではミトコンドリア機能低下によるATP生成低下により第1相インスリン開口放出が低下しており、CDKAL1遺伝子変異はインスリン分泌第1相を選択的に抑制することで2型糖尿病発症のリスクを高めていることが示唆された。また妊娠CDKAL1欠損マウスの解析によりCDKAL1遺伝子変異は妊娠期の代償性インスリン分泌亢進不全を起こすことで妊娠糖尿病発症のリスクも増大させる可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：A variant of the CDKAL1 gene was reported to be associated with type 2 diabetes. To determine the role of CDKAL1 in beta-cells, we studied insulin release profiles in CDKAL1 gene knockout (KO) mice. Total internal reflection fluorescence imaging of CDKAL1 KO beta-cells showed that the number of fusion events during first-phase insulin secretion was reduced with delayed and slow cytosolic Ca<sup>2+</sup> increase. The responsiveness of KATP channels to glucose was blunted in KO cells. Although CDKAL1 is homologous to CDK5RAP1, there was no difference in CDK5 activity between WT and KO islets. Thus, CDKAL1 controls first-phase insulin exocytosis in beta-cells by facilitating KATP channel responsiveness and subsequent Ca<sup>2+</sup> channels activity through pathways other than CDK5-mediated regulation. Defects in this process caused by decreased CDKAL1 expression levels may confer an increased risk of type 2 diabetes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：インスリン分泌 開口放出 糖尿病 GWAS CDKAL1

## 1. 研究開始当初の背景

近年の数千人以上の患者群と健常者群を用いたゲノムワイド関連解析 (GWAS, Genome-Wide Association Study) により、多数の2型糖尿病疾患感受性遺伝子の存在が明らかにされてきた。しかし、これらの遺伝子の2型糖尿病発症への関与のメカニズムは不明な点が多く、その解明に向けた研究が開始されている。

このGWASで得られた2型糖尿病疾患感受性遺伝子にはインスリン分泌障害との関連が示唆される遺伝子が多く見出されている。しかし、これらの遺伝子のほとんどが、それまでインスリン分泌との関連が推察されていないものであり、その機能さえも不明の遺伝子も多い。中でも *CDKAL1* はインスリン分泌関連2型糖尿病感受性遺伝子として、日本人だけでなく、他の民族でも再現性高く報告されている (Nat Genet (2007) 39, 770; Science (2007) 316, 1331; Science (2007) 316, 1336; Science (2007) 316, 1341; Diabetes (2008) 57, 791; Lancet (2010) 375, 408)。*CDKAL1* 遺伝子は、65-kDa の *CDKAL1* タンパクをエンコードしているが、*CDKAL1* タンパクの機能については全く報告がなされておらず、不明な点が多い。しかし、名前の由来である *CDK5* regulatory subunit-associated protein 1 (*CDK5RAP1*) と相同性が高く、*CDK5RAP1* が *CDK5* (cyclin-dependent kinase 5) 活性化タンパクである *p35* に結合し、*CDK5* の活性を阻害することから、*CDKAL1* も同様に *CDK5* の機能を調節していることが推察されてきた。

興味深いことに、*CDKAL1* リスクアリル保持者では2型糖尿病患者に特徴的なインスリン分泌第1相の低下が見られ、一方、インスリン分泌第2相およびインスリン感受性には相関が見られないことが報告されている (Diabetologia (2008) 51, 1659; J Clin Endocrinol Metab (2008) 93, 1924)。すな

わち *CDKAL1* リスクアリルは第1相インスリン分泌障害を介して、2型糖尿病のリスクを上げていると考えられるが、なぜこの遺伝子変異がインスリン第1相分泌低下を生じるのか、また *CDK5* の機能調節と関連があるのか、重要な研究課題となっている。

私達は *CDKAL1* に着目し、すでに *CDKAL1* ノックアウトマウス (国立国際医療センター・岡村室長 (本研究の連携研究者) との共同研究) を用いた解析に着手している (Ohara-Imaizumi et al. PLoS ONE (2010) 5, e15553)。現在までに、*CDKAL1* ノックアウトマウスから調製した細胞では第1相インスリン分泌が低下していることがわかっている。しかしながら、*CDKAL1* 欠損によるインスリン分泌低下の機序は依然不明であり、これを明らかにすることが本研究の目的である。

## 2. 研究の目的

本研究では *CDKAL1* の第1相インスリン分泌における役割の解明を目的とする。*CDKAL1* ノックアウトマウスの *in vivo* 解析、あるいはノックアウトマウスから調製した細胞を主に用いたインスリン分泌の徹底解析を行う。*CDKAL1* の発現低下および機能不全と第1相インスリン分泌低下の関連を明確にして、2型糖尿病発症の機序を明らかにする。

## 3. 研究の方法

*CDKAL1* ノックアウトマウスの *in vivo* 解析、あるいはノックアウトマウスから調製した細胞を主に用いて、2相性インスリン分泌の徹底解析 (インスリン分泌顆粒開口放出の TIRF 顕微鏡によるイメージング解析法、細胞内  $Ca^{2+}$  測定法、細胞及び膵島の perfusion 実験法、膵灌流実験法) を行い、第1相分泌のどの過程が障害を受けているかを明らかにし、第1相分泌における *CDKAL1* の機能を明確にする。次いで、生化学的、分子生物学、電気生理学的手法を用いて、*CDKAL1* の発現低

下および機能不全がどのようなメカニズムで第1相インスリン分泌低下を引き起こすのかを解明し、2型糖尿病発症の機序を考察する。

#### 4. 研究成果

(1) 野生型マウスから調製した膵細胞において *CDKAL1* は小胞体に局在していた。*CDKAL1* ノックアウト細胞にグルコース刺激を行った所、インスリン分泌第1相のみが低下し分泌第2相は野生型細胞と同程度であった。グルコース刺激に対する細胞内  $Ca^{2+}$  上昇はノックアウト細胞では大きく遅延しており、野生型細胞で見られる第1相分泌時の急峻な  $Ca^{2+}$  上昇は見られなかった。電気生理学実験の結果、ノックアウト細胞では Glucose 刺激に対する  $K_{ATP}$  チャンネルの応答の遅延および低下が観察された。ノックアウト細胞では Glucose 刺激による細胞内 ATP 生成が低下しており、その原因がミトコンドリア機能低下であることをミトコンドリア膜電位応答蛍光測定により明らかにした。一方 *CDK5* 活性は野生型とノックアウト細胞両者に違いがなく、*CDKAL1* 欠損によるインスリン分泌低下には *CDK5* が関与していないことがわかった。以上の結果より、*CDKAL1* 欠損はミトコンドリア機能低下による ATP 生成低下を引き起し、 $K_{ATP}$  チャンネルの応答性低下、それに伴う細胞内  $Ca^{2+}$  上昇の遅延により、第1相インスリン分泌を障害することを明らかにした。

(2) *CDKAL1* は2型糖尿病感受性遺伝子として知られているが、*CDKAL1* リスクアレルは妊娠糖尿病とも関連があることが最近報告されている (Kwak et al. *Diabetes* 61, 2012; Lauenborg et al. *J Clin Endocrinol Metab.* 94, 2009)。しかし *CDKAL1* の機能欠損による妊娠糖尿病発症のメカニズムは明らかではない。妊娠期では母体は著しいインスリン抵抗性を示すようになり、これを代償するため

に膵細胞からのインスリン分泌が著明に増大することが知られている。この代償性インスリン分泌亢進が不十分な場合、血糖値が上昇し、妊娠糖尿病の原因となると考えられている。そこで *CDKAL1* 発現低下と妊娠糖尿病との関連を明らかにするために、まず野生型マウスを用いて妊娠期のインスリン分泌亢進機構を調べ、次いで、*CDKAL1* ノックアウトマウスを用いて、*CDKAL1* 発現低下時の妊娠期インスリン分泌亢進への影響を検討した。野生型妊娠マウスの膵灌流実験では、グルコース応答性インスリン分泌が非妊娠マウスに比べて約3倍増加していた。膵島の単離実験では、妊娠期では非妊娠期に比べて細胞容積が増大しており、またグルコース刺激応答性インスリン分泌能(% release)も増大していた。すなわち、妊娠期に見られる代償性のグルコース応答性インスリン分泌亢進は細胞量増大と細胞インスリン分泌能増大の2つの要因によることがわかった。一方、妊娠 *CDKAL1* ノックアウトマウス膵灌流実験では野生型妊娠マウスに観察されるグルコース応答性インスリン分泌の増大が見られなかった。妊娠ノックアウト細胞では妊娠野生型細胞に比べて細胞内インスリン量の低下およびグルコース刺激時の ATP 生成と  $Ca^{2+}$  上昇の減少によるインスリン分泌能の低下が認められた。以上の結果は *CDKAL1* 遺伝子変異が2型糖尿病発症のリスクだけでなく、妊娠期の代償性インスリン分泌亢進不全を起こすことで妊娠糖尿病発症のリスクをも増大させる可能性を示唆している。

#### 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 6件)

Ohara-Imaizumi, M., Kim, H., Yoshida, M., Fujiwara, T., Aoyagi, K., Toyofuku, Y., Nakamichi, Y.,

Nishiwaki, C., Okamura, T., Uchida, T., Fujitani, Y., Akagawa, K., Kakei, M., Watada, H., German, M.S., and Nagamatsu, S. (2013) Serotonin regulates glucose stimulated insulin secretion from pancreatic cells during pregnancy. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 110, 19420-19425 (査読有) (DOI: 10.1073/pnas.1310953110)

Tamaki, M., Fujitani, Y, Uchida, T., Tamura, Y., Takeno, K., Kawaguchi, M., Watanabe, T., Hara, A., Ogiwara, T., Shimizu, T., Mita, T., Hirose, T., Ohara-Imaizumi, M., Abe, T., Kiyonari, H., Hojyo, S., Fukada, T., Nagamatsu, S., Hirano, T., Kawamori, R., Watada, H. (2013) The diabetes-susceptible gene SLC30A8/ZnT8 regulates hepatic insulin clearance. **JCI in Invest.** 123, 4513-4524 (査読有) (DOI:10.1172/JCI68807)

Aoyagi, K., Ohara-Imaizumi, M., Nishiwaki, C., Nakamichi, Y., Ueki, K., Kadowaki, T. and Nagamatsu, S. (2012) Acute inhibition of PI3K-PDK1-Akt pathway potentiates insulin secretion through upregulation of newcomer granule fusions in pancreatic beta-cells. **PLoS One.** 7, e47381 (査読有) (DOI: 10.1371/journal.pone.0047381)

Sasakawa, N., Ohara-Imaizumi, M., Fukuda, M., Kabayama, H., Mikoshiba, K. and Kumakura, K. (2011) Dissociation of inositol polyphosphates from the C2B domain of synaptotagmin facilitates spontaneous release of catecholamines in adrenal chromaffin cells. A suggestive evidence of a

fusion clamp by synaptotagmin. **Neuropharmacology.** 60, 1364-1370 (査読有)(DOI: 10.1016/j.neuropharm.2011.03.005)

Nagamatsu, S., Ohara-Imaizumi, M., Nakamichi, Y., Aoyagi, K. and Nishiwaki, C. (2011) DPP-4 inhibitor des-F-sitagliptin treatment increased insulin exocytosis from db/db mice beta cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 412, 556-560 (査読有) (DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.07.119)

Aoyagi, K., Ohara-Imaizumi, M. and Nagamatsu, S. (2011) Regulation of resident and newcomer insulin granules by calcium and SNARE proteins. **Front Biosci.** 16, 1197-1210 (査読有) (<http://www.bioscience.org/2011/V16/af/3784/fulltext.htm>)

〔学会発表〕(計 20件)

青柳 共太, 今泉 美佳, Mei Zhen, 永松 信哉. 膵細胞からのインスリン分泌におけるNALCN/mNLF-1の役割 文部科学省 科学研究費補助金「新学術領域研究」細胞内ロジスティクス・シンポジウム 兵庫 (2013.9.17-18)

青柳 共太, 今泉 美佳, Mei Zhen, 永松 信哉. 膵細胞からのインスリン分泌におけるNALCN/mNLF-1の役割 第86回日本生化学会大会 横浜 (2013.9.11-13)

Ohara-Imaizumi M, Kim H, Yoshida M, Fujiwara T, Aoyagi K, Toyofuku Y, Nakamichi Y, Nishiwaki C, Okamura T, Uchida T, Fujitani Y, Akagawa K, Kakei M, Watada H, German MS and Nagamatsu S. Serotonin regulates glucose

stimulated insulin secretion from pancreatic cells during pregnancy. 73<sup>th</sup> Scientific Session of American Diabetes Association, Chicago, USA, June 21-25, 2013

今泉美佳 ホルモン開口分泌の分子イメージング (教育講演) 第86回日本内分泌学会学術総会 仙台 (2013.4.25-27)

Ohara-Imaizumi M, Kim H, Yoshida M, Fujiwara T, Aoyagi K, Toyofuku Y, Nakamichi Y, Nishiwaki C, Okamura T, Uchida T, Fujitani Y, Akagawa K, Kakei M, Watada H, German MS and Nagamatsu S. Serotonin regulates glucose stimulated insulin secretion from pancreatic cells during pregnancy. Beta Cell Workshop 2013 京都. (2013.4.23-26)

Aoyagi K, Ohara-Imaizumi M, Nagamatsu S. Acute inhibition of PI3K-PDK1-Akt pathway potentiates glucose-induced insulin secretion through myosinVa pathway in pancreatic beta cells. Beta Cell Workshop 2013 京都. (2013.4.23-26)

今泉美佳, 吉田昌史, 青柳共太, 豊福優希子, 綿田裕孝, 加計正文, 永松信哉. 5-HT receptor 3a signaling regulates insulin release from pancreatic beta cells during pregnancy. 第90回日本生理学会大会シンポジウム. 東京 (2013.3.27-29).

青柳共太, 今泉美佳, 西脇知世乃, 中道洋子, 永松信哉. Acute inhibition of PI3K-PDK1-Akt pathway potentiates glucose-induced insulin secretion through MyosinVa in pancreatic beta-cells 第85回日本生化学会大会. 博多. (2012.12.14-16)

今泉美佳, 青柳共太, 永松信哉. 妊娠期膵細胞でのセロトニンによるインスリン分泌亢進機構. 第14回 応用薬理シンポジウム. 甲府. (2012. 9.3-4)  
Ohara-Imaizumi M. Serotonin signaling regulates insulin release from pancreatic beta cells during pregnancy. 第6回 Diabetes Leading-edge Conference. 千葉. (2012.8.11-12)

今泉美佳, 青柳共太, 永松信哉 糖尿病原因究明のためのイメージングによるインスリン開口放出機構解明 文部科学省 科学研究費補助金「新学術領域研究」第4回「細胞内ロジスティクス」班会議 仙台、宮城 (2012.6.13-15)  
青柳共太, 今泉美佳, 永松信哉 第2相インスリン分泌制御における PI3K-PDK1-Akt 経路の役割の検討 文部科学省 科学研究費補助金「新学術領域研究」第4回「細胞内ロジスティクス」班会議 仙台、宮城 (2012.6.13-15)

今泉美佳, 吉田昌史, 豊福優希子, 青柳共太, 中道洋子, 西脇知世乃, 加計正文, 綿田裕孝, 永松信哉. 妊娠期膵細胞でのセロトニンによるインスリン分泌亢進機構. 第54回日本糖尿病学会年次学術集会. 横浜. (2012. 5.17-19)

青柳共太, 今泉美佳, 西脇知世乃, 中道洋子, 永松信哉. 第2相インスリン分泌制御における PI3K-PDK1-Akt 経路の役割の検討. 第54回日本糖尿病学会年次学術集会. 横浜. (2012. 5.17-19)

Ohara-Imaizumi M, Aoyagi K, Yoshida M, Kakei M and Nagamatsu S: Serotonin signaling regulates insulin secretion from pancreatic beta cells

during pregnancy (Invited lecture)  
Exocytosis in endocrine cells  
-linking experiments and theory  
Lund University Diabetes Centre,  
Malmö, Sweden April 26-27, 2012

今泉美佳 上智大学理工学研究科生物  
科学領域記念シンポジウム「シナプス  
伝達機構の理解」 膵 細胞からのイン  
スリン開口放出の可視化解析(2012.  
3.10)

青柳共太、今泉美佳、永松信哉 : 第2  
相インスリン分泌制御における PI-3  
kinase と PDK1-Akt 経路の役割の検討  
第16回東京インスリン分泌研究会, 東  
京, 2012.2.23).

Aoyagi K, Ohara-Imaizumi M,  
Nishiwaki C, Nakamichi Y, Nagamatsu S.  
Acute inhibition of PI3K-PDK1-Akt  
pathway potentiates glucose-induced  
insulin secretion in pancreatic  
b-cells. 第84回日本生化学会. 京都.  
(2011.9.21-24).

今泉美佳, 青柳共太, 永松信哉 : 糖尿  
病原因究明のためのイメージングによ  
るインスリン開口放出機構解明. 文部  
科学省 科学研究費補助金「新学術領域  
研究」第3回 細胞内ロジスティクス班  
会議, 鳥羽, (2011.6.1-3).

今泉美佳, 青柳共太, 吉田昌史, 斎藤  
太郎, 岡村匡史, 竹中均, 中道洋子,  
西脇知世乃, 久永真市, 加計正文, 永  
松信哉. CDKAL1 の第1相インスリン分  
泌における役割. 第54回日本糖尿病学  
会年次学術集会. 札幌.  
(2011.5.19-21).

〔図書〕(計 1件)

Ohara-Imaizumi M, Aoyagi K, Nagamatsu  
S. Imaging of insulin exocytosis from  
pancreatic beta cells. Exocytosis

Methods. Neuromethods 83. Springer  
Protocols. Thorn P. (ed.) Humana  
Press. pp55-74 (2013)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/user/medicine/insulin/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今泉 美佳 (OHARA-IMAIZUMI, Mica)  
杏林大学・医学部・教授  
研究者番号: 40201941

(2) 連携研究者

青柳 共太 (AOYAGI, Kyota)  
杏林大学・医学部・助教  
研究者番号: 50453527

永松 信哉 (NAGAMATSU, Shinya)  
杏林大学・医学部・教授  
研究者番号: 80231489

岡村 匡史 (OKAMURA, Tadashi)  
独立行政法人 国立国際医療センター・研  
究所・室長  
研究者番号: 00333790