

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591340

研究課題名(和文) インクレチンホルモンによる神経性・液性膵 細胞インスリン分泌調節に関する研究

研究課題名(英文) A study of neuronal and hormonal mediations of insulin secretion by incretins.

研究代表者

加計 正文 (Takei, Masafumi)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：90214270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではインクレチンホルモンによるインスリン分泌刺激の機序を明らかにした。インクレチンホルモンであるGLP-1やGIPは膵細胞のTRPM2チャネル(transient receptor potential channel)を活性化させた。TRPM2の活性化は膜を興奮させることでブドウ糖によるインスリン分泌の感受性を高めていることが明らかになった。今後のTRPM2チャネルを標的とした創薬が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we clarified the mechanistic pathway for stimulation of insulin secretion by incretins that include GLP-1 and GIP. These hormones open TRPM2 channel (transient receptor potential channel) that is a class of background current channel and its openings evoke increase in membrane excitability of pancreatic beta cells and consequently potentiate insulin secretion induced by glucose. We are expecting a novel antidiabetic drug development as a target site against this channel protein.

研究分野：endocrinology and metabolism

キーワード：insulin secretion incretin diabetes membrane potential

1. 研究開始当初の背景

膵β細胞は食事摂取に応じて繊細なインスリンを分泌し血糖調節を行うことで生体エネルギー代謝を制御している。β細胞のイオンチャンネルには ATP 感受性 K⁺チャンネル (KATP チャンネル) と電位依存性 K⁺チャンネル (Kv チャンネル)、電位依存性 Ca²⁺チャンネルがある (Rorsman, et al. J Physiol. 374.531-50.'86)。最近糖尿病の治療薬としてインクレチン関連薬が臨床使用されているが、インクレチンホルモンである GLP-1 (glucagon-like peptide 1) や GIP (glucose dependent insulinotropic polypeptide) のインスリン分泌増強の機序は不明である。

2. 研究の目的

本研究ではインクレチンホルモンのβ細胞における作用機序を明らかにする。KATP チャンネル依存性経路はグルコース刺激インスリン分泌機序の基軸となる経路で、細胞外グルコース濃度の上昇によるβ細胞内糖代謝の亢進による細胞質 ATP/ADP 比の上昇が細胞膜の KATP チャンネルを閉鎖することで代謝情報が電気情報へと変換される。KATP の閉鎖は膜の脱分極を来し、電位依存性 Ca²⁺チャンネル (VDCC) を活性化する。その結果活動電位が発生する。活動電位は VDCC と Kv チャンネルの両者の調和ある活動により生じ (Ashcroft. Biochem Soc Trans. 34.243-6.'06)、細胞外 Ca²⁺の細胞内への流入により細胞質 Ca²⁺濃度上昇と、インスリン顆粒の開口放出が誘発される。この経路を KATP チャンネル依存性 (惹起) 経路と呼んでいる。一方、KATP チャンネル非依存性 (増幅) 経路の存在も指摘されているが、これはグルコース代謝により活性化される未知の物質 (ATP, cAMP や PKC などがいわれている) がインスリン顆粒を動員 (膜へのドッキング) し時間とともに増大するインスリン分泌経路をさす。GLP-1 等のインクレ

チンホルモンは cAMP 産生を介してこの経路に作用しインスリン分泌をさらに増強すると考えられているが、その詳細な機序並びに GLP-1 のイオンチャンネルへの作用は十分明らかではない。我々はこれまで Kv チャンネル活動に注目して研究をし、新規 Kv チャンネル調節経路としてグルコース代謝が Kv チャンネルを調節することを報告した (Yoshida, kakei, et al. FEBS Lett. 583.2225-30.'09, Yoshida, Kakei, et al. Biochem Biophys Res Commun. 396.304-309.'10)。Kv チャンネルは脱リン酸化でチャンネル活性が増加することが明らかになった。その脱リン酸化は細胞内 Ca²⁺濃度依存性であった。インクレチンホルモンは cAMP を増加させることが知られているので、cAMP/PKA 依存性にチャンネル蛋白が再リン酸化されるとすれば、チャンネル活性が低下しインスリン分泌の増加が考えられる。我々は過去に摂食促進物質で主に胃から分泌されるグレリンが細胞の Kv チャンネルを増強してインスリン分泌を抑制する作用を報告した (Dezaki, Kakei, et al. Diabetes. 56.2319-27.'07, Dezaki, Kakei, et al. Diabetes. 60.2315-24.'11)。グレリン作用は細胞内 cAMP 濃度抑制による機序を介して Kv チャンネル活動を増強させることも明らかにした。これらの結果は上記インクレチンホルモンによる Kv チャンネル抑制と矛盾しない結果である。従って Kv チャンネル活性化にチャンネル脱リン酸化が関連し、さらに cAMP/PKA 系により再リン酸化される機序でインクレチンホルモンが作用している可能性が推定される。また、インクレチンホルモンの VDCC や KATP チャンネルへの作用も明らかではないことからこれらの作用についても明白な評価を得る検討が必要で、これらのチャンネルへの作用も検討する。一方、最近 Trpm チャンネルが GLP-1 作用の標的である可能性を示唆する報告がされたが

(Uchida, et al. Diabetes. 60.119-126.'11, MacDonald. Diabetes. 60.28-9.'11)、まだチャネルレベルでの報告はない。本研究は Trpm チャネルについての検討も行う予定である。

3. 研究の方法

具体的手技としては (a)イオンチャネル電流測定(b)インスリン分泌測定(c)細胞内 Ca^{2+} 濃度とイオンチャネル電流の同時測定 (d)イオンチャネル発現系での実験を用いる。細胞はラット膵細胞と、ラット迷走神経節細胞を用いる。方法：チャネル活動応答 (パッチクランプ法), 並びに細胞内 Ca^{2+} 濃度反応 (蛍光強度測定) を適宜リアルタイムで同時測定することによりイオンチャネル(Nakazaki, Kakei, et al. Diabetes. 44.878-83.'95), 細胞内 Ca^{2+} 応答(Kakei, et al. Auton Neurosci. 102.39-44.'02)のダイナミックな調節機構を明らかにする。さらにインスリン分泌とイオンチャネル、細胞内 Ca^{2+} 応答のシグナリング機構の関連性を検討する。Kv チャネル、Trpm 電流の代謝性・リン酸化による作用の検討も行う。研究材料はラットあるいはマウスの膵β細胞を用いる。

4. 研究成果

本研究で明らかになったこととしては:(1)インクレチンホルモンが細胞の上記のイオンチャネルには影響を及ぼさないことが判明した。(2)一方で、TRP チャネル (transient receptor potential) をインクレチンが活性化することが分かった。このチャネルは背景電流の1種であった。細胞の膜電位はATP感受性K⁺チャネルと背景電流の量のバランスで決定される。TRP チャネルの活性化は背景電流として増加し、膜電位の脱分極をもたらすことから、グルコース刺激持の脱分極応答を増強させる。また、この作用機序としてはインクレチンホルモンの受容体への結合は細胞内 cAMP を産生し、その下流のEPAC2を介してTRPチャネルを刺激するこ

とが分かった。この新しい機序はこれまでの細胞とインクレチンホルモンの機序において、新規的である。さらにTRPチャネルへの作用濃度はピコモラーレベルで活性化することも明らかとなり、生理的濃度で作用することが判明した。TRPチャネルはその通すイオン種は非選択的である。Na, Ca, Kイオンなどがその透過イオン種である。このチャネルを活性化する作用をGIPも有することも分かった。以上の成果は2014年Diabetes誌に発表した。

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22件)

1. Yamada, H., T. Saito, A. Aoki, T. Asano, M. Yoshida, A. Ikoma, I. Kusaka, H. Toyoshima, M. Kakei, and S.E. Ishikawa, Circulating betatrophin is elevated in patients with type 1 and type 2 diabetes. Endocr J. 2015
2. Tsujimoto, T., R. Yamamoto-Honda, H. Kajio, M. Kishimoto, H. Noto, R. Hachiya, A. Kimura, M. Kakei, and M. Noda, Prediction of 90-day mortality in patients without diabetes by severe hypoglycemia: blood glucose level as a novel marker of severity of underlying disease. Acta Diabetol. 52(2): 307-14. 2015
3. Tsujimoto, T., R. Yamamoto-Honda, H. Kajio, M. Kishimoto, H. Noto, R. Hachiya, A. Kimura, M. Kakei, and M. Noda, High risk of abnormal QT prolongation in the early morning in diabetic and non-diabetic patients with severe hypoglycemia. Ann Med: 1-7. 2015
4. Sukma Rita, R., K. Dezaki, T. Kurashina, M. Kakei, and T. Yada, Partial Blockade of Kv2.1 Channel Potentiates GLP-1's Insulinotropic

- Effects in Islets and Reduces Its Dose Required for Improving Glucose Tolerance in Type 2 Diabetic Male Mice. *Endocrinology*. 1(1): 114-23. 2015
5. Iwasaki, Y., Y. Maejima, S. Suyama, M. Yoshida, T. Arai, K. Katsurada, P. Kumari, H. Nakabayashi, M. Kakei, and T. Yada, Peripheral oxytocin activates vagal afferent neurons to suppress feeding in normal and leptin-resistant mice: a route for ameliorating hyperphagia and obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 308(5): R360-9. 2015
6. Ito, K., S. Ookawara, Y. Ueda, S. Goto, H. Miyazawa, H. Yamada, T. Kitano, M. Shindo, Y. Kaku, K. Hirai, M. Yoshida, T. Hoshino, A. Nabata, H. Mori, I. Yoshida, M. Kakei, and K. Tabei, Factors affecting cerebral oxygenation in hemodialysis patients: cerebral oxygenation associates with pH, hemodialysis duration, serum albumin concentration, and diabetes mellitus. *PLoS One*. 10(2): e0117474. 2015
7. Ishikawa, M., M. Kato, H. Sasaki, T. Morii, H. Fujita, M. Kakei, T. Narita, and Y. Yamada, Poorly-controlled Acromegaly Accompanied by Subclinical Adrenal Cushing's Syndrome after Surgery for Multiple Endocrine Tumors. *Intern Med*. 54(6): 617-20. 2015
8. Hamasaki, H., H. Yanai, M. Kakei, M. Noda, and O. Ezaki, The association between daily physical activity and plasma B-type natriuretic peptide in patients with glucose intolerance: a cross-sectional study. *BMJ Open*. 5(1): e006276. 2015
9. Ayush, E.A., Y. Iwasaki, S. Iwamoto, H. Nakabayashi, M. Kakei, and T. Yada, Glucagon directly interacts with vagal afferent nodose ganglion neurons to induce Ca(2+) signaling via glucagon receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 456(3): 727-32. 2015
10. Yosida, M., K. Dezaki, K. Uchida, S. Kodera, N.V. Lam, K. Ito, R.S. Rita, H. Yamada, K. Shimomura, S.E. Ishikawa, H. Sugawara, M. Kawakami, M. Tominaga, T. Yada, and M. Kakei, Involvement of cAMP/EPAC/TRPM2 activation in glucose- and incretin-induced insulin secretion. *Diabetes*. 63(10): 3394-403. 2014
11. Yamashita, T., M. Yoshida, H. Yamada, T. Asano, A. Aoki, A. Ikoma, I. Kusaka, M. Kakei, and S.E. Ishikawa, Prompt efficacy of tolvaptan in treating hyponatremia of syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone (SIADH) closely associated with rupture of a gastric artery aneurysm. *Intern Med*. 53(8): 845-9. 2014
12. Yamada, H., M. Yoshida, F. Takayuki, M. Kakei, and S.E. Ishikawa, Case of fulminant type 1 diabetes with coronary microcirculatory dysfunction. *J Diabetes Investig*. 5(6): 748-9. 2014
13. Yamada, H., T. Asano, A. Aoki, A. Ikoma, M. Yoshida, I. Kusaka, M. Kawakami, M. Kakei, and S.E. Ishikawa, Combination therapy of angiotensin II receptor blocker and thiazide produces severe hyponatremia in elderly hypertensive subjects. *Intern Med*. 53(7): 749-52. 2014
14. Yada, T., B. Damdindorj, R.S. Rita, T. Kurashina, A. Ando, M. Taguchi, M.

- Koizumi, H. Sone, M. Nakata, M. Kakei, and K. Dezaki, Ghrelin signalling in beta-cells regulates insulin secretion and blood glucose. *Diabetes Obes Metab.* 16 Suppl 1: 111-7. 2014
15. Tsujimoto, T., R. Yamamoto-Honda, H. Kajio, M. Kishimoto, H. Noto, R. Hachiya, A. Kimura, M. Kakei, and M. Noda, Vital signs, QT prolongation, and newly diagnosed cardiovascular disease during severe hypoglycemia in type 1 and type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 37(1): 217-25. 2014
16. Tsujimoto, T., R. Yamamoto-Honda, H. Kajio, M. Kishimoto, H. Noto, R. Hachiya, A. Kimura, M. Kakei, and M. Noda, Prediction of 90-day mortality in patients without diabetes by severe hypoglycemia: blood glucose level as a novel marker of severity of underlying disease. *Acta Diabetol.* 2014
17. Tsujimoto, T., R. Yamamoto-Honda, H. Kajio, M. Kishimoto, H. Noto, R. Hachiya, A. Kimura, M. Kakei, and M. Noda, Seasonal variations of severe hypoglycemia in patients with type 1 diabetes mellitus, type 2 diabetes mellitus, and non-diabetes mellitus: clinical analysis of 578 hypoglycemia cases. *Medicine (Baltimore).* 93(23): e148. 2014
18. Manaka, K., M. Nakata, K. Shimomura, R.S. Rita, Y. Maejima, M. Yoshida, K. Dezaki, M. Kakei, and T. Yada, Chronic exposure to valproic acid promotes insulin release, reduces KATP channel current and does not affect Ca (2+) signaling in mouse islets. *J Physiol Sci.* 64(1): 77-83. 2014
19. Iwasaki, Y., Y. Maejima, S. Suyama, M. Yoshida, T. Arai, K. Katsurada, P. Kumari, H. Nakabayashi, M. Kakei, and T. Yada, Peripheral oxytocin activates vagal afferent neurons to suppress feeding in normal and leptin-resistant mice: A route for ameliorating hyperphagia and obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol: ajpregu* 00344 2014. 2014
20. Ihana, N., T. Tsujimoto, R. Yamamoto-Honda, M. Kishimoto, H. Kajio, H. Noto, M. Kakei, and M. Noda, Improvement of both fasting and postprandial glyceic control by the two-step addition of miglitol and mitoglinide to basal insulin therapy: a pilot study. *Diabetol Metab Syndr.* 6: 48. 2014
21. Hamasaki, H., H. Yanai, M. Kakei, M. Noda, and O. Ezaki, The validity of the non-exercise activity thermogenesis questionnaire evaluated by objectively measured daily physical activity by the triaxial accelerometer. *BMC Sports Sci Med Rehabil.* 6: 27. 2014
22. Fujiwara, T., M. Yoshida, T. Nakamura, K. Sakakura, H. Wada, K. Arao, T. Katayama, H. Funayama, Y. Sugawara, T. Mitsushashi, M. Kakei, S.I. Momomura, and J. Ako, Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors are associated with improved left ventricular diastolic function after acute myocardial infarction in diabetic patients. *Heart Vessels.* 2014
- 〔学会発表〕(計7件)
1. Boldbaatar Damdindorj , 出崎克也 , 倉科智行 , Rauza Rita , 加計正文 , 矢田俊彦 : Ghrelin counteracts the

insulinotropic action of GLP-1 by attenuating cAMP production and Ca²⁺ signaling in islet β-cells. 第85回日本内分泌学会学術総会, 2012. 4.19-21, 名古屋

2. 出崎克也, Boldbaatar Damdindorj, 加計正文, 矢田俊彦: グレリンの膵β細胞インスリン分泌抑制作用におけるcAMPシグナルの関与. 第33回日本肥満学会, 2012. 10.11-12, 京都

3. 岩崎有作, 加計正文, 中林 肇, 小平(平野)美里, 前島裕子, 矢田俊彦: 膵ポリペプチドとペプチドYY3-36の求心性迷走神経への直接作用. 第33回日本肥満学会, 2012. 10.11-12, 京都

4. 出崎克也, Damdindorj Boldbaatar, 倉科智行, 加計正文, 矢田俊彦: グレリンによるβ細胞cAMPシグナルを介したグルコース誘発インスリン分泌抑制. 第55回日本糖尿病学会年次学術集会, 2012. 5.17-19, 横浜

5. 吉田昌史, 中田正範, 大和志保, 出崎克也, 石川三衛, 川上正舒, 矢田俊彦, 加計正文: 膵β細胞グルコース刺激活動電位形成時のCa²⁺依存性Kv2.1チャンネルの役割. 第55回日本糖尿病学会年次学術集会, 2012. 5.17-19, 横浜

6. 吉田昌史, 大和志保, 中田正範, 出崎克也, 石川三衛, 矢田俊彦, 川上正舒, 加計正文: 膵β細胞グルコース刺激時のCa依存性Kv2.1チャンネルによる分泌調節. 第12回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会, さいたま市, 2012年3月23-24日.

7. 吉田昌史, 大和志保, 出崎克也, 中田正範, 山田穂高, 石川三衛, 矢田俊彦, 川上正舒, 加計正文: 膵細胞における新規 GLP-1 メカニズムとしての Trpm2 チャンネル 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 2013 年 5 月 16-18 日 熊本市 / 糖尿病 56(Suppl.): S113, 2013

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
加計正文 (KAKEI, Masafumi)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90214270

(2)研究分担者 ()

研究者番号:

(3)連携研究者 ()

研究者番号: