

平成30年6月16日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460396

研究課題名(和文) 妊娠期膵細胞におけるインスリン分泌能亢進機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of increased glucose-stimulated insulin secretion during pregnancy

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠期母体ではインスリン抵抗性が引き起され、その代償として膵細胞からのインスリン分泌能が増大するが、そのメカニズムの解明は妊娠糖尿病の病因究明のためにも重要な研究課題となっている。本研究ではノックアウトマウスを用いて1)妊娠期で分泌増加するATPがP2X7受容体を介してインスリン分泌能を亢進させること、また2)リスクアレルが妊娠糖尿病と関連があることが示唆されているCDKAL1の膵細胞での発現低下が妊娠期でのインスリン分泌能亢進不全を引き起こす機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In preparation for the metabolic demands of pregnancy, cells in the maternal pancreatic islets increase both in number and in glucose-stimulated insulin secretion per cell. Mechanisms have been proposed for the increased cell mass, but not for the increased glucose-stimulated insulin secretion. Here we show using knockout mice for P2X7-purinoreceptor and CDKAL1, a type 2 diabetes susceptibility gene that (i) ATP, acting in a paracrine/autocrine manner through P2X7 plays an essential role in the increased glucose-stimulated insulin secretion of pregnancy; (ii) the decreased expression of CDKAL1 is associated with reduced glucose-stimulated insulin secretion during pregnancy.

研究分野：細胞生物学

キーワード：インスリン分泌 膵細胞 妊娠糖尿病

1. 研究開始当初の背景

妊娠期の母体では、胎児へのエネルギー源となるグルコースを供給するために、血糖降下ホルモンであるインスリンが効きにくくなる、いわゆるインスリン抵抗性が引き起こされる。しかし母体では血糖値を正常に保つために多量のインスリンを膵細胞から分泌することでインスリン抵抗性を代償している。インスリンが十分に分泌されないとは妊娠糖尿病の原因となり (Buchanan & Xiang (2005) J Clin Invest) 妊娠糖尿病患者が急増している現代において、妊娠期の代償性インスリン分泌亢進機構の解明は重要な研究課題である。

代償性インスリン分泌亢進には膵細胞量増加と共に個々の細胞からのインスリン分泌能亢進が重要な役割を果たすと考えられている (Sorenson & Brelje (1997) Hormone and metabolic research)。細胞量増加機構については研究が先行している一方、細胞からのインスリン分泌能亢進のメカニズムは未だ不明な点が多い。最近、私達は妊娠期膵細胞からのインスリン分泌能亢進の調節機構として、妊娠期に限って

細胞で急激に合成、分泌されるセロトニンが (Kim et al. (2010) Nature Medicine)、autocrine-paracrine 作用によりセロトニン受容体である Htr3a を介してインスリン分泌能を亢進させるメカニズムを妊娠 Htr3a ノックアウトマウスを用いて明らかにした (Ohara-Imaizumi et al. (2013) Proc Natl Acad Sci U S A. 110)。しかしながら、Htr3a をノックアウトしても妊娠期膵細胞からのインスリン分泌の低下は部分的であり、妊娠期インスリン分泌能亢進調節機構には Htr3a 以外のシグナル経路の存在も示唆された。

今回、妊娠期膵細胞からのインスリン分泌能亢進の新たなシグナル経路として、ATP 受容体シグナルに着目した。ATP は膵細胞

内のインスリン顆粒に貯蔵されており、グルコース刺激に応じてインスリンと共に開口分泌されることが知られている。膵細胞膜には ATP 受容体である各種 P2 受容体が局在しており、分泌された ATP の autocrine-paracrine による P2 受容体活性化を介したインスリン分泌調節が示唆されているが、未だ不明な点が多い (Burnstock and Novak (2012) J Endocrinol)。私達は各種 P2 受容体のアンタゴニストを用いた予備実験により、P2X7 受容体阻害剤が妊娠期インスリン分泌能亢進を有意に抑制することを見出した。そこで、本研究では妊娠 P2X7 ノックアウトマウスを用いてインスリン分泌能亢進の分子機構を検討した。

また、2 型糖尿病疾患感受性遺伝子である CDKAL1 は最近、妊娠糖尿病発症にも有意に関連していることが報告されている (Kwaket al. (2012) Diabetes; Zhang et al. (2013) Hum Reprod Update)。私達は既に 2 型糖尿病疾患感受性遺伝子である CDKAL1 のノックアウトマウスを用いて、CDKAL1 発現低下がグルコース応答性インスリン分泌不全を引き起こすことを明らかにしており (Ohara-Imaizumi et al. (2010) PLoS One)、さらに、このマウスでは妊娠期の代償性インスリン分泌亢進不全が引き起こされることを見出している。本研究ではその CDKAL1 発現低下による代償性インスリン分泌亢進不全のメカニズムを解明する目的で研究を進めた。

2. 研究の目的

妊娠期膵細胞からのインスリン分泌能亢進機構の新たなシグナル経路として P2X7 受容体シグナルの役割を明らかにする。また、2 型糖尿病感受性遺伝子である CDKAL1 発現低下が妊娠期の代償性インスリン分泌亢進不全を引き起こすメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1)妊娠期における P2X7 受容体シグナルによるインスリン分泌能亢進機構を解明するため、妊娠 P2X7 受容体の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単離膵島および分散培養膵細胞、また P2X7 受容体に選択的なアゴニスト、アンタゴニスト処理を行った膵島、細胞を用いてグルコース刺激依存的なインスリン分泌、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化、細胞外 ATP 放出、インスリン分泌のイメージング解析、組織化学的解析を行った。

(2)CDKAL1 発現低下が妊娠期の代償性インスリン分泌亢進不全を引き起こす機構を解明するため、妊娠 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単離膵島および分散培養膵細胞を用いてグルコース刺激依存的なインスリン分泌、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化、細胞内 ATP 産生、小胞体ストレス応答、組織化学的解析を行った。

4. 研究成果

(1)妊娠期における P2X7 受容体シグナルによるインスリン分泌能亢進機構

妊娠期 細胞でのインスリン分泌亢進に P2 受容体シグナルが関与しているかどうかを明らかにするため、非妊娠期と妊娠期（妊娠 14-16 日目）マウスから単離した膵島および分散培養膵細胞を用いて各種 P2 受容体の発現、及び阻害薬のグルコース応答性インスリン分泌への効果を調べた。その結果、P2X7 受容体阻害薬である BBG や KN-62 存在下では妊娠期膵島からのグルコース応答性インスリン分泌亢進が有意に減弱していた。そこで、P2X7 受容体の妊娠期における役割を明らかにするために、P2X7 受容体ノックアウトマウスを用いて実験を進めた。妊娠 P2X7 受容体ノックアウトマウスから調製した膵島では、細胞量増大に

は影響を及ぼさなかったが、グルコース応答性のインスリン分泌(% release)は妊娠野生型マウス膵島に比べて有意に低下することを見出し、妊娠期 細胞からのインスリン分泌亢進に P2X7 受容体シグナルが重要な役割を果たしていることを確認した。妊娠期膵島ではグルコース応答性に細胞外に放出される ATP 量が非妊娠期膵島より有意に増加していること、また ectonucleotidase 阻害剤の効果の解析により、妊娠期では ATP 放出増加により低感受性 P2 受容体である P2X7 受容体が活性化され、代償性のグルコース応答性インスリン分泌能亢進が引き起こされることが示唆された。

(2)CDKAL1 発現低下が妊娠期の代償性インスリン分泌亢進不全を引き起こす機構

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、日本人を含め、ほとんどの民族で再現性高く報告されている。CDKAL1 タンパク分子はリジンに対応する tRNA をチオメチル化する修飾酵素であり、インスリン分泌障害を介して 2 型糖尿病発症リスクの増大に寄与している可能性が報告されている(Wei et al.(2011) J Clin Invest)。一方、興味深いことに最近 CDKAL1 の一塩基多型変異が妊娠糖尿病発症にも有意に関連していることが報告されているが、この遺伝子変異がどのようなメカニズムで妊娠糖尿病を発症させるのか未だ不明である。本研究では、妊娠期 CDKAL1 ノックアウトマウスを用いて CDKAL1 発現低下による代償性インスリン分泌亢進不全機構を解析した。

経口ブドウ糖負荷試験を行った所、非妊娠 CDKAL1 ノックアウトマウスでは非妊娠 WT マウスと同様な耐糖能を示したが、妊娠（14-16 日目）のノックアウトマウスでは、妊娠野生型マウスと比べ、糖負荷後の有意

な血糖上昇が見られ、耐糖能異常を認めた。妊娠ノックアウトマウスの膵灌流実験では妊娠野生型マウスで見られる代償性のインスリン分泌亢進が低下していた。次に単離膵島からのグルコース応答性インスリン分泌能を調べたところ、野生型の妊娠期膵島では、グルコース応答性インスリン分泌(% release)の増加がみられたが、妊娠期ノックアウトマウス膵島では分泌増加が減弱していた。また、妊娠期ノックアウトマウス膵島では細胞内 Ca^{2+} 上昇も低下していた。一方、野生型妊娠マウスにおける細胞量と細胞増殖の指標である Ki67 陽性細胞増加は非妊娠に比べて増加していたが、妊娠 CDKAL1 ノックアウトマウスでもこれらは同様に増加していた。従って、妊娠 CDKAL1 ノックアウトマウスで見られる代償性インスリン分泌抑制は細胞当たりのインスリン分泌能亢進が障害を受けている可能性が考えられた。

妊娠 CDKAL1 ノックアウト膵島では妊娠野生型膵島に比べてグルコース刺激時の ATP 産生が低下しており、またこの時、妊娠 CDKAL1 ノックアウト細胞では活性酸素 ROS の産生が顕著に増加していた。また、妊娠 CDKAL1 ノックアウト膵島では小胞体 (ER) ストレスマーカー遺伝子の発現が妊娠野生型膵島に比べて上昇しており、妊娠ノックアウト細胞では強い ER ストレスが生じていることがわかった。

これらの結果から、CDKAL1 の発現低下した妊娠期細胞では、強い小胞体ストレスおよびミトコンドリアの機能低下が引き起こされており、その結果、ATP の産生低下、それによる K_{ATP} チャネル応答の低下、電位依存性 Ca^{2+} チャネルを介した Ca^{2+} 流入の低下により、インスリン分泌の低下が引き起こされていることがわかった。しかし、小胞体ストレス及びミトコンドリア機能低下を引き起こす詳細な分子メカニズムについて

は未だ不明であり、今後の検討課題である。このように本研究により CDKAL1 遺伝子変異が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増大させる可能性が示唆された。

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5件)

Krishnankutty A, Kimura T, Saito T, Aoyagi K, Asada A, Takahashi SI, Ando K, Ohara-Imaizumi M, Ishiguro K, Hisanaga SI. (2017) In vivo regulation of glycogen synthase kinase 3 activity in neurons and brains Scientific Reports 7, 8602 (査読有)

(DOI:10.1038/s41598-017-09239-5)

Kunii M, Ohara-Imaizumi M, Takahashi N, Kobayashi M, Kawakami R, Kondoh Y, Shimizu T, Simizu S, Lin B, Nunomura K, Aoyagi K, Ohno M, Ohmuraya M, Sato T, Yoshimura S, Sato K, Harada R, Kim YJ, Osada H, Nemoto T, Kasai H, Kitamura T, Nagamatsu S, Harada A. (2016) Opposing roles for SNAP23 in secretion in exocrine and endocrine pancreatic cells. J Cell Biol 215, 121-138 (査読有)

(DOI: 10.1083/jcb.201604030)

Aoyagi K, Ohara-Imaizumi M, Itakura, M., Torii, S., Akimoto, Y., Nishiwaki, C., Nakamichi, Y., Kishimoto, T., Kawakami, H., Harada, A., Takahashi, M., Nagamatsu S. (2016) VAMP7 regulates autophagy to maintain mitochondrial homeostasis and to control insulin secretion in pancreatic β -cells. Diabetes 65, 1648-1659 (査読有)

(DOI: 10.2337/db15-1207)

今泉美佳, 藤原智徳, 大塚弘毅 妊娠期 (2015) 膵細胞におけるインスリン分泌亢進機構の解明, 46, 19-21 杏林医学会雑誌(査読無)

Kim, K., Oh, C.M., Ohara-Imaizumi, M., Park, S., Namkung, J., Yadav, V.K., Tamarina, N.A., Roe, M.W., Philipson, L.H., Karsenty, G., Nagamatsu, S., German, M.S., Kim, H. (2014) Functional role of serotonin in insulin secretion in a diet-induced insulin-resistant state. *Endocrinology* 156, 444-452 (査読有) (DOI: 10.1210/en.2014-1687)

[学会発表](計20件)

青柳共太、西脇知世乃、中道洋子、福富俊之、鳥居征司、牧山智彦、櫻井裕之、板倉誠、今泉美佳 The role of VAMP7 in the autophagosome formation in pancreatic β -cells. 膵細胞におけるVAMP7によるオートファゴソーム形成の制御機構 ConBio2017 (第90回日本生化学会大会、第40回日本分子生物学会年会合同大会)(2017年度生命科学系学会合同年次大会)神戸 (2017.12.6-9)

Ohara-Imaizumi M. Hida, Y., Yoshida, M., Aoyagi, K., Ohkura, M., Sakimura, K., Nakai, J., Kakei, M., Nagamatsu, S., Ohtsuka, T. Role of active zone protein ELKS in insulin secretion from pancreatic β -cells.第11回 Diabetes Leading-edge Conference 大津 (2017.8.8-9)

Aoyagi K., Itakura M., Nakamichi Y., Nishiwaki C., Torii S., Nagamatsu S., Ohara-Imaizumi M. VAMP7 regulates autophagy to maintain mitochondrial homeostasis and to control insulin secretion in pancreatic β -cells.第60回日本糖尿病学会年次学術集会 名古屋 (2017.5.18-20) (招待講演)

今泉美佳 インスリン分泌におけるアクティブゾーンタンパク質の役割 (招待講演) 第26回東京インスリン分泌研究会 東京 (2017.2.23)

青柳共太、西脇知世乃、中道洋子、岸本拓磨、鳥居征司、今泉美佳 VAMP7 regulates autophagy to maintain mitochondrial homeostasis and to

control insulin secretion in pancreatic beta-cells. 第89回日本生化学会大会 仙台.(2016.9.25-27)
今泉美佳 分泌を含めた開口放出の可塑性や代謝について 第3回 開口放出機構研究会 東京.(2016.7.11)

今泉美佳、青柳共太、吉田昌史、飛田耶馬人、岸本拓磨、中道洋子、西脇知世乃、崎村建司、大塚稔久、加計正文、永松信哉 インスリン開口分泌におけるアクティブゾーン構成タンパク質 ELKSの役割 第59回日本糖尿病学会年次学術集会. 京都.(2016.5.19-21)
今泉美佳、青柳共太、飛田耶馬人、崎村建司、大塚稔久 インスリン開口分泌におけるアクティブゾーン構成タンパク質の役割「シンポジウム：生物多様性からみる膵内分泌細胞の機能的理解」第121回日本解剖学会総会・全国学術集会. 福島(2016.3.28-30) (招待講演)

青柳共太、今泉美佳、板倉誠、鳥居征司、秋元義弘、西脇知世乃、中道洋子、岸本拓磨、原田彰宏、高橋正身、永松信哉 VAMP7はオートファジーを制御してミトコンドリアの恒常性維持と第2相インスリン分泌を調節する: VAMP7 regulates autophagy to maintain mitochondrial homeostasis and 2nd phase insulin secretion in pancreatic beta-cells BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会) 神戸. (2015.12.1-4)

青柳共太、今泉美佳、西脇知世乃、中道洋子、岸本拓磨、永松信哉 VAMP7はオートファジーの制御を介してミトコンドリア恒常性の維持と膵細胞からのインスリン分泌を制御する. 第44回杏林医学会総会 東京(2015.11.21)
青柳共太、今泉美佳、西脇知世乃、中道洋子、岸本拓磨、永松信哉 VAMP7 regulates autophagy to maintain mitochondrial homeostasis and to control second phase insulin secretion in pancreatic β -cells. 第58回日本神経化学会大会 大宮. (2015.9.11-13)

Ohara-Imaizumi M. The active zone protein family ELKS facilitates glucose-stimulated Ca²⁺ influx and insulin secretion in pancreatic beta cell 第9回 Diabetes Leading-edge Conference 大津 (2015.8.8-9)

今泉美佳 膵 細胞からのインスリン開口放出機構研究 第4回糖尿病トランスレーショナルリサーチ研究会. 弘前 (2015.7.21)(招待講演)

青柳共太、今泉美佳、板倉誠、鳥居征司、岸本拓磨、原田彰宏、秋元義弘、高橋正身、永松信哉 VAMP7はオートファジーによるミトコンドリア恒常性維持機構を介して膵 細胞からの第2相インスリン分泌を制御する: VAMP7 regulates autophagy to maintain mitochondrial homeostasis and to control the second phase insulin secretion in pancreatic β -cells 第67回日本細胞生物学会大会 東京. (2015.6.30-7.2)

青柳共太、今泉美佳、板倉誠、鳥居征司、岸本拓磨、西脇知世乃、中道洋子、秋元義弘、原田彰宏、高橋正身、永松信哉 VAMP7による第2相インスリン分泌の制御機構 第58回日本糖尿病学会年次学術集会. 山口. (2015.5.21-24)

今泉美佳、青柳共太、岸本拓磨、永松信哉 ノックアウトマウスを用いたインスリン開口分泌のイメージング解析 「シンポジウム: モデル動物を用いたインスリン分泌研究」 第29回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会. 京都 (2015.2.13-14)(招待講演)

今泉美佳、藤原智徳、大塚弘毅 妊娠期膵 細胞におけるインスリン分泌亢進機能の解明. 第43回杏林医学会総会 東京. (2014.11.15)

今泉美佳、青柳共太、岸本拓磨、永松信哉 有芯顆粒を介したインスリン分泌動態の可視化 (シンポジウム: 神経ペプチドや神経栄養因子の小胞輸送と精神神経疾患) 第36回日本生物学的精神医学会・第57回日本神経化学学会大会合同年会 奈良 (2014.9.29-10.1) (招待講演)

Kim K, Oh C-M, Ohara-Imaizumi, M.

Nagamatsu S., German MS, Kim H. Functional Role of Serotonin in Insulin Secretion Under Diet-induced Insulin-Resistant State 74th Scientific Session of American Diabetes Association, San Francisco, CA, USA, June 13-17, 2014
今泉美佳、青柳共太、岡村匡史、中道洋子、西脇知世乃、永松信哉 CDKAL1欠損マウスでは妊娠期の代償性インスリン分泌亢進機能が低下している 第57回日本糖尿病学会年次学術集会. 大阪. (2014.5.22-24)

〔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・講師

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