

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461336

研究課題名(和文) 2型糖尿病発症・進展におけるグルカゴン分泌の病態生理学的意義の解明

研究課題名(英文) Pathophysiological analyses of glucagon dysregulation in development of glucose intolerance and diabetes.

研究代表者

河盛 段 (Kawamori, Dan)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50622362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では将来の新規糖尿病治療法の確立を目指し、その病態に深く関与するグルカゴンの分泌異常について、その発症要因、時期、機序を解明すべく研究を行った。マウスに対し各種栄養素比率を調整した飼育餌の負荷を16週間行ったところ、高蛋白質摂取マウスでは負荷早期より耐糖能異常、血漿グルカゴン増加を呈し、その病態的意義が示された。また、細胞株を用いてグルカゴン分泌異常の背景機序を分子生物学的に解析し、ブドウ糖による酸化ストレスとインスリンシグナル低下を同定した。

研究成果の概要(英文)：At this moment, mechanisms for dysregulated glucagon secretion are still unclear. Here, we explored the etiology and underlying molecular mechanisms of glucagon dysregulation. Regular mice were fed by nutritionally modified diets for 16 weeks, and metabolic parameters were examined. The mice fed by highly protein-containing diet promptly exhibited glucose intolerance while smaller increase in body weight than regular diet-fed mice, together with significant elevation of plasma glucagon / insulin ratio suggesting its pathological impact. In vitro glucose load on glucagon-secreting cell-line InR1G induced hypersecretion of glucagon, and increase in oxidative stress and deterioration of insulin signaling were identified as underlying mechanisms. These data elucidate, at least partly, the previously unclear mechanism of abnormal glucagon secretion, providing insights into a potential novel approach to diabetes treatment, targeting glucagon.

研究分野：糖尿病

キーワード：糖尿病 グルカゴン エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

現代日本において生活習慣の変貌に伴い急速に増加する糖尿病は大きな社会健康問題となっている。すなわち、糖尿病は生体内エネルギー恒常性の破綻というそれ自身の病態に加え、特有の細小血管合併症そして全身の動脈硬化といった大血管合併症の大きな誘因となり、致命的疾患の発生素地としてもきわめて重要と考えられるため、糖尿病は国民健康を大きく損なう原因として合併症の発症予防といった観点からも早急な対応が求められている。

「膵β細胞より分泌されるインスリンの作用不足による慢性高血糖を主徴とする疾患」(日本糖尿病学会)と定義づけられる糖尿病であるが、一方で膵α細胞より分泌されるグルカゴンも糖尿病ではその分泌制御が障害されており、糖尿病の病態生理において非常に重要であるといえる。しかし、これまで精力的に研究が行われ、そして治療に応用されてきたインスリンとは対照的に、グルカゴン分泌異常発症の要因やメカニズムについての詳細は未だ明らかではない。

2. 研究の目的

膵α細胞から分泌されるグルカゴンはインスリンと対を成し、生体内血糖恒常性維持に中心的な働きを担うが、糖尿病ではその分泌制御異常が認められ病態悪化に深く関与する。この糖尿病におけるグルカゴン分泌異常は広く認識されている反面、その発症要因等の詳細については未だ不明な点が多く、グルカゴン標的療法の開発を妨げている。そこで本研究では、①グルカゴン分泌異常が糖尿病発症過程のどの時期で、どのような要因により惹き起こされるかを解析するとともに、②分子生物学実験モデルを用いてのその背景メカニズムの解明を行い、糖尿病におけるグルカゴン病態生理の包括的な理解を目指す。

3. 研究の方法

(1)代謝要因による生体内グルカゴン分泌変化の検討

まず本研究ではグルカゴン分泌異常の経時的な発症経過について明らかとすべく、生体モデルの解析を行った。

6週齢のC57B6雄性マウスに対し、

- A)通常餌(カロリー比:炭水化物 55%、蛋白質 25%、脂肪 20%)
- B)高蛋白餌(炭水化物 10%、蛋白質 45%、脂肪 45%)
- C)高脂肪餌(炭水化物 30%、蛋白質 25%、脂肪 45%)
- D)高糖質餌(炭水化物 75%、蛋白質 15%、脂肪 10%)

の各種栄養素比率変更餌で16週間、食餌負荷を行った。体重、摂餌量、血糖値、血漿インスリン濃度、血漿グルカゴン濃度を自由摂食下午前8:30~9:30に、負荷前及び負荷後

より毎週測定した。加えて、経口糖負荷試験(負荷後4、8、12、16週)、腹腔内糖負荷インスリン分泌試験(負荷後10週)、インスリン感受性試験(負荷後14週)をそれぞれ行い評価した。また、一部マウスにおいては負荷後6週時点でマウス膵島単離を行い(コラゲナーゼ法)、単離膵島からのインスリン、グルカゴン分泌の評価をStatic Incubation法にて行った。インスリン測定(森永)、グルカゴン測定(Mercodia)はそれぞれELISA法にて行った。

(2)グルカゴン分泌異常発症に関わる分子メカニズムの解明

次に膵α細胞のグルカゴン分泌異常の背景メカニズムに関して、分子生物学的に検討を行った。

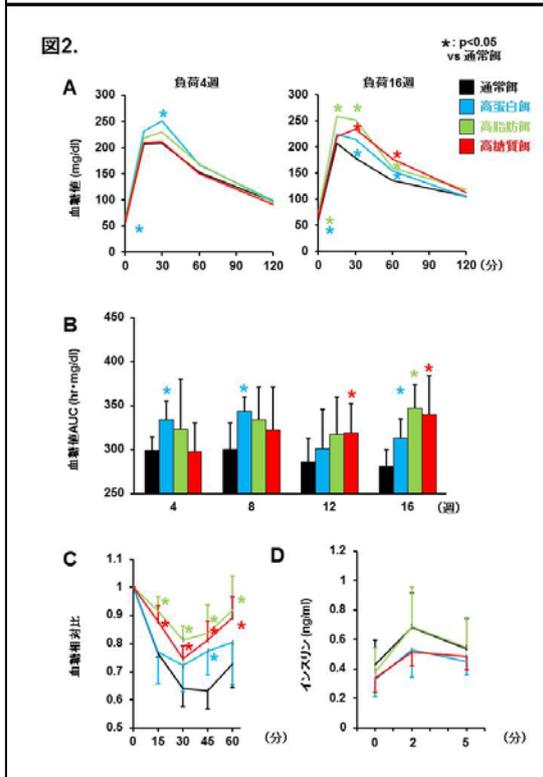
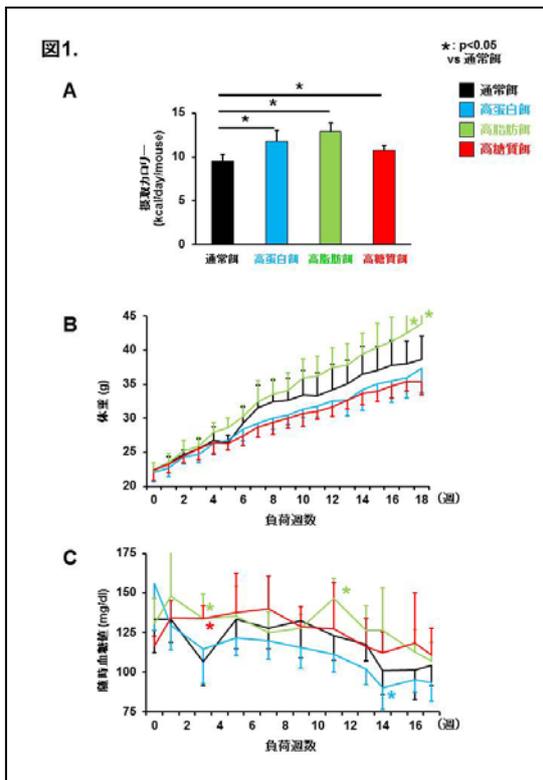
刺激応答性グルカゴン分泌及び細胞内シグナル伝達が評価可能であるハムスター由来グルカゴン分泌細胞株InR1G細胞に対し、糖尿病の慢性高血糖を模倣する長時間高グルコース負荷を行い、グルコース刺激に対するグルカゴン分泌反応をStatic Incubation法にて評価、同時にグルコース負荷後の基礎状態およびインスリン刺激下でのシグナル伝達についてWestern blotting法にて評価を行った。

4. 研究成果

(1)代謝要因による生体内グルカゴン分泌変化の検討

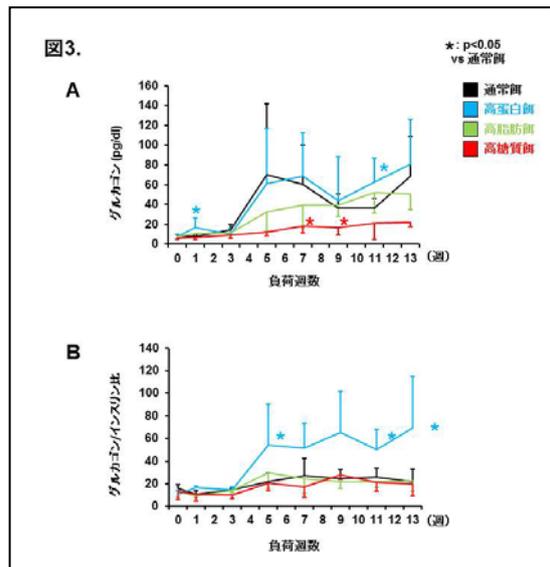
上記方法に則り、マウスに対してさまざまな摂取栄養素比率餌を負荷し、一般生理学的指標の評価を行った。

摂取カロリーはA:通常餌群と比し、B~D各群において有意に高値を呈したが(図1A)、体重においては負荷早期こそ同様であったものの、負荷後期においてC:高脂肪餌負荷群のみにおいて増加を呈し、B:高蛋白餌負荷群及びD:高糖質餌負荷群においては摂取カロリーの増加にもかかわらず増加軽減傾向を呈した(図1B)。なお、自由摂食下血糖値は各群で有意な変化は認めなかったが、B:高蛋白餌負荷群では低値傾向を示し(図1C)、栄養素比率の相違が体重や血糖値といった代謝学的パラメーターに影響を与えることを見出した。

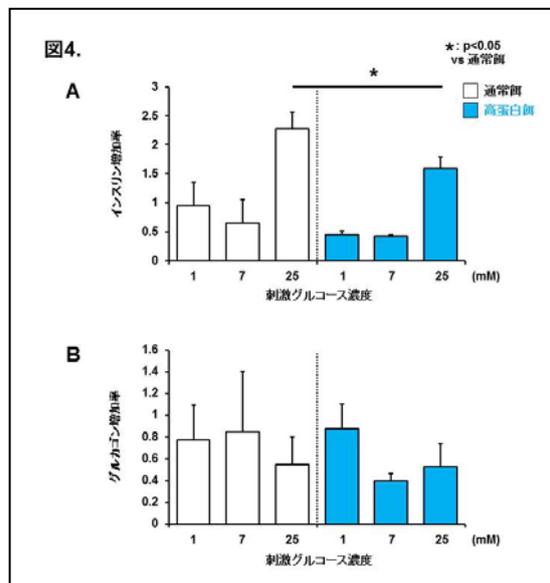


各種食餌負荷を行ったマウスにおいて、負荷前、負荷後に定期的に経口糖負荷試験を行い、耐糖能の評価を行った。興味深いことに、B: 高蛋白餌負荷群では体重低値および自由摂食下血糖値低値の傾向にもかかわらず、早期より耐糖能の悪化を呈した (図 2A)。この耐糖能異常は負荷後期においても持続していたが、後期ではC: 高脂肪餌負荷群においてより著しい耐糖能悪化を認めた (図 2A, B)。一方、負荷後 14 週時点でのインスリン感受

性は C: 高脂肪餌負荷群で耐糖能と同様に最も悪化していた。また早期より耐糖能悪化を示した B: 高蛋白餌負荷群では、体重低値傾向にもかかわらず軽度のインスリン抵抗性悪化傾向を示した (図 2C)。腹腔内糖負荷応答性インスリン分泌試験では、B: 高蛋白餌負荷群、D: 高糖質餌負荷群において糖応答性インスリン分泌反応の悪化傾向を呈した (図 2D)。これらより、インスリン分泌不全と感受性悪化が相まって耐糖能悪化を惹起したものと考えられた。加えて自由摂食下に血漿グルカゴン値を評価したところ、B: 高蛋白餌負荷群において血漿グルカゴン値は上昇傾向を (図 3A)、特にグルカゴン/インスリン比は顕著な増加を呈し (図 3B)、これがインスリン感受性の低下や耐糖能悪化に関与していることが示唆された。



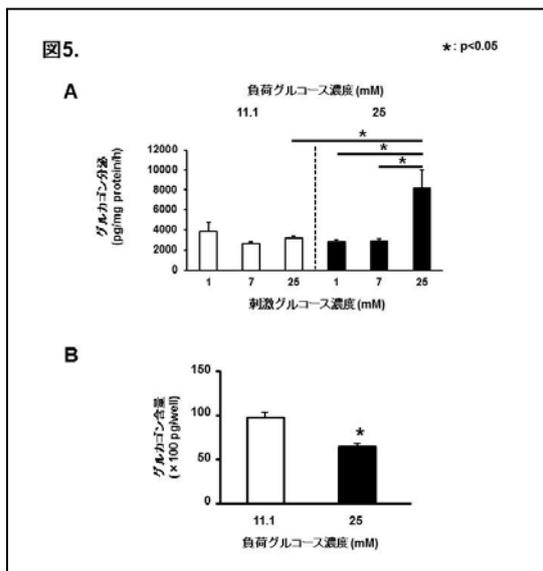
また、負荷後 6 週時点の A: 通常餌および B: 高蛋白餌負荷マウス単離膵島では、A: 通常餌マウス膵島と比し、B: 高蛋白餌負荷マウス膵島では高グルコース応答性インスリン分泌の反応不良を呈したが (図 4A)、グルカゴン分泌について変化はみられなかった (図 4B)。



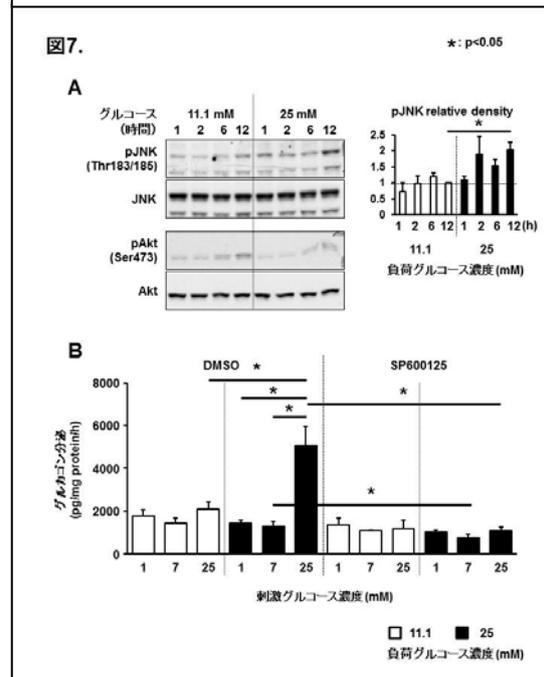
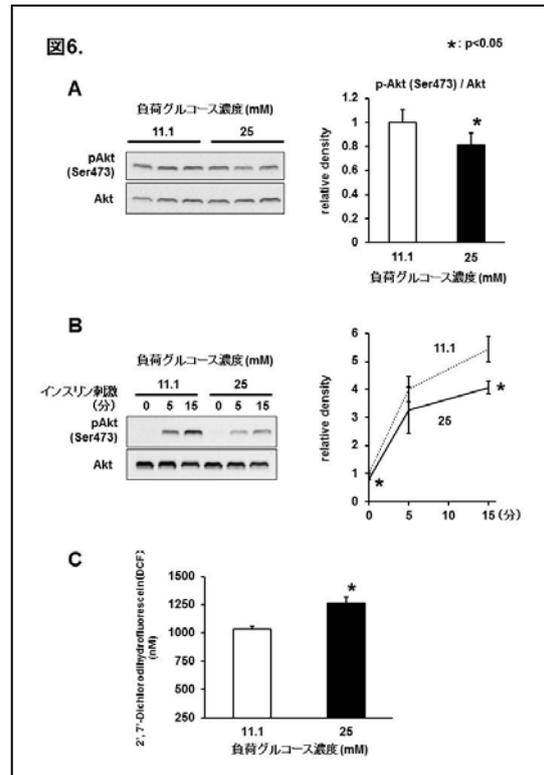
摂取栄養素比率の変化により各群において耐糖能の悪化が認められたが、その発症時期およびインスリン、グルカゴン分泌動態は異なり、各種栄養素が糖代謝およびホルモン分泌動態に与える影響がそれぞれ異なることが示された。特に、高蛋白餌負荷では負荷早期からグルカゴン分泌増加を認め、それが耐糖能異常の発症に寄与していることが示唆された。外的要因によりグルカゴン分泌異常が誘導されることが示され、これまで不明であった糖尿病におけるグルカゴン分泌異常発症の誘因及び発症時期の解明において有用な所見であると考えられた。

(2) グルカゴン分泌異常発症に関わる分子メカニズムの解明

まず、InR1G 細胞に対し高グルコース負荷 (25mM、12 時間) を行いグルカゴン分泌の評価を行ったところ、通常条件下 (11.1mM グルコース) 培養細胞と比し、25mM の高グルコース刺激時のグルカゴン分泌亢進を呈した (図 5A)。一方、InR1G 細胞内グルカゴン含量は有意な低下を呈し (図 5B)、InR1G に対する高グルコース負荷はグルカゴン産生を増加させることなく分泌パターン異常を惹起することが確認された。



次に、グルカゴン分泌調節に中心的な役割を担うインスリンシグナルは、高グルコース負荷により Akt の基礎 (図 6A)、インスリン刺激下 (100nM、15 分 ; 図 6B) と同様に低下していた。この条件下で InR1G 細胞内酸化ストレスは有意な増加を呈した (図 6C)。加えて酸化ストレスを含めたストレス応答性シグナル伝達である JNK 経路はグルコース負荷により経時的に活性化し、対照的に Akt 基礎リン酸化は低下した (図 7A)。実際、JNK 特異的阻害薬 SP600125 (10 μM、12 時間) は、高グルコース負荷により惹起されたグルカゴン分泌亢進を軽減させた (図 7B)。



これらの結果より、高グルコースが InR1G において JNK 活性化を介してインスリンシグナルを障害し、その結果グルカゴン分泌異常を惹起することが示され、これが糖尿病におけるグルカゴン分泌異常発症メカニズムの一端を担う可能性が示された。これらの結果は糖尿病におけるグルカゴン調節異常解明の一助となるとともに、糖尿病治療への新規アプローチとなることが期待される。

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)

①Katsura T, Kawamori D, Aida E, Matsuoka TA, Shimomura I. Glucotoxicity induces abnormal glucagon secretion through impaired insulin signaling in InR1G cells. *PLoS One*. 2017, 12(4):e0176271. doi: 10.1371/journal.pone.0176271、査読有り

[学会発表] (計9件)

①河盛 段: [受賞講演] 糖尿病におけるインスリン・グルカゴン分泌障害メカニズムの解明、第60回日本糖尿病学会年次学術集会、2017年5月18日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

②河盛 段: [シンポジウム] インクレチン薬への期待～病態モデルにおける α ・ β 細胞への効果、2017年5月20日、日本特殊陶業市民会館(愛知県・名古屋市)

③桂 央士、河盛 段、高比 康充、下 直樹、松岡 孝昭、下村 伊一郎: 高グルコース誘導性グルカゴン分泌異常メカニズムにおけるJNKの寄与、第60回日本糖尿病学会年次学術集会、2017年5月20日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

④桂 央士、河盛 段、小林 雅樹、北村 忠弘、松岡 孝昭、下村 伊一郎: マウスに対する高蛋白質摂取は、負荷早期よりグルカゴン分泌異常と耐糖能異常を誘導する、第59回日本糖尿病学会年次学術集会、2016年5月20日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

⑤河盛 段: [シンポジウム] 膵 α ・ β 細胞のインスリン作用障害とインクレチンの効果、第89回日本内分泌学会学術総会、2016年4月21日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

⑥河盛 段: [ワークショップ] Discovery of new roles for glucagon and pancreatic α -cells、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、2015年12月2日、神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)

⑦Kawamori D, Katsura T, Aida E, Kaneto H, Matsuoka T, Shimomura I: Chronic high glucose load induces dysregulation of glucagon secretion through impaired insulin signaling、American Diabetes Association 75th Scientific Sessions、2015年6月7日、ボストン(アメリカ合衆国)

⑧桂 央士、河盛 段、相田 絵理、久保 典

代、松岡 孝昭、下村 伊一郎: 糖尿病慢性高血糖によるグルカゴン調節異常発症の背景分子メカニズムの解析、第58回日本糖尿病学会年次学術集会、2015年5月22日、グランプラス セント・ヴァレンタイン(山口県・下関市)

⑨河盛 段、桂 央士、相田 絵理、松岡 孝昭、下村 伊一郎: 慢性高グルコースによる α 細胞グルカゴン分泌異常発症の背景メカニズムの同定、第88回日本内分泌学会学術総会、2015年4月23日、ホテルニューオータニ(東京都・千代田区)

[図書] (計0件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河盛 段 (KAWAMORI, DAN)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 50622362

(2) 研究分担者

松岡 孝昭 (MATSUOKA, Takkaaki)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 10379258

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし