

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461350

研究課題名(和文)膵ラ氏島機能制御機構における膵由来インクレチン分泌の生理的意義の解明

研究課題名(英文) Physiological role of pancreatic incretin on the functional regulation of pancreatic islet cells

研究代表者

加来 浩平 (Kaku, Kohei)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：10116709

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)：膵GLP-1の生理的意義解明のため、ラット膵単独灌流と膵ラ氏島免疫染色を施行し、糖尿病GKラット細胞からのGLP-1分泌亢進、GLP-1R発現、Exendin-4刺激によるGLP-1の分泌亢進、cAMP依存性インスリン分泌亢進を確認した。またGLP-1、GLP-1R、endosome markerの3重染色よりGLP-1/GLP-1Rのendosome形成を明らかにした。以上より、糖尿病膵ラ氏島細胞でのautocrine作用によるGLP-1Rシグナル増強機構の存在が示唆された。非糖尿病ラットでは同様の機構は存在せず、糖尿病の膵ラ氏島機能不全に対する組織修復機構である可能性が想定された。

研究成果の概要(英文)：To assess a physiological role of pancreatic GLP-1 on the regulation of pancreatic islet cell function, GLP-1 secretion by using pancreas perfusion study and GLP-1 receptors (GLP-1Rs) in islet cells by immunohistochemical analysis were investigated in non-diabetic and diabetic rats.

The perfusion study of diabetic GK rats demonstrated a significant secretion of GLP-1 from the pancreas. GLP-1Rs were observed in β -cells in diabetic GK rats, but not in non-diabetic rats. Exendin-4 stimulated both glucagon and GLP-1 secretions from β -cells and cAMP-dependent insulin secretion from β -cells. In addition, the immunohistochemical analysis revealed that GLP-1/GLP-1R complex induced the endosome formation in pancreatic β -cells of diabetic rats.

These results strongly suggested the existence of autocrine mechanism of GLP-1/GLP-1R in pancreatic β -cells of diabetic rats, by which the deranged islet function in diabetic condition might be restored.

研究分野：医歯薬学

キーワード：糖尿病 膵ラ氏島機能 膵灌流 膵インクレチン 膵細胞 GLP-1 GLP-1受容体 autocrine作用

1. 研究開始当初の背景

(1) 2型糖尿病の膵ラ氏島機能不全とインクレチン関連薬の役割について

糖代謝異常にインスリン分泌不全は必須の病態である。近年、グルカゴン分泌異常も含めて膵ラ氏島機能不全は病型を問わず糖尿病の発症から進行の全ての局面において主たる病態を形成すると考えられるようになった。折しもインクレチン関連薬が広く普及し、とりわけ GLP-1 の膵ラ氏島機能調節作用が注目されるようになった。インクレチン関連薬である GLP-1 受容体作動薬や DPP-4 阻害薬は血糖依存性にインスリンとグルカゴンの分泌調節に働くことが知られ作用機構の解明は極めて重要な課題であった。

(2) GLP-1 による膵ラ氏島機能調節機構に関する当時の研究状況

GLP-1 が膵ラ氏島機能調節機構に多大な影響を及ぼしていることは言うまでもないが、そこに関与する GLP-1 の由来については不明であった。我々は既に膵島形成モデルとして MIN6 細胞および単離マウス膵ラ氏島を用い、グルカゴン分泌細胞上に GLP-1 受容体の存在を明らかにし、Ex-4 刺激による self-inducible な GLP-1 分泌を証明し、膵島細胞の分化・機能に一定の役割を果たす可能性を報告して来た。この Ex-4 による GLP-1 産生増幅はグルカゴン分泌から独立したものであり、かつインスリン分泌細胞の分化増殖、Maf-A 発現亢進、インスリン発現亢進を示唆する成績を得ている¹⁾。また生理的低濃度の GLP-1 のシグナル伝達についても新たな知見をえており、膵臓における GLP-1 の作用は pM オーダーの比較的低濃度で何らかの作用を発揮する可能性を見出していた²⁾。

さらに予備実験として、我々は正常ラットを用いて腸管-膵同時灌流と膵単独灌流実験を行い、腸管由来 GLP-1 から独立した膵由来 GLP-1 分泌の可能性を見いだした³⁾。この膵由来 GLP-1 は、腸管由来 GLP-1 とは無関係に分泌され、インスリン分泌と同様に 7~8 分間隔でピークを有する律動性(拍動性)である(図1)。腸管由来 GLP-1 分泌が、グルコースや IBMX、IL-6 等により増幅されるが、膵由来 GLP-1 分泌はこれら既存刺激物質では影響を受けず、低濃度グルコースで増幅され、somatostatin でのみ抑制された。これらの成

績は膵由来 GLP-1 の分泌は、腸管由来 GLP-1 分泌から独立したものであると考えられた。この律動性 GLP-1 分泌は単離膵ラ氏島でも確認された。

一方、げっ歯類では膵ラ氏島内の GLP-1 受容体 (GLP-1R) 発現に関する報告は一部あるものの、ヒト膵臓での GLP-1 受容体発現については否定的な報告からわずかに見られるとの報告まで未だ決着はついていない状況にあった。

以上の状況を鑑みると、糖尿病の膵ラ氏島機能不全の機構を理解し、インクレチンによる機能調節機構を明らかにするうえで、膵由来 GLP-1 の作用および作用機構の解明は極めて重要な課題であった。

Pulsatile secretion of glucagon and GLP-1 from pancreas

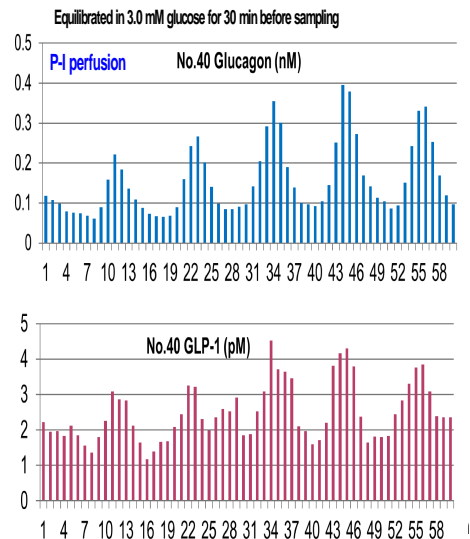


図1. 膵臓単独灌流によるグルカゴンと GLP-1 の律動性分泌

2. 研究の目的

我々がこれまでに MIN6 細胞や単離マウス膵ラ氏島を用いた実験、膵単独灌流実験によって蓄積してきた成績から、MIN6 細胞集団内のグルカゴン分泌細胞上の GLP-1 受容体の存在、膵ラ氏島細胞からの GLP-1 分泌が確認できていたが、膵由来 GLP-1 の生理的役割については、全く不明のままであった。本研究の目的は膵インクレチン分泌の生理的意義を明らかにすることであり、具体的な目標は以下の通りである。

(1)膵ラ氏島機能制御における GLP-1 の生理的役割の解明：ラット膵ラ氏島機能制御への

膵由来 GLP-1 の関与を明らかにするため、ラ氏島細胞に於ける GLP-1R の発現の確認、GLP-1 分泌機構の解明、さらにはラ氏島細胞機能として重要なインスリンとグルカゴンの分泌への膵由来 GLP-1 の関与の有無を明らかにする。

(2)糖尿病の膵ラ氏島機能不全とインクレチンとの関連性の解明：2型糖尿病の膵ラ氏島機能不全にはインスリン分泌不全、グルカゴン分泌異常とともに形態的障害（細胞量の減少）がみられる。一方で、外来性 GLP-1 投与によって、これらの異常はある程度改善することが実験的に知られている。糖尿病状態における膵ラ氏島機能不全に膵 GLP-1 がどのような役割を果たすかについて解明する。また GLP-1 と共に重要なインクレチンである GIP についても膵ラ氏島における局在も含めて、その意義について明らかにする。

3. 研究の方法

(1)膵 GLP-1 の分泌機構の解明

血糖正常ラットおよび糖尿病モデルラットを用いた GLP-1 分泌プロファイルの検討：正常血糖ラットの消化管を切除し膵だけを還流する膵単独還流系と消化管を切除しないで膵と消化管を同時に還流する膵臓-腸管同時還流系を用いて、各種分泌刺激物質、抑制物質の存在下での GLP-1、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチンの分泌プロフィールを比較検討した。更に GK ラットを用いて正常ラットと同様の実験を行った。

(2)膵 GLP-1 の生理的役割の解明

糖尿病および非糖尿病モデルラット膵ラ氏島 GLP-1R 局在の相違性を明らかにするとともに GLP-1R の機能性について検討した。糖尿病モデルとして GK ラット、streptozotocin (STZ) 投与 Wistar ラットを使用した。対照には STZ 非投与 Wistar ラットを用いた。消化管を全摘した膵単独還流で 5.5 mM glucose, 50 µg/ml aprotinin, 20 nM vildagliptin を基礎還流し、20 分後から GLP-1 の測定に影響を与えない 10 nM Ex-4 を添加し、さらに 30 分後から cAMP 依存性分泌をみるため 2 mM IBMX に切り替え、トータル 80 分の還流を行い還流液の insulin, glucagon, GLP-1 濃度を測定した。

また膵組織を摘出後、直ちに凍結させ、クオースタットにて 8 µm の厚さの切片標本作製し、GLP-1R 抗体による膵ラ氏島免疫染色で GLP-1R の局在を検討した。さらに GLP-1 と結合し、機能する GLP-1R であることを確認するため、endosome 染色による可視化を試みた。すなわち GLP-1, GLP-1R に対する 2 抗体と endosome 関連マーカーである -Arrestin2, EEA-1, Rab11, Rab7 の 1 抗体を組み合わせて 3 重染色をし、Alexa 405, 488, 594 結合二次抗体を使用し共焦点顕微鏡 (confocal laser scanning microscope: CLM) でクロストークを排除して GLP-1R との共局在性を調べた。endosome 構造を保持するために界面活性剤、抗原賦活剤を使用せずに実験を行った。

(3)膵ラ氏島細胞における GIP/GIP 受容体の存在と GLP-1/GLP-1 受容体との相違性の検討

GK rat, streptozotocin (STZ) 投与 Wistar rat を使用した。GIP, GIPR, GLP-1, GLP-1R, glucagon, insulin, endosome マーカーである EEA1 に対する抗体を用いた。また各抗体を組み合わせた多重免疫染色をし、共焦点顕微鏡で各 peptide と受容体との共在性を検討した。また膵単独還流を行い、Exendin-4 刺激下での GIP 分泌を検討した。

4. 研究成果

(1)膵 GLP-1, インスリン, グルカゴン分泌 (膵灌流実験)

非糖尿病 (正常 Wistar) ラットでは GLP-1 の基礎分泌は認めるものの、IBMX 刺激による GLP-1 分泌亢進は見られなかった。一方、糖尿病モデル GK ラットでは糖尿病未発症の 5-10 週齢では非糖尿病ラットと同様に、cAMP 活性化薬である IBMX 刺激による GLP-1 分泌亢進は見られないが、25 週齢で IBMX 刺激による cAMP 依存性 GLP-1 分泌亢進を認めた。また 25 週齢 GK と STZ 投与 Wistar ラットにおいて GLP-1R 作動薬である Ex-4 添加により GLP-1, glucagon の分泌亢進をみた。一方、Ex-4 刺激により insulin 分泌も同時に亢進した。それに伴い glucagon 分泌は、Ex-4 添加前のレベル以下まで抑制され、GLP-1 による insulin を介する glucagon 分泌抑制作用が示唆された (図 2)。GIP 分泌も糖尿病ラット膵灌流実験で認めるが、Ex-4 による明らかな分

分泌亢進は見られなかった。

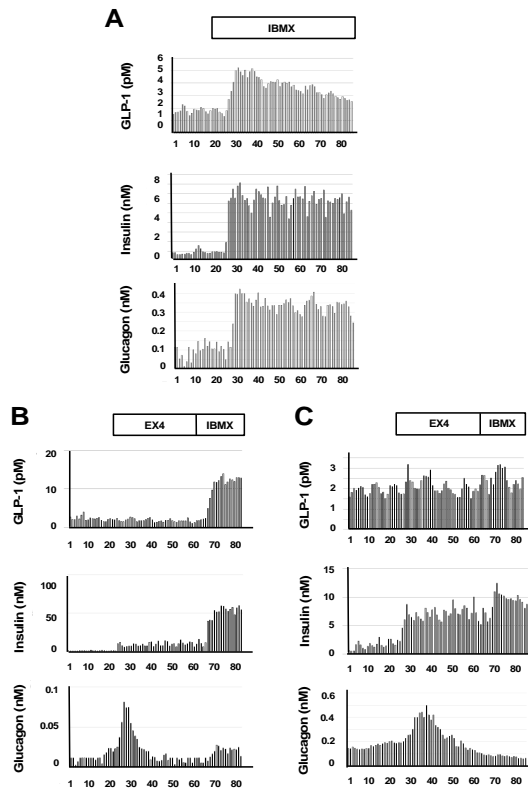


図2. 糖尿病モデル GK ラットと STZ 誘発糖尿病ラット(Wistar)における膵 GLP-1, インスリン、グルカゴン分泌に及ぼす IBMX と Ex-4 の影響 (膵単独灌流実験)。(A,B) GK ラット(25 週齢)、(C) STZ 誘発糖尿病ラット(9 週齢) glucose; 5.5mM, IBMX; 2mM, Ex-4; 10nM.

(2) 膵ラ氏島免疫染色による GLP-1/GLP-1R の存在と生理的意義

非糖尿病 Wistar ラット膵ラ氏島免疫染色の結果、insulin 産生細胞 (細胞領域) において GLP-1 と GLP-1R の存在がわずかに確認されるものの、細胞領域では殆ど認めなかった。一方、STZ 投与 rat と GK rat では膵ラ氏島の形態は著しく異なるが、GLP-1, GLP-1R の染色態度は明瞭であり、より豊富な発現が確認された (図 3)。さらに各種 endosome 関連マーカー (-Arrestin2, EEA1, Rab11, Rab7) と共局性のある puncture 構造として insulin 産生細胞 (細胞) のみならずグルカゴン産生細胞 (細胞) にも認められた (図 4)。同時に endosome 内には adenylylate cyclase の共存も確認されたことから、GLP-1/GLP-1R complex は cAMP 依存性の細胞内シグナル伝達機構に関与することが示唆された。

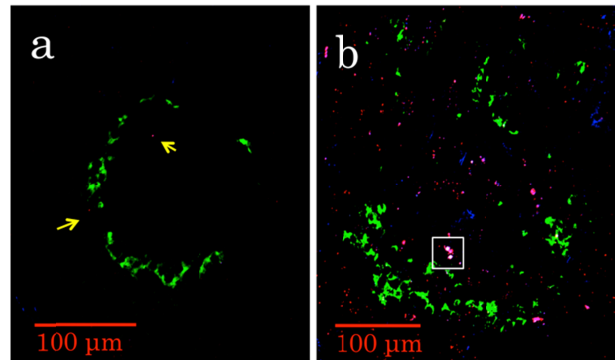


図3. 非糖尿病 (a:正常 Wistar 10wk) 及び糖尿病 (b:GK 25wk) ラットの膵ラ氏島免疫染色 糖尿病ラットでは膵ラ氏島の構築は乱れている。GLP-1(緑)、GLP-1R (赤)、EEA2(青)。内は GLP-1, GLP-1R, EEA1 の3色が融合し、白色を呈した endosome を示している。

すなわち Early endosome marker である EEA2 や -Arrestin2 との共存が確認されたことは、GLP-1/GLP-1 complex が -Arrestin2 によってリクルートされ、early endosome を形成するものと考えられた。また late endosome marker である Rab7 や recycling endosome marker として知られる Rab11 との共存確認から、GLP-1R は recycling する可能性が示された。すなわち糖尿病ラットの細胞では GLP-1R が発現しており、GLP-1 と結合後、-Arrestin2 と結合し internalization により endosome を形成して、cAMP を介して細胞内にシグナル伝達に関与すること、GLP-1R は recycling しようすることが強く示唆される結果であった。これらの結果は糖尿病ラット細胞において autocrine 作用による GLP-1 分泌亢進と受容体を介するシグナル増幅機構の存在を示唆するものである。

(3) GIP/GIP 受容体の発現と GLP-1/GLP-1 受容体との相違性

非糖尿病ラットの膵ラ氏島では GLP-1 と異なり GIP の局在は認めなかった。一方、糖尿病ラット膵細胞 (グルカゴン産生細胞) ではグルカゴンと GLP-1 の共存とともに、グルカゴンと共存する GIP の存在を確認できた。GIP 発現細胞は GLP-1 分泌細胞とは独立して存在した。また GLP-1/GLP-1R と同様に、細胞に GIP/GIPR complex が endosome を形成することが確認された。興味あることに、

GLP-1/GLP-1R と GIP/GIPR が共存して large endosome を形成することも確認された。GIP/GIPR complex の意義についてはさらなる検討を要すると考えられた。

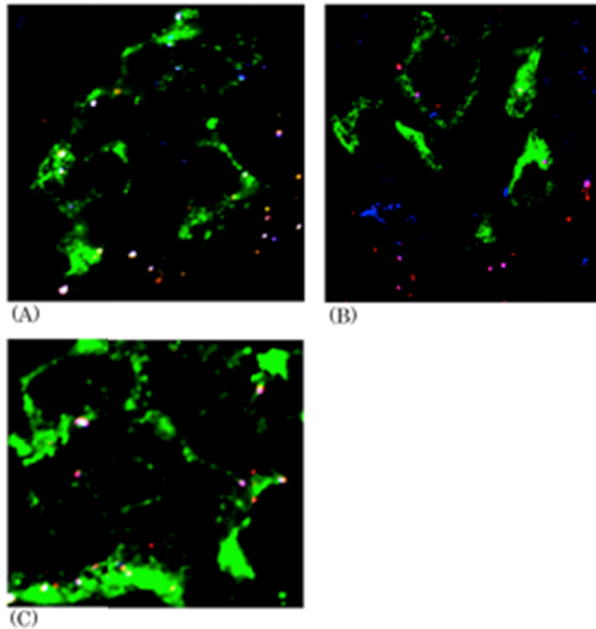


図4. 糖尿病モデル GK ラット (25wk) 膵ラ氏島の免疫染色

A: GLP-1(緑)、GLP-1R(赤)、Rab11(青)
 B: GLP-1(緑)、GLP-1R(赤)、Rab7(青)
 C: GLP-1(緑)、GLP-1R(青)、adenylate cyclase(赤)

(A) GLP-1/GLP-1R が Rab11(青) と共存しており、GLP-1R の recycling を示唆している。(B) GLP-1R(赤) と Rab7(青) が共存し、magenta 色を呈する dot(endosome) が存在する。(C) early endosome と思われる部位での adenylate cyclase の共在を認める。

以上の研究成果は、糖尿病状態での膵ラ氏島細胞においては正常状態では見られないインクレチンの発現増加と機能する GLP-1R の発現を認め、GLP-1 刺激により細胞からの glucagon, GLP-1 分泌を促進させるという autocrine 機構が存在することを明らかにした。我々は既に外来性の GLP-1R 作動薬を糖尿病モデル動物に投与すると、障害された膵細胞の保護効果が認められることを報告している⁴⁾。インクレチン関連薬による膵細胞の保護効果に関する同様の成績は、他にも多くの報告がなされていることから、本研究で見られた糖尿病状態における GLP-1 分泌亢進が障害された膵ラ氏島細胞保護と機能

の修復に寄与する可能性は否定できないものと思われた。さらに糖尿病における奇異性 glucagon 分泌亢進には細胞における GLP-1R 刺激が関与する可能性もある。すなわち膵細胞からの GLP-1 には autocrine 及び paracrine 機構が存在し、糖尿病における膵ラ氏島細胞機能調節に深く関与する可能性が、本研究によって明らかにされたと言える。

引用文献

- (1) Nakashima K, Shimoda M, Hamamoto S, Tatsumi F, Hirukawa H, Tawaramoto K, Kanda Y, Kaku K : Self-inducible secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) that allows MIN6 cells to maintain insulin secretion and insure cell survival. *Mol Cell Endocrinol* 349(2): 281-288, 2012
- (2) Shigeto M, Katsura M, Matsuda M, Okuma S, Kaku K: Low, but physiological, concentration of GLP-1 stimulates insulin secretion independent of the cAMP-dependent protein kinase pathway. *J Pharmacol Sci* 108: 274-279, 2008
- (3) Nakashima K, Hamamoto S, Kimura Y, Shimoda M, Tawaramoto K, Kimura T, Okauchi S, Kaku K : Pulsatile secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) from pancreatic alpha cells: evidence for independent mechanism from intestinal GLP-1 secretion in rodents.(oral presentation). The 49th EASD Annual Meeting, Sept 23-27, 2013 (Barcelona)
- (4) Kanda Y, Hamamoto S, Tawaramoto K, Hashiramoto M, Matsuki M, Kaku K: The human glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide preserves pancreatic beta cells via regulation of cell kinetics and suppression of oxidative and endoplasmic reticulum stress in a mouse model of diabetes. *Diabetologia* 54(5):1098-1108, 2011

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)

Shigeto M, Cha CY, Rorsman P, Kaku K:
A role of PLC/PKC-dependent pathway
in GLP-1-stimulated insulin
secretion. *J Mol Med (Berl)*. 2017 Jan
17. doi: 10.1007/s00109-017-1508-6.
[Epub ahead of print]

[学会発表](計3件)

中島弘二、田邊昭仁、木下智絵、小畑淳
史、木村友彦、下田将司、金藤秀明、加
来浩平 糖尿病モデルラットにおける肝
細胞脂肪沈着と肝細胞 GLP-1 受容体
(GLP-1R)の発現亢進 第3回肝臓と糖尿
病・代謝研究会「石川県立音楽堂邦楽ホ
ール・交流ホール(石川県・金沢市)」、
2016年7月16日

中島弘二、金藤秀明、木村友彦、下田将
司、加来浩平 糖尿病モデルラットの
細胞における GIP/GIP 受容体の発現と
GLP-1/GLP-1 受容体との相違性 第59回
日本糖尿病学会年次学術集会「国立京都
国際会館他(京都府・京都市)」、2016年5
月20日

中島弘二、木村友彦、岡内省三、下田将
司、金藤秀明、加来浩平 糖尿病モデル
ラット膵 細胞には GLP-1 受容体が発現
し GLP-1 の autocrine 機構が存在する
第58回日本糖尿病学会年次学術集会「海
峡メッセ下関他(山口県・下関市)」、2015
年5月22日

6. 研究組織

(1)研究代表者

加来 浩平 (KAKU Kohei)
川崎医科大学・医学部・総合内科学1・
特任教授
研究者番号: 10116709

(2)研究分担者

下田 将司 (SHIMODA Masashi)
川崎医科大学・医学部・糖尿病・代謝・内分
泌内科学・講師

研究者番号: 60388957

(4)研究協力者

中島 弘二 (NAKASHIMA Koji)
木村 友彦 (KIMURA Tomohiko)
蛭川 英典 (HIRUKAWA Hidenori)
岡内 省三 (OKAUCHI Seizo)
小畑 淳史 (OBATA Atsushi)
金藤 秀明 (KANETO Hideaki)
重藤 誠 (SHIGETO Makoto)
Patrik Rorsman