

「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」  
平成19 年度採択研究代表者

清野 進

神戸大学大学院医学研究科・教授

## 糖代謝恒常性を維持する細胞機能の制御機構

### § 1. 研究実施の概要

糖代謝は生命活動において極めて本質的で根源的な生体反応である。膵臓に存在するランゲルハンス島(膵島)は血糖調節の中心的役割を果たしている。血糖を降下させるインスリンを分泌する $\beta$ 細胞を含む4種類の内分泌細胞から構成される膵島は、異なる細胞が集合しただけの単なる細胞集団ではなく、糖代謝恒常性を維持する高次に機能統合されたシステムである。しかしながらこれまでの研究は、個々の細胞における個々の機能分子に着目した還元主義的なアプローチが主流であり、高次機能体としての膵島を解明するには至っていない。様々な代謝状態により制御される膵島機能をより高次のレベルで統合的に解明するためには、メタボローム解析を取り入れた包括的研究が不可欠である。本研究では、1)膵島機能の制御機構の解明、2)膵島細胞の再生制御機構の解明、3)代謝異常と膵島機能異常との関係の解明の3つの課題に取り組む。本年度は、膵 $\beta$ 細胞におけるインスリン分泌の新たなシグナルメカニズムを解明するとともに、膵 $\beta$ 細胞株を用いた比較メタボローム解析に本格的に着手した。

### § 2. 研究実施体制

#### (1) 清野グループ

① 研究分担グループ長: 清野 進 (神戸大学大学院、教授)

#### ② 研究項目

- ・ 研究の総括
- ・ メタボローム解析
- ・ 膵島細胞機能の解析
- ・ 膵島細胞維持機構の解析

(2) 溝口グループ

① 研究分担グループ長: 溝口 明 (三重大学大学院、教授)

② 研究項目

- ・ 膵島細胞の形態学的解析
- ・ 膵島細胞機能の形態学的解析

(3) 稲垣グループ

① 研究分担グループ長: 稲垣 暢也 (京都大学大学院、教授)

② 研究項目

- ・ 膵島の代謝測定
- ・ 膵島の機能解析

(4) 清水グループ

① 研究分担グループ長: 清水 謙多郎 (東京大学大学院、教授)

② 研究項目

- ・ メタボローム解析におけるインフォマティクス支援

### § 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は、(4-1)に対応する)

#### 1. 膵島機能の制御機構の解明

cAMPは膵β細胞においてインスリン分泌を制御する代謝シグナルとしてきわめて重要であるが、その作用については未だ不明な部分が多い。cAMPセンサーであるEpac2はGuanine nucleotide exchange factor (GEF)であり、cAMPと結合すると低分子量Gタンパク質Rap1を活性化してインスリン分泌を促進する。インスリン分泌におけるEpac2の役割を解明する目的でEpac2 FRET (fluorescence resonance energy transfer)センサー(C-Epac2-Y)を開発し、Epac2の活性化を引き起こす化合物を検索した。その結果、偶然にも、糖尿病治療薬として広く用いられているスルホニル尿素(SU)薬であるトルブタミド(TLB)とグリベンクラミド(GLB)がFRETの低下を引き起こす(Epac2を活性化すること)を発見した<sup>4,7)</sup>。また、Epac2欠損マウスの単離膵島では、TLBならびにGLB刺激によるインスリン分泌反応が明らかに低下していた。さらに、経口グルコース負荷試験の際のTLBの効果を検討したところ、Epac2欠損マウスでインスリン反応が有意に低下し、血糖降下作用が減弱した。SU薬は現在最もよく使用されている糖尿病治療薬の1つであり、膵β細胞のATP感受性カリウム( $K_{ATP}$ )チャンネルの調節サブユニットであるSUR1に結合してチャンネルを閉鎖することによってインスリン分泌を刺激すると考えられ、SU薬の標的分子としてはSUR1が唯一知られていた。今回の研究成果は、SU薬のインスリン分泌刺激作用にはEpac2を介するメカニズムも重要であること

を明らかにした。これは SU 薬による糖尿病治療を新しい視点から提示する予想外の発見であり、医療現場に大きなインパクトを与えるものと思われる。インクレチンの作用も Epac2 を介するメカニズムが重要であることを合わせて考えると、Epac2 は糖尿病治療に対する新たな創薬の標的として期待される。

また、Epac2 の N 末端領域に存在する cAMP 結合ドメインを欠いたスプライズバリエント Epac2B を発見し、Epac2A (従来の Epac2) は N 末端領域を介して細胞膜に局在することでインスリン分泌を制御することを明らかにした<sup>1)</sup>。さらに、低分子量 G タンパク質 Rab11 とその標的分子 Rip11 がインスリン分泌制御に関与することを明らかにした<sup>2)</sup>。一方、cAMP シグナルがグルコース応答性インスリン分泌を単に増強するだけでなく、ニフルム酸感受性イオンチャネルを介して誘導性にも作用することを見出した<sup>3)</sup>。高濃度グルコースと高濃度カリウム刺激によって惹起されるインスリン開口分泌には、それぞれ異なるインスリン顆粒プールが関与することを示した<sup>5)</sup>。

今年度はさらに、新たに樹立した種々の膵β細胞株を用いた、質量分析による細胞内代謝物の網羅的解析(メタボローム解析)に本格的に着手した。種々の新たな膵β細胞株(MIN6-Kと命名)を樹立し、そのうち、MIN6-K8 細胞はグルコース応答性インスリン分泌反応と GLP-1 による増強効果が認められたが、K20 細胞では GLP-1 の効果は見られなかった。また、MIN6-K を正常の膵島構造に近い 3 次元の細胞塊である偽膵島を形成して培養するといずれの株細胞においても GLP-1 によるグルコース応答性インスリン分泌反応の増強が認められた<sup>8)</sup>。以上の結果から、異なる細胞株間や単層培養状態と偽膵島で細胞内代謝が異なる可能性が考えられ、実際に ATP や cAMP の産生量が増加していることが確認された。さらに、ガスクロマトグラフィー-質量分析計(GC/MS)を用いたメタボローム解析によって、偽膵島ではグルコース代謝、アミノ酸代謝に関わる多くの代謝物が増加することを見出した。また、キャピラリー電気泳動-質量分析計(CE/MS)を用いて、GLP-1 を添加した時に限ってどの細胞株でもその量が著しく変化する代謝物を同定した。このことは cAMP シグナルと相互作用するグルコース代謝経路の存在を示唆している。

## 2. 膵島細胞の再生制御機構の解明

膵β細胞の運命を追跡するために、時空間的制御可能な膵β細胞特異的 Cre リコンビナーゼ発現マウス(Ins2-Cre<sup>ER</sup> マウス)を作製した。このマウスとレポーターマウス(R26R-YFP マウス)を交配させることによって、任意の時期にインスリン発現細胞を標識し、これを追跡するマウスモデルが作製できる。今年度は、Ins2-Cre<sup>ER</sup> マウスにおける膵β細胞機能の解析に着手するとともに、両者を交配した Ins2-Cre<sup>ER</sup>/R26R-YFP マウスを作製し、膵β細胞の標識の効率や特異性について検討した。Ins2-Cre<sup>ER</sup> のヘテロノックインマウス同士を交配して、同腹の wt/wt(野生型)、wt/cre(ヘテロノックイン)、cre/cre(ホモノックイン)について体重と随時血糖を4週齢から16週例まで週1回測定したところ、これら3群間で差異は認められなかった。インスリン分泌機能と耐糖能の低下も見られなかった。また、Ins2-Cre<sup>ER</sup>/R26R-YFP マウスにおいて Cre リコンビナーゼの発現がインスリンの発現と完全に一致し、1 mg x 7 日間のタモキシフェン投与でほとんどの膵β細胞が EYFP を発現するようになるが、膵β細胞以外の細胞での EYFP の発現は全く認められないことを確認した。したがっ

て、このマウスを用いた膵β細胞標識の特異性は極めて高いことが検証された。さらに、タモキシフェン 1 mg を 1 回投与することで約 20% の膵β細胞が標識できることを見出した。今後、様々な条件で Ins2-Cre<sup>ER</sup>/R26R-YFP マウスにおいて膵β細胞の再生を誘導し、細胞の運命を追跡する予定である。

### 3. 代謝異常と膵島機能異常との関係の解明

代謝に関与する組織におけるリン脂質組成の特性に関する検討として、インスリン分泌臓器である膵β細胞を含む膵島組織およびインスリン感受性に関与するとされる肝臓、骨格筋、白色脂肪組織、褐色脂肪組織、及び血漿についてリン脂質メタボローム解析を行った。東京大学大学院の田口良教授との共同研究によりマウスおよびラットの膵島組織では、リン脂質(特に PC、PE、PS)において sn-2 位にアラキドン酸(20:4)をもつ分子種が多いことが判明した。また、非肥満型 2 型糖尿病モデルである GK rat および野生型ラットを用いて、膵島含有リン脂質に関して検討を行った。その結果、各組織に比して膵島での含有リン脂質中、アラキドン酸(20:4)が多い傾向も含め、両群で有意な変化は認められなかった。一方、酸化リン脂質の分解産物である鎖長の短いアルデヒド体やカルボキシル体は GK rat 膵島で多く認められた。さらに、高脂肪食を野生型マウスおよび過食肥満糖尿病モデルマウス(KKAy mouse)に摂取させ、膵島含有リン脂質組成の変化を検討した。両群ともに膵島含有リン脂質組成の変化が認められ、その傾向は過食モデルである KKAy mouse で顕著であった。

また、高脂肪食負荷におけるインスリン分泌および体脂肪組成変化に関する消化管ホルモン(インクレチン)の関与に関して検討を行った<sup>6)</sup>。食後の血糖調節およびインスリン分泌に重要な消化管ホルモンである GLP-1 シグナルを欠損させたモデルマウス;GLP-1 遺伝子欠損マウスを用いた検討で、同マウスでは対照(野生型マウス)に比べ糖負荷後のインスリン分泌は低下し、高脂肪食摂食下において体脂肪率の上昇を認め<sup>6)</sup>、高脂肪食摂食時の体組成および体脂肪率の変化にインクレチンが関与していることを検証した。

## § 4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

- 1) Niimura M, Miki T, Shibasaki T, Fujimoto W, Iwanaga T, Seino S. Critical role of the N-terminal cyclic AMP-binding domain of Epac2 in its subcellular localization and function. *J Cell Physiol* 219:652-658, 2009. DOI: 10.1002/jcp.21709
- 2) Sugawara K, Shibasaki T, Mizoguchi A, Saito T, Seino S. Rab11 and its effector Rip11 participate in regulation of Insulin granule exocytosis. *Genes to Cells* 14:445-465, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-2443.2009.01285.x
- 3) Fujimoto W, Miki T, Ogura T, Zhang M, Seino Y, Satin LS, Nakaya H, Seino S. Niflumic acid-sensitive ion channels play an important role in the induction of glucose-stimulated

insulin secretion by cyclic AMP in mice. *Diabetologia* 52:863-872, 2009. DOI: 10.1007/s00125-009-1306-y

- 4) Zhang CL, Katoh M, Shibasaki T, Minami K, Sunaga Y, Takahashi H, Yokoi N, Iwasaki M, Miki T, Seino S. The cAMP sensor Epac2 is a direct target of antidiabetic sulfonylurea drugs. *Science* 325:607-610, 2009. DOI: 10.1126/science.1172256
- 5) Seino S, Takahashi H, Fujimoto W, and Shibasaki T. Roles of cAMP signalling in insulin granule exocytosis. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 11:180-188, 2009. DOI: 10.1111/j.1463-1326.2009.01108.x
- 6) Liu X, Harada N, Yamane S, Kitajima L, Uchida S, Hamasaki A, Mukai E, Toyoda K, Yamada C, Yamada Y, Seino Y, Inagaki N. Effects of long-term dipeptidyl peptidase-IV inhibition on body composition and glucose tolerance in high fat diet-fed mice. *Life Sci* 84:876-881, 2009. DOI: 10.1016/j.lfs.2009.03.022
- 7) Seino S, Zhang CL, Shibasaki T. Sulfonylurea action re-revisited. *J Diabet Invest* in press. DOI: 10.1111/j.2040-1124.2010.00014.x
- 8) Iwasaki M, Minami K, Shibasaki T, Miki T, Miyazaki J-I, and Seino S. Establishment of new clonal pancreatic  $\beta$ -cell lines (MIN6-K) useful for study of incretin/cAMP signaling. *J Diabet Invest* in press. DOI: 未定

#### (4-2) 知財出願

① 平成21年度特許出願件数(国内 1件)

② CREST 研究期間累積件数(国内 1件)