

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

日本臨床 (2011.05) 69巻5号:808～812.

【インクレチン関連薬 糖尿病治療のパラダイムシフト】
インクレチンの基礎・臨床研究の進歩
インクレチンのインスリン分泌促進作用の分子メカニズム

藤田征弘, 羽田勝計

インクレチンのインスリン分泌促進作用の分子メカニズム

Molecular mechanism of insulin secretion facilitated by incretin.

藤田征弘 羽田勝計

旭川医科大学 内科学講座 病態代謝内科学分野

YUKIHIRO FUJITA, MASAKAZU HANEDA

Division of Metabolism and Biosystemic Science, Department of Internal
Medicine, Asahikawa Medical University

Key words;

cAMP, PKA, Epac2

Abstract

Incretins, such as GIP and GLP-1 enhance insulin secretion from pancreatic β cells in a glucose dependent manner. Incretins potentiate adenylate cyclase activity through their G-protein coupled receptors and then increase intracellular cAMP level. Intracellular cAMP modulates insulin secretion by both PKA-dependent and PKA-independent pathways. PKA potentiates intracellular Ca^+ influx via phosphorylation of voltage dependent calcium channel (VDCC), which increases insulin exocytosis. PKA also phosphorylates K_{ATP} channel and facilitates insulin release. In contrast, Epac2 potentiates insulin secretion by cAMP in a PKA-independent pathway. The small G-protein Rap1, which is activated specifically through Epac2, contributes the first phase of insulin secretion possibly by control of insulin granules fusion to plasma membrane.

はじめに

GIP(Glucose-dependent insulintropic polypeptide)と GLP-1 (Glucagon-like peptide-1)は主として小腸から分泌される腸管ホルモンで、食事由来の糖や脂質により主として小腸の K 細胞(GIP)と L 細胞(GLP-1)から門脈血中に分泌される。GIP と GLP-1 は、膵β細胞からそれぞれの G 蛋白質共役受容体を介して細胞内の cAMP 濃度を上昇させて、血糖依存性にインスリンの分泌を促進する。本稿では、GIP と GLP-1 のインスリン分泌促進の機序について概説する。

1. GIP 受容体、GLP-1 受容体とインスリン分泌

活性型 GIP と活性型 GLP-1 はそれぞれ膵臓ランゲルハンス島のβ細胞の膜上に存在するそれぞれの 7 回膜貫通型の G 蛋白質共役受容体に結合する。GIP 受容体を欠損するマウスやでは野生型マウスに比較して糖負荷や食事負荷時でのインスリン分泌が低下している。また、ヒトのゲノムワイド解析で、GIP 受容体のプロモーター領域の SNP がインスリン分泌の低下に関係していることが明らかになった(1)。さらに、膵β細胞特異的 dominant negative GIP 受容体を発現したブタでは年齢を経るごとにβ細胞領域が縮小し、インスリン分泌が低下することが報告されている(2)。

一方、GLP-1 受容体欠損マウスでも空腹時血糖の上昇と糖負荷後のインスリン分泌に低下を認めている。興味深いことにインクレチン受容体のダブルノックアウト(DIRKO)マウスは、それぞれの単独欠損マウスに比較して、さらにブドウ糖負荷後のインスリン分泌の低下を認めている。このことは、GIP と GLP-1 がインクレチンとして相加的にβ細胞に働き、インスリン分泌を促していることが示唆している(3)。

2. 惹起経路と増幅経路

GIPやGLP-1が発見された当初にインスリン分泌促進効果に対する生理学的な検討がなされ、そのインスリン分泌促進効果はある一定濃度の血糖濃度以上でのみで認めた。一方、血糖値が低いとき(4mM以下)にはインスリン分泌を促進しないことが明らかになっている。

膵β細胞でのインスリンの分泌機構には惹起経路と増幅経路が想定されている。惹起経路では、まずグルコースが細胞膜上の糖輸送担 glucose transporter2 (GLUT2 または solute carrier family 2 (SLC2A2))を介して細胞内に取り込まれることから始まる。GLUT2 はグルコースへの親和性が低いためグルコースセンサーとして働いている。細胞内に流入したグルコースは、解糖系およびTCAサイクルを經由して代謝され、ADPからATPが産生され、細胞内ATP/ADP比が上昇する。細胞膜上にある K_{ATP} チャネルが閉鎖されるため、 K^+ が細胞外へのeffluxが停止し細胞膜が脱分極し、電位依存型 Ca^{2+} チャネル(voltage-dependent Ca^{2+} Channel (VDCC))が開く。その結果、

細胞内Ca²⁺濃度が上昇しインスリン顆粒が開口分泌される。この過程がインスリン分泌の惹起経路である。一方インクレチンの作用は、糖依存性に引き起こされた（惹起された）インスリン分泌を増幅する（増幅経路）。GIP受容体およびGLP-1受容体はG蛋白質共役受容体で、3量体GTP結合蛋白G_sαβγと共役してアデニル酸シクラーゼ(adenylate cyclase (AC))を活性化させ細胞内cAMP濃度を上昇させる。上昇した細胞内cAMPは、主にPKA (protein kinase A) 依存性の経路と非依存性の経路でインスリン分泌を促進させる。ACを阻害すると、GIPやGLP-1によるcAMP産生は抑制され、糖によるインスリン分泌促進効果は消失する(4)。図1

1. PKA 依存性経路

インクレチンが受容体に結合し細胞内のcAMP濃度が上昇すると、プロテインキナーA (protein kinase A ; PKA)が活性化される。PKAはβ細胞内の種々の蛋白をリン酸化することでインスリン分泌を増強する方向へ働く。その代表がVDCCで、リン酸化より細胞外からのCa²⁺の流入を増幅させる(5)。その結果、細胞質内Ca²⁺濃度が上昇しインスリンの開口分泌が促進される。

図1

また、PKAはK_{ATP}チャネルのKir6.2とSUR1をそれぞれリン酸化し、インスリン分泌を促進させる(6)。PKAはCREB(cAMP responsive element-binding protein)をリン酸化するが、その結果IRS-2、Aktを介して転写因子PDX-1(pancreatic duodenal homeobox-1)を活性化させる。PDX-1はインスリン遺伝子やグルコキナーゼ遺伝子の転写を調節し、またβ細胞の増殖・分化を促進することが知られている。したがってこの経路の活性化は、インスリンの細胞内のプールの増加に寄与している。

PKAはさらに電位依存性 K⁺ (Kv) チャネルを閉鎖することで、脱分極を延長させインスリン分泌を促進させるが(7)、この作用にはPI3 kinase/PKCζ系も同時にかかわっている。

インスリンの開口分泌にかかわる蛋白質のうち PKA でリン酸化されるものも報告されている。PKA によるリン酸化が分泌の律速にかかわっている可能性があり、一部インクレチンの作用を説明しうるかもしれない。

2. PKA 非依存性経路

PKA 非依存性のインスリン分泌促進効果には、cAMP に結合蛋白である Epac2 (exchange protein activated by cAMP、または cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II; cAMP-GEF II)が関与している(8)。Epac には Epac1 と Epac2 のアイソフォームがあるが、前者が広範な臓器に発現しているのに対し、後者は神経細胞や内分泌細胞に発現している。膵β細胞では、Epac2 のスプライスバリエントのうち Epac2A が発現している。Epac1 がインスリン分

泌にかかわっている報告もあるが、インスリン分泌に対する割合は Epac2 ほどではない。cAMP の非存在下では、Epac2 は折れ曲がることで閉鎖型になり、グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) が露出できず、その活性が阻害されている。インクレチンが受容体に結合しアデニル酸シクラーゼが活性化され、β細胞内で cAMP 濃度が上昇すると、N 末端側にある 2 つの cAMP 結合ドメインに結合し Epac2 は開放型となり、GEF (guanine nucleotide exchange factor) が露出され、small G 蛋白 Rap1(Ras-related protein 1)を GDP 型 (非活性型) から GTP 型 (活性化) へ変換する(9)。Rap1 は分泌顆粒に存在することから、分泌顆粒の細胞膜へ融合を制御しインスリン分泌を調節しているものと考えられる(10)。図 2

実際、膵β細胞株で Rap1 の発現を siRNA で低下させると、8-Br-cAMP によるインスリン分泌効果を減弱させる。また、Rap1 特異的不活性化蛋白をマウス単離膵島で発現させるとインスリン分泌促進効果が減弱する(10)。Epac2A 欠損マウスから単離した膵β細胞において、グルコース単独刺激に対するインスリン分泌は野生型β細胞と変わらないが、グルコースと 8-bromo cAMP 共刺激によりインスリン分泌の第 1 相が障害されることから、Epac2/Rap1 は第 1 相にかかわっていると考えられる(10)。実際 2 型糖尿病患者では、6 週間持続で GLP-1 を投与すると、グルコースに対するインスリン分泌の第 1 相の改善と最大インスリン分泌能の改善を認めている(11)。

一方、cAMPは小胞体のリアノジン受容体へ働き、小胞体から細胞質へのCa²⁺の移行を促進することが知られているが(12)、この機構はPKA非依存性でEpac2を必要とする(13)。

最近 Epac2 にグリグラシド以外のスルホニル尿素(SU)剤が結合し、インスリン分泌を惹起することが明らかになっており、インクレチンと SU 剤の共通のターゲット分子として注目を受けている(14)。また、Mukai らは GLP-1 受容体作動薬の exendin-4 により、膵β細胞内での ROS (Reactive oxygen species) 産生抑制と ATP 産生改善することでβ細胞機能の改善を糖尿病モデルの GK ラットで認めており、GLP-1 受容体を介する Src の抑制が、Epac2 依存性であることを明らかにしている(15)。

そのほか、インクレチンにより PKA 非依存性に活性化された Epac2 は Rap1 とは別に、Rim2 と complex を形成し、small G 蛋白 Rab3 を介するインスリンの開口分泌にかかわっている(4)。

3. GIP と GLP-1 によるインスリン分泌作用は協同的か

前述のように、DIRKOマウスはそれぞれGIP受容体欠損またGLP-1 受容体欠損マウスと比較して、経口のグルコース負荷に対してインスリン分泌がより低下している(3)。したがって、GIP と GLP-1 のインクレチン作用は相加的と言える。GIPとGLP-1 のインスリン分泌促進の機序は、ほぼ同じであるが、若干の差異も指摘されている。K_{ATP}チャネル欠損(Kir6.2^{-/-})マウスでは、グ

ルコース応答性のインスリン分泌が障害されているが、GLP-1 はグルコース応答性を部分的に誘導するのにに対しGIPではこの効果を見ない。このことはGIP が K_{ATP} チャネル依存性にのみインスリン分泌を促進するのにに対し、GLP-1 は K_{ATP} チャネル非依存性にも糖依存性のインスリン分泌を促進し得ることを示唆している(16)。つまり、 K_{ATP} チャネル依存性のインスリン分泌は、GIP とGLP-1 は協同的に働くが、 K_{ATP} チャネル非依存性のインスリン分泌はGLP-1 のみの働きである可能性が高い。

4. 膵 α 細胞の GIP によるインスリン分泌促進作用

Fujitaらは、膵 α 細胞にPC 2 によりプロセッシングを受けるC端を欠損したshort-form GIP (GIP₁₋₃₀)が発現していることを明らかにした(17)。このshort-form GIPは通常のGIPとほぼ同じインスリン分泌能をもつこと、また中和抗体や受容体に対する抗体を用いた検討からパラクリンで β 細胞からのインスリン分泌促進にかかわっていることが示されている。

おわりに

インクレチンによるインスリン分泌機構のメカニズムはかなり明らかにされてきたが、まだ不明な点も残されている。実際臨床でインクレチン関連薬が使われは初めており、インクレチン膵外作用を含め、今後インクレチン研究が発展し詳細な機序の解明が期待されている。

文献

1. Saxena R et al. Genetic variation in GIPR influences the glucose and insulin responses to an oral glucose challenge. *Nat Genet.* 2010 Feb;42(2):142-8.
2. Renner S et al. Glucose intolerance and reduced proliferation of pancreatic beta-cells in transgenic pigs with impaired glucose-dependent insulinotropic polypeptide function. *Diabetes.* 2010 May;59(5):1228-38.
3. Hansotia T et al. Double incretin receptor knockout (DIRKO) mice reveal an essential role for the enteroinsular axis in transducing the glucoregulatory actions of DPP-IV inhibitors. *Diabetes.* 2004 May;53(5):1326-35.
4. Kashima Y et al. Critical role of cAMP-GEFII--Rim2 complex in incretin-potentiated insulin secretion. *J Biol Chem.* 2001 Dec 7;276(49):46046-53.
5. Safayhi H et al. L-type calcium channels in insulin-secreting cells: biochemical characterization and phosphorylation in RINm5F cells. *Mol Endocrinol.* 1997 May;11(5):619-29.
6. Beguin P et al. PKA-mediated phosphorylation of the human K(ATP) channel: separate roles of Kir6.2 and SUR1 subunit phosphorylation. *EMBO J.* 1999 Sep 1;18(17):4722-32.
7. MacDonald PE et al. Antagonism of rat beta-cell voltage-dependent K⁺ currents by exendin 4 requires dual activation of the cAMP/protein kinase A and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathways. *J Biol Chem.* 2003 Dec 26;278(52):52446-53.
8. Ozaki N et al. cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nat Cell Biol.* 2000 Nov;2(11):805-11.
9. Rehmann H, et al. Structure of the cyclic-AMP-responsive exchange factor Epac2 in its auto-inhibited state. *Nature.* 2006 Feb 2;439(7076):625-8.
10. Shibasaki T et al. Essential role of Epac2/Rap1 signaling in regulation of insulin granule dynamics by cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Dec 4;104(49):19333-8.
11. Zander M et al. Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *Lancet.* 2002 Mar 9;359(9309):824-30.
12. Islam MS et al. In situ activation of the type 2 ryanodine receptor in pancreatic beta cells requires cAMP-dependent phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 May 26;95(11):6145-50.
13. Kang G et al. cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II (Epac2) mediates Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in INS-1 pancreatic beta-cells. *J Physiol.* 2001 Oct 15;536(Pt 2):375-85.
14. Zhang CL et al. The cAMP sensor Epac2 is a direct target of antidiabetic sulfonylurea drugs. *Science.* 2009 Jul 31;325(5940):607-10.
15. Mukai E et al. Exendin-4 suppresses Src activation and reactive oxygen species production in diabetic GK rat islets

in an Epac-dependent manner. *Diabetes*. 2010 Oct 26.

16. Miki T et al. Distinct effects of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-1 on insulin secretion and gut motility. *Diabetes*. 2005 Apr;54(4):1056-63.

17. Fujita Y et al. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is expressed in pancreatic islet alpha-cells and promotes insulin secretion. *Gastroenterology*. 2010 May;138(5):1966-75.



