



G-protein-coupled receptor 40 agonist GW9508 potentiates glucose-stimulated insulin secretion through activation of protein kinase C α and ϵ in INS-1 cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2020-04-06 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 橋本, 卓也 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00003692

博士 (医学) 橋本 卓也

論文題目

G-protein-coupled receptor 40 agonist GW9508 potentiates glucose-stimulated insulin secretion through activation of protein kinase $C\alpha$ and ϵ in INS-1 cells

(G タンパク質共益型受容体 40 作動薬である GW9508 は INS-1 細胞においてプロテインキナーゼ $C\alpha$ および ϵ の活性化を介してグルコース刺激性インスリン分泌を増強する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

2 型糖尿病の発症、治療戦略においてインスリン分泌機構の解明は重要な課題である。中～長鎖脂肪酸をリガンドとする G タンパク質共益型受容体 40(GPR40) は、膵 β 細胞に高率に発現しており、グルコース刺激性インスリン分泌を増強させることが知られており、2 型糖尿病患者における新規の治療介入として期待されている。GPR40 シグナルは、理論上プロテインキナーゼ C(PKC)を活性化させるが、その PKC 活性化がグルコース刺激性インスリン分泌にどのように関わっているかは不明である。我々は GPR40 作動薬である GW9508 が、インスリン分泌培養細胞である INS-1 細胞において、従来型 PKC と新型 PKC をどのように活性化させるかを低濃度、および高濃度グルコース下で検討した。

[材料ならびに方法]

蛍光顕微鏡を用いて、細胞内カルシウム濃度変化の指標となる Fura2 と、PKC の活性化指標である MARCKS-GFP の蛍光強度変化を、3 mM グルコースと 20 mM グルコース条件下で 5 分毎に同時観察した。従来型 PKC である PKC α と新規型 PKC である PKC ϵ の活性化を評価するために、全反射顕微鏡を用いて、PKC α -GFP と PKC ϵ -GFP の細胞膜における蛍光強度変化を 5 分毎に観察した。PKC α および PKC ϵ の阻害剤として、細胞膜透過性をもつアンテナペディアと、それぞれの PKC の偽基質を融合したペプチドを合成した。インスリン分泌における GW9508、および阻害剤の影響を評価するため、static incubation 法を用いてインスリン分泌実験を行い、得られた試料から酵素結合免疫吸着検査(ELISA)法にてインスリン濃度を測定した。

[結果]

3 mM グルコース条件下では、GW9508 は MARCKS-GFP の細胞質への移行を持続的に誘導し、細胞内カルシウム濃度($[Ca^{2+}]_i$)変化とは一致しない動態を示した。一方で 20 mM グルコース条件下では、GW9508 は MARCKS-GFP の持続的な移行だけでなく、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に伴った一過性の細胞質移行を誘導した。評価した全 INS-1 細胞で $[Ca^{2+}]_i$ の上昇度と MARCKS-GFP の蛍光強度変化の相関を調べたところ、3 mM グルコース条件下よりも 20 mM グルコース条件下の方が、 $[Ca^{2+}]_i$

上昇と MARCKS-GFP 蛍光強度変化との相関が強かった。20 mM グルコース、およびカルシウムチャネル阻害剤であるニフェジピンの存在下で、GW9508 は MARCKS-GFP の持続的な移行を誘導したが、一過性の移行は減弱した。PKC isoform レベルでの検討において、3 mM グルコース条件下では、GW9508 を添加しても PKC α の細胞膜への移行はほとんどみられなかったが、PKC ϵ の移行は GW9508 により持続的に誘導された。20 mM グルコース条件下では、GW9508 は PKC α を一過性に移行させ、また PKC ϵ の持続的な移行と共に、一過性の PKC ϵ の移行も誘導した。3 mM グルコース条件下において、GW9508 はインスリン分泌を増強させなかったが、20 mM グルコース下においてのみインスリン分泌を増強させた。20 mM グルコース条件下で PKC α 、PKC ϵ の阻害剤を GW9508 と共に添加すると、GW9508 により増強されたインスリン分泌はいずれの阻害剤においても減弱し、その効果は PKC ϵ の阻害剤でより強力であった。

[考察]

低グルコース濃度下では、GW9508 は $[Ca^{2+}]_i$ 変化とは関係なく、主に PKC ϵ を持続的に活性化させていた。一方で高グルコース濃度下では、GW9508 は $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に伴った PKC α 、PKC ϵ の一過性活性化を誘導した。そして GW9508 によるグルコース刺激性インスリン分泌の増強効果はいずれの PKC 阻害剤によっても減弱し、特に PKC ϵ 阻害剤においてより減弱した。以上の結果より、GW9508 は PKC ϵ を直接的に活性化させていること、また PKC α や PKC ϵ の一過性の活性化がインスリン分泌に関与していることが示唆された。一般に、GPR40 作動薬はホスホリパーゼ C(PLC)を活性化させ、ホスファチジルイノシトール三リン酸からイノシトール三リン酸(IP $_3$)とジアシルグリセロール(DAG)を産生する。低グルコース濃度下において、GW9508 により産生された IP $_3$ ・DAG は PKC α を活性化させるのに不十分であったが、DAG は PKC ϵ の活性化に十分な量が産生されていたことが示唆された。一方で高グルコース濃度下においては、グルコース代謝により産生されたアデノシン三リン酸(ATP)により、ATP 感受性カリウムチャネル(K $_{ATP}$ チャネル)の閉鎖による脱分極を介し、電位依存性カルシウムチャネル(VDCC)から流入される Ca $^{2+}$ が、PKC α を活性化させていることが示唆された。また、PKC ϵ の一過性活性化は、VDCC から流入される Ca $^{2+}$ が PLC を活性化させることで、DAG を産生させている可能性が考えられた。

[結論]

低グルコース濃度下においては、GW9508 は PKC α の活性化を誘導せず、PKC ϵ のみを活性化させたが、そのみではインスリン分泌の増強には繋がらなかった。一方で高グルコース濃度下においては、GW9508 により PKC α と PKC ϵ が共に活性化され、インスリン分泌の増強に関連し、両者の同時活性化が GPR40 作動薬によるインスリン分泌増強効果に重要であることが示された。