

令和元年6月11日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16145

研究課題名(和文)膵細胞におけるプロスタシンの生理的機能の解析

研究課題名(英文)Analysis of the physiological function of prostaticin in pancreatic beta cells

研究代表者

一條 昌志 (Masashi, ICHIJO)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：50436854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膵細胞特異的プロスタシンKOマウス(KO)においては、グルコース負荷試験において血糖値が有意に高いことを我々の研究において認めた。マウス膵細胞株(MIN6)において、プロスタシンをノックダウンし、カルシウムイメージング法を行ったところ高グルコース濃度下におけるCa²⁺の取り込み低下を認めた。マウス膵細胞での免疫電顕を行ったところ、プロスタシンがインスリン分泌顆粒膜状に発現していることを認めた。以上より、プロスタシンが膵細胞におけるインスリン分泌において重要な役割を働いていることが本研究により強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵細胞におけるインスリン分泌において、プロスタシンが重要な役割を働いていることが本研究により示唆された。インスリン分泌に関わる新たなメカニズムの発見であり、本研究結果が糖尿病に関する新たな病態の解明や、新規薬剤の開発に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In pancreatic beta cell-specific prostaticin KO mice (KO), we found in our studies that blood glucose levels were significantly higher in the glucose tolerance test. In MIN6 in which prostaticin was knocked down, Ca²⁺ uptake was reduced at high glucose concentration. Immunoelectron microscopic examination of mouse pancreatic cells revealed that prostaticin was expressed in the form of insulin secretory granules. From the above, it is strongly suggested by this study that prostaticin plays an important role in insulin secretion in pancreatic cells.

研究分野：代謝内分泌

キーワード：糖尿病 膵細胞 インスリン分泌

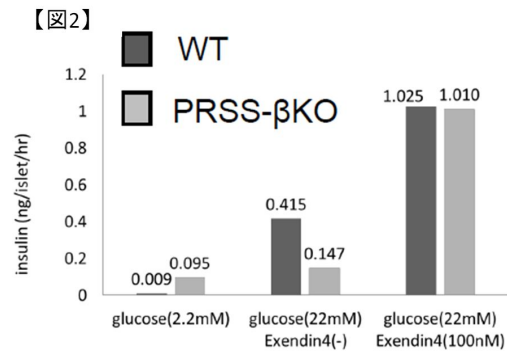
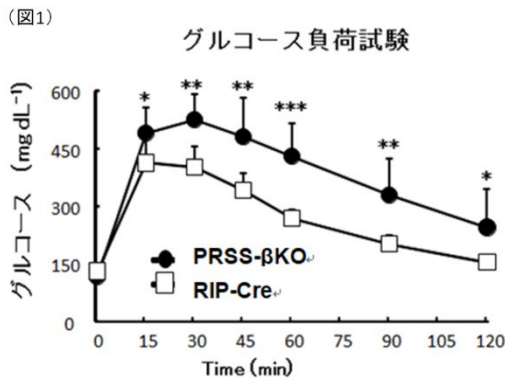
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ロスタシンはENaCの活性化にかかわるセリンプロテアーゼの一種であり、上皮型Naチャンネル(ENaC)を活性化し、生体内のNa代謝に大きく関与していることが報告されている(Am J Physiol Renal Physiol. 2012)。さらに、プロスタシンの新たな生理的機能としてTLR4の切断による発現制御を介して肝臓におけるインスリン抵抗性を調節することで、飽食・肥満による糖尿病発症に肝臓のプロスタシン発現量低下が関与していることを明らかにした(Nature Communications. 2014)。予備実験において、実際の糖尿病患者の肝臓においてもプロスタシンの発現が低下し、相対的にTLR4の発現が増加している実験結果が得られている。

プロスタシンは全身臓器に発現が認められているものの、上記ENaCやTLR4を標的にしている以外に他臓器での報告は少ない。膵臓においてもプロスタシンの発現は認められているが、その作用についてはこれまで解明されていない。膵臓におけるプロスタシンの機能的な役割を解明するにあたり、まずは膵細胞でのインスリン分泌への関与について注目した。当教室では膵細胞特異的プロスタシンノックアウトマウス(PRSS-KO)を作成済みであり、同マウスを用いた実験を中心に、プロスタシンに関して次のような予備的な研究結果を得ている。膵細胞特異的プロスタシンKOマウス(PRSS-KO)では、グルコースの腹腔内注射(IPGTT)においてコントロールマウス(RIP-Cre)と比較して、血糖が有意に高いことが認められた(図1)。また、PRSS-KOの単離膵島を用いた検討では、high glucose(22mM)に対するインスリン分泌反応が低下しており、GLP-1受容体作動薬であるExendin-4を同時に投与するとインスリン分泌がコントロールマウスと同程度まで改善する結果が得られている(図2)。

また、マウス膵細胞株においてshRNAを用いてプロスタシンをノックダウンすると、インスリン分泌顆粒の開放放出に必要なSNARE(syntaxin 1A, SNAP25)の発現が蛋白レベルで低下していることが認められた。これらの結果から、プロスタシンは膵細胞でのインスリン分泌に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。



2. 研究の目的

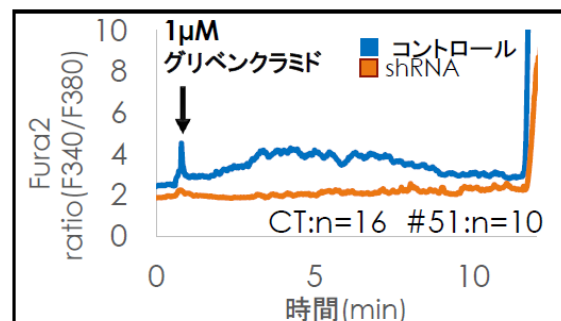
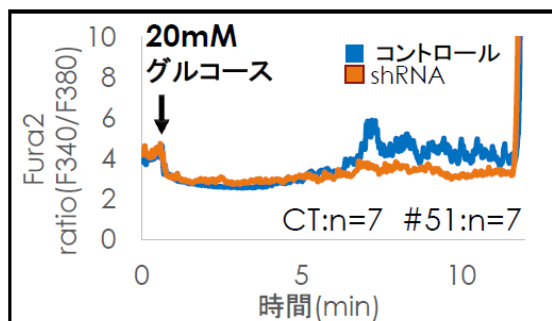
膵細胞でのプロスタシンの働きを解明し、2型糖尿病に対する新しい治療法開発の分子基盤を構築することである。

3. 研究の方法

- (1) マウス膵細胞株(MIN6)において、shRNAを用いてプロスタシンをノックダウンし、カルシウムイメージング法を行う。
- (2) マウス膵細胞でのプロスタシンの免疫電顕を行う。

4. 研究成果

(1) マウス膵細胞株(MIN6)において、shRNAを用いてプロスタシンをノックダウンし、カルシウムイメージング法を行ったところ高グルコース濃度下におけるCa²⁺の取り込み低下を認めた。また、グリベンクラミド投与下においても、Ca²⁺の取り込み低下を認めた。

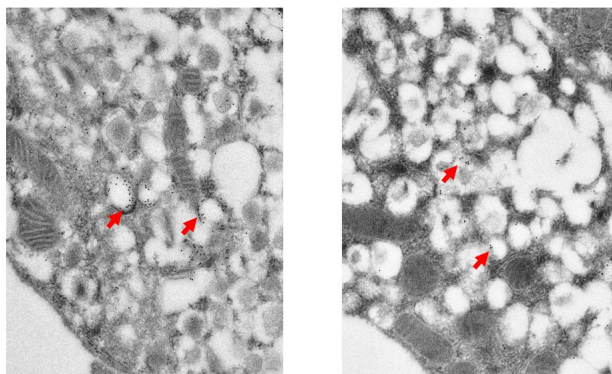


以上から、膵細胞でのプロスタシンの役割として、Caチャネルの制御に関わっていることが予想された。しかしながら、膵細胞のCaチャネルにおいて、プロスタシンの分子的な作用機序に関しては、今回は明らかにはできなかった。

(2) マウス膵細胞での免疫電顕を行ったところ、プロスタシンが膵細胞のインスリン分泌顆粒上に発現していた。

免疫電顕結果

Prostasinはインスリン顆粒膜上に発現している



Control (RIP/Cre)

膵β細胞Prostasin KO (BKO)

我々はこれまでに、プロスタシンノックダウン MIN6 においてインスリン分泌顆粒の開放に必要な SNARE の発現が低下していることを認めており、上記結果とあわせて、SNARE 蛋白とプロスタシンが関連していることが示唆された。

SNARE 蛋白によって Ca チャネルが制御されている (Mol Biol cell. 2016) ことも報告されており、膵細胞においてプロスタシンは、SNARE 蛋白の発現制御することでインスリン分泌を促進することが推察された

以上より、プロスタシンが膵細胞におけるインスリン分泌において重要な役割を働いていることが本研究により強く示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

2018年 第23回 日本病態プロテアーゼ学会 年次集会 プロスタシンによる膵細胞インスリン分泌の制御

(発表者名 石井俊史 共同演者 一條昌志、古屋文彦、北村健一郎)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：北村健一郎

ローマ字氏名：KITAMURA, Kenichiro

所属研究機関名：山梨大学

部局名：大学院総合研究部

職名：教授

研究者番号(8桁): 10304990

研究分担者氏名：古屋文彦

ローマ字氏名：FURUYA, Fumihiko

所属研究機関名：山梨大学

部局名：大学院総合研究部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：90456450

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。