

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08977

研究課題名(和文)炭酸脱水酵素5 (Car8)によるGLP-1分泌制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the regulatory mechanism of GLP-1 secretion by carbonic anhydrase 8 (Car8)

研究代表者

山根 俊介 (Yamane, Shunsuke)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90582156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：単離L細胞におけるCar8遺伝子発現は非L細胞に比較して有意に高値であり、マウス下部小腸免疫染色でもL細胞でのCAR8発現を確認した。長鎖脂肪酸刺激によるSTC-1細胞からのGLP-1分泌は、Car8の発現抑制により増強、過剰発現によって低下した。さらに、 $\alpha$ -リノレン酸刺激時STC-1細胞内カルシウム濃度の上昇はCar8発現の抑制により増加した。CAR8機能欠失型変異マウスの経口糖負荷時GLP-1分泌は野生型マウスと同等であったが、コーン油投与時GLP-1分泌は野生型マウスに比べて有意に高値であった。以上の結果からCAR8は長鎖脂肪酸誘導性GLP-1分泌の制御に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Car8を介したGLP-1分泌制御機構を明らかにすることにより、内因性GLP-1分泌を増強する薬剤の開発につながる可能性があり、糖尿病治療の新たな標的となりうると考えている。L細胞が標識されたマウスや、単離腸管内分泌細胞の確立した解析技術を併せ持つ研究室は世界的に見ても限られており、また中枢神経系以外の細胞・組織におけるCar8の発現・機能に関しては全く報告がなく、本研究の独自性は極めて高いといえる。さらに本研究での解析手法や知見が、他の腸管内分泌ホルモンの分泌・作用機構も含めた腸管内分泌システムの統合的理解への端緒となりうるため、より広い領域への波及効果も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Car8 gene expression in isolated L cells was significantly higher than in non-L cells, and immunostaining of mouse lower small intestine also confirmed Car8 expression in L cells. GLP-1 secretion from STC-1 cells upon stimulation with LCFA s was enhanced by suppression of Car8 expression and decreased by overexpression. Furthermore, the increase in intracellular calcium concentration in STC-1 cells upon  $\alpha$ -linolenic acid stimulation was increased by suppression of Car8 expression. GLP-1 secretion in mutant mice lacking CAR8 function was similar to that of wild-type mice upon oral glucose loading, but GLP-1 secretion upon corn oil administration was significantly higher than that of wild-type mice. These results suggest that CAR8 is involved in the regulation of LCFA-induced GLP-1 secretion.

研究分野：インクレチン研究

キーワード：インクレチン分泌 GLP-1 CAR8

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

インクレチンは、経口の栄養摂取に伴い腸管内分泌細胞から分泌され、膵細胞に発現する受容体に結合することでインスリン分泌を増強する腸管ホルモンであり、インクレチンとしては glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) と glucagon-like peptide-1 (GLP-1) が知られている。インクレチンは血糖依存性に(高血糖時にのみ)インスリン分泌を増強し、さらに GLP-1 に関しては膵細胞保護作用(Yamane S, et al. J Diabetes Invest. 2011)、食欲抑制作用、グルカゴン分泌抑制作用など、血糖降下に有利に働く多面的な生理活性を有することが報告されている。現在すでに、インクレチンの分解酵素である dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4) の効果を減弱することで、インクレチン作用を増強する薬剤が糖尿病治療に広く用いられているが、内因性のインクレチン分泌を刺激する薬剤はいまだ開発されていない。糖尿病患者においては GLP-1 分泌が低下している、との報告もあり、GLP-1 分泌機序を解明し、GLP-1 の内因性分泌を刺激する薬剤が開発できれば、肥満・糖尿病治療薬としての有用性が期待される。GLP-1 は下部小腸および大腸に多く分布する腸管内分泌 L 細胞から産生されることが知られており、GLP-1 分泌機序を解明するためには L 細胞の単離が必須であるが、そのために必要な L 細胞標識モデル動物および L 細胞の単離技術、解析手法を有する研究室は世界的にも限られており、GLP-1 分泌機構に関しては未解明の部分が多く残されている。申請者らは L 細胞が蛍光タンパクで標識されたマウスの腸管から L 細胞を単離し網羅的遺伝子解析を行うことで、L 細胞で高い発現を示す遺伝子の一つとして炭酸脱水酵素 8 (carbonic anhydrase 8; Car8) を同定した。中枢神経系においては、Car8 がイノシトール 1,4,5-三リン酸受容体 (Inositol trisphosphate receptor; IP3R) を介した小胞体からのカルシウム流出を負に制御することが報告されているが、他の細胞、組織における発現や機能に関しては報告がない。

### 2. 研究の目的

本研究は、炭酸脱水酵素 8 (carbonic anhydrase 8; Car8) の GLP-1 分泌における機能の解析を目的とする。申請者らはこれまで、インクレチンのひとつである GIP の産生・分泌機序に関する研究を行ってきた。green fluorescent protein (GFP) を GIP 遺伝子部位に挿入した GIP-GFP ノックインマウスを作製し、GIP を産生する腸管内分泌細胞である K 細胞の可視化と単離を可能にした。すでにこのマウスを用いて K 細胞を単離し、発現する GPCR や転写因子、脂肪酸輸送タンパクなど複数の分子が GIP の産生・分泌に関与していることを明らかにしており、この分野における申請者グループの寄与は非常に大きい(Suzuki K, et al. J Biol Chem 2013)(Iwasaki K, et al. Endocrinology. 2015)(Shibue K, et al. Am J Physiol Endocrinol Metab 2015)(Ikeguchi E, et al. Am J. Physiol Gastrointest Liver Physiol.2018)。一方 GLP-1 に関しても、名古屋大学の林良敬准教授との共同研究により、グルカゴン(Gcg) 遺伝子に GFP をノックインした L 細胞可視化マウス (gcg-GFP ノックインマウス) を用いて L 細胞の単離にも成功している(Suzuki K, et al. J Diabetes Investig. 2017)。さらに単離 L 細胞の網羅的遺伝子発現解析の結果、L 細胞において特徴的に発現の高い分子を複数同定しており、その中で、中枢神経系において IP3 受容体を介した小胞体からのカルシウム流出制御に関わることが報告されている分子 Car8 について着目した。Car8 を介した GLP-1 分泌制御機構を明らかにすることにより、内因性 GLP-1 分泌を増強する薬剤の開発につながる可能性があり、糖尿病治療の新たな標的となりうると考えている。

### 3. 研究の方法

- (1) CAR8 の局在に関して、単離 L 細胞の RT-PCR および Gcg<sup>gfp/+</sup>下部小腸の免疫組織学的検討を行う
- (2) 腸管内分泌細胞株 STC-1 を用いて、各種分泌刺激に対する GLP-1 分泌を、siRNA を用いた Car8 発現抑制下および発現ベクター導入による過剰発現下で評価する。
- (3) Car8 による STC-1 細胞内カルシウム濃度制御の評価  
中枢神経系と同様、IP3R を介した小胞体からのカルシウム流出制御により、Car8 が L 細胞内においても細胞内カルシウム濃度の増減調節に関与している可能性があり、STC-1 を用いて、Car8 のノックダウン、過剰発現時の細胞内カルシウム濃度を蛍光プローブ Fura2 を用いて測定する。
- (4) GLP-1 分泌における Car8 の関与(in vivo での検討)  
Car8 欠損マウス(ジャクソン研究所から購入)を用いて、経口糖負荷、脂肪摂取時の血糖値、血中インスリン値、GLP-1 分泌を測定し、野生型マウスと比較する。

### 4. 研究成果

(1) CAR8 の局在に関して、単離 L 細胞の RT-PCR および  $Gcg^{flp/+}$  下部小腸の免疫組織学的検討を行った。RT-PCR では L 細胞における Car8 発現は非 L 細胞に比較して有意に高値であり、免疫染色でも  $Gcg^{flp/+}$  マウス下部小腸では GFP と CAR8 が共染することを確認した。

(2) 腸管内分泌細胞株 STC-1 細胞を用いて、各種分泌刺激に対する GLP-1 分泌を、siRNA を用いた Car8 発現抑制下および発現ベクター導入による過剰発現下で評価した。その結果、リノール酸や  $\alpha$ -リノレン酸といった長鎖脂肪酸刺激による STC-1 細胞からの GLP-1 分泌は、Car8 の発現抑制により増強 (図 1)、過剰発現によって低下した。一方短鎖脂肪酸、胆汁酸、oleoylethanolamide (OEA) による GLP-1 分泌は Car8 の発現抑制による影響を受けなかった。

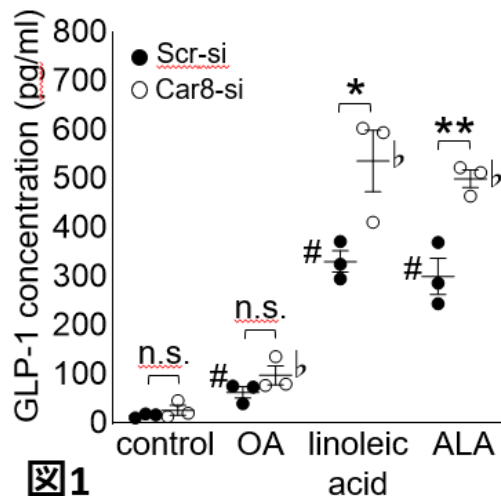


図1

(3) 脂肪酸刺激時 STC-1 細胞内カルシウム濃度の変化を siRNA を用いた Car8 発現抑制下で評価したところ、 $\alpha$ -リノレン酸刺激時 STC-1 細胞内カルシウム濃度の上昇は Car8 発現の抑制により有意に増加した。

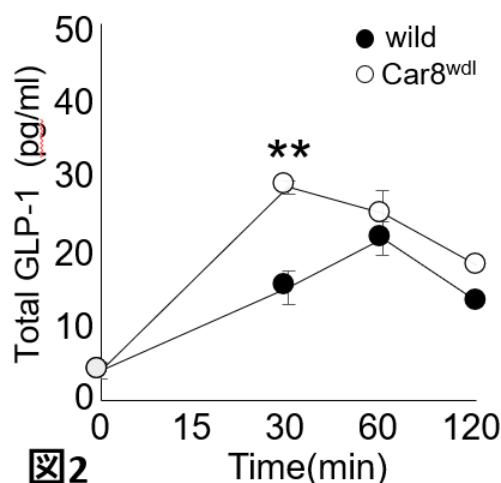
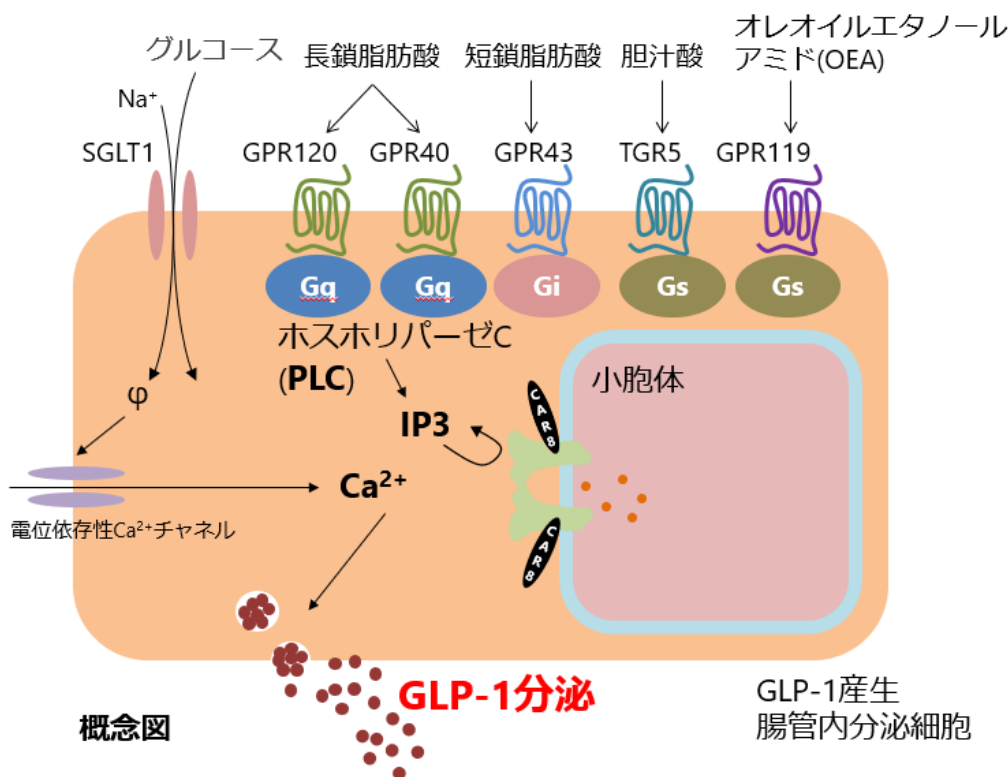


図2

(4) CAR8 機能欠失型変異を有する Car8<sup>wdl</sup> マウスで、経口油脂投与時血中 GLP-1 濃度を評価したところ、経口糖負荷時の GLP-1 分泌は野生型マウスと比べて差を認めなかったのに対して、コーン油投与時 GLP-1 分泌が野生型マウスに比べて有意に高値であった (図 2)。CAR8 欠損マウスの腸管蠕動や腸管 GLP-1 含量は野生型マウスと有意な差を認めなかった。

以上の結果から CAR8 は細胞内カルシウム濃度の調節を介して、長鎖脂肪酸誘導性 GLP-1 分泌の制御に関与することが示唆された (概念図)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujiwara Yuta, Yamane Shunsuke, Harada Norio, Ikeguchi-Ogura Eri, Usui Ryota, Nakamura Toshihiro, Iwasaki Kanako, Suzuki Kazuyo, Yabe Daisuke, Hayashi Yoshitaka, Inagaki Nobuya	4. 巻 320
2. 論文標題 Carbonic anhydrase 8 (CAR8) negatively regulates GLP-1 secretion from enteroendocrine cells in response to long-chain fatty acids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology	6. 最初と最後の頁 G617 ~ G626
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpgi.00312.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤原雄太、山根俊介、原田範雄、池口絵理、岩崎可南子、鈴木和代、白井亮太、矢部大介、林良敬、稲垣暢也
2. 発表標題 炭酸脱水酵素 8 (Car8) によるGLP-1分泌制御機構の解明
3. 学会等名 第64日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原雄太、山根俊介、原田範雄、池口絵理、岩崎可南子、鈴木和代、白井亮太、矢部大介、林良敬、稲垣暢也
2. 発表標題 炭酸脱水酵素 8 (Car8) によるGLP-1分泌制御機構の解明
3. 学会等名 インクレチン研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------