

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 23 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：19K09021

研究課題名(和文)小胞体内カルシウム・センサーSTIMによるインスリン分泌制御基盤の研究

研究課題名(英文) Regulation of Insulin Secretion by Intracellular Calcium Sensor STIM in the Endoplasmic Reticulum

研究代表者

小倉 雅仁 (Masahito, Ogura)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：00547812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：膵細胞のグルコース応答性インスリン分泌において、細胞内カルシウム濃度の上昇は重要である。小胞体を介した細胞内カルシウム濃度調節機構の鍵分子である小胞体膜蛋白STIM (stromal interaction molecule) 1及び2の膵細胞における意義は不明であったため、その機能解析を行った。膵細胞特異的STIM1欠損マウス、膵細胞特異的STIM2欠損マウスを作成し、解析した。脂肪酸によるグルコース応答性インスリン分泌の増強にSTIM1が関与することが示唆された。また、膵細胞特異的STIM2欠損マウスは野生型マウスに比べて血糖値が高い傾向があった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病の克服には新規治療標的の探索が急務であり本研究成果において、これまで全く未解明であった膵細胞からのインスリン分泌におけるSTIM1の役割が明らかになったことは、大きな意義を持つと考えられる。糖尿病の薬物治療において、薬物による低血糖は大きな問題である。そのみならず、今回明らかになったSTIM1の役割はグルコース依存性にインスリン分泌を増強する機序に関与すると思われ、STIM1の役割を利用した薬剤は、低血糖を生じさせることなくインスリン分泌を促進し得る可能性があり、大きな期待を持つことができる。

研究成果の概要(英文)： Elevated intracellular calcium concentration is important for glucose induced insulin secretion in pancreatic β cells. STIM (stromal interaction molecule) 1 and 2 are key molecules in the regulation of intracellular calcium concentration via the endoplasmic reticulum. However the role of STIM 1 and 2 in pancreatic β cells was unknown.

Pancreatic β cell specific STIM1-deficient mice and pancreatic β cell specific STIM2 deficient mice were generated, and phenotypic analysis was performed. STIM1 may be involved in the enhancement of glucose induced insulin secretion by fatty acids. In addition, β cell specific STIM2 deficient mice tended to have higher blood glucose levels than wild-type mice.

研究分野：糖尿病学 インスリン分泌

キーワード：糖尿病 膵細胞 インスリン GPR40 小胞体

1. 研究開始当初の背景

生体の糖代謝は、グルコース刺激による膵β細胞からのインスリン分泌（グルコース依存性インスリン分泌）により厳格に制御されており、その破綻は世界人口の約 10%が罹患する糖尿病の発症や重症化と密接に関係することから、グルコース依存性インスリン分泌の分子機構の解明は重要な研究課題である。膵β細胞は、細胞外から取り込んだグルコースを代謝することで産生された ATP により、ATP 依存性カリウムチャンネルが閉鎖し、細胞膜が脱分極することで、電位依存性カルシウムチャンネルが開口し、細胞内へのカルシウム流入が生じ、インスリン顆粒の開口放出に至る（図 1）。従って、細胞内のカルシウム（Ca）の濃度変化がインスリン分泌制御、さらには糖尿病の発症、重症化に重要な役割を担う。

細胞内のカルシウム濃度は、膵β細胞のみならず、多くの細胞において細胞機能制御に重要な役割を担う。肥満細胞やリンパ球において、電位依存性カルシウムチャンネルを介した細胞外からのカルシウム流入とは独立して、近年、ストア作動性カルシウム流入（store-operated calcium entry; SOCE）と呼ばれるカルシウム流入機構が存在することが示され、その生理学的意義に関心が高まっている。ストア作動性カルシウム流入は小胞体膜蛋白 STIM（stromal interaction molecule）により誘導される¹⁾²⁾³⁾。STIM には、STIM1 と STIM2 の 2 つの isoform が存在し、小胞体内のカルシウム低下を感知し、細胞膜上のカルシウムチャンネル Orai1 を活性化し、細胞外カルシウムの細胞内への流入を促進する（図 2）。これまでストア作動性カルシウム流入の役割については、免疫細胞や肝細胞で検討されてきたが⁴⁾⁵⁾⁶⁾、膵β細胞のような、刺激応答性のホルモン分泌細胞種において、ストア作動性カルシウム流入の意義は全く検討されていなかった。

図 1. 膵β細胞からのインスリン分泌

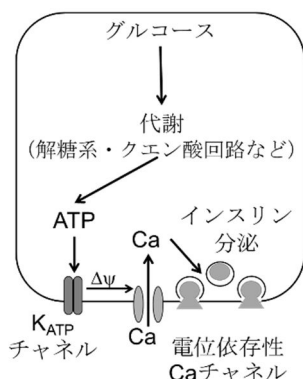
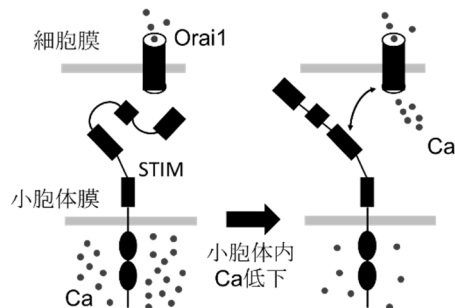


図 2. STIM による SOCE の活性化



2. 研究の目的

本研究では、膵β細胞における STIM1 や STIM2 の役割を解明することでインスリン分泌におけるストア作動性カルシウム流入の意義を明確化することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) in vitro について

膵β細胞株である MIN6 細胞において、siRNA により STIM1、STIM2 をノックダウンし、細胞内カルシウム動態やストア作動性カルシウム流入、グルコース依存性インスリン分泌に対する影響を評価する。

(2) ex vivo について

STIM1、STIM2 の遺伝子を全身性に欠失したマウスは胎生致死にいたるため、Cre/loxP 系を用いて膵β細胞特異的に STIM1、STIM2 の遺伝子を単独もしくは同時に欠失したマウス（βSTIM1cKO、βSTIM2cKO、βSTIM1/STIM2cKO マウス）を作成し、作出したマウスより膵島を単離し、細胞内カルシウム動態やストア作動性カルシウム流入、グルコース依存性インスリン分泌に対する影響を評価する。

(3) in vivo について

作出したβSTIM1cKO、βSTIM2cKO、βSTIM1/STIM2cKO マウスを用いて、体重や血糖値、また経口ブドウ糖負荷試験にて耐糖能を評価する。

4. 研究成果

(1) STIM1 の機能について

膵β細胞株である MIN6 を用いて、STIM1 や Orai1 をノックダウンしたところ、ストア作動性カルシウム流入は著明に低下した。次に STIM1 や Orai1 をノックダウンし、グルコース依存性インスリン分泌の評価を行ったところ、予想に反してインスリン分泌に差を認めなかった。脂

脂肪酸はグルコース依存性インスリン分泌を増強するが、そのインスリン分泌増強は刺激するグルコース濃度に依存することが知られている。また、GPR40などの脂肪酸受容体の下流シグナルには小胞体カルシウム濃度を調節するIP₃が知られており、STIMのインスリン分泌における作用はグルコース依存性インスリン分泌ではなく、脂肪酸によるグルコース依存性インスリン分泌の増強と関連する可能性を次に着想した。脂肪酸によるグルコース依存性インスリン分泌増強という仕組みを利用することにより、低血糖を起こさずにインスリン分泌を増強する薬剤の開発につながることも興味深いと考えた。

fasiglifamは膵β細胞における脂肪酸受容体GPR40のアゴニストとして報告されている。まず、IP₃シグナルを阻害剤を用いて阻害したところ、fasiglifamによるグルコース依存性インスリン分泌の増強作用は減弱された。IP₃レセプター(IP₃R1)のノックダウンにより、fasiglifamのグルコース依存性インスリン分泌の増強作用および細胞内カルシウム上昇作用は減弱した。そこで、fasiglifamによる細胞内カルシウム上昇作用やグルコース依存性インスリン分泌の増強作用とSTIM1やOrai1との関係を検討した。MIN6を用いてSTIM1やOrai1をノックダウンしたところ、fasiglifamによる細胞内カルシウムの増加は抑制された。またfasiglifamによるグルコース依存性インスリン分泌の増強も抑制された。本検討は脂肪酸をリガンドとしても再現された。このことから、STIM1/Orai1によって誘導されるストア作動性カルシウム流入はGPR40刺激によるグルコース応答性インスリン分泌増強、細胞内カルシウム増加に重要な役割を担っていることが示唆された。

次にCre/loxP系を用いて膵β細胞特異的にSTIM1の遺伝子を欠失したマウス(βSTIM1cKOマウス)を作成した。作成したβSTIM1cKOマウスは解剖学的な異常を認めず、成長や生殖にも異常を認めなかった。また、βSTIM1cKOマウスの膵島を免疫組織化学染色したところ、膵島の構造に異常を認めず、β細胞量やα/β細胞比率にも異常を認めなかった。通常食で野生型マウスとβSTIM1cKOマウスには体重に差がなく、随時血糖値にも差を認めなかった。STIM1cKOマウスの単離膵島では、野生型マウス単離膵島と比べて、ストア作動性カルシウム流入は減弱しており、fasiglifamによるグルコース依存性インスリン分泌増強作用、細胞内カルシウム上昇作用も減弱していた。経口ブドウ糖負荷試験でも、野生型マウスと比べてβSTIM1cKOではfasiglifamによる耐糖能の改善効果が有意に障害されており、インスリン分泌増強効果も低下した。

以上の結果から、膵β細胞においてIP₃R1/STIM1/Orai1経路を介して誘導されるストア作動性カルシウム流入は、GPR40シグナルによるインスリン分泌増強作用に重要な役割を担っていることが明らかとなった。本研究成果はSci Rep.誌に報告した⁷⁾。

(2) STIM2の機能について

MIN6ではSTIM2のノックダウンによりストア作動性カルシウム流入が増強したが、グルコース依存性インスリン分泌は変化しなかった。一方で、細胞内のインスリン含量の低下を認めた。また、グルコースによる細胞内カルシウム濃度増加の亢進を認めた。STIMは小胞体に局在するタンパク質であり、STIM2と小胞体ストレスとの関連に興味を持ったので、MIN6を用いて検討したところ、STIM2をノックダウンすることにより、脂肪酸による小胞体ストレスに関連する分子のmRNA発現が増加する傾向を認めた。

Cre/loxP系を用いて膵β細胞特異的にSTIM2の遺伝子を欠失したマウス(βSTIM2cKOマウス)を作成した。作成したβSTIM2cKOマウスには解剖学的な異常を認めず、成長や生殖にも異常を認めなかった。通常食でβSTIM2cKOマウスは野生型マウスと体重には差がなく、βSTIM2cKOマウスはマウス野生型に比べて、随時血糖値や経口血糖負荷試験時の血糖値が高い傾向にあった。高脂肪食負荷でβSTIM2cKOマウスは野生型マウスと体重には差がなく、随時血糖値や経口血糖負荷試験時の血糖値に関しては、βSTIM2cKOマウスは野生型マウスに比べて高い傾向にあった。βSTIM2cKOマウスより単離した膵島において、グルコース依存性インスリン分泌は野生型マウス単離膵島と差を認めなかった。

(3) STIM1とSTIM2を同時欠損させた条件での解析

MIN6ではSTIM1とSTIM2を同時欠損させた条件において、グルコース依存性インスリン分泌に変化を認めなかった。Cre/loxP系を用いて膵β細胞特異的にSTIM1の遺伝子を欠失したβSTIM1マウスと、膵β細胞特異的にSTIM2を欠損させたマウスβSTIM2cKOマウスを交配し、膵β細胞特異的にSTIM1とSTIM2を同時に欠損させたβSTIM1/STIM2cKOマウスを作成した。βSTIM1/STIM2cKOマウスは解剖学的な異常を認めず、成長や生殖にも異常を認めなかった。βSTIM1/STIM2cKOマウスは野生型マウスと比べて、通常食および高脂肪食負荷において体重・随時血糖値に差を認めなかった。経口血糖負荷試験においてβSTIM1/STIM2cKOマウスは野生型マウスと通常食で差を認めず、高脂肪食負荷でも差を認めなかった。βSTIM1/STIM2cKOマウスより単離した膵島において、グルコース依存性インスリン分泌は野生型マウス単離膵島と差を認めなかった。

- 1) Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. Nat Rev Immunol. 7:690-702. 2007
- 2) Vig M, DeHaven WI, Bird GS, Billingsley JM, Wang H, Rao PE, Hutchings AB, Jouvin MH, Putney JW, Kinet JP. Defective mast cell effector functions in mice lacking the

CRACM1 pore subunit of store-operated calcium release-activated calcium channels. *Nat Immunol.* 9:89-96.2008

- 3) Navarro-Borelly L, Somasundaram A, Yamashita M, Ren D, Miller RJ, Prakriya M. STIM1-Orai1 interactions and Orai1 conformational changes revealed by live-cell FRET microscopy. *J Physiol.* 586:5383-401.2008
- 4) Matsumoto M, Fujii Y, Baba A, Hikida M, Kurosaki T, Baba Y. The calcium sensors STIM1 and STIM2 control B cell regulatory function through interleukin-10 production. *Immunity.* 34:703-14.2011.
- 5) Mancarella S, Potireddy S, Wang Y, Gao H, Gandhirajan RK, Autieri M, Scalia R, Cheng Z, Wang H, Madesh M, Houser SR, Gill DL. Targeted STIM deletion impairs calcium homeostasis, NFAT activation, and growth of smooth muscle. *FASEB J.* 27:893-906. 2013
- 6) Arruda AP, Pers BM, Parlakgul G, Güney E, Goh T, Cagampan E, Lee GY, Goncalves RL, Hotamisligil GS. Defective STIM-mediated store operated Ca²⁺ entry in hepatocytes leads to metabolic dysfunction in obesity. *Elife.* 6:e29968. 2017
- 7) Usui R, Yabe D, Fauzi M, Goto H, Botagarova A, Tokumoto S, Tatsuoka H, Tahara Y, Kobayashi S, Manabe T, Baba Y, Kurosaki T, Herrera PL, Ogura M, Nagashima K, Inagaki N. GPR40 activation initiates store-operated Ca²⁺ entry and potentiates insulin secretion via the IP3R1/STIM1/Orai1 pathway in pancreatic β -cells. *Sci Rep.* 9:15562.2019

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tatsuoka H, Sakamoto S, Yabe D, Kabai R, Kato U, Okumura T, Botagarova A, Tokumoto S, Usui R, Ogura M, Nagashima K, Mukai E, Fujtani Y, Watanabe A, Inagaki N	4. 巻 23
2. 論文標題 Transcriptome Analysis Dissects the Replicating Process of Pancreatic Beta Cells in Partial Pancreatectomy Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101774.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tokumoto S, Yabe D, Tatsuoka H, Usui R, Fauzi M, Botagarova A, Goto H, Herrera PL, Ogura M, Inagaki N.	4. 巻 69
2. 論文標題 Generation and Characterization of a Novel Mouse Model that Allows Spatiotemporal Quantification of Pancreatic β -Cell Proliferation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diabetes.	6. 最初と最後の頁 2340-2351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2337/db20-0290.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Usui R, Yabe D, Fauzi M, Goto H Botagarova A Tokumoto S, Tatsuoka H, Tahara Y, Kobayashi S, Manabe T, Baba Y, Kurosaki T, Herrera P L, Ogura M, Nagashima K, and Inagaki N	4. 巻 9
2. 論文標題 GPR40 activation initiates store-operated Ca ²⁺ entry and potentiates insulin secretion via the IP3R1/STIM1/Orai1 pathway in pancreatic β -cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-52048-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 白井 亮太、矢部 大介、Fauzi Muhammad, Botagarova Ainur、後藤 久典、徳本 信介、龍岡 久登、田原裕美子、小林 静香、真鍋 俊也、黒崎 知博、Pedro Luis Herrera、小倉 雅仁、長嶋 一昭、稲垣 暢也
2. 発表標題 膵 細胞におけるGPR40シグナルに注目 したストア依存性カルシウム流入の意義の 解明
3. 学会等名 第62回 日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 徳本 信介、矢部 大介、龍岡 久登、臼井 亮太、後藤 久典、ファウジ ムハンマド、ポタガロバ アイヌラ、小倉 雅仁、稲垣 暢也
2. 発表標題 細胞周期可視化蛍光プローブFucci2aRを用いた膵 細胞増殖の新規定量法の開発
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 龍岡 久登、矢部 大介、坂本 智子、渡辺 亮、徳本 信介、ポタガロバ アイヌラ、臼井 亮太、後藤 久典、ファウジ ムハンマド、小倉 雅仁、稲垣 暢也
2. 発表標題 RNAシークエンスとATCシークエンスを用いた、加齢における膵 細胞増殖能低下のメカニズムの解析
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinsuke Tokumoto, Daisuke Yabe, Hisato Tatsuoka, Ryota Usui, Muhammad Fauzi, Hiasanori Goto, Masahito Ogura, Nobuya Inagaki
2. 発表標題 Generation of a Novel Mouse Model to study β -cell proliferation.;
3. 学会等名 The 11th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hisato Tatsuoka, Daisuke Yabe, Satoko Sakakomo, Akira Watanabe, Ryota Usui, Shinsuke Tokumoto, Botagarova Ainur, Daisuke Otani, Hiasanori Goto, Muhammad Fauzi, Masahito Ogura, Nobuya Inagaki.
2. 発表標題 Difference in epigenetic regulations between young and old mice explored the mechanism of beta cell proliferation.
3. 学会等名 The 11th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Usui R, Yabe D, Fauzi M, Goto H, Botagarova A, Tokumoto S, Tatsuoka H, Tahara Y, Kobayashi S, Manabe T, Baba Y, Kurosaki T, Ogura M, Nagashima K, Inagaki N
2. 発表標題 Store-operated Ca ²⁺ entry activated by STIM1 plays an essential role in GPR40-mediated GLIS potentiation.
3. 学会等名 American Diabetes Association the 79th Scientific Sessions (国際学会)
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