

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17958

研究課題名（和文）プロスタシンによる膵 細胞インスリン分泌制御機構の解明

研究課題名（英文）Prostasin promotes insulin secretion in pancreatic beta-cells

研究代表者

石井 俊史 (ISHII, Toshihisa)

山梨大学・大学院総合研究部・臨床助教

研究者番号：50835957

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 細胞におけるプロスタシンの役割を明らかにするため、膵 細胞特異的プロスタシンノックアウト及び過剰発現マウスと、プロスタシンを発現抑制及び過剰発現させたマウスインスリノーマ細胞株MIN6細胞を用いてインスリン分泌を比較した。その結果、プロスタシンはインスリン分泌を促進することが判明した。また、プロスタシンノックダウンMIN6細胞ではCa²⁺の取り込みが抑制されたが、プロスタシンによる電位依存性Ca²⁺チャネルへの直接的作用は否定的であった。今後新たな基質の探索を要する。一方、プロスタシンは血糖依存的に発現調節され、インスリン分泌制御機構において重要な役割を担うことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって膵 細胞プロスタシンのインスリン分泌機構における生理的意義及び糖尿病における病態的意義が明らかになりつつある。血糖依存的に発現調節されるプロスタシンはインスリン分泌を改善させる新規治療ターゲットとして合理的な発現調節機構を有していると考えられる。本研究のさらなる追求によって糖尿病に関する新たな病態解明や新規治療開発へとつながることが期待される。

研究成果の概要（英文）：To clarify the role of prostasin (PRSS8) in pancreatic beta-cells, we compared insulin secretion in pancreatic beta cell-specific PRSS8 knockout and overexpression mice, or PRSS8 suppressed and overexpressed mouse insulinoma cell line MIN6 cells. We found that PRSS8 promoted insulin secretion. However Ca²⁺ uptake was suppressed in PRSS8 knockdown MIN6 cells, PRSS8 had no directly effect on voltage-dependent Ca²⁺ channels. New substrates of PRSS8 should be explored in the future. On the other hand, the expression of PRSS8 was regulated in a glucose-dependent manner, suggesting that PRSS8 plays an important role in the regulation of insulin secretion.

研究分野：内分泌、糖尿病、腎臓

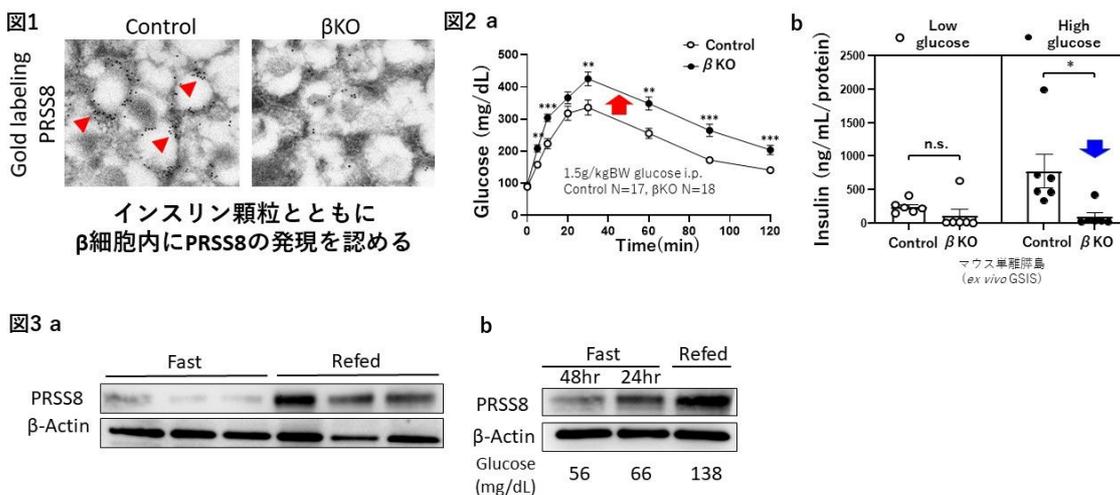
キーワード：プロスタシン インスリン分泌 膵 細胞

1. 研究開始当初の背景

プロスタシン (PRSS8) は GPI アンカー型及び分泌型セリンプロテアーゼであり, ENaC の活性化による生体内の Na 代謝への関与が報告されている (Carattino MD, et al. Am J Physiol Renal Physiol. 2014). また, 肝臓においては Toll-like receptor 4 (TLR4) の切断によるインスリン抵抗性の制御, 抗炎症効果が報告されている (当研究室員 内村ら, Nature Communications. 2014). この報告の中で, 耐糖能異常者では血中プロスタシン濃度が低下していることも判明しており, 糖尿病におけるプロスタシンの関与が示唆される. プロスタシンは 1994 年にはじめて精液より精製され, 前立腺, 腎臓, 腸管, 肝臓, 上皮, 膵臓などに発現することが知られている. 上述の機能を除き, 多くの臓器でその機能や意義は知られていない. 膵臓においてもプロスタシンの局在や機能は知られていない. そこで膵β細胞におけるプロスタシンの役割を明らかにすることを旨とした.

まず, マウス膵臓におけるプロスタシンの発現局在を明らかにするため, 免疫染色法を用いると, 膵外分泌腺組織とともに膵島における発現を認めた. さらに, 免疫電顕法を用いて, 膵β細胞にその発現を確認した (図 1). 続いて当研究室で独自に作製した膵β細胞特異的プロスタシンノックアウト (PRSS8-βKO) 及び過剰発現 (PRSS8-βTG) マウスを用いた解析を行った. PRSS8-βKO マウスでは, グルコース腹腔内投与 (IPGTT) において有意な血糖上昇と単離膵島におけるグルコース刺激性インスリン分泌の低下を認めた (図 2). 一方, PRSS8-βTG マウスでは, 有意差は認めないものの IPGTT では血糖上昇抑制の傾向を認め, 単離膵島におけるグルコース刺激性インスリン分泌の有意な増加を認めた. また, マウスインスリンノーマ細胞株を用いた検討においても, プロスタシンノックダウン細胞ではインスリン分泌の有意な低下を, 過剰発現細胞では有意な増加を認めた. 以上から, 膵β細胞においてプロスタシン発現量はインスリン分泌を増減させることが明らかとなった. さらに興味深いことに, 2 型糖尿病患者の血中プロスタシン濃度は低下しており, 糖尿病との病態的関連が強く示唆された.

また, 膵β細胞におけるプロスタシン発現量を観察すると, 絶食によって減少, 再食餌によって増加し, 血糖依存的に変化する可能性が考えられた (図 3).



2. 研究の目的

膵β細胞におけるプロスタシンの生理的意義や糖尿病における病態的意義を明らかにするため, 本研究ではプロスタシンのターゲット蛋白(基質)の同定を含めたインスリン分泌制御機構, プロスタシン自体の発現調節, プロスタシンの治療応用の可能性について明らかにすることを目的とした. 本研究によって, 糖尿病病態解明と新規治療開発の分子基盤構築を行うことを最終目標とする.

3. 研究の方法

(1) 電気生理学的アプローチによる電位依存性 Ca²⁺チャネルの解析

これまでの実験結果から, プロスタシン発現抑制下ではグルコース以外に KCl や SU 剤である glibenclamide によってもインスリン分泌は低下したが, GLP-1 受容体作動薬である Exendine-4 をグルコースとともに投与することで, その差がなくなることから, 電位依存性 Ca²⁺チャネルから開口分泌までの機構にプロスタシンが作用していると想定された. そこで, 電

位依存性 Ca^{2+} チャネルの解析を行うため、 Ca^{2+} 蛍光指示薬 Fura2-AM を用いて細胞内 Ca^{2+} 濃度測定による Ca^{2+} イメージングを行った。また、チャネル開口率やコンダクタンスの比較のためパッチクランプ実験を用いて single cell 解析を行った。さらに、既報から考えられるプロスタシンの作用する切断配列から $\alpha 2$ サブユニットへの直接的な作用を想定し、 Ca^{2+} チャネルのサブタイプを含め、ウエスタンブロットによってその変化を解析した。

(2) 膵β細胞におけるプロスタシン発現調節の解析

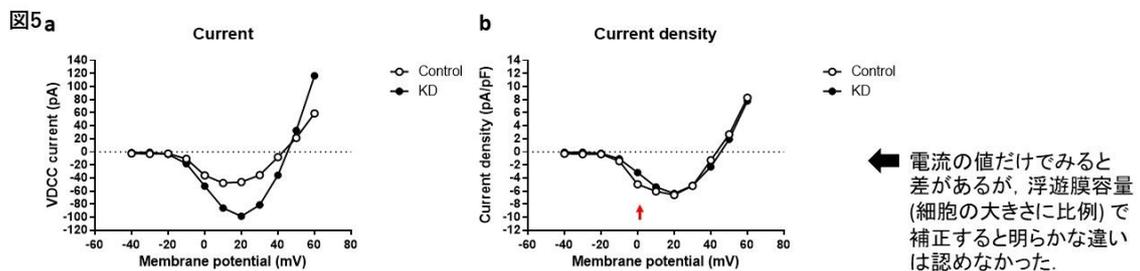
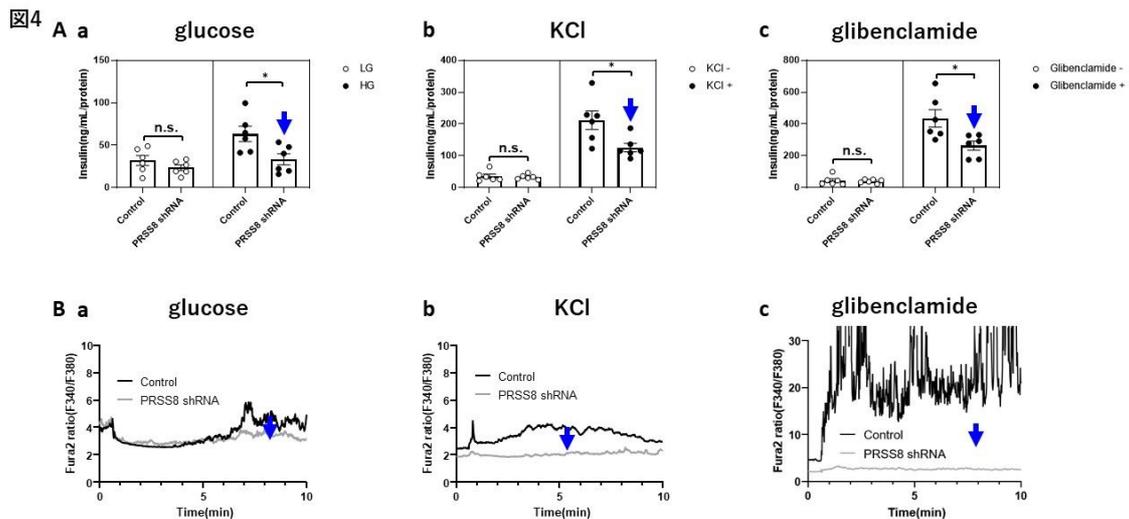
マウス膵β細胞におけるプロスタシン発現量は血糖依存的に変化することが推定されることから、MIN6 細胞を用いてグルコース濃度によるプロスタシン発現量の変化をウエスタンブロットを用いて確認した。また、このときのインスリン分泌機能について比較を行った。さらに糖鎖修飾による発現調節が想定されることから、脱グリコシル化による発現比較を行った。また、タンパク合成停止作用を持つシクロヘキシミド (CHX) を投与し、蛋白分解に違いがないか比較を行った。

(3) 外来性プロスタシンによるインスリン分泌への影響

MIN6 細胞に当研究室で作製した活性型リコンビナントヒトプロスタシンを暴露し、インスリン分泌への影響を調べた。

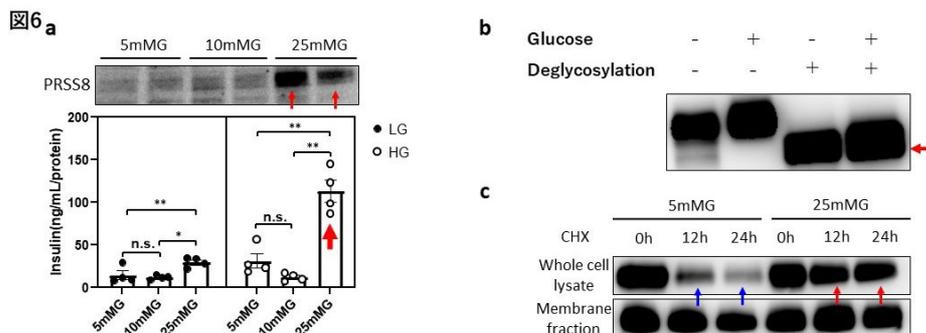
4. 研究成果

(1) プロスタシンノックダウン細胞において Fura2-AM を用いた解析を行ったところ、グルコース、KCl, glibenclamide 刺激下では、 Ca^{2+} 取り込みの低下を認め (図 4, PRSS8 shRNA), インスリン分泌の低下を裏付ける結果であった。一方、パッチクランプ実験による single cell 解析では明らかな違いを認めなかった (図 5)。また、電位依存性 Ca^{2+} チャネルのサブタイプと $\alpha 2$ サブユニットについてウエスタンブロットによる解析を行ったが、こちらも明らかな違いがみられなかった。以上から、プロスタシンは直接的に電位依存性 Ca^{2+} チャネルに関与するのではなく、その他の基質に作用し間接的に Ca^{2+} 取り込みに影響すると考えられた。現在、膵β細胞におけるプロスタシンの新たな基質候補として、上皮様成長因子受容体 (EGFR) を想定して実験を開始している。EGFR はプロスタシンによる切断・活性化が報告されており、インスリン分泌及びβ細胞増殖に関わる key molecule とされるが、膵β細胞におけるプロスタシンとの関連はこれまで知られていない。



(2) MIN6 細胞において、前培養のグルコース濃度を変化させると、高グルコース条件下では、プロスタシン発現増加とともに、良好なインスリン分泌を示した (図 6a)。この結果からもプロスタシン発現量とインスリン分泌量の関連が示唆された。なお、高グルコース下ではプロスタシンの mRNA レベルの有意な変化は認めなかった。一方、高グルコース条件下におけるプロスタ

シンを脱グリコシル化すると、低グルコース下で見られる低分子量バンドと同一分子量であると考えられた(図 6b)。さらに、蛋白合成阻害薬 CHX の投与を行うと、高グルコース下ではその分解が緩徐となった(図 6c)。糖鎖修飾はグルコースを材料の一つとし、蛋白の品質管理に利用されることから、グルコースによるプロスタシン発現調節は、糖鎖修飾によってその分解を調節をしていることが示唆された。また、高スクロース食を負荷したマウス膵島では、投与 1 週間後にプロスタシン発現量の増加を認めたと、3, 5, 10 週目ではその発現が低下していたことから、肝臓におけるプロスタシンと同じく、長期的な代謝ストレス下では発現量が低下し、糖尿病との病態的関連が示唆された。



(3) 最後に MIN6 細胞に活性型リコンビナントヒトプロスタシンを投与すると、高グルコース下では濃度依存的にインスリン分泌の増加を認めた。この結果から、外来性の活性型プロスタシンも内在性プロスタシンと同様にインスリン分泌促進効果を認めることが分かった。プロスタシンの治療応用には、膵β細胞特異的にプロスタシンを局所投与する、あるいは核酸導入による発現調節が必要と考えられる。将来的に期待される技術として、現在北海道大学大学院薬学研究院・薬剤分子設計学研究室にて研究されている多機能性エンベロープ型ナノ構造体 (multifunctional envelope-type nano device; MEND) を用いた治療応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石井 俊史, 一條 昌志, 内村 幸平, 小林 秀俊, 滝澤 壮一, 古屋 文彦
2. 発表標題 膵 細胞プロスタシンによるインスリン分泌制御機構の解明
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会学術集会
4. 発表年 2020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
---------	---------