

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16367

研究課題名（和文）膵細胞プロスタシンによるインスリン分泌制御機構と増殖維持効果の解明

研究課題名（英文）Regulatory mechanism of insulin secretion and maintenance of proliferation by prostaasin 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） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、これまでにPRSS8を膵細胞特異的に発現抑制あるいは過剰発現させたマウスにおいてインスリン分泌に影響を与えることを明らかにしてきた。また、マウスインスリノーマ細胞株MIN6細胞でも同様の結果が得られ、PRSS8によってインスリン分泌が制御されることが示唆された。本研究期間では、新たに膵細胞のPRSS8が上皮成長因子受容体（EGFR）を基質とし、EGFRの切断・活性化を介してインスリン分泌を制御していることが判明した。さらに、PRSS8の発現量や活性によって細胞増殖に影響したことから、PRSS8は膵細胞においてインスリン分泌と細胞増殖の両者を制御していることが考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病は、膵細胞から分泌される血糖低下ホルモンである「インスリンの分泌の減少」と、インスリンが効きづらくなる「インスリン抵抗性」を特徴する。細胞の機能不全・減少によってインスリン分泌が低下すると、治療選択肢が制限され、治療コントロールが難しくなる。糖尿病による合併症の発症・進展を防ぐためには、細胞の機能や細胞数を保持する治療が求められる。PRSS8はEGFRを介してインスリン分泌と細胞増殖に関与していることから、細胞の機能不全・細胞数の減少を捉えるバイオマーカーや細胞の機能や細胞数を保持する治療ターゲットとなる可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）： In this study, we have previously shown that PRSS8 affects insulin secretion in pancreatic β -cell-specific PRSS8 knockout and overexpressing mice. Similar results were also obtained in the mouse insulinoma cell line MIN6 cells, suggesting that insulin secretion is regulated by PRSS8. In this study period, we newly found that PRSS8 in pancreatic beta cells is a substrate of epidermal growth factor receptor (EGFR) and regulates insulin secretion via cleavage and activation of EGFR. Furthermore, the expression level and activity of PRSS8 affected cell proliferation, suggesting that PRSS8 regulates both insulin secretion and cell proliferation in pancreatic β -cells.

研究分野：糖尿病、腎臓病

キーワード：膵細胞 インスリン分泌 プロスタシン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は血糖降下ホルモンであるインスリン分泌の異常やインスリン抵抗性に起因する慢性的な高血糖を示す代謝性疾患である。インスリン分泌の異常は、膵β細胞の機能不全や細胞数の減少によって生じる。膵島の再生能力には限界があり、減少したβ細胞量を回復させる確立された治療はない。糖尿病の合併症を予防するためには、β細胞を維持・温存する治療法の開発が急務となっている。

上皮成長因子受容体 (EGFR) は、細胞増殖や様々なホルモンの発現・開口分泌に関与する。膵β細胞においては、細胞増殖や分化に関与する (長期的作用) とともに、インスリン分泌を促進する (短期的作用) ことが知られている。

プロスタシン (PRSS8) は、分子量 40kDa のアンカー型もしくは分泌型のセリンプロテアーゼで、基質を切断することによって様々な生体プロセスの制御に関与していると考えられている。しかし、PRSS8 は腎臓、肝臓、腸管、肺、膵臓など多くの臓器に発現していることがわかっているが、その役割の多くは謎に包まれている。本研究では、糖代謝の主軸である膵臓における PRSS8 の役割の解明に取り組んだ。

2. 研究の目的

PRSS8 の基質の1つとして、EGFR が報告されている。膵β細胞における EGFR の作用から、本研究では、「膵β細胞において PRSS8 が EGFR を介してインスリン分泌及び細胞増殖を制御する」という仮説を立て、検証を行った。

3. 研究の方法

(1) 動物

C57BL/6 マウスを用いて、当研究室で独自に作製した膵β細胞特異的 PRSS8 ノックアウト (PRSS8-βKO) マウス及び過剰発現 (PRSS8-βTG) マウスを用いた。PRSS8-βKO マウスは Cre/loxP システムを用いて作製し、それ自体に耐糖能異常を来す報告があるため Rat insulin promoter (RIP) -Cre マウスをコントロールに用いた。PRSS8-βTG は、同腹仔である野生型 (WT) をコントロールに用いた。

(2) 細胞

大阪大学提供のマウスインスリノーマ細胞株 MIN6 細胞を用いた。プラチナ E レトロウイルスパッケージング細胞 (Cell Biolabs; San Diego, CA, USA) に、マウス PRSS8 shRNA (Silencer Select shRNA, ID : S94451, Thermo Fisher Scientific) またはコントロール shRNA (ID : 4,390,844) を jetPRIME (Polyplus ; New York, USA) を用いてトランスフェクトし、その上清を用いて PRSS8 発現抑制 MIN6 細胞を作製した。また、pcDNA3.1-PRSS8 (GenScript, ID: OHu16476)を用いて、PRSS8 過剰発現 MIN6 細胞を作製した。

(3) 試薬

グルコース、リコンビナントヒト EGF (rhEGF)、erlotinib は FUJIFILM Wako (Osaka, Japan) から購入した。リコンビナントヒト PRSS8 (rhPRSS8) は当研究室で独自に精製した。

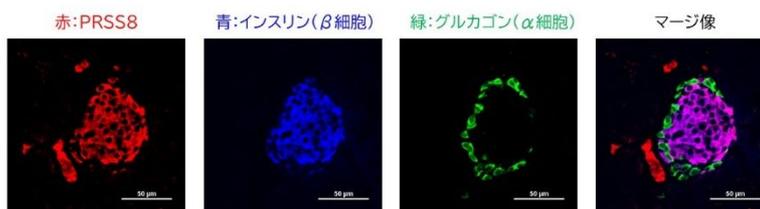
4. 研究成果

(1) 膵β細胞における PRSS8 の発現

抗 PRSS8 抗体を用いて野生型マウスの膵臓の免疫染色を行った。PRSS8 は膵島のインスリン陽性細胞と共同在することから、膵β細胞に発現していることが判明した (図 1)。免疫電子顕微鏡においても、PRSS8 はインスリン顆粒を含むβ細胞内に観察された。PRSS8 は細胞膜構成蛋白である N-cadherin とも共同在することから、細胞膜上の発現が確認できた。

図1

マウス膵島の免疫蛍光染色



PRSS8(赤)とβ細胞(青)が同じ部位に存在する(紫)ことから、β細胞にプロスタシンが発現していることがわかる

(2) 内因性 PRSS8 によるインスリン分泌の制御

PRSS8-βKO マウス及び PRSS8-βTG マウスの単離膵島を用いて、グルコース刺激性インスリン分泌を測定した。PRSS8-βKO マウスではインスリン分泌が抑制され、PRSS8-βTG マウスではインスリン分泌が有意に増加した (図 2)。

図2

マウス膵島を用いた
グルコース刺激性インスリン分泌

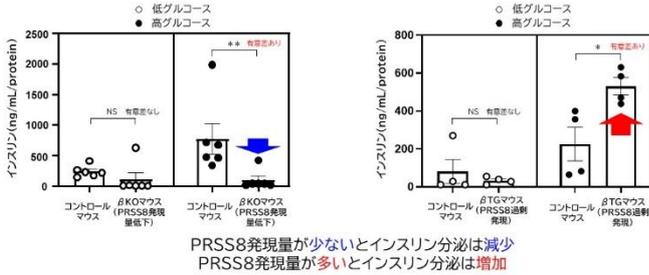
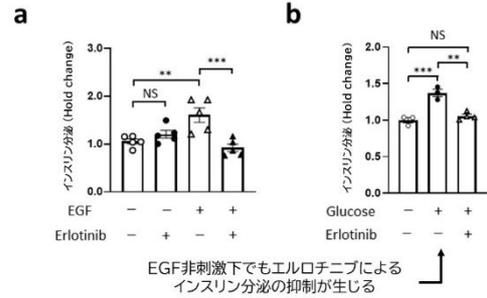


図3

EGFR阻害薬エルロチニブによる
グルコース刺激性インスリン分泌の阻害

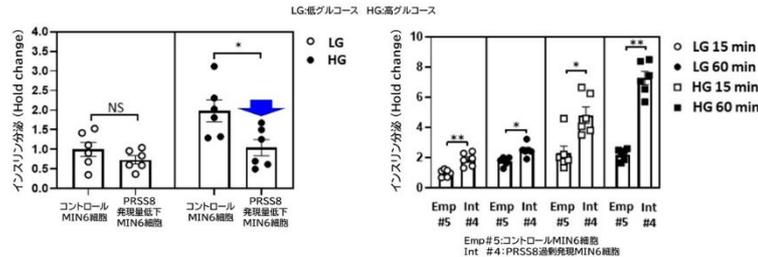


(3) EGF-EGFR シグナルによるインスリン分泌の促進

これまでに EGF-EGFR シグナルによってインスリン分泌を促進させることが報告されている。予備実験として、MIN6 細胞を用いて EGF による刺激を行うと、既報と同じくインスリン分泌が増強し、これは EGFR 阻害薬 erlotinib によってキャンセルされた (図 3)。興味深いことに、EGF 非刺激下でのグルコース刺激性インスリン分泌も erlotinib によって抑制された。この結果は、グルコースによるインスリン分泌のメカニズムに EGF-EGFR シグナルを内包していることを示唆する。MIN6 細胞におけるグルコース投与下での EGF の挙動を調べると、EGF の mRNA 発現量、蛋白発現量、上清中の濃度を増加させた。以上から、膵β細胞でもグルコースによって autocrine/paracrine に EGF を産生していることが示唆された。

図4

MIN6細胞における
PRSS8発現量とインスリン分泌

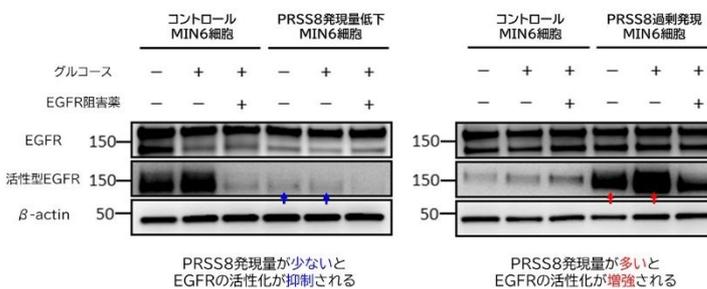


(4) PRSS8 は EGFR 活性化を介してインスリン分泌を制御する

MIN6 細胞においても、PRSS8 の発現量によってインスリン分泌はマウス膵島の実験と同様の挙動を示した (図 4)。続いて、PRSS8 の発現量と EGFR の活性化の関連性を調べた。PRSS8 発現が少ない状態では、高グルコース条件下での EGFR の活性化が抑制され、反対に PRSS8 発現量が過剰な状態では、高グルコース条件下での EGFR 活性化が促進されていた (図 5)。

図5

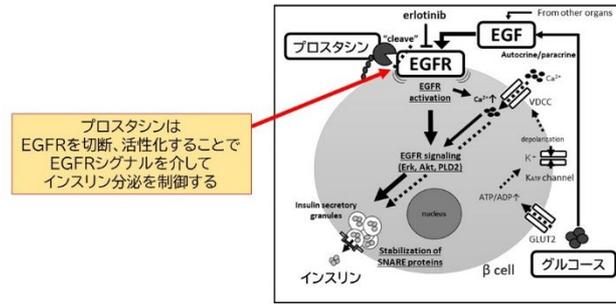
PRSS8発現量とEGFR活性化



(5) PRSS8 によるインスリン分泌制御モデル (仮説)

これまでに挙げた研究成果から、次のような膵β細胞 PRSS8 のインスリン分泌制御モデルを考えた (図 6)。

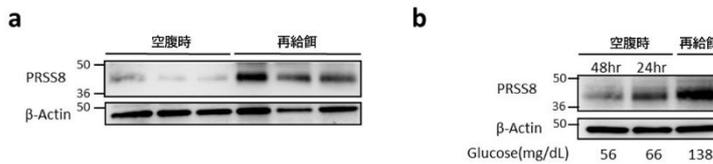
図6 膵β細胞におけるプロスタシンの作用メカニズム(仮説)



(6) グルコースによる PRSS8 発現量の調節

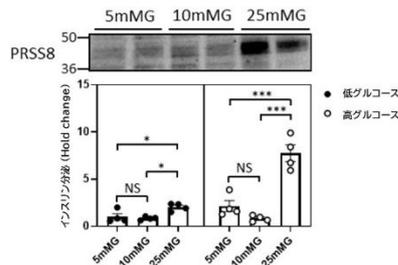
続いて、インスリン分泌を制御する PRSS8 の発現を調節する因子を探ることにした。マウス膵島における PRSS8 の発現量は、空腹時と比較し給餌下では著明に増加することがわかった(図7)。この結果から、血糖の上昇、すなわちグルコースへの曝露が PRSS8 発現を増加させる因子ではないかと考えた。MIN6 細胞においても、グルコースによって PRSS8 の発現量が増加し、それに伴ってインスリン分泌も増加していた(図8)。生体内では、血糖値の上昇、すなわちインスリン需要に応じて PRSS8 の発現量が変化し、インスリン分泌を制御している可能性が考えられる。

図7 膵β細胞PRSS8発現量と血中グルコース濃度



食餌によってPRSS8発現量が増加する
血糖値とPRSS8発現量との関連性が考えられる

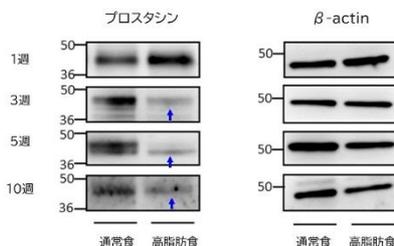
図8 MIN6細胞におけるPRSS8発現量とインスリン分泌



グルコース濃度が高いほどPRSS8発現量が増加し、インスリン分泌が促進される

さらに続いて、上述のグルコースによる PRSS8 の発現量の増加は、比較的短期間の曝露であったが、長期間の曝露、つまり代謝異常の状態ではどのように変化するのかを調べた。高脂肪食を与えた野生型マウスの膵島では、1週間時点では PRSS8 の発現量が増加するものの、3週目以降は逆に発現量が低下することが判明した(図9)。さらに、糖尿病モデルである db/db マウスでも PRSS8 の発現が低下していた。長期間の代謝ストレス状態では、PRSS8 の発現量が低下すると考えられる。この結果は、糖尿病の病態に PRSS8 が関する可能性を示唆する。

図9 高脂肪食を与えたマウスのプロスタシンの発現量

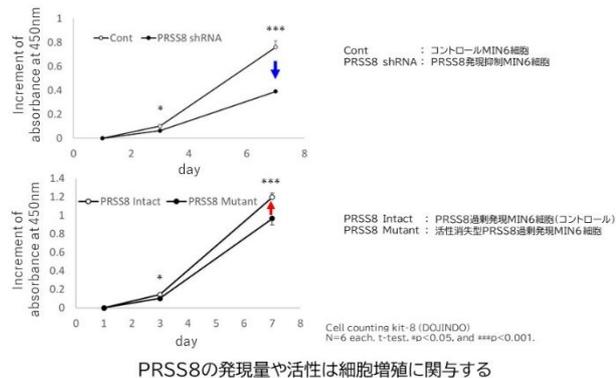


長期に渡って高脂肪食を与えたマウスの膵島ではプロスタシンの発現量が低下する

(7) PRSS8によるβ細胞増殖への影響

ここまでは EGFR の短期的作用であるインスリン分泌に焦点を当て検証を行ってきた。PRSS8 は EGFR の長期的作用であるβ細胞増殖にも関与している可能性が考えられる。そこで、β細胞増殖への作用を検討するため、次の実験を実施した。Cell-counting kit - 8 (DOJINDO) を用いて MIN6 細胞の細胞増殖量を比較したところ、PRSS8 発現抑制細胞では、培養開始から 3 日目、7 日目のタイムポイントにおいて、有意な抑制が認められた。また、通常の PRSS8 を過剰発現させた細胞とプロテアーゼ活性を消失させた PRSS8 の過剰発現細胞の比較では、活性の消失によって細胞増殖量が有意に低下していた(図 10)。これらの結果から、PRSS8 がβ細胞増殖に関与していることが示唆された。PRSS8 のβ細胞増殖への関連については今後さらに検証が必要である。

図10 MIN6細胞におけるPRSS8発現量と細胞増殖



(8) まとめ

これまで取り組んできた研究成果によって、「膵β細胞において PRSS8 が EGFR を介してインスリン分泌及び細胞増殖を制御する」という生理的作用が明らかになってきた。本研究の限界として、PRSS8 は EGFR の他にも複数の基質を介して作用していることが考えられるが、本研究ではこれまでに検証できていない。また、マウス・細胞を用いた研究であり、今後ヒトにおける検証が必要である。さらに、糖尿病の発症・進展における病態への関与も疑われる。こうした課題に取り組むことで、膵β細胞の機能不全・細胞数の減少を捉えるバイオマーカーやβ細胞の機能や細胞数を保持する治療ターゲットとなる可能性がある。

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 1件）

1. 著者名 Ishii Toshihisa, Miyasato Yoshikazu, Ichijo Masashi, Uchimura Kohei, Furuya Fumihiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Membrane protease prostaticin promotes insulin secretion by regulating the epidermal growth factor receptor pathway	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-36326-7	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石井 俊史
2. 発表標題 プロスタシンは膵b細胞におけるインスリン分泌と細胞増殖を制御する
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toshihisa Ishii, Kohei Uchimura, Fumihiko Furuya
2. 発表標題 The membrane protease prostaticin promotes insulin secretion by regulating the epidermal growth factor receptor pathway
3. 学会等名 82nd scientific sessions of the American Diabetes Association（国際学会）
4. 発表年 2022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
---------	---------