

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16234

研究課題名(和文) カルシウム感知受容体が膵細胞および腸管上皮細胞機能の調節に果たす役割の解明

研究課題名(英文) The role of calcium-sensing receptors in the regulation of pancreatic beta cell and intestinal epithelial cell function.

研究代表者

倉橋 清衛 (KURAHASHI, Kiyoe)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教

研究者番号：30567342

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)：ヒト活性型変異CaSRノックインマウス(ADH-KI)はインスリン分泌低下を伴う耐糖能異常が認められたが、膵島1個当たりのインスリン含量や膵島の数は野生型マウスと差がなく、CaSRシグナルの恒常的活性化によるインスリン分泌低下の機序は膵細胞量の減少ではなく、インスリン分泌機構の障害によるものと考えられた。ADH-KIにCaSRの阻害薬の投与したところ耐糖能の改善の傾向が認められ、CaSRが糖尿病の新たな薬物治療の標的になり得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

既報では活性型変異CaSRによる耐糖能異常は膵細胞量の減少によるとされていたが、本研究では新たな機序として膵細胞のインスリン分泌機構の異常を見出した。CaSR阻害薬の投与によりインスリン分泌の改善が認められたことから、CaSRが糖尿病の治療標的となりうることを見出した。CaSRを標的とした糖尿病治療は類を見ず、画期的と考えられる。今後、膵細胞選択的なヒト活性型変異CaSRノックインマウスを作出するなどしてさらに機序の解明を進め、CaSRを新たな治療標的として確立していく。

研究成果の概要(英文)：Human active mutant CaSR knock-in mice (ADH-KI) showed abnormal glucose tolerance with decreased insulin secretion, but the insulin content per islet and the number of islets were not different from those of wild-type mice, suggesting that the mechanism of decreased insulin secretion due to constant activation of CaSR signaling was not a decrease in pancreatic beta cell volume, but a decrease in insulin secretion. ADH-KI was administered with an inhibitor of CaSR, which had trend of improving glucose tolerance, suggesting that CaSR may be a novel target for drug therapy for diabetes.

研究分野：糖尿病

キーワード：糖尿病 膵細胞 カルシウム感知受容体 Calcilytic

1. 研究開始当初の背景

カルシウム感受性受容体(CaSR)は、主に副甲状腺および腎尿細管に発現し、細胞外 Ca 濃度変動に応じて PTH 分泌や尿細管における Ca 再吸収を調節することで、生体の Ca 恒常性に中心的な役割を果たしている。また、CaSR は膵細胞表面や小腸上皮細胞の管腔側および毛細血管側にも発現しており(Rasschaert J et al: Biochem Biophys Res Commun, 1999, Muramatsu M et al: Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2014)、インスリンおよびインクレチン分泌調節を介して血糖の調節にも関与しているという報告がある。

我々はこれまでの検討でヒト活性型変異 CaSR (A843E)を全身性に遺伝子導入した常染色体優性低 Ca 血症 1 型モデルマウス(ADH-KI マウス)では恒常的に CaSR シグナルが活性化しており、ヒトにおける表現型と同様に低 PTH 血症、低 Ca 血症等があることを見出していた (Dong B: JBMR, 2015)。予備的検討でこの ADH-KI マウスに耐糖能の悪化が認められることがわかり、さらに我々は CaSR の活性化を阻害する calcilytic を有しており、CaSR を標的とした細胞機能の調節が可能であることから、耐糖能障害における CaSR の役割を詳細に検討することが可能と考えた。

2. 研究の目的

CaSR がインスリン、グルカゴンおよびインクレチンの分泌機構に果たす役割および腸管上皮からのブドウ糖吸収能の調節に果たす役割を明らかにし、CaSR が 2 型糖尿病の治療ターゲットたり得るかを解明する。

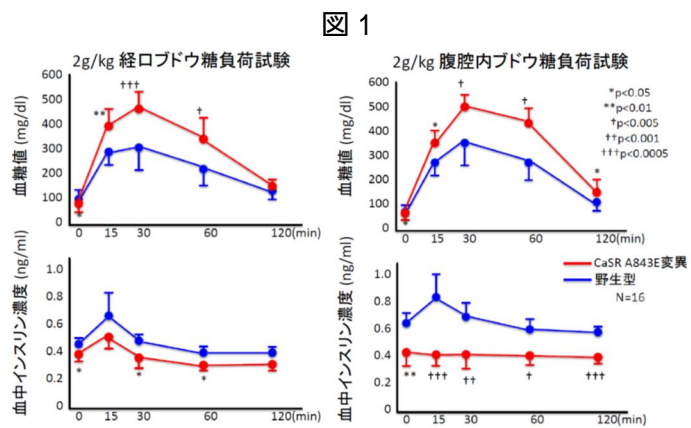
3. 研究の方法

まず、ADH-KI マウス個体を用いて耐糖能とインスリン分泌能を評価する。膵島の形態および膵におけるインスリン、グルカゴンの含量を免疫組織化学により明らかにする。マウス個体から膵島を単離して培養し、グルコース応答性インスリン分泌する。さらに、CaSR アンタゴニストである calcilytic の投与を行い、CaSR シグナルの抑制によるインスリン分泌の改善が可能か検討する。

4. 研究成果

(1) CaSR シグナルの持続的活性化はマウス個体においてインスリン分泌の低下を伴う耐糖能の悪化を引き起こす

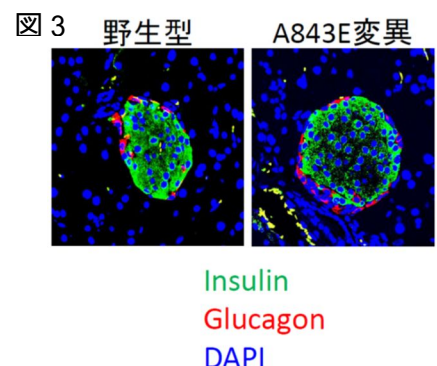
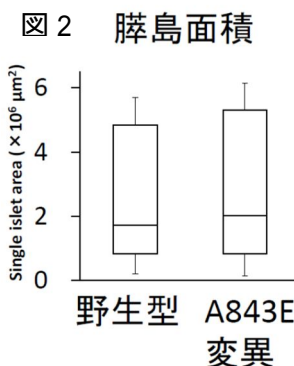
野生型マウスと比較して ADH-KI マウスでは経口および腹腔内ブドウ糖負荷にてインスリン分泌の低下を伴う耐糖能の低下が認められた(図 1)。空腹時血糖は野生型マウスと ADH-KI マウスで同等で、HOMA-IR も両者に差はなく、CaSR の持続的活性化による耐糖能悪化の原因としてインスリン抵抗性の関与は否定的と考えられた。また、経口ブドウ糖負荷試験と腹腔内ブドウ糖負荷で同等にインスリン分泌低下と耐糖能の悪化が認められたことから、CaSR シグナルの持続的活性化はインクレチン分泌に関与しないものと考えられた。少数のマウスを用いた検討で、CaSR の阻害剤である calcilytic の投与は ADH-KI マウスのインスリン分泌能とともに耐糖能を改善させる傾向が認められた。以上のマウス個体の解析から CaSR シグナルの持続的活性化による耐糖能の悪化は主として膵細胞におけるインスリン分泌能の低下にあると考えられた。



認められたことから、CaSR シグナルの持続的活性化はインクレチン分泌に関与しないものと考えられた。少数のマウスを用いた検討で、CaSR の阻害剤である calcilytic の投与は ADH-KI マウスのインスリン分泌能とともに耐糖能を改善させる傾向が認められた。以上のマウス個体の解析から CaSR シグナルの持続的活性化による耐糖能の悪化は主として膵細胞におけるインスリン分泌能の低下にあると考えられた。

(2) CaSR シグナルの持続的活性化によって膵島面積や膵島の構造は変化しない

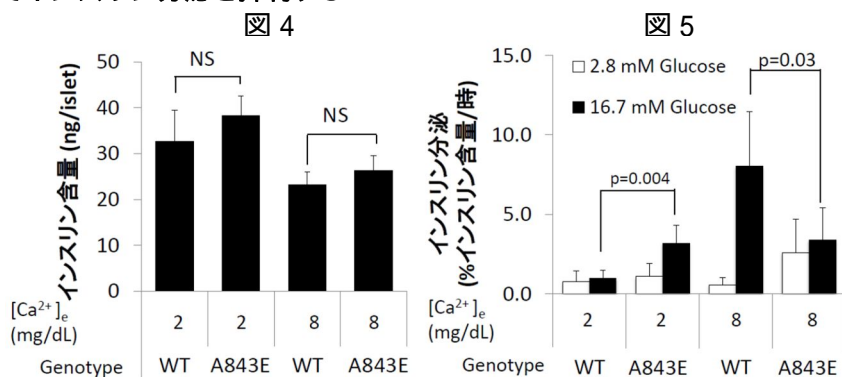
野生型マウスと ADH-KI マウスの膵臓切片を用いて膵島面積を測定したところ、両者に差は認められず(図 2)、膵島のインスリン陽性細胞とグルカゴン陽性細胞の構成にも変化がなかった(図 3)。以上から、CaSR シグナルの持続的活性化によって膵島面積や膵島の構造は変化せず、CaSR シグナルの持続的活性化による耐糖能の悪化は膵細胞の増殖の変化や細胞死によるものではないと考えられた。



Insulin
Glucagon
DAPI

(3) CaSR シグナルの持続的活性化は低細胞外 Ca^{2+} 濃度でインスリン分泌を促進し、生体内と同等の細胞外 Ca^{2+} 濃度でインスリン分泌を抑制する

単離膵島を用いて野生型マウスとADH-KIマウスの膵島1個当たりのインスリン含量を比較したところ、両者に差は認められなかった(図4)。さらに、単離膵島を用いてグルコース応答性インスリン分泌実験を行ったところ、低細胞外 Ca^{2+} 濃度(2



mg/dL)では野生型マウスから単離した膵島に比べADH-KIマウスから単離した膵島で有意にグルコース応答性分泌が良好だった。一方、生体内と同等の細胞外 Ca^{2+} 濃度(8 mg/dL)では野生型マウスから単離した膵島に比べADH-KIマウスから単離した膵島でインスリン分泌が低下していた(図5)。以上から、CaSRシグナルの持続的活性化は膵島当たりのインスリン含量は変化させず、インスリン分泌機構を障害することでグルコース応答性インスリン分泌を低下させるものと考えられた。CaSRシグナルの活性化は細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させることから、CaSRシグナルの持続的活性化によるインスリン分泌機構の障害に細胞内 Ca^{2+} 濃度の過剰な上昇が関わると考えられた。

以上の結果をまとめると以下ようになる。CaSRシグナルの持続的活性化はマウス個体においてインスリン分泌の低下を伴う耐糖能の悪化を引き起こす。インスリン分泌の低下は膵島量あるいは膵島に含まれるインスリン量の減少ではなく、インスリン分泌機構の障害によるものと考えられる。少数のマウスによる予備的な実験結果であるが、ADH-KIマウスにCalcilyticを投与することによりインスリン分泌の改善を伴う耐糖能の改善の傾向が認められたことから、過剰なCaSRシグナルの抑制がインスリン分泌を改善させる糖尿病薬物治療の標的となりうるものが示唆された。CaSRを標的とする糖尿病治療は類を見ないものであり、新たな糖尿病治療戦略の創出に資すると思われる。

今後、ヒト活性型変異CaSR(A843E)をノックインした膵細胞株MIN6の作製や、膵細胞特異的にヒト活性型変異CaSR(A843E)をノックインした遺伝子改変マウスを作製中で、さらに詳細なインスリン分泌機構障害のメカニズムの検討を計画している。

引用文献

- Rasschaert, J. and Malaisse, W. J. (1999) 'Expression of the calcium-sensing receptor in pancreatic islet B-cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 264(3), pp. 615-8.
- Muramatsu, M., Hira, T., Mitsunaga, A., Sato, E., Nakajima, S., Kitahara, Y., Eto, Y. and Hara, H. (2014) 'Activation of the gut calcium-sensing receptor by peptide agonists reduces rapid elevation of plasma glucose in response to oral glucose load in rats', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 306(12), pp. G1099-G1107.
- Dong, B., Endo, I., Ohnishi, Y., Kondo, T., Hasegawa, T., Amizuka, N., Kiyonari, H., Shioi, G., Abe, M., Fukumoto, S. and Matsumoto, T. (2015) 'Calcilytic Ameliorates Abnormalities of Mutant Calcium-Sensing Receptor (CaSR) Knock-In Mice Mimicking Autosomal Dominant Hypocalcemia (ADH)', *Journal of Bone and Mineral Research*, 30(11), pp. 1980-1993.

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Bingzi Dong, Itsuro Endo, Yukiyo Ohnishi, Yukari Mitsui, Kiyoe Kurahashi, Mai Kanai, Masahiro Hiasa, Jumpei Teramachi, Hirofumi Tenshin, Seiji Fukumoto, Masahiro Abe, Toshio Matsumoto	4. 巻 3
2. 論文標題 Persistent Activation of Calcium Sensing Receptor Suppresses Bone Turnover, Increases Microcracks, and Decreases Bone Strength	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JBMR PLUS	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） 10.1002/jbm4.10182	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 Okada A, Yamada-Yamashita M, Tominaga Y, Jo K, Mori H, Suzuki R, Ishizu M, Tamaki M, Akehi Y, Takashi Y, Koga D, Shimokita E, Tanihara F, Kurahashi K, Yoshida S, Mitsui Y, Masuda S, Endo I, Aihara KI, Kagami S, Abe M, Ferreri K, Fujitani Y, Matsuhisa M, Kuroda A.	4. 巻 -
2. 論文標題 Novel method utilizing bisulfite conversion with dual amplification-refractory mutation system polymerase chain reaction to detect circulating pancreatic -cell cfDNA.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig.	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） 10.1111/jdi.13806	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 Miyake M, Sobajima M, Kurahashi K, Shigenaga A, Denda M, Otaka A, Saio T, Sakane N, Kosako H, Oyadomari S.	4. 巻 29
2. 論文標題 Identification of an endoplasmic reticulum proteostasis modulator that enhances insulin production in pancreatic cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Chem Biol.	6. 最初と最後の頁 996-1009
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chembiol.2022.01.002.	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0件

〔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
---------	---------