

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23966

研究課題名(和文) 膵細胞における小胞体膜タンパクSTIMの意義の解明

研究課題名(英文) Investigation of the function of STIM in pancreatic b-cells

研究代表者

臼井 亮太 (USUI, RYOTA)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：40850996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：膵細胞において、様々なインスリン分泌調整機構が明らかにされているが、STIM及びストア作動性カルシウム流入(SOCE)について分子機構や生理学的意義については明らかにされていない。今回MIN6細胞を及び膵細胞特異的STIM1欠損マウスも用いて、欠損マウスでは単離膵島におけるインスリン分泌や細胞内カルシウム増加作用さらに、生体内における経口ブドウ糖負荷試験にてGPR40作動薬による血糖改善効果が障害されることを示し、膵細胞においてSTIM1によって誘導されるSOCEがGPR40活性化によるインスリン分泌の作用に重要な役割を担っていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵細胞にはグルコース応答性インスリン分泌以外にも様々なインスリン分泌調整機構が存在しているが、栄養素の一つである脂肪酸刺激によるインスリン分泌増強作用において、今回新たにSTIM1という因子が重要な役割を担っていることを明らかにした。

糖尿病患者においては膵細胞のSTIM1発現量が低下しているという報告もあり、本研究における成果とあわせて栄養素、あるいは糖尿病治療薬の効果予測因子としてSTIM1が有用である可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry (SOCE) is activated by endoplasmic reticulum (ER) Ca<sup>2+</sup> sensor STIM1 which senses depletion of Ca<sup>2+</sup> from the ER, and induces extracellular Ca<sup>2+</sup> influx through Orai1 to the cytosol to maintain intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis in various cell types, however the role of SOCE in pancreatic b-cells remains largely unknown. STIM1 or Orai1 KD MIN6 cells and islets from b-cell-specific STIM1 KO mice similarly abolished GPR40 agonist, fas-mediated potentiation of GIIS and fas-induced elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup> levels, while there was little effect on GIIS itself. In OGTT, blood glucose levels were similar in control mice and STIM1 KO mice without fas administration, however fas-mediated glucose lowering and insulin increasing effect were significantly lower compared with control. GPR40 signal activates STIM1 and SOCE activated by STIM1 is essential for GPR40-mediated potentiation of GIIS.

研究分野：インスリン分泌

キーワード：インスリン分泌 カルシウム

## 1. 研究開始当初の背景

膵細胞のインスリン分泌機構において、グルコース代謝と連動した電位依存性カルシウムチャンネル(VDCC)を介した細胞内カルシウム流入が重要な役割を担う一方、小胞体からのカルシウム放出もインスリン分泌制御に関与している。また小胞体ストレスが細胞機能不全をおこし糖尿病を引き起こすことが報告されており、膵細胞における小胞体の役割は大きい。これまで VDCC を介したインスリン分泌メカニズムに関する報告は数多いが、新たなカルシウム流入メカニズムである SOCE(store-operated calcium entry)に関する理解は不十分である。近年、細胞内カルシウム流入を担う SOCE を誘導することで小胞体カルシウム濃度を制御する小胞体膜蛋白 STIM(stromal interaction molecule)が同定されたが、その生理学的意義や制御機構は不明である。特に生体内において STIM1、STIM2 の細胞における役割や小胞体ストレスとの関係を検討した成果は一切ない。

## 2. 研究の目的

本研究では膵細胞において小胞体内カルシウムや小胞体ストレスがインスリン分泌に与える影響を、SOCE の鍵分子である STIM に注目して検討することを目的とする。その中でも、長鎖脂肪酸をリガンドとする GPR40 などの小胞体内カルシウム濃度が変化しうる刺激において、この機構が作用することが想定されるため、GPR40 刺激下でインスリン分泌や細胞内カルシウム動態を中心に解析する。

## 3. 研究の方法

膵細胞株である MIN6 細胞において、siRNA を用いて、STIM1、STIM2 をノックダウンした細胞を作出し、グルコース応答性インスリン分泌(GIIS)を定常状態、あるいは脂肪酸添加状態で評価する。さらに、細胞内及び小胞体内のカルシウム動態を Fura-2、G-CEPIA1er を用いて評価するとともに小胞体ストレスマーカーの評価を行う。また各種阻害薬を用いて STIM が関与し細胞機能に影響する細胞内シグナルを探索する。

さらに膵細胞株で得られた知見を、生体内での効果として応用するために、STIM1、STIM2 の遺伝子を欠損したマウスで解析を行うが、STIM1 や STIM2 を全身性に欠失したマウスは胎生致死あるいは早期に死に至るという既報があること、膵細胞における純粋な影響を解析することを目的とするため、Cre/loxP 系を用いて膵細胞特異的に STIM1、STIM2 の遺伝子を単独もしくは両者を欠失したマウス(STIM1cKO, STIM2cKO, STIM1/STIM2cKO マウス)を作出し、通常食あるいは高脂肪食条件下で随時血糖測定、及び体重測定を行うとともに細胞機能を評価するため経口ブドウ糖負荷試験やインスリン負荷試験を行う。膵切片を作出し、膵細胞量を評価するとともに、単離膵島を用いることにより、インスリン分泌能、細胞内カルシウム動態に加えて、膵細胞における小胞体ストレスマーカーの評価を行う。

#### 4. 研究成果

MIN6 細胞、及びマウス膵島において STIM1、Orai1 が蛋白レベルで発現していることを確認した後、MIN6 細胞を用いて STIM1 およびその下流因子である Orai1 を siRNA によりノックダウンすることで SOCE が著明に抑制されることから、膵細胞においても STIM1、Orai1 が SOCE に重要な役割を担っていることを確認した。さらに長鎖脂肪酸であるパルミチン酸や GPR40 作動薬である fasiglifam はグルコース応答性インスリン分泌を増強させ、細胞内カルシウムも増加させるが、その作用が STIM1 や Orai1 をノックダウンすることで著明に減弱されることを示した ( 図 1、 2 )。

また、膵細胞特異的 STIM1 欠損マウスも用いて解析を行ったところ、欠損マウスでは体重や随時血糖、膵島の大きさなどに変化は認めなかったが、単離膵島におけるインスリン分泌や細胞内カルシウム増加作用を解析したところ、ブドウ糖による反応性に変化はなかったが、fasiglifam による反応性は有意に低下していた。さらに生体内における経口ブドウ糖

負荷試験でも fasiglifam 非投与下では血糖値、血中インスリン値に差は認められなかったが、fasiglifam 投与下では膵細胞特異的 STIM1 欠損マウスの血糖値は有意に高値であり、インスリン分泌増加効果も消失していたことから、GPR40 刺激による血糖改善効果が障害されていることが明らかになった ( 図 3 )。一方、STIM1 欠損マウスでは STIM のもう一つのアイソフォームである STIM2 の mRNA 発現量が有意に増加しており STIM2 による代償機構が働いている可能性が示唆された。この知見を英国学術誌に報告した。

次に STIM2 において MIN6 細胞を用いて siRNA によりノックダウンするとインスリンコンテンツが有意に低下し、パルミチン酸負荷条件下では小胞体ストレスマーカーの発現量が増加していることから、STIM2 が小胞体内カルシウムを介して小胞体ストレスに影響

図 1. STIM1 ノックダウンの解析

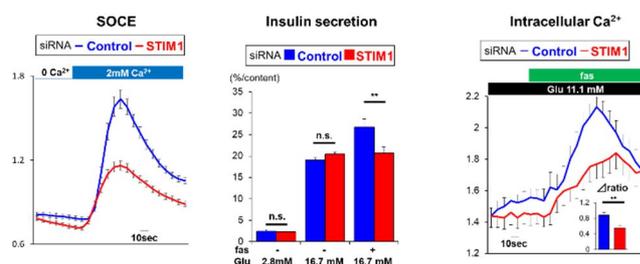


図 2. Orai1 ノックダウンの解析

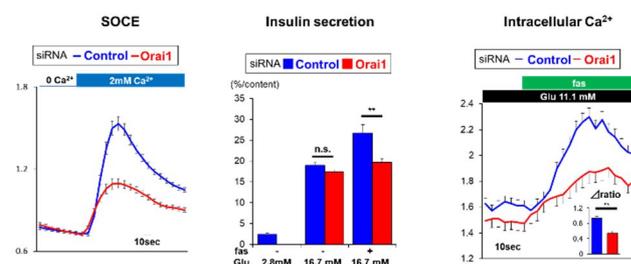
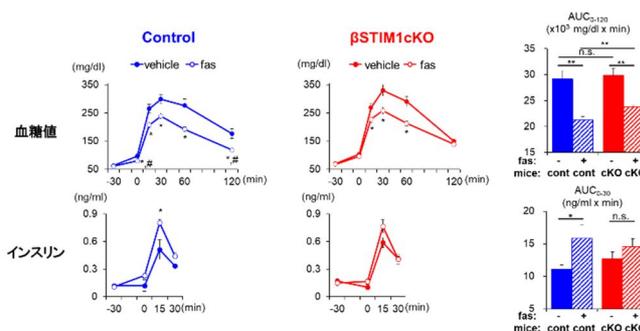


図 3. 膵細胞特異的 STIM1 欠損マウスの解析



を与えている可能性が示唆された。また膵 細胞特異的 STIM2 欠損マウスも用いて、経口ブドウ糖負荷試験を施行したところ、STIM2 欠損マウスでは耐糖能が悪化していたが、インスリン分泌は有意差を認めず、別の作用が影響している可能性が示唆された。

以上から STIM2 に関しては未だ解析途中ではあるが、膵 細胞において STIM1 によって誘導される SOCE が長鎖脂肪酸をリガンドとする GPR40 活性化によるインスリン分泌の作用に重要な役割を担っていることを明らかになった。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Usui Ryota, Yabe Daisuke, Fauzi Muhammad, Goto Hisanori, Botagarova Ainur, Tokumoto Shinsuke, Tatsuoka Hisato, Tahara Yumiko, Kobayashi Shizuka, Manabe Toshiya, Baba Yoshihiro, Kuroski Tomohiro, Herrera Pedro Luis, Ogura Masahito, Nagashima Kazuaki, Inagaki Nobuya	4. 巻 9
2. 論文標題 GPR40 activation initiates store-operated Ca <sup>2+</sup> entry and potentiates insulin secretion via the IP3R1/STIM1/Orai1 pathway in pancreatic $\beta$ -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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 1.Usui R, Yabe D, Fauzi M, Goto H, Botagarova A, Tokumoto S, Tatsuoka H, Tahara Y, Kobayashi S, Manabe T, Baba Y, Kuroski T, Ogura M, Nagashima K, Inagaki N
2. 発表標題 Store-operated Ca <sup>2+</sup> entry activated by STIM1 plays an essential role in GPR40-mediated $\beta$ cell potentiation.
3. 学会等名 American Diabetes Association the 79th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 臼井 亮太、矢部 大介、Muhammad Fauzi、Ainur Botagarova、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

〔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
---------	---------