

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17489

研究課題名(和文) 膵細胞における炭酸脱水酵素8 (Car8)によるインスリン分泌制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of insulin secretion by carbonic anhydrase 8 (Car8) in pancreatic beta cells

研究代表者

臼井 亮太 (Usui, Ryota)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：40850996

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)：Car8欠損マウスの単離膵島においてインスリン分泌や細胞内カルシウムにおいて有意な差を認めなかった。このことは単離膵島におけるCar8の発現が少なかったことが影響していると考えられる。一方Car8は肝細胞に高発現しており、Car8ノックアウトマウスから単離した肝細胞では野生型マウスと比して糖新生は有意に増加していた。ピルビン酸や乳酸などの糖新生を誘導する基質を加えた状態における肝細胞の細胞内カルシウム濃度の解析を行ったところ、野生型マウスと比して有意な細胞内カルシウム濃度上昇を認めた。このことからCar8は細胞内カルシウムシグナルを介して糖新生を負に制御してい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

糖代謝において、膵細胞によるインスリン分泌のみならず、肝臓での糖新生も必要な役割を担っている。今回単離膵島、及び膵細胞株においては発現量の少ないことが影響してかCar8欠損によるインスリン分泌の変化は同定できなかったが、肝細胞においてはCar8は細胞内カルシウムシグナルを介して糖新生を負に制御していることが示唆され、糖新生を制御する因子としてCar8がターゲットとなりえる可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：There was no significant differences in insulin secretion or intracellular calcium between isolated islets from Car8-deficient mice and wild-type mice. This may be due to the low expression of Car8 in isolated islets.

On the other hand, Car8 is highly expressed in hepatocytes, then glycogenesis was significantly increased in hepatocytes isolated from Car8 knockout mice compared to wild-type mice. Intracellular calcium concentration in the presence of glycosylation-inducing substrates such as pyruvate and lactate was also significantly increased in the hepatocytes from Car8 knockout mice compared to wild-type mice.

This suggests that Car8 negatively regulates glycogenesis via intracellular calcium signaling.

研究分野：インスリン分泌

キーワード：カルシウム 糖新生 インスリン分泌

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、脂肪酸などによる刺激では 1,4,5-三リン酸受容体 (Inositol trisphosphate receptor; IP3R) を介した小胞体からのカルシウム放出もインスリン分泌制御に大きく関与している。近年炭酸脱水酵素 8 (carbonic anhydrase 8; Car8) が IP3R を介した小胞体からのカルシウム放出を負に制御することが報告され、その役割について注目されているが、膵 細胞におけるその生理学的意義や制御機構は不明である。

2. 研究の目的

本研究では Car8 に注目し、1) Car8 を欠損する膵 細胞株、Car8 を欠損するマウスを作出し、耐糖能やインスリン分泌能を評価することで Car8 の膵 細胞における役割を明確化しインスリン分泌増幅経路を更に増強する新たな手段を模索する。またそれと同時に、Car8 ノックアウトマウスを用いて肝臓など糖代謝にかかわる臓器を解析することで、Car8 の糖代謝における役割を統合的に明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

膵 細胞株である MIN6 細胞において、siRNA により Car8 をノックダウンし、グルコース応答性インスリン分泌(GIIS)及び脂肪酸添加、あるいはその他の IP3 産生を増加させる刺激による GIIS 増強作用に対する Car8 の影響を検討する。

また、Car8 ノックアウトマウスの単離膵島で GIIS の評価や脂肪酸添加などの IP3 産生を増強させる刺激による GIIS 増強作用を評価し、細胞内カルシウム濃度も観察することで、膵 細胞でのインスリン分泌やカルシウム動態における Car8 の役割を明確にする。また Car8 ノックアウトマウスに対して経口ブドウ糖負荷や長鎖脂肪酸受容体作動薬投与を行い、血糖値、血中インスリン濃度を測定し、野生型マウスと比較する。

またデータベースの結果より Car8 は肝細胞にも発現していると考えられるため、ノックアウトマウスから単離した肝細胞を用いて糖新生を評価するとともに、糖新生の基質を加えた際の細胞内カルシウム濃度の変化を観察する。もし、両者に差異を認める場合は IP3 シグナルが影響している可能性を考慮し、阻害薬を用いた実験を行い、そのメカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

膵 細胞株である MIN6 細胞において Car8 を siRNA にてノックダウンしたがグルコース応答性インスリン分泌、及び脂肪酸によるインスリン分泌増強作用に変化は認めなかった。また MIN6 細胞における蛋白レベルでの Car8 発現量は非常に低い一方、単離膵島では発現が認められ肝細胞では高発現していた。

Car8 ノックアウトマウスにおける単離膵島においてグルコース刺激、あるいは脂肪酸負荷により刺激されるインスリン分泌を評価したが、野生型マウスと比べて有意な差を認めなかった。このことは単離膵島における Car8 の発現が少なかったことが影響していると考えられる。

一方、ウエスタンブロット法による解析で Car8 が肝細胞に高発現しており、IP3 シグナルが糖新生制御に関わっているという既報にヒントを得て、肝細胞における Car8 の役割に関する解析を行った。Car8 ノックアウトマウスから単離した肝細胞では野生型マウスと比して糖新生は有意に増加していた。そのメカニズムを明らかにするため、ピルビン酸や乳酸などの糖新生を誘導する基質を加えた状態における肝細胞の細胞内カルシウム濃度の解析を行ったところ、野生型マウスと比して有意な細胞内カルシウム濃度上昇を認めた。

このことから Car8 は細胞内カルシウムシグナルを介して糖新生を負に制御していることが示唆された。

これまでの研究から Car8 は腸管内分泌細胞である L 細胞において、IP3 シグナルを負に制御していることが明らかになっているため、同様の機序を介しているかについて現在検討を行っている。

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 Fujiwara Yuta, Yamane Shunsuke, Harada Norio, Ikeguchi Eri, Usui Ryota, Nakamura Toshihiro, Iwasaki Kanako, Suzuki Kazuyo, Yabe Daisuke, Hayashi Yoshitaka, Inagaki Nobuya	4. 巻 -
2. 論文標題 Carbonic anhydrase 8 (Car8) negatively regulates GLP-1 secretion from enteroendocrine cells in response to long-chain fatty acids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpgi.00312.2020	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
---------	---------