

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08673

研究課題名(和文)新規インスリン分泌関連蛋白の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of novel ER stress related protein

研究代表者

山口 賢(YAMAGUCHI, Suguru)

日本大学・医学部・研究医員

研究者番号：70451614

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)：新規ストレス応答蛋白として時計遺伝子であるChrono遺伝子を見出した。MIN6細胞やマウスの単離膵島において、小胞体ストレス刺激で、Chrono遺伝子のmRNA及びタンパク量の増加を認めた。マウスChrono遺伝子のイントロン1領域に、小胞体ストレス経路の一つであるPERK経路で誘導される遺伝子・ATF4の結合部位が存在した。Chrono遺伝子欠損マウスの耐糖能について実験を行っている。Chrono遺伝子が、ストレス下において、時計遺伝子の発現を調節することにより、細胞障害に重要な機能を有している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インスリン分泌不全においても時計遺伝子が関連している事が、報告されている。サーカディアンリズムを制御する時計遺伝子は、十数個同定されているが、小胞体ストレスとの関連性を示す報告はほとんどない。Chrono遺伝子は、コア時計遺伝子を抑制する機能を有する。Chrono遺伝子が、ストレス下において、時計遺伝子の発現を調整している可能性がある。本研究の発展により、ストレス下での時計遺伝子の発現経路の新たなメカニズムの解明につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We here found novel function of the circadian clock gene, CHRONO, in regulation of ER stress. The expression of CHRONO was studied in MIN6 cells and isolated mouse islets treated with the ER stress inducers thapsigargin by quantitative real-time PCR analysis. The mRNA levels of CHRONO were increased significantly in MIN6 treated with thapsigargin and in isolated islets treated with tunicamycin. Sequence analysis of the CHRONO locus disclosed a potential C/EBP-ATF composite element site intron 1. CHRONO expression was found to be upregulated by ER stress. However, in MEF cells lacking ATF4, ER stress failed to upregulate CHRONO expression. We are now searching glucose metabolism of CHRONO knockout mice. More research is needed to clarify the roles of CHRONO in regulation of ER stress.

研究分野：糖尿病

キーワード：膵 細胞障害 小胞体ストレス 時計遺伝子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病の原因遺伝子として、全ゲノム解析により、100に近い遺伝子が報告されているが、この中の多くがインスリン分泌や膵細胞における生存に関わるものである。詳細なインスリン分泌の制御や恒常性維持機構については、未だ、未解明の部分が多いのが現状である。膵細胞の機能異常及び細胞量の減少の原因として、小胞体ストレスや低酸素などの細胞内のストレスが関与している。膵細胞におけるグルコース応答性インスリン分泌機構、細胞の恒常性維持機構や生存能に関わる機序を解明する事は、今後の創薬への発展、糖尿病の根治に繋がる治療を考える上でもっとも重要な課題である。

### 2. 研究の目的

本研究は膵細胞における新たなインスリン分泌機序や膵細胞の恒常性維持機構を解明し、糖尿病の新たな治療戦略の可能性を探ることを目的とする。本研究における申請時の目的は、ecombinase-mediated cassette exchange (RMCE) 法を応用し、目的遺伝子を薬剤誘導性に過剰発現できる細胞株やノックダウン細胞株の樹立し、網羅的な解析を行うことであった。新規インスリン分泌調節蛋白として見出した、HIF-1の抑制遺伝子である CITED4 (Cbp/P300-interacting Transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 4) の機能解析を行う。また、新規小胞体ストレス応答遺伝子として、見出した時計遺伝子の1つである Chrono (circadian associated repressor of transcription, Ciart, gm129) 遺伝子の機能解析を行う。Chrono 遺伝子は2014年、国内外の研究グループから同時に報告された時計遺伝子である (PLoS Biol. 2014 Apr 15;12(4)、PLoS Biol. 2014 Apr 15;12(4))。サーカディアンリズムの乱れは、生活習慣病、肥満、糖尿病、発癌など様々な疾患に関与している。2型糖尿病におけるインスリン分泌不全においても時計遺伝子に関連している事が報告されているが、膵細胞における各時計遺伝子の機能は解明されていない部分が多い。

### 3. 研究の方法

- (1) RMCE 法を用い、薬剤誘導的に CITED4 を過剰発現する MIN6 細胞株を作製し、HIF-1 下流遺伝子及びインスリン分泌への影響を検討する。HIF-1 下流遺伝子である LDHA のノックダウン細胞を作製する。塩化コバルトで、HIF-1 を活性化し、インスリン分泌試験を行う。
- (2) 膵細胞における、低酸素応答反応を解析するために、MIN6 細胞を用いて、20%通常培養下と低酸素培養下のマイクロアレイ解析を行った。低酸素濃度は、生体での生理的な低酸素状況に近い5%の酸素濃度とした。発現の異なった遺伝子の中で、時計遺伝子の1つである Chrono 遺伝子の発現が、低酸素培養下で遺伝子発現が著明に増加していた。MIN6 細胞やマウスの単離膵臓島における Chrono 遺伝子やその他の遺伝子の発現について検討を行う。
- (3) マウスにおける Chrono 遺伝子について、プロモーターの解析を行ったところ、小胞体ストレス応答蛋白の結合配列が存在した。これについて検討を行う。
- (4) Chrono 遺伝子欠損 MEF 細胞を、理化学研究所 脳科学総合研究センター精神生物学研究チーム 内匠 透 チームリーダーより供与いただき、小胞体ストレス下での細胞生存能について検討した。
- (5) ヘテロ Chrono 遺伝子欠損マウスを理化学研究所より、提供していただいた。ホモ Chrono 遺伝子欠損マウスを作製し、糖負荷試験、インスリン負荷試験を行い、詳細な耐糖能について評価する。また、高脂肪食を与え、体重、血糖、血中インスリン濃度を測定する。

### 4. 研究成果

- (1) MIN6 細胞で、RMCE 法を用いて、薬剤誘導的に CITED4 を過剰発現させると、高グルコース刺激下でのインスリン分泌の亢進を認めた。CITED4 の過剰発現により、HIF-1 下流の遺伝子である Glut1 が約50%に減少し、Ldha が約20%に減少していた。そこで LDHA をノックダウンする事でインスリン分泌に影響を及ぼすかについて検討を行った。RMCE 法にて、薬剤誘導的に LDHA の shRNA を発現させると、高グルコース刺激下でのインスリン分泌が亢進した。MIN6 細胞株を塩化コバルト存在下で培養し、HIF-1 の発現を亢進させると、高グルコース刺激でのインスリン分泌が優位に抑制された。

細胞が低酸素にさらされると、HIF-1 $\alpha$  の発現が亢進し、糖輸送や解糖系の酵素が誘導され、低酸素状態での生存に有利な状況を作る。HIF-1 $\alpha$  が膵 $\beta$ 細胞機能について重要な役割

を担うとの報告は散見されるが、インスリン分泌を亢進させるか、あるいは、低下させるかは、報告によって異なり、見解の一致が得られていない。我々の膵β細胞株では、CITED4を過剰発現させる事で、HIF-1αが転写をつかさどる下流の遺伝子の発現が抑制される事がわかった。HIF-1αの機能を抑制する事で、インスリン分泌が亢進すると示唆された。

- (2) 低酸素や小胞体ストレス MINI6 細胞において、タプシガルギンによる薬剤の小胞体ストレス (0.5 uM · 12h) において、Chrono 遺伝子は 30 倍の発現量の増加を認めた。同様に、ツニカマイシン (2 ug/ml · 12h) による小胞体ストレスによっても 30 倍程度の mRNA の増加を認めた。低酸素刺激や小胞体ストレスでの Chrono 遺伝子の蛋白誘導は、ウェスタンブロット法による蛋白レベルでも確認された。小胞体ストレスでは、Bmal1 や Per1 などの他の時計遺伝子の発現も上昇する事がわかった。Bmal1 や Per1 は、両者とも mRNA レベルで、5 倍程度の増加を認めた。上記の結果は、マウスの単離膵島でも同様であった。
- (3) 小胞体ストレスによる Chrono 遺伝子の誘導は、ATF4 欠損 MEF 細胞では有意に抑制された (図 2)。
- (4) Chrono 遺伝子欠損 MEF 細胞とコントロール細胞で小胞体ストレス下での細胞生存能について検討を行った。両者で生存能の変化は認めなかった (図 3)。
- (5) Chrono 遺伝子欠損マウスを普通食で飼育し、継続的な検討、糖負荷試験を行った。これらの実験においては野生型マウスと比較し、有意な変化は認めなかった。現在、高脂肪食下での飼育を行って、同様の実験を行っている。

サーカディアンリズムを制御する時計遺伝子は、これまでに十数個同定されている。我々は、時計遺伝子の一つである Chrono 遺伝子が小胞体ストレス応答蛋白であり、転写因子 ATF4 を介して発現が調節される事を発見した。さらに、Chrono 遺伝子が、膵細胞株で発現しており、野生型マウスの単離膵島においても小胞体ストレス刺激で誘導される事がわかった。

膵細胞において、小胞体ストレスで時計遺伝子が誘導されたという報告は存在する (EBioMedicine, 2017 Apr;18:146-156)。しかしながら、その詳細な意義については、不明である。生体での恒常性維持において、サーカディアンリズムの乱れは、睡眠障害、生活習慣病、肥満、糖尿病など様々な疾患に關与している。2 型糖尿病におけるインスリン分泌不全においても時計遺伝子が關連している事が、報告されている。サーカディアンリズムの中樞は視交叉上核に存在するが、時計遺伝子は末梢組織においても発現している。膵細胞においても時計遺伝子は発現しているが、膵細胞における各時計遺伝子の機能は解明されていない部分が多い。Chrono 遺伝子は、細胞内ストレス応答に対する、時計遺伝

図1. 小胞体ストレスによるChrono遺伝子の誘導 (MIN6細胞)

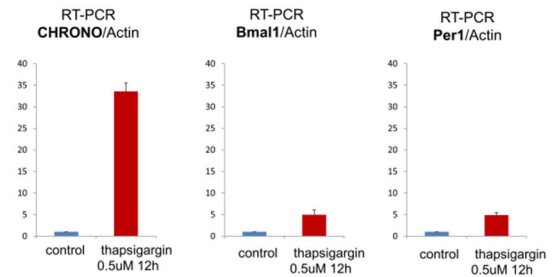


図2. ATF4欠損MEF細胞では、小胞体ストレスによるChrono遺伝子の誘導が有意に低下する

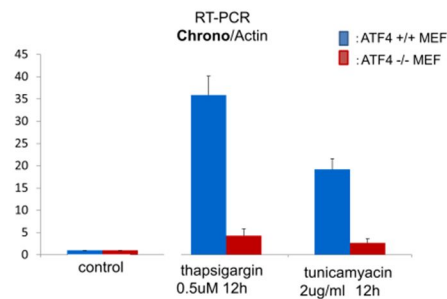
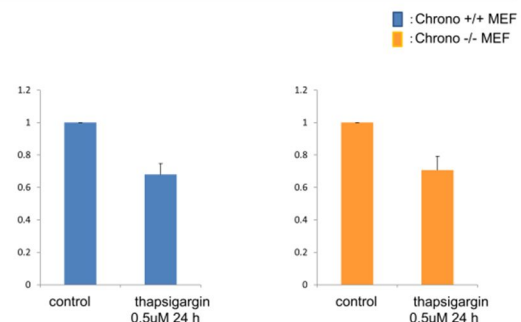


図3. 小胞体ストレス下でのChrono欠損MEF細胞の生存能  
理化学研究所 脳科学総合研究センター精神生物学研究チーム  
内匠 透 チームリーダーより供与



子群の発現変化の中枢を担っている可能性がある。本研究期間内において、腭細胞における Chrono 遺伝子の機能について、十分な研究結果を得ることができなかった。今後、さらに、Chrono 遺伝子欠損マウスの分析を行う予定である。また、RMCE 法にてノックダウンや過剰発現細胞株を作製し、機能解析について詳細な検討を加える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口賢、長澤瑛子、山名碧、小須田南、石原寿光
2. 発表標題 膵 細胞におけるChrono遺伝子の機能解析
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

1. 発表者名 山口 賢、長澤瑛子、山名碧、小須田南、石原寿光
2. 発表標題 インスリン分泌におけるCITED4の機能解析
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----