

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11146

研究課題名(和文) 糖尿病発症へのエピゲノムの関与

研究課題名(英文) Impact of epigenome on the onset of diabetes mellitus

研究代表者

倭 英司 (Yamato, Eiji)

武庫川女子大学・食物栄養科学部・教授

研究者番号：20273667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：エピゲノムに影響を与えるHDAC阻害剤の膵β細胞株に与える影響を検討した。HDAC阻害剤はインスリン基礎分泌量を増加させるが、グルコース応答性インスリン分泌は抑制した。網羅的遺伝子解析の結果、HDAC阻害剤は神経系遺伝子群を発現誘導し、細胞増殖遺伝子群およびインスリン分泌制御遺伝子群を発現抑制した。以上からHDAC阻害剤は膵β細胞において遺伝子転写レベルでインスリン分泌に影響することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HDAC阻害剤がインスリン分泌機構に遺伝子レベルで影響を与えることが判明したが、インスリン基礎分泌量の増加とグルコース応答性インスリン分泌抑制は老化マウスなどでも認められる現象で、2型糖尿病の発症原因の解明に寄与する可能性がある。またHDAC阻害剤は細胞増殖を抑制した。HDAC阻害剤は抗悪性腫瘍剤としても臨床応用されているが、膵内分泌細胞腫瘍にも効果がある可能性が示され、今後の臨床応用も期待できるが、インスリン分泌機構への影響についても十分留意する必要があることが示された。

研究成果の概要(英文)：The effects of HDAC-inhibitors affecting the epigenome on pancreatic beta cell lines were investigated. HDAC-inhibitors increased basal insulin secretion but suppressed glucose-responsive insulin secretion. As a result of comprehensive gene analysis, the HDAC-inhibitor induced the expression of the nervous system gene group and suppressed the expression of the cell proliferation gene group and the insulin secretion control gene group. From the above, it was revealed that HDAC-inhibitors affect insulin secretion at the gene transcription level in pancreatic beta cells.

研究分野：糖尿病学

キーワード：インスリン分泌 HDAC阻害剤 エピゲノム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

この研究のきっかけは、インスリン分泌機構の解析時に、インプリンティング遺伝子のエピゲノムの変動がインスリン分泌に関与している可能性を見出したことを端緒にしている。これまでの報告ではインスリン遺伝子など直接インスリン分泌に関わるもののエピゲノム変化が報告されていたが、我々の解析から、インスリン分泌の悪化には、それよりも global なエピゲノム変化が起きていることが示唆された。

そこで、私は、HDAC 阻害剤を用いて global に遺伝子変化をインスリン分泌細胞に起こさせることを着想した。また、近年、HDAC 阻害剤のリンパ球に対する効果から免疫抑制を起こすとの報告から糖尿病患者への応用が考えられるに至り、インスリン分泌細胞への影響を検討することは急務であると考えた。

これまで、免疫学的検討を行う目的でインスリン分泌細胞を用いた HDAC 阻害剤の検討がなされ、インスリン分泌には差異は生じないと報告はあるが、これらの濃度はエピゲノムに影響を与えていない可能性があり、しかも臨床的に投与する場合には、予期せぬ血中高濃度も考える必要がある。そこで本研究では、多くの実験でエピゲノム変化を生じさせ、しかも細胞の生存率には影響を与えない濃度を用いて検討を試みることにした。

2. 研究の目的

本研究では、臨床的に知られている他のインスリン刺激物質によるインスリン分泌動態を変化させるか否かを検討し、さらにこのようなインスリン分泌動態の変化を惹起する遺伝子群を網羅的に検索するために HDAC 阻害剤の有無によるマイクロアレイ解析を行った。また、ES 細胞についても同様に HDAC 阻害剤の有無によるマイクロアレイ解析を行った。

3. 研究の方法

HDAC 阻害剤はインスリン分泌動態に関与する可能性があるため、まずグルコース、KCl を用いた検討を行った。また、インスリン分泌に対する影響を他の HDAC 阻害剤を用いて行った。特に HDAC 阻害剤はクラスに分類されるため、クラスによる違いも確認するため、網羅的な検討を行っていく。また、クラスによる差異が同定できれば、機序の解明に役立つと考えられる。さらに、これらの変化を及ぼした HDAC 阻害剤の機序を解明する目的で Agilent 社のマイクロアレイ解析を行い、責任遺伝子の候補を同定する。

4. 研究成果

HDAC のインスリン分泌に対する影響を明らかにした。グルコースに対するインスリン分泌反応は、HDAC 阻害剤のクラスの区別なく、高用量であればグルコース応答性インスリン分泌を抑制することが示された (図 1)。

これらのことから HDAC 阻害剤はインスリン分泌に細胞障害性に働くのではなく、インスリン分泌制御に関与することを示唆する。

また、同時にこの影響は膵β細胞機能維持に重要な役割をもっている、Pdx1、MafA 遺伝子の抑制を伴うことが明らかになった (図 2)。

この現象は他の HDAC 阻害剤、VPA、NaB でも認められ、この現象が HDAC 阻害剤全般に認められることが明らかになった (図 3)。また、この遺伝子抑制効果はタンパク合成も抑制することが、Pdx1 染色、MafA 染色でも明らかとなった (図 4)。

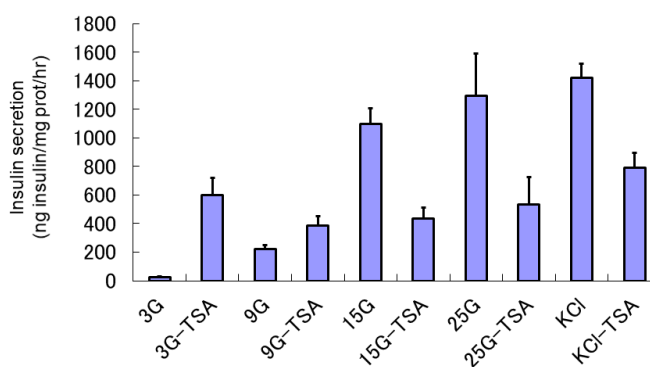


図1 TSA添加によるインスリン分泌の影響

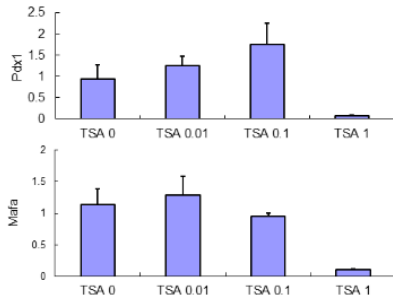


図2 TSA添加によるPdx1、MafA遺伝子発現への影響

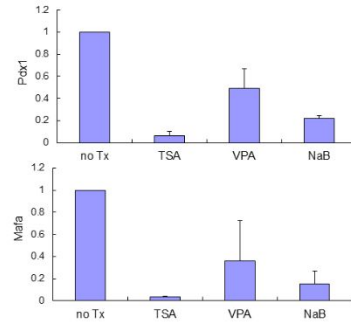


図3 各種HDAC阻害剤添加によるPdx1、MafA遺伝子発現への影響

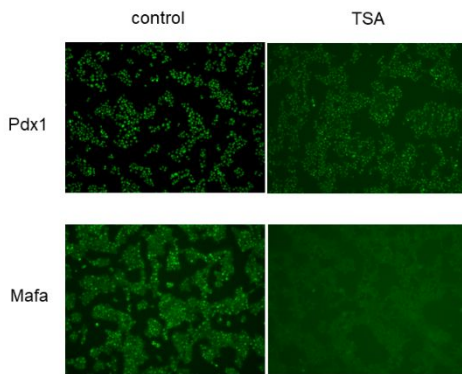


図4 TSA添加によるPdx1、MafA蛋白発現への影響

これらの HDAC 阻害剤の作用発現機序を明らかにする目的で、膵細胞を用いて HDAC 阻害剤処理と未処理の間で遺伝子発現の網羅的検討をするためアジレントマイクロアレイを行った。MIN6 細胞の HDAC 阻害剤 Trichostatin A(TSA) 処理群と未処理群から RNA を抽出し、Agilent 社のマイクロアレイを用いて遺伝子発現を網羅的に検索した。得られた遺伝子がどのような機能を有しているかを検討する目的で、Metascape が配信している web 上の検索エンジン (<http://metascape.org>) を用いて GO を基準としてエンリッチメント解析を行った。

その結果、TSA が発現を誘導する遺伝子は、"regulation of neuron differentiation", "sensory organ development", "synaptic signaling" など神経系の遺伝子群が検出された。一方、TSA により発現を抑制する遺伝子として、"cell cycle", "DNA replication", "insulin secretion" などに分類される遺伝子群が検出された(図5)。これらのことから、TSA は細胞増殖を抑制し、インスリン分泌は遺伝子レベルで機能抑制されることが判明した。なかでも、GO:0035774 である "positive regulation of insulin secretion involved in cellular response to glucose stimulus" として挙げられている 33 の遺伝子のうち GPR27, PDX1, PPP3CB, GPR68, BAIAP3, NR1H4, CLTRN, RFX6 の 8 遺伝子が TSA で抑制されており、これらの遺伝子が TSA によるインスリン分泌抑制機構に関与している可能性が高い。

この結果から、TSA はインスリン分泌機構の抑制のみならず、神経系の遺伝子発現亢進が認められた。幹細胞分化に TSA が利用されていることが知られて

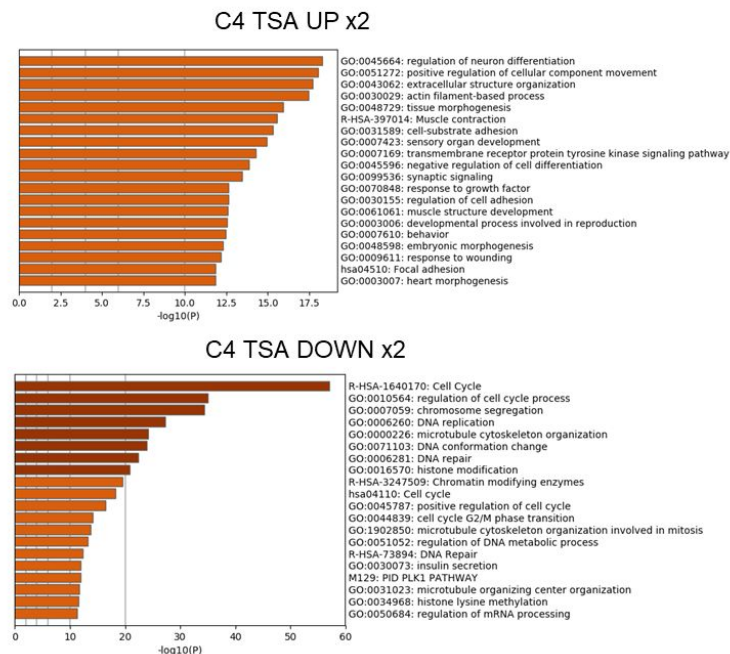


図5 TSAで増減するMIN6細胞発現遺伝子Enrichment解析

いる。またインスリン分泌細胞には神経系の遺伝子発現が多いことも知られている。そこで、ES細胞を用いてTSAで誘導される遺伝子群、抑制される遺伝子群を脾細胞株との比較を行った(図6)。その結果、ES細胞において、TSAが発現を誘導する遺伝子は”trans-synaptic

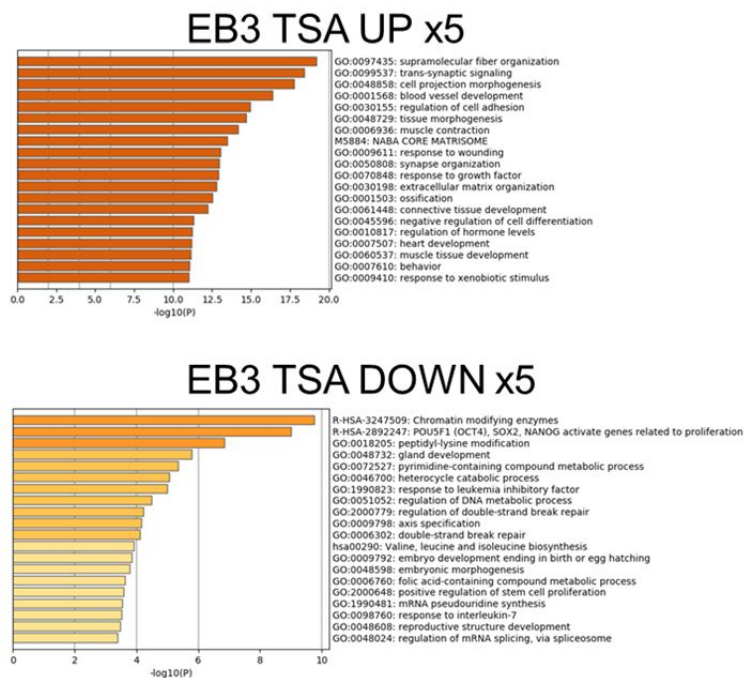


図6 TSAで増減するES細胞発現遺伝子Enrichment解析

signaling”、”synapse organization”などの神経関連遺伝子のみならず、”muscle contraction”、”ossification”、”heart development”など、ES細胞の初期分化誘導方法の一つである胚様体形成の初期分化で認められる神経系、心筋系の遺伝子群が認められた。一方で、”Chromatin modifying enzymes”などクロマチン形成関連遺伝子群の抑制と”POU5F1 (OCT4), SOX2, NANOG activate genes related to proliferation”、”response to leukemia inhibitory factor”など、ES細胞の未分化能維持に重要な、Oct4、Nanog 遺伝子の抑制と未分化状態維持に必須の液性因子 LIF 誘導遺伝子群の抑制が認められた。

TSA を始めとする HDAC 阻害剤はヒストンのアセチル化を介して、クロマチン構造の弛緩を誘導して、発現抑制された遺伝子発現を促進させることがわかっている。今回、2種類の細胞株、特に分化細胞と未分化細胞の TSA に対する遺伝子発現変動を対比して見ると、機能分化状態を維持している MIN6 細胞では抑制の遺伝子群が多く認められたのに対し、未分化細胞、ES細胞では発現促進される遺伝子群が多かった。このことから、また分化細胞である MIN6 細胞では TSA により細胞増殖関連遺伝子の著明な抑制が認められた。近年 HDAC 阻害剤の抗悪性腫瘍剤としての効果が認められるようになり、実際にポリノスタットは臨床応用もされているが、HDAC 阻害剤の増殖抑制効果が作用機序の一つである可能性も示された。

これらの結果から、HDAC 阻害剤がインスリン分泌機構に遺伝子レベルで影響を与えることが判明したが、インスリン基礎分泌量の増加とグルコース応答性インスリン分泌抑制は老化マウスなどでも認められる現象で、2型糖尿病の発症原因の解明に寄与する可能性がある。また HDAC 阻害剤は細胞増殖を抑制した。HDAC 阻害剤は抗悪性腫瘍剤としても臨床応用されているが、膵内分泌細胞腫瘍にも効果がある可能性が示され、今後の臨床応用も期待できるが、インスリン分泌機構への影響についても十分留意する必要があることが示された。

引用文献 Yamato E: High dose of histone deacetylase inhibitors affects insulin secretory mechanism of pancreatic beta cell line. *Endocr Regul*: 52, 21-26, 2018

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------