様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　 ７ 月 １７ 日現在

機関番号：１５４０１
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2022
課題番号：１９Ｋ１６５４２

研究課題名（和文）Integrator complex による脂肪細胞分化制御機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of adipocyte differentiation by Integrator complex

研究代表者
大谷　裕一郎（Otani, Yuichiro）

広島大学・病院（医）・講師

研究者番号：００８１７０９１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究で我々は脂肪細胞特異的IntS6 conditional knock-out マウスの産出に成功し、脂肪組織の萎縮、高血糖、体重増加不良といった全身性脂肪萎縮症に類似する表現型を呈する時期があることを示した。このことはIntegrator complex による遺伝子転写調整が脂肪組織の分化、維持に重要であることを示唆する結果であり、IntS6 やIntegrator complex が糖尿病やメタボリックシンドロームの治療ターゲットとなりうる可能性があると言える。

研究成果の学術的意義や社会的意義
我々はさまざまな組織でIntS6というタンパク質を欠失させることのできるマウスの作成に成功しました。本研究ではその中で脂肪細胞のみでIntS6を欠損させることに成功し、そのマウスでは脂肪組織の萎縮、高血糖、脂肪肝といった、代謝異常を呈することが明らかとなり、IntS6やIntegrator complex が糖尿病やメタボリックシンドロームといった疾患の新たな治療ターゲットとなる可能性があることがわかりました。

研究成果の概要（英文）：In this research, we succeeded the development of adipose specific IntS6 conditional knockout mouse which exhibit poor development of adipose tissue, hyperglycemia, and poor weight gain in high fat diet mimic the congenital lipodystrophy syndrome. Our results implicate that the regulation of gene expression by Integrator Complex is essential for the differentiation and maintenance of adipocyte and adipose tissue, and could be the treatment target of Diabetes mellitus and Metabolic syndrome.

研究分野：病態医化学

キーワード：IntS6　Integrator Complex　全身性脂肪萎縮症　遺伝子転写調節　メタボリック症候群　糖尿病　脂肪肝

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

申請者らは 2013 年に Akt substrate of 160 kDa (以下 AS160)を bait（エサ） とした Yeast two-hybrid による網羅的タンパク質相互作用のスクリーニングで Integrator complex subunit 6 (以下 IntS6)を見出した。AS160 は脂肪細胞や筋肉細胞に発現し Glucose Transporter 4 のトランスロケーションを制御するタンパク質であるため、3T3L-1 マウス前駆脂肪細胞を用い small interfering RNA （以下 siRNA）を応用した in vitro の実験を行った。驚いたことに Ints6 をノックダウンした 3T3L-1 マウス前駆脂肪細胞は、培地への分化誘導剤（キサンチン誘導体、インスリン、デキサメタゾン）添加による脂肪細胞への分化がほぼ完全に抑制された。同じく Integrator complex のサブユニットである Integrator complex subunit 11（以下 IntS11）のノックダウン実験でも同様の結果が得られたため、我々は Integrator complex が脂肪細胞の分化に重要な役割を担う複合体であると考えるに至った。(Otani Y, et al. Biochem Biophys Res Commun.)　IntS6 は以前、各種癌細胞における LOH（loss of heterozygosity）や発現低下の報告が相次いだため、Deleted in cancer cells 1（以下 Dice 1)と呼ばれ、がん抑制遺伝子であると予測されていた。しかし、2005 年に David Baillat らにより Integrator Complex (以下 IC)という巨大タンパク質複合体が発見され、このタンパク質が 14 あるサブユニットのうちの一つであることが報告されたことから IntS6 と呼ばれるようになった。当初報告された IC の機能は RNA ポリメラーゼⅡ(RNAPⅡ)の C-Terminal domain (CTD)に結合して U1, U2 small nuclear RNA(sn RNA) のプロセッシングを担うというものであった。(Baillat D et al. Cell. 2005 Oct 21;123(2):265-76.) が 2019 年に IC が RNAPⅡの promoter-proximal pausing を制御し messenger RNA（以下 mRNA）の転写開始の制御全般に関わるという報告がなされたことから IntS6 や IC が悪性腫瘍のみならず、肥満やメタボリックシンドロームの発症メカニズムとも関わっている可能性が高いと推測し研究を開始した。これまでに IntS6 ノックアウトマウスの報告はなく、全身ノックアウトマウスは胎生致死となる可能性も高かったことから、本研究では脂肪細胞特異的に IntS6 を欠失した IntS6 conditional knockout mouse(以下 IntS6 cKO mouse)を産出し糖、脂質代謝を中心とした表現型の解析を行うことを第一の目標とした。

2. 研究の目的

本研究の目的は Ints6 cKO mouse の糖、脂質代謝を中心とした表現型を解析すると同時に Ints6 cKO mouse の受精卵を保存し、Ints6 やＩＣ がメタボリックシンドロームや悪性腫瘍の治療ターゲットとなるかを探ることである。

３．研究の方法

研究開始当初は IntS6 と homologous なタンパク質は報告されておらず、その機能も未解明でプロモーターもはっきりとしていない。従って IntS6 を全身でノックアウトしたマウスは胎性致死や生育不良となり、十分な解析が行えない可能性が考えられた。例えば Integrator complex subunit 1(IntS1)のノックアウトマウスは胚盤胞早期で発生が停止しアポトーシスを起こすことが報告されている(Toshiyuki Hata , Manabu Nakayama. Biochim Biophys Acta 2007 Jul ; 1773 (7):1039-51.)。また Exon1 を loxp で挟むと IntS6 のプロモーター領域に loxp 配列を挿入する可能性があり IntS6 の遺伝子発現に影響を及ぼし正確な機能解析が困難になる危険性があったため、申請者は Exon5 を含む 1.1 kilo base pairs(以下 Kbp)を loxP で挟むストラテジーで cKO mouse を産出することとした。具体的には(Figure.1)に示す通り全 2652 bp のうち最

初の 883 base pairs でフレームシフトを誘導し Ints6 を欠失させる計画とした。

さらに本研究では IntS6 cKO マウスを、Adipoq-Cre-ERT2 マウス(アディポネクチンプロモーターで制御されタモキシフェン依存性に核内移行する Cre recombinase を発現するマウス)と交配させ、確実に IntS6 Exon5$^{floxed/floxed}$, Adipoq-Cre-ERT2 を産出し、マウスの性成熟を待ち生後 4–8 週後にタモキシフェンを投与し時期特異的に IntS6 を欠失させる予定とした、この手順を踏まえることで本研究が胎生致死の解析でおわるリスクを低減した。

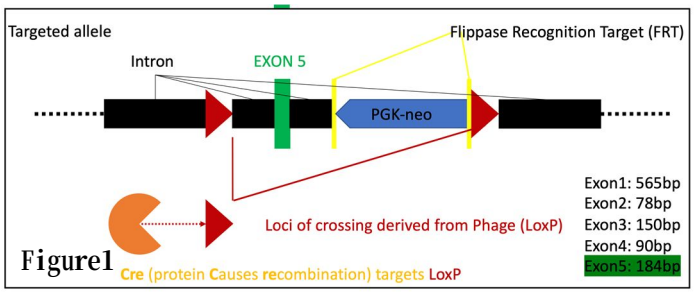
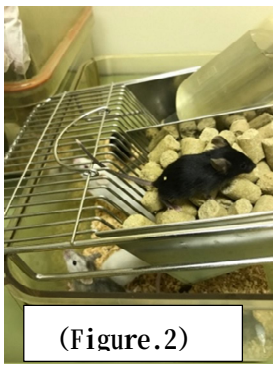


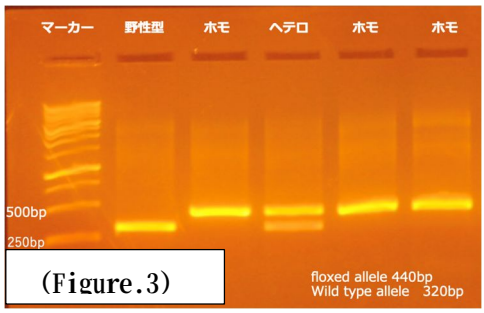
Figure1

４．研究成果

申請者は 2019 年より IntS6 cKO マウスの作成に向け、トランスジェニック社との共同作業で 2020 年 Ints6 Exon 5 targeted allele を持つ ES 細胞を樹立した。その後、ES 細胞を用いて本学自然科学研究支援開発センター外丸祐介教授、神田暁史先生により 2021 年 1 月 ES 細胞寄与度 100％のキメラマウスが産出された**(Figure.2)**。


(Figure.2)

同時に共同研究者である広島大学医化学教室 よりCAG-Flpe マウス、Adipoq-Cre-ERT2 マウスの凍結精子を分与いただき、自然科学研究支援開発センターにて人工授精を行い、それぞれ産出した。得られたES細胞寄与度100％のキメラマウスとCAG-Flpeマウスと自然交配させ、第1世代マウス(F1マウス)を産出した。これらのマウスで尻尾の組織を用いたジェノタイピングで薬剤耐性遺伝子(PGK-neo)を除去したマウス(flox/+, Flpe/+)を同定した。引き続き、これらのマウス同士の交配を行い、FLPeを除去し、Ints6 Exon5$^{floxed/wt}$,のホモ化をおこなった。産子に雌雄の極端な偏りや生育不良は認めずIntS6 Exon5$^{floxed/floxed}$, Adipoq-Cre-ERT2が産出された。野生型マウス、IntS6 Exon5$^{floxed/wt}$（ヘテロマウス)、IntS6 Exon5$^{floxed/floxed}$（ホモマウス）を区別するために行なったPCR増幅産物のアガロースゲル電気泳動の結果を示す**(figure.3)**。この結果をもとに、一度のPCRで容易に３つの遺伝子型の区別が可能であることがわかる。また、体外受精法で1組あたり30-70 個、合計15組 合計1000個のExon5$^{floxed/floxed}$, Adipoq-Cre-ERT2(+ or -)の受精卵を凍結保存し、今後の追加で行う胚移植を行う準備体制を整えた。



(Figure.3)

当初の予定通り IntS6 Exon5$^{floxed/floxed}$, Adipoq-Cre-ERT2 が産出されたため、2022 年 7 月から、タモキシフェンの腹腔内投与を行い、1 週間経過したマウスを解剖したところ顕著な脂肪組織の萎縮が認められた**(figure.4)**。また脂肪組織を採取し、抽出したタンパク質を用いた脂肪組織のウエスタンブロッティングで IntS6 の

発現低下を確認することができた(Figure.5)。

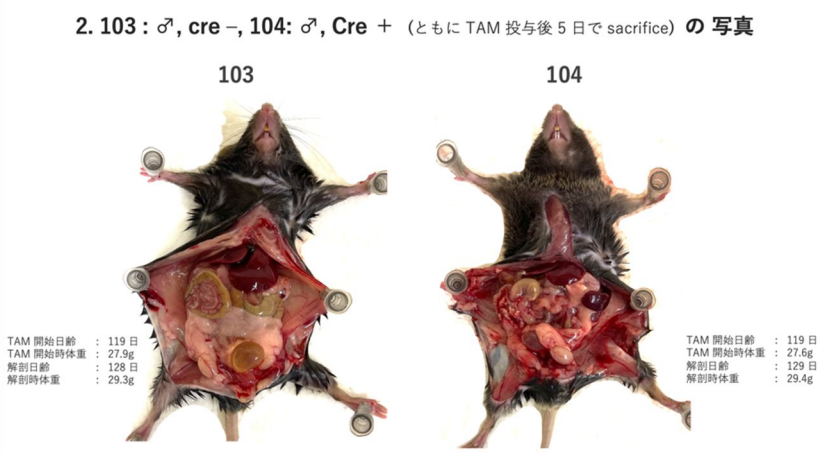


figure.4

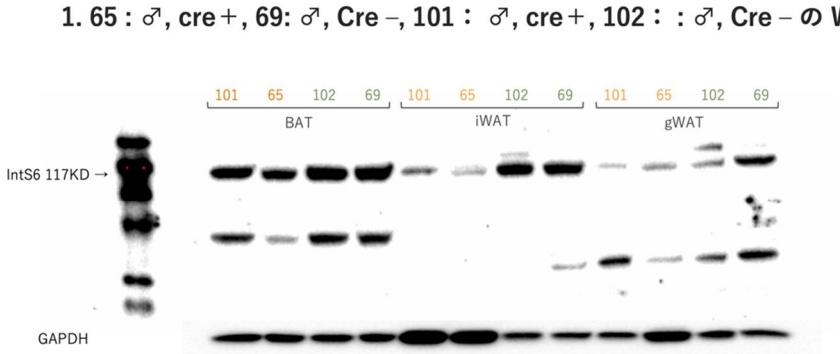


Figure.5

現在、我々は高脂肪食、通常食を与えCre+のマウス(脂肪組織でIntS6がノックアウトされているマウス)とCre-のマウス（IntS6がノックアウトされていないマウス）との間での群間比較を行っている。Figure.6に示す通りHFD開始7週にてCre+群ではCre-群と比較して体重増加が有意に低下していた。一部のマウスの解剖を行なったところHFDを投与したCre＋マウスでは組織学的に著明な脂肪肝を呈し、血糖値もCre+群で耐糖能障害を示唆しており、当初の予測通りIntS6やICはメタボリックシンドロームや糖尿病の治療ターゲットとなる可能性は十分にあることがわかった。またaP2 Creマウスと交配させることによりをlipodystrophyのモデルマウスの産出が可能となる可能性も十分にあると考え実験を進める予定である。

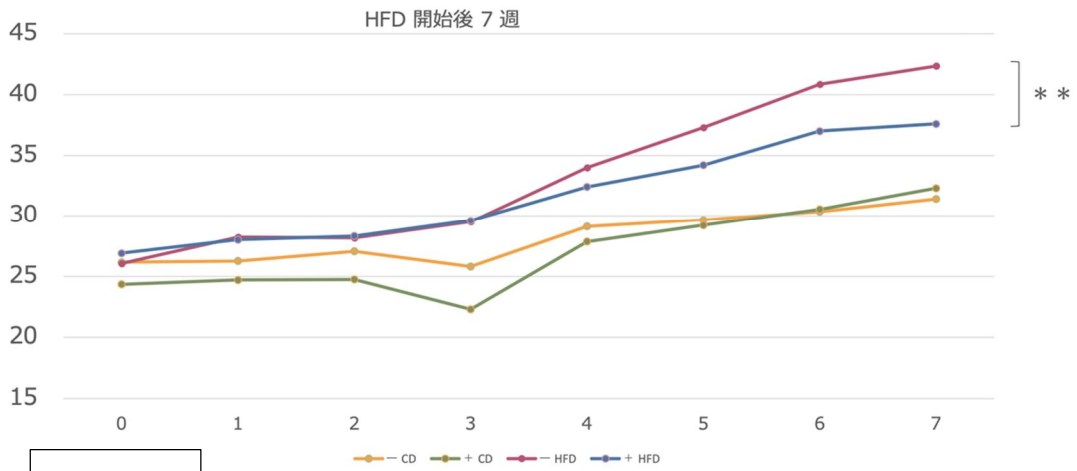


Figure.6

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　1件）

１．発表者名 重信　友宇也
２．発表標題 Adipocyte-Specific IntS6-Deficient Mouse Model Shows Tolerance to High-Fat Diet -Induced Obesity
３．学会等名 The Obesity Society Annual Meeting,（国際学会）
４．発表年 2024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