

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17963

研究課題名(和文) 膵細胞におけるCK2の役割

研究課題名(英文) Role of CK2 in unfolded protein response in pancreatic beta cells

研究代表者

高井 智子 (Takai, Tomoko)

神戸大学・医学研究科・学術研究員

研究者番号：90823047

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)：2型糖尿病の進展に小胞体ストレス(ER stress)による膵細胞量減少は重要である。Casein kinase 2 (CK2)はER stress下で、抗アポトーシス作用を持つことが報告されており、CK2の膵細胞で役割の解明を目的とした。

MIN6細胞は、ER stress下でのCK2ノックダウンにより、unfolded protein response(UPR)は亢進した。MIN6細胞にCK2の強制発現を行うと、CK2活性化、EDEM、GRP78が増加し、UPRは減少した。以上よりCK2はMin6細胞でERADを亢進し小胞体ストレスを軽減し、2型糖尿病の治療に役立つと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2型糖尿病の人口は増加傾向であり、日本での有病率は20歳以上で9%、高齢者ではさらに上昇する。

高血糖や肥満によるインスリン合成の負荷は小胞体ストレスを引き起こし、膵細胞量の減少の原因となる。これまでには、糖尿病モデルマウスにおいてCHOP、C/EBPの欠損、分子シャペロンの投与などにより小胞体ストレスを改善させ耐糖能の改善がみられている。

今回もCK2活性化により小胞体ストレス軽減がみられ、2型糖尿病の治療に役立つと考えられた。また、小胞体ストレスは2型糖尿病だけでなく、肥満、神経変性疾患など多数の疾患との関連が示唆されており、他分野にも原因の解明に役立つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Endoplasmic reticulum (ER) stress due to obesity and systemic insulin resistance is an important pathogenic factor that might lead to pancreatic cell failure. CK2 has a pro-survival function in ER stress function. The aim of this study is to clarify the role of CK2 in the pancreatic beta cells.

CK2beta, which leads to activation of CK2, overexpressed Min6 cells improved UPR signals induced by tunicamycin and showed increase in EDEM and GRP78. The alpha1-antitrypsin variant is known to a model of ERAD substrate. The degradation of the alpha1-antitrypsin variant was promoted by co-expression with CK2beta.

The findings of this study suggested that CK2beta ameliorated UPR via ERAD activation and prevented pancreatic beta cells from ER-stress induced apoptosis. CK2 activation might be a new strategy for prevention of pancreatic cell failure.

研究分野：内分泌・代謝

キーワード：2型糖尿病 小胞体ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病の発症・進展において、小胞体ストレスによる膵細胞量の減少は重要な原因のひとつである。膵細胞では、肥満に伴うインスリン抵抗性や高血糖への反応としてインスリン合成が増大するため、膵細胞は発達した小胞体を持つ。過度のインスリン合成の負荷により正常に立体構造が作られなかったタンパク(unfolded protein)は蓄積し、小胞体ストレス亢進がアポトーシスを誘導することで、膵細胞量は減少する。私たちの研究室では、CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) family に属する転写因子である C/EBP に注目している。C/EBP は小胞体ストレスによって発現が誘導され、GRP78 の誘導抑制を介してさらに小胞体ストレスを増悪させることで、膵細胞量を減少させることを明らかにした。最近私たちは、C/EBP は膵細胞株である Min6 細胞内で、Casein kinase 2 (CK2)によりリン酸化されていることを明らかにした。CK2 はキナーゼ活性をもつサブユニット、活性調節を行うサブユニット各 2 個ずつから構成されている。既報において CK2 は小胞体ストレスに対して翻訳抑制を行う ATF4、アポトーシスを誘導する CHOP をリン酸化し、転写機能の調節により小胞体ストレスに対して抗アポトーシス作用を持つと考えられていた。このため CK2 活性化は小胞体ストレスを軽減させ、C/EBP の蓄積の減少や膵細胞の維持につながると考えられ、研究を行うこととした。

2. 研究の目的

CK2 は、小胞体ストレスに対して抗アポトーシス作用を持つと考えられていた。CK2 の阻害は小胞体ストレスを増強しアポトーシスを引き起こすことが知られており抗癌剤として研究されているが、CK2 の膵細胞への作用に関する報告はこれまでにみられなかった。このため膵細胞への CK2 の作用を明らかにし、2型糖尿病の治療に役立てることを目的とした。

3. 研究の方法

独自に作成した小胞体ストレス関連糖尿病モデルマウス(膵細胞特異的 C/EBP トランスジェニックマウス)を保有しており(J Clin Invest. 2010;120:115-26)、このマウスや2型糖尿病のモデルマウスである db/db マウスなどを用いて膵島での CK2 の発現を検討し、マウス膵細胞株である Min6 を使用して CK2 阻害・活性化による小胞体ストレスシグナルへの影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 膵細胞での CK2 の発現

CK2 は酵素活性をもつサブユニットとサブユニットそれぞれ 2 個ずつの 4 量体で形成されている。また、Cdc37 は CK2 によって特異的にリン酸化されシャペロンとして働くことが示されており CK2 活性の評価に用いた。

はじめに、Min6 細胞において小胞体ストレス下(ツニカマイシン 2 µg/mL)での CK2 の発現について検討した。小胞体ストレス下において CK2 の発現量はあまり変化がなかったが CK2 は増加を認めた。また、p-CDC37 は小胞体ストレス下において亢進した。

次に db/db マウスの膵島を摘出しコントロールマウスである db/m マウスと比較したところ

同様の变化を認めた。また、膵細胞特異的 C/EBP トランスジェニックマウス、高脂肪食飼育マウスにおいても同様の結果を得た。

以上のことから、2型糖尿病モデルマウスの膵細胞において、小胞体ストレスにより CK2 が増加し CK2 活性は増加することが示された。

(2) CK2 が Min6 細胞の増殖、小胞体ストレスシグナルに与える影響

Min6 細胞にツニカマイシン(2 μg/L)処理を行い小胞体ストレス下で培養し、CK2 阻害薬 (CX4549 10μM)による UPR への影響について検討した。Min6 細胞はツニカマイシン(2 μg/L) 処理により unfolded protein response は亢進し、C/EBP、CHOP の発現の亢進、アポトーシスの亢進による Cleaved caspase 3 の増加を認め、cell viability は減少した。ツニカマイシンと CK2 阻害薬の併用により UPR はさらに亢進し、cell viability は減少した。

次にアデノ随伴ウイルスにより Min6 細胞へ CK2 の過剰発現を行ったところ Cdc37 のリン酸化は亢進し、CK2 の活性化が確認できた。この際分子シャペロンである GRP78、小胞体関連分解(Endoplasmic reticulum-associated degradation, ERAD)タンパクである EDEM, Derlin-2 の増加を認めた。この Min6 細胞へツニカマイシン処理を行ったところ、ツニカマイシンによる C/EBP、CHOP の発現の亢進、アポトーシスの亢進による Cleaved caspase 3 の増加は軽減された。また、Min6 細胞へ CK2 のノックダウンを行ったところ、UPR は亢進した。GRP78, EDEM, Derlin-2 は CK2 ノックダウンにより減少を認めた。

(3) CK2 活性化による小胞体ストレス改善の機序

これまでに CK2 は CHOP や ATF4 のリン酸化し転写活性を調節することで、小胞体ストレスから保護していると考えられていた。

しかし、私たちの検討では CK2 過剰発現により GRP78, EDEM, Derlin-2 の増加を認め、ERAD を亢進させる働きが示唆され、その機序について検討した。

CK2 は CHOP や ATF4 と DNA と結合する領域である bZip ドメインを介して結合する。ATF6 は小胞体膜貫通タンパクで、通常状態では小胞体に存在する。ATF6 は unfolded protein の蓄積を感知すると切断され細胞質側領域が核へ移行し転写因子として働き UPR シグナルを誘導する。その細胞質側領域に bZip ドメインを持つことから、CK2 は ATF6 と結合していると考えた。Min6 細胞内で、共免疫沈降により CK2 と ATF6 の結合を示した。また、大腸菌で TF タグ融合 ATF6 を作成し、CK2 と in vitro で反応させたところ結合が示され、また phos-tag ゲルを用いてリン酸化を確認した。

CK2 による ATF6 のリン酸化部位の同定や、その部分のアラニン置換による GRP78, EDEM, Derlin-2 の発現への効果は現在検討中である。

(4) CK2 活性化による unfolded protein 蓄積の改善

これまでの結果から CK2 の活性化により GRP78, EDEM, Derlin-2 の増加による ERAD を亢進が示唆されたため、実際に Unfolded protein が減少するかを検討した。

アンチトリプシン欠損症の患者から単離されたアンチトリプシン変異型は、ERAD の基質となる。Min6 細胞にアンチトリプシン変異型と CK2 を共発現させたところ、アンチトリプシン変異型の蓄積は抑制された。

以上より、CK2 は ATF6 のリン酸化により GRP78, EDEM, Derlin-2 の増加による ERAD の亢進を通して小胞体ストレスに対し保護効果をもつと考えられた。CK2 活性化は膵細胞で小胞体ストレスを改善し、2型糖尿病の治療につながると考えられた。

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kanno A, Asahara SI, Kawamura M, Furubayashi A, Tsuchiya S, Suzuki E, Takai T, Koyanagi-Kimura M, Matsuda T, Okada Y, Ogawa W, Kido Y.	4. 巻 10(3)
2. 論文標題 Early administration of dapagliflozin preserves pancreatic beta cell mass through a legacy effect in a mouse model of type 2 diabetes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig.	6. 最初と最後の頁 577-590
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.12945.Epub 2018 Nov.8.	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高井智子 井上佳歩 松田友和 木村真希 浅原俊一郎 木戸良明
2. 発表標題 膵 細胞のUnfolded protein responseにおけるCK2の役割
3. 学会等名 第56回日本臨床分子医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高井智子 松田友和 木村真希 浅原俊一郎 木戸良明
2. 発表標題 膵 細胞のUnfolded protein responseにおけるCK2の役割
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
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
---------	---------