

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17977

研究課題名(和文)新規糖尿病関連遺伝子UBE2E2の膵細胞における役割の解明

研究課題名(英文)Role of UBE2E2 in regulating pancreatic beta cell mass

研究代表者

桜井 賛孝 (Sakurai, Yoshitaka)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70748376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムワイド関連解析で東アジア人特有の2型糖尿病関連遺伝子としてUBE2E2が報告されたが、その機序は不明である。膵細胞における役割を検証するため、膵細胞特異的UBE2E2トランスジェニックマウス(TGマウス)を作製した。独立した2ラインで糖負荷試験時のインスリン分泌低下を伴う高血糖を呈した。離乳期以前の細胞量と増殖能の低下、p21の発現高値を認めた。プロテオーム解析でMesothelin(MSLN)の著明な低下を認めたが、MSLN全身ノックアウトマウスは正常耐糖能であった。膵細胞のUBE2E2の過剰発現は個体としての膵細胞量の低下を介して糖負荷後のインスリン分泌低下に関与していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究に用いるモデルマウスは当研究室で独自に作製されたものであり、類似の研究結果は国内外を含め未だ報告されていない。また、以前より日本人と欧米人の糖尿病の病態は異なることが広く知られているが、本研究結果で明らかになった事象に基づき検討を行うことで、日本人に特徴的な糖尿病発症の素地やメカニズムの一端を解明できるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：In 2010, large-scale Genome-Wide Association Study (GWAS) identified novel susceptibility loci for T2DM. In this study, SNPs in UBE2E2 were associated with T2DM in populations of East Asian descent but not in populations of European descent. To verify its role in pancreatic beta cells, we generated pancreatic beta cell-specific UBE2E2 transgenic mice. Two independent lines exhibited hyperglycemia with decreased insulin secretion during glucose tolerance test. They showed decreased beta cell mass and proliferative capacity of beta cells before weaning, and elevated gene expression of p21 in pancreatic islet cells. Proteome analysis showed a marked decrease in Mesothelin (MSLN), but MSLN knockout mice had normal glucose tolerance. Overexpression of UBE2E2 in pancreatic beta cells was associated with decreased insulin secretion after glucose loading via a decrease in beta cell mass.

研究分野：糖尿病

キーワード：インスリン分泌

1. 研究開始当初の背景

ゲノムワイド関連解析 (GWAS; Genome-Wide Association Study) により 2006 年に 2 型糖尿病関連遺伝子として TCF7L2 が同定され (NatGenet.38:320,2006)、2008 年には電位依存性カリウムチャネルである KCNQ1 が同定された (NatGenet.40:1092,2008/NatGenet.40:1098, 2008)。その後、日本人の糖尿病患者 11000 人と健康な 8500 人を対象にした GWAS の結果、UBE2E2 と C2CD4A/B の遺伝子変異が 2 型糖尿病の発症に強く関連していることを、2010 年に当科の研究グループが報告した (Nature Genetics.42:864-8,2010)。この中で、C2CD4A/B は民族を超えて共通の 2 型糖尿病遺伝子であったが、UBE2E2 は日本人や東アジア人 (シンガポール、香港、韓国) でのみ有意な 2 型糖尿病遺伝子であった。さらに、UBE2E2 のリスクアレルはインスリン分泌指数である HOMA- β が低値であることと関連していることも明らかになった。ユビキチン修飾系は E1(ユビキチン活性化酵素)、E2(ユビキチン結合酵素)、E3(ユビキチンリガーゼ)の連続的な酵素反応によって引き起こされる翻訳後修飾系である。E3 が選択的に識別する標的タンパク質に形成されるポリユビキチン鎖が、プロテアソームによる選択的タンパク質分解の識別シグナルとなる。ユビキチンを活性化する E1 は主に 1 種類であるが、E2 はヒトでは約 30 種類以上、E3 は数百種類以上存在し、これらの反応系は下流に行くほど多様性を増す。また、ユビキチン分子内に存在する 7 つにリジン残基 (K6、K11、K27、K29、K33、K48、K63) にユビキチン間結合が生じることが報告されているが、近年は従来のタンパク質分解の識別シグナルとなるのみならず、形成されたポリユビキチン鎖が他のシグナル経路を活性化することも明らかになっており (Mol Cell.20;64(2):251-266,2016)、ユビキチン修飾系はさらに複雑な様相を呈している。ユビキチンのキャリアー蛋白として機能する種々の E2 の中で、UBE2E2 は 1997 年に日本人のグループによってクローニングされたが (Cytogenet Cell Genet.78:107-111,1997)、その詳細な機能に関しては明らかでない点が多く、特に膵細胞における役割は全く不明である。

2. 研究の目的

予備検討として、野生型マウスにおける *Ube2e2* mRNA の全身での発現分布を確認したところ、筋肉、白色脂肪組織、肝臓、大脳、視床下部、膵島の中では大脳、視床下部の中枢神経組織で高発現だったが、膵島を含め基本的には全身で広範に発現していた。また、高脂肪食負荷 (約 14 週間) を行った野生型マウスにおいて *Ube2e2* 遺伝子の発現は、肝臓と視床下部では変化を認めなかったが、膵島では有意に増加、脂肪組織では有意に低下していた。高脂肪食負荷を行った膵島では既報と同様にポリユビキチン鎖の形成が亢進していたが、この際に UBE2E2 蛋白の発現も増加していた。病態モデルで UBE2E2 の発現が増加する意義や、膵細胞における役割を検証するため、機能亢進型のモデルとして、膵細胞特異的 UBE2E2 トランスジェニックマウスを作製し、その表現型を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

マウス膵島の mRNA 由来の cDNA をテンプレートとして UBE2E2 蛋白をコードする exon2~6 の領域 (606bp) をクローニングした (exon1 は蛋白をコードしない)。なお、ヒトとマウスの同領域の相同性は 92% であった。また、他の E2 蛋白と比較した際、特徴的な配列は exon2 に含まれていた。このようにクローニングした UBE2E2 遺伝子を RIP プロモーター下に配置したコンストラクトを構築しトランスジェニックマウス (Rip-UBE2E2-TG マウス) を作製した。複数のラインの中から、繁殖状況が良好な 2 ライン (ライン 18、ライン 20) を選別して解析する方針とした。マウスのバックグラウンドは C57BL/6J であり、対照群には交配で産出された野生型マウスを用いた。

4. 研究成果

実際に作製したトランスジェニックマウスの状態を評価した。UBE2E2 領域のゲノム DNA に着目した定量的 PCR により transgene のコピー数はライン 18、ライン 20 において各々 3 と 35 と推算された。また、TG マウスの膵島では UBE2E2 遺伝子は各々約 40 倍、約 80 倍に増加していた。ウェスタンブロットでは、いずれのラインも膵島における UBE2E2 が蛋白レベルで十分に過剰発現されており、免疫組織染色でも UBE2E2 蛋白は膵細胞で過剰発現されていることを確認できた。また、他の臓器・組織では UBE2E2 の発現量に差を認めず、本研究で用いたトランスジェニックマウスにおいて UBE2E2 の過剰発現は膵細胞に特異的であると考えられた。Rip-UBE2E2-TG マウスを用いた解析によって以下の点が明らかになった。

糖負荷後の高血糖

体重や随時血糖は対照群と同等であった。また、インスリン刺激試験においても対照群との差を認めず、インスリン感受性も対照群と同等であった。一方で、経口糖負荷試験、腹腔内糖負荷試験では、いずれのラインにおいてもインスリン分泌低下を伴う高血糖を認めた。これらの結果はアダルト期として約 16 週齢での評価であるため、糖負荷後の高血糖という所見が若齢でも認

められるのかということを検討するため、6 週齢時においても経口糖負荷試験を行ったところ、いずれのラインにおいてもアダルト期と同様にインスリン分泌低下による糖負荷後の高血糖を認めた。Rip-UBE2E2-TG マウスは、若週齢時からインスリン追加分泌の低下という表現型を呈していると考えられた。

細胞量の低下

免疫組織染色の結果、TG マウスは膵島の平均サイズが有意に小さく、細胞領域も有意に低下していた。一方、インスリン含量で補正したグルコース応答性のインスリン分泌は保たれており、また、単離膵島におけるインスリン遺伝子や細胞の分化に関与する遺伝子発現も対照群と同等であったため、個体としての細胞量の低下が Rip-UBE2E2-TG マウスの表現型の主な要因であると考えられた。TG マウスの細胞量の低下は出生直後では明らかではないが、2 週齢時には既に認められており、離乳期以前の膵島の形成、増大に異常があることが示唆された。

p21^{Cip1} 遺伝子の発現の上昇

Rip-UBE2E2-TG マウスの膵島では、いずれのラインにおいても細胞周期の制御因子の一つである *p21^{Cip1}* 遺伝子の発現が 3 週齢時、アダルト期のいずれにおいても有意に高かった。膵細胞株である MIN6 細胞において UBE2E2 を過剰発現しても *p21^{Cip1}* 遺伝子の発現に変化を認めなかったため、この所見は UBE2E2 を過剰発現した膵島においてのみ認められる何らかの変化に関連したものであると推察された。*p21^{Cip1}* 遺伝子は細胞増殖に関して抑制的に働くことが知られており、実際に 1 週齢の TG マウスの膵細胞において BrdU 陽性細胞の割合は有意に少なく、細胞の増殖能の低下が示唆された。

Msln 遺伝子の発現の低下

単離膵島を用いたプロテオーム解析を行った結果、2,293 種類の蛋白質を同定し、519 種類の蛋白質が有意に変化していた。TG 群で有意に発現増加していた蛋白質、低下していた蛋白質に関して各々パスイ解析を行ったところ、前者では蛋白合成に関連する経路、後者では糖代謝に関連する経路が明らかになったが、各々、過剰発現自体の変化、高血糖に関連する二次的な変化である可能性が否定できなかった。

UBE2E2 過剰発現による特異的な変化を探るべく、プロテオーム解析で有意に変化していた個々の蛋白の中で、TG マウスで最も発現が低下していたメソテリン (MSLN) に着目した。MSLN は胸膜や腹膜の中皮細胞に発現している糖蛋白であるが、膵癌や卵巣癌を含め多くの癌腫で高発現しており、一部の腫瘍においては細胞増殖や接着、転移などに関与することも知られている。

TG マウスの膵島で認められた MSLN の著明な低下は、mRNA レベルでも認められた。野生型マウスにおいて *Msln* 遺伝子は肺を含めた他の全身の組織に比較して膵島で高発現であった。また、野生型マウスにおいて MSLN の発現はアダルト期よりも離乳前の時期に有意に発現増加しており、同時期においても TG マウスの膵島の MSLN の発現は低かった。MSLN は、既報と同様に膵細胞株である MIN6 細胞において発現を認めなかった。また全身ノックアウトマウスは特記すべき表現型がないことが報告されているが (Mol Cell Biol. 8:2902-6, 2000) 耐糖能に関する評価は未施行であった。UBE2E2 は転写因子ではないので、*Msln* 遺伝子の転写調節因子がユビキチン化されたことによる変化だと推察されるが、いずれにしても MSLN が病態形成へどのように寄与しているのかを *in vivo* で解析するために KO マウスを用いた解析が有用であると考えられた。そこで、intron1 と exon2 の部位に gRNA を設計して CRISPR/Cas9 システムで exon2 の部位を含む 176bp を欠損したメソテリン全身欠損マウス (MSLNKO マウス) を作製したところ、このマウスの胸膜では MSLN 蛋白の発現が消失していた。しかしながら、MSLNKO マウスは糖負荷試験において正常耐糖能であり、膵細胞量の低下も認めなかった。Rip-UBE2E2-TG マウスで認められた一連の表現型を認めなかったことから、TG マウスで認めた MSLN の低下は病態形成には寄与していないことが明らかになった。

以上のことから、膵細胞の UBE2E2 の過剰発現は膵細胞量の低下を介して *in vivo* における糖負荷後のインスリン分泌低下に関与していることが示唆された。*p21^{Cip1}* 遺伝子発現高値の意義の検証、膵細胞における増殖能・アポトーシスの詳細な評価、さらには、UBE2E2 と関連し得る E3 リガーゼの探索や特異的な基質の同定などに関しては、今後の検討課題であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Aihara Masakazu, Kubota Naoto, Minami Takahiro, Shirakawa Rika, Sakurai Yoshitaka, Hayashi Takanori, Iwamoto Masahiko, Takamoto Iseki, Kubota Tetsuya, Suzuki Ryo, Usami Satoshi, Jinnouchi Hideaki, Aihara Makoto, Yamauchi Toshimasa, Sakata Toshiya, Kadowaki Takashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Association between tear and blood glucose concentrations: Random intercept model adjusted with confounders in tear samples negative for occult blood	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 266 ~ 276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13344	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 -

1. 著者名 Sakurai Yoshitaka, Kubota Naoto, Yamauchi Toshimasa, Kadowaki Takashi	4. 巻 22
2. 論文標題 Role of Insulin Resistance in MAFLD	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4156 ~ 4156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22084156	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 -

1. 著者名 Hayashi Takanori, Kubota Tetsuya, Mariko Inoue, Takamoto Iseki, Aihara Masakazu, Sakurai Yoshitaka, Wada Nobuhiro, Miki Takashi, Yamauchi Toshimasa, Kubota Naoto, Kadowaki Takashi	4. 巻 70
2. 論文標題 Lack of Brain Insulin Receptor Substrate-1 Causes Growth Retardation, With Decreased Expression of Growth Hormone-Releasing Hormone in the Hypothalamus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 1640 ~ 1653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2337/db20-0482	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jinnouchi Takanobu, Sakurai Yoshitaka, Miyoshi Kengo, Koizumi Chie, Waki Hironori, Kubota Naoto, Yamauchi Toshimasa	4. 巻 61
2. 論文標題 Chronic Intestinal Pseudo-obstruction with Mitochondrial Diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 469 ~ 474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.7714-21	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8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 桜井賛孝、窪田直人、高本偉碩、和田亘弘、門脇孝、山内敏正
2. 発表標題 新規糖尿病関連遺伝子UBE2E2の隣 細胞における役割
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 桜井賛孝、窪田直人、高本偉碩、和田亘弘、林高則、窪田哲也、笹子敬洋、門脇孝、山内敏正
2. 発表標題 糖尿病関連遺伝子UBE2E2の隣 細胞における役割
3. 学会等名 第93回 日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桜井賛孝、窪田直人、高本偉碩、和田亘弘、林高則、窪田哲也、笹子敬洋、門脇孝、山内敏正
2. 発表標題 糖尿病関連遺伝子UBE2E2の隣 細胞における役割
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桜井賛孝、窪田直人、高本偉碩、和田亘弘、林高則、窪田哲也、笹子敬洋、門脇孝、山内敏正
2. 発表標題 糖尿病関連遺伝子UBE2E2の隣 細胞における役割
3. 学会等名 第41回 日本肥満学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桜井賢孝、窪田直人、高本偉碩、和田亘弘、林高則、窪田哲也、笹子敬洋、門脇孝、山内敏正
2. 発表標題 糖尿病関連遺伝子UBE2E2の膵 細胞における役割
3. 学会等名 第94回 日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桜井賢孝、窪田直人、高本偉碩、和田亘弘、相原允一、林高則、窪田哲也、笹子敬洋、門脇孝、山内敏正
2. 発表標題 糖尿病関連遺伝子UBE2E2の膵 細胞における役割
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桜井賢孝、窪田直人、山内敏正
2. 発表標題 インスリンの作用異常と分泌低下がもたらす代謝異常（肝癌進展に及ぼす影響と分泌低下の機序）
3. 学会等名 第39回日本内分泌学会 内分泌代謝学サマーセミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桜井賢孝、窪田直人、高本偉碩、和田亘弘、相原允一、林高則、窪田哲也、笹子敬洋、門脇孝、山内敏正
2. 発表標題 糖尿病関連遺伝子UBE2E2の膵 細胞における役割
3. 学会等名 第32回分子糖尿病学シンポジウム
4. 発表年 2021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
---------	---------