

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11590

研究課題名(和文) 肥満2型糖尿病のインスリン分泌および作用障害におけるXORの役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of roles of XOR on impairment of insulin secretion and action in type 2 diabetes with obesity

研究代表者

藤城 緑 (FUJISHIRO, Midori)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：50420211

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)：MIN6腫細胞のうち、インスリン分泌能が不良なクローン株において、還元型XORであるキサンチン脱水素酵素(Xdh)の発現が増加していることを確認した。我々が樹立したテトラサイクリン誘導的に外来遺伝子を発現させることが可能なMIN6細胞に、種々の遺伝子を高効率に導入することが可能なRMCE(recombinase-mediated cassette exchange)法を採用し、Xdhに対するshRNAを導入し、Xdh蛋白の発現が抑制されることを確認した。Xdh shRNAを導入したMIN6細胞では、コントロールと比較して、有意差は認められないものの、インスリン分泌能が回復する傾向を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2型糖尿病は、加齢とともにインスリン分泌能も低下するため、高齢2型糖尿病患者が増加している現代社会において、インスリン抵抗性改善薬のみでは管理困難な状況が多くなってきている。インスリン分泌およびインスリン抵抗性の両者に酸化ストレスが関与していることは証明されているものの、そこを標的とした安全で有効な薬剤は、未だ開発されていない。近年肥満2型糖尿病患者において、尿酸代謝の律速酵素であるキサンチン酸化還元酵素(XOR)活性の亢進が注目されているが、今回我々は、インスリン分泌細胞において、XORの発現調整が、インスリン分泌能に関与している可能性を確認した。抗糖尿病薬の創薬に繋がる可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We discovered upregulation of protein expression level of xanthine dehydrogenase (Xdh) which is the reduced form of xanthine oxidoreductase (XOR) in MIN6 cell lines with poor insulin secretion ability. We recently reported establishment of a master insulin secreting MIN6-based cell line for efficiently generating stable transformants with a tetracycline-inducible system, which has a platform on the novel safe harbor genome locus for integration of foreign genes by means of recombinase-mediated cassette exchange (RMCE). Using this system, we conducted a loss-of-function study by utilizing shRNA-mediated knockdown. We confirmed inhibition of Xdh protein expression level in MIN6 cells treated with Xdh shRNA. We found that Xdh-knockdown MIN6 cells had tendency to improve glucose-stimulated insulin secretion, while no significant differences were observed compared to control.

研究分野：糖尿病・内分泌学

キーワード：2型糖尿病 キサンチン酸化還元酵素

## 1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病は、インスリン分泌とインスリン作用の両者の障害による血糖値上昇を特徴とする多因子疾患である。慢性的な高血糖のみならず、間歇的な血糖上昇も大血管や細小血管合併症を進展させるが、これには、酸化ストレスや慢性炎症を含む、多くの因子が関与している(Ceriello A, Diabetes, 2005)。近年、メタボリックシンドローム(Mets)や肥満症患者の脂肪、血管、肝臓や腎臓などの主要臓器において、尿酸代謝の律速酵素であるキサンチン酸化還元酵素(xanthine oxidoreductase, XOR)活性が亢進していることが注目されている(Zhang J, Clin Lab, 2014; Kuppusamy UR, Diabet Med, 2005)。

通常、XORはNAD<sup>+</sup>を電子受容体とするキサンチン脱水素酵素(XDH)として細胞内で合成されるが、虚血や組織障害時にはキサンチン酸化酵素(XO)へ変換し、反応過程でO<sub>2</sub>-やH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>などの活性酸素種(ROS)を生じる(Nishino T, FEBS J, 2008)。糖尿病患者において、組織の血流低下に伴う低酸素状態におけるXOR活性亢進と、糖尿病合併症進展への関与が示唆されており(Battelli MG, Atherosclerosis, 2018; Miric DJ, J Diabetes Complications, 2013)。我々も動物実験で証明してきた(Kushiya A, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012)。近年、肥満マウスにおいて、内臓脂肪でXORの発現が顕著に上昇することが報告され(Tsushima Y, J Biol Chem, 2013)。Metsとの関連が深い慢性炎症や、肥満による細胞肥大に伴う相対的低酸素などがXORに由来する酸化ストレスを創出し、病態の悪循環を形成すると考えられている(Cristine E, J Physiol, 2004)。ヒト脂肪細胞ではXOR遺伝子発現が低いことが報告されたが、低酸素状態の脂肪細胞では、XORの基質となるヒポキサンチンが増加していることが確認された(Nagao H, Obesity, 2018)。XORによるヒポキサンチンの酸化過程で産生されるROSは、生体防御に関わるMAPキナーゼ(MAPK)を直接的に活性化することが知られている(Guyton KZ, J Biol Chem, 1996)。我々は、分化後の脂肪細胞のインスリンシグナル伝達経路におけるMAPKの役割を報告してきた(Fujishiro M, Mol Endocrinol, 2003; Fujishiro M, J Biol Chem, 2001)。その機序にXORが関与している可能性が考えられるが、これまでに報告はない。

一方、2型糖尿病の基本病態として、インスリン抵抗性と同様に膵細胞からのインスリン分泌障害が重要であることが再認識されている(Rhodes CJ, Science, 2005)。膵細胞はインスリンを分泌するために特化された細胞であり、プロインスリンから成熟インスリン分子への変換の場である小胞体に対する負荷(小胞体ストレス)が、通常から高い状態にある(浦野文彦, 生化学, 2007)。我々も、小胞体ストレスが膵細胞の生存などに深く関わっていることを示してきた(Yamamoto T, Sci Rep, 2017)。また、膵細胞では、スーパーオキシドジスムターゼなどの抗酸化タンパク質の発現が微弱であり、酸化ストレスへの防御機構が脆弱であることが知られている(Krauss S, J Clin Invest, 2003)。膵細胞のXOR活性は、比較的高いことが報告されている(Xu P, Biochem Biophys Res Commun, 1994)。現在まで、インスリン分泌機序におけるXORの関与については未解明である。

## 2. 研究の目的

2型糖尿病患者では、加齢とともにインスリン分泌能も低下し、インスリン抵抗性改善薬のみでの治療は困難である。XOR活性については、腎臓や糖尿病血管合併症発症に伴う動脈硬化性病変における研究が盛んに行われているが、分化後の脂肪細胞におけるインスリンシグナル伝達経路や、膵細胞におけるインスリン分泌機構への影響については未解明である。

本研究は、XORを過剰発現または発現抑制させることで、2型糖尿病で見られるXOR亢進状態における、インスリン分泌および作用の両者の障害の機序を解明し、低血糖を誘発しにくい、全く新規のインスリン分泌促進薬の開発に繋げることを目的に行った。

## 3. 研究の方法

2型糖尿病で見られるXOR亢進状態における、インスリン分泌およびインスリン作用の両者の障害の機序を解明するために、下記を行っていくこととした。

- (1)脂肪細胞と、膵細胞の両者における、XOR作用の重要性を明らかにする。
  - (2)XORによる、MAPK・mTOR・インスリンシグナル伝達経路への関与を明らかにする。
  - (3)個体レベルでの、脂肪細胞および膵細胞におけるXOR作用の重要性を明らかにする。
- 今回の研究期間中には、(1)を進めた。

我々は、インスリン分泌MIN6細胞のサブクローンの中で、インスリン分泌能が高いクローンと軽度に低いクローンの間での遺伝子発現の違いを解析してきたが(Furukawa A, J Diabetes Investig, 2021)還元型XORであるキサンチン脱水素酵素(Xdh)の発現が多くなっていることを見出した。そこで、インスリン分泌能が悪いMIN6細胞クローン株において、shRNAによりXdhの発現を抑制することで、インスリン分泌能が改善するかを検討してみることとした。

遺伝子導入操作には、ドキシサイクリン(Doxycycline: DOX)により遺伝子発現が誘導される手法(Tet-Onシステム)を応用した。我々は、MIN6細胞にテトラサイクリン依存性転写因子

(**Tet3G**)を恒常的に発現させ、さらに様々な遺伝子を高効率に導入することを可能にするため、**RMCE (recombinase-mediated cassette exchange)**法の **platform** を設置した細胞株を、インスリン分泌能が良い **MIN6** 細胞クローン株をもとに、樹立した。同様のマスター細胞株をインスリン分泌能の軽度低下した細胞で作製することを試みた。

そして、**Xdh** に対する **shRNA** を発現する **cDNA** を導入し、**Xdh** の発現を抑制し、インスリン分泌能の変化を検討した。**shRNA** 配列は、**Cold Spring Harbor** 研究所の作製した **shERWOOD program** を用いた。

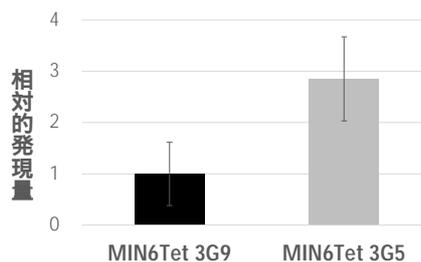


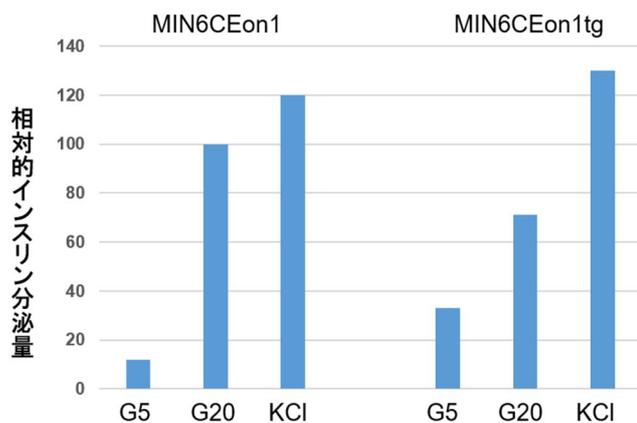
図1 インスリン分泌能の高いクローンと軽度低下したクローンでの mRNA microarray 解析での Xdh 発現

#### 4. 研究成果

(1) **MIN6** における、インスリン分泌能による **XOR** 発現量の比較。

インスリン分泌能が高いクローン株 (**MIN6Tet 3G9** 細胞) と比して、インスリン分泌能が軽度に低下したクローン株 (**MIN6Tet 3G5** 細胞) において、**Xdh** の発現を **real-time PCR** 法で解析したところ、**microarray** で認められたように (図1) **Xdh** 発現は、**MIN6Tet 3G5** 細胞において、**2.11 ± 0.43** 倍に増えていた。そこで、インスリン分泌能が不良な **MIN6Tet 3G5** 細胞を用いて、過去に報告した手法 (**Furukawa A, J Diabetes Investig, 2021**) で、遺伝子挿入の **platform** を **Zxdb** 遺伝子座にノックインした。しかし、この細胞株では、**Tet3G** の発現量があまり高くなく、**DOX** による遺伝子発現誘導効率が高くないことが分かった。

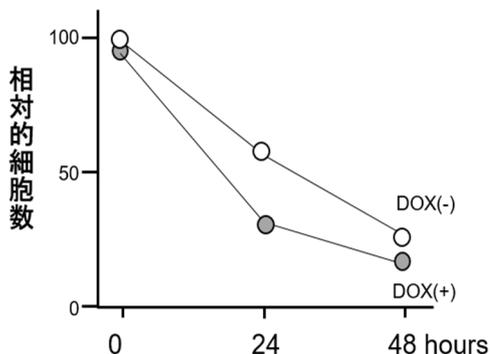
(2) **Tet3G** 遺伝子の挿入部位は **MIN6CEon1** 細胞と同一である方がよいと考え、**MIN6CEon1** 細胞自体に小胞体ストレスを加えることにより、インスリン分泌能を低下させることを試みた。小胞体ストレス誘導剤である **thapsigargin** に暴露すると **90%** 以上の **MIN6** 細胞は死滅するが、**10%** 程度の細胞は生存し、約 **3** 週間後には元の細胞数に復帰する。**MIN6CEon1** 細胞に **thapsigargin** 処理を **3** 回繰り返し暴露し、生存した細胞を得て、**MIN6CEon1tg** とした。**MIN6CEon1tg** のインスリン分泌能は、**MIN6CEon1** に比較して、図2のように **5 mM** のグルコースでの分泌が高くなり、**20 mM** グルコースでの分泌が低くなった。また、**MIN6CEon1tg** 細胞における **Xdh** 発現は、**MIN6CEon1** の約 **2.5** 倍であった。



**Xdh** がグルコースによるインスリン分泌の低下の原因である可能性を検証するため、**MIN6CEon1tg** 細胞において、**Xdh** に対する **shRNA** を発現させることにより、**Xdh** 発現を抑制した場合の効果を検証した。**MIN6CEon1tg** 細胞における 2 種類の **shRNA** の **DOX** による誘導的発現は、いずれの **shRNA** でも **Xdh mRNA** 量を約 **20%** に低下させた。しかし、グルコースに対するインスリン分泌は、やや増加する傾向を認めたが、統計学的には有意なものではなかった。

図2 小胞体ストレスに頻回暴露することによるグルコース応答性インスリン分泌の障害

**Xdh** は酸化ストレスに関与する分子として知られている。小胞体ストレス応答も酸化ストレス応答と類似点も数多くあり、**Xdh** の発現が酸化ストレスや小胞体ストレスを惹起している可能性が想定される。一方で、酸化ストレスや小胞体ストレスが亢進した状態に対して、防御的に作用する可能性も想定される。そこで、**MIN6CEon1tg** 細胞において、**thapsigargin** とは別の機序で小胞体ストレスを惹起する **tunicamycin** による細胞生存能を検討した。



その結果、**Xdh** の発現抑制は、**tunicamycin** による小胞体ストレスに対して脆弱になることが明らかになった。

インスリン分泌能の低下した細胞では、おそらく何等かの要因でストレスが亢進した状態であり、**Xdh** の発現増加は、そのようなストレスに対抗する反応である可能性が考えられる。

図3 **Xdh** 発現抑制による小胞体ストレス誘導アポトーシスへの影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tanaka A, Kosuda M, Yamana M, Furukawa A, Nagasawa A, Fujishiro M, Kohno G, Ishihara H	4. 巻 13
2. 論文標題 A large-scale functional analysis of genes expressed differentially in insulin secreting MIN6 sublines with high versus mildly reduced glucose-responsiveness.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5654
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-32589-2	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 該当する

1. 著者名 Fujishiro M, Ishihara H, Ogawa K, Murase T, Nakamura T, Watanabe K, Sakoda H, Ono H, Yamamotoya T, Nakatsu Y, Asano T, Kushiya A.	4. 巻 9
2. 論文標題 Impact of Plasma Xanthine Oxidoreductase Activity on the Mechanisms of Distal Symmetric Polyneuropathy Development in Patients with Type 2 Diabetes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 1052
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines9081052	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤城緑
2. 発表標題 2型糖尿病を対象としたプリン体代謝関連物質の血管合併症発症および進展に対する影響の研究（続報）
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

〔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
研究分担者	山名 碧 (YAMANA Midori)  (40869468)	日本大学・医学部・助手   (32665)	

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
---------	---------