

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09390

研究課題名(和文) Txnipとp53を介した膵 細胞翻訳制御機構解明に基づく2型糖尿病治療の研究

研究課題名(英文) Investigation on islet beta-cell mRNA translation and p53 during the pathogenesis of type 2 diabetes

研究代表者

幡中 雅行 (HATANAKA, Masayuki)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60572534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ポリリボソーム解析を採用し、習慣的な高脂肪摂取により膵 細胞が機能不全をきたす機序について、翻訳機能の観点から検討した。通常食と比較し高脂肪食飼育マウス膵島では、全般的翻訳抑制が確認された。細胞機能に重要であるinsulin, pdx1, Slc2a2, GckのmRNAはmonosome側にシフトしており、翻訳抑制を認めた。このとき酸化ストレスマーカーは増加し、さらにp53経路活性化をきたしていた。そのことに関連し、翻訳開始因子eIF4Eとリボソーム合成関連遺伝子の発現が減少していた。酸化ストレス、DNA損傷によるp53経路活性化が 細胞における全般的翻訳抑制に寄与することが推察された。

研究成果の概要(英文)：Few studies have interrogated the mechanisms of β -cell dysfunction at the level of mRNA translation under conditions of high fat diet (HFD) consumption. We sought to address this issue through polyribosome profile analysis of islets from mice fed 16-weeks of 42% HFD. HFD-islet analysis revealed global reductions in mRNA translation with a reduction in the polyribosome/monoribosome ratio. HFD-islets demonstrated evidence of oxidative stress and DNA damage, as well as activation of p53. MIN-6 β -cells treated with doxorubicin to directly induce DNA damage mimicked our observed effects in islets. Islets from animals treated with pioglitazone demonstrated a reversal of effects observed from HFD. Finally, HFD-islets demonstrated reduced expression of ribosome biogenesis genes and the key translation initiation factor eIF4E. We propose an effect of chronic HFD on β -cells, wherein DNA damage owing to oxidative stress results in p53 activation and a resultant inhibition of mRNA translation.

研究分野：糖尿病

キーワード：2型糖尿病 細胞 翻訳 p53

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病の成因として、細胞の機能・量の低下による、インスリン抵抗性に対する代償機構の破綻が重要である。高脂肪食摂取の状況下では細胞がインスリン抵抗性に代償して十分にインスリン分泌を増加できなくなると血糖上昇をきたす。膵細胞機能障害に関わる因子として種々の細胞内ストレスとの関連が示唆されている。ストレスにตอบสนองして翻訳速度はダイナミックに変化する。蛋白合成速度の調節のために、細胞は転写レベルでは mRNA の量自体を増減させる必要があるのに対し、翻訳レベルでは既成の mRNA とリボソームを動員することで、迅速かつ効率的に実行することが可能である。翻訳は転写と同様に時々刻々とその効率に変化し、細胞機能調節において重要である。事実、翻訳の主要制御因子として知られる mTORC1 経路は細胞の成長・増殖・インスリン分泌能のために重要な役割を有する。しかしながら細胞における翻訳制御機構に関しては、実験的手法が困難であることもあり十分な解明に至っていない。そこで我々はポリリボソームプロファイル (Polyribosome Profiling: PRP) 解析を採用し、短期間 (1 週間) の高脂肪食投与下の C57/BL6J マウス膵細胞においては mTORC1 経路が活性化し翻訳が促進されることを示し、翻訳制御機構の一端を解明した⁽¹⁾。翻訳過程は多くのエネルギーを消費するため、ミトコンドリアにおける ATP 産生能力が翻訳機能維持のために必須となる。近年 p53 活性亢進がミトコンドリア機能の抑制を介してミトコンドリア機能を低下させ ATP 産生を減少することが報告され⁽²⁾、p53 活性が少なくともエネルギー制御を介して翻訳抑制に寄与しうることが想定される。さらに近年 p53 活性化が mTORC1 抑制を介して翻訳抑制に寄与することが報告された⁽³⁾。以上の背景から p53 活性亢進が高脂肪食誘導性の翻訳制御メカニズムにおいて

重要な役割を有する可能性を想定した。

2. 研究の目的

習慣的な高脂肪摂取により細胞が機能不全をきたすメカニズムについて、翻訳機能の観点から新たに解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス

C57BL6/J マウスは Jackson Laboratories から購入した。8 週齢マウスに 17% 通常食あるいは 42% kcal 脂肪食を投与した。ラ氏島の単離は以前の報告と同様の手法にて行った⁽⁴⁾。Polyribosomal profile (PRP) と RT-PCR PRP 解析は MIN6 細胞とラ氏島を用いて既報と同様の手法で行った⁽⁵⁾。細胞溶解液は 10-50% ショ糖密度勾配液により、BioComp piston gradient fractionator を用いて分画化した。RNA 量は吸光度 254nm にて測定した。dDNA 合成後、定量 PCR には SYBR Green I を用いた⁽⁶⁾。

(2) ウェスタン解析

MIN6 細胞とラ氏島の細胞溶解液は既報の手法を用いて処理した⁽⁷⁾。ウェスタン解析には 4-20% gradient SDS-PAGE gel (Bio-Rad) を用いた。蛋白質発現レベルは蛍光標識された 2 次抗体 (Li-Cor Biosciences) を用いて視覚化し、Li-Cor software を用いて定量化した。

(3) 免疫染色

マウスに対して 4% パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定した後、膵臓摘出、パラフィン包埋を行い、5 μm 厚の切片を作成した。1 次抗体、2 次抗体はそれぞれ以下の条件で使用し、共焦点顕微鏡 (Zeiss LSM 700) を用いて撮像した。1 次抗体: insulin (guinea pig anti-porcine, Abcam, 1:250, AB7842), 4-HNE (rabbit anti-4HNE, Abcam 1:1000, AB66155), nitrotyrosine (rabbit anti-mouse, Millipore, 1:250, AB5411), p21 (rabbit anti-mouse, Santa Cruz, 1:250, sc397), p53 (rabbit anti-mouse, Santa Cruz, 1:250, sc6243), γH2AX pSer140 (mouse anti-mouse; Novus Biologicals, 1:150,

NB100-74435), nuclei (diamidino-2-phyllindole-DAPI). 2 次抗体 : goat anti-rabbit antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, 1:500), goat anti-guinea pig antibody conjugated to Alexa Fluor 555 (Molecular Probes, 1:500).

(4)統計学的解析

統計学的有意差は 2 群間で two-tailed Student's t test を用いて評価された。すべての統計学的解析には Prism 5 software を用いた。統計学的有意差は $P < 0.05$ の場合であると仮定した。

4. 研究成果

C57BL/6J マウスに高脂肪食を 16 週間投与し、膵島を用いたポリリボゾームプロファイル (PRP) 解析を行った。高脂肪食飼育マウス膵島では、通常食飼育マウスと比較して、Polysome/Monosome (P/M) 比が減少しており、翻訳が全般的に抑制を受けていた。細胞機能に重要である insulin, pdx1, Slc2a2, Gck の mRNA は高脂肪食飼育マウス膵島では monosome 側にシフトしており、これらの分子の翻訳が抑制を受けることが示された。このとき、小胞体ストレスマーカー (Chop, Atf4, Bip, sXbp1) の mRNA レベルは増加しておらず、また Chop や Atf4 の翻訳促進は確認されなかった。これらの結果から、高脂肪による

細胞翻訳抑制のメカニズムは小胞体ストレス以外にあると考えられた。対照的に酸化ストレスマーカー (Gpx1, Sod1, Nrf2) は高脂肪食により増加することが確認された。膵免疫染色では、高脂肪食マウス細胞において p53 が核内へ局在化を示した。さらに p53 の下流標的である p21 の発現は増強していた。これらの細胞では DNA 損傷マーカーである H2AX や酸化ストレスマーカーである Nitrotyrosine の発現は増加していた。高脂肪食により膵細胞に酸化ストレスとそれに関連する DNA 損傷をきたし、p53 経路が活性化していることが想定された。次に

MIN6 細胞に対して doxorubicin 処理を行うことで DNA 損傷ストレスを誘導した。doxorubicin 処理により p53 発現量と p53 リン酸化レベルが増加すること、P/M 比は減少し、翻訳抑制をきたすことが確認された。近年 p53 が全般的翻訳抑制に寄与していることが示されており、糖尿病病態においても、活性化した p53 経路が翻訳抑制の重要メカニズムとして寄与することが推察された。

慢性的な高脂肪食摂取が膵細胞翻訳にもたらす影響を明らかにするため、in vitro の実験モデルとして、MIN6 細胞をパルミチン酸 + 炎症性サイトカインにて処理し解析を行った。ポリリボゾームプロファイル (PRP) 解析にて Polysome/Monosome (P/M) 比が減少し、翻訳が全般的に抑制を受けることが示された。それに合致して、パルミチン酸 + 炎症性サイトカインにて処理した MIN6 細胞ではピューロマイシン取り込みが減少しており、蛋白合成が減少していることが確認された。p53 のターゲット遺伝子である Cdkn1a の発現が増加しており、翻訳抑制と p53 活性化との関連性が示された。高脂肪食飼育マウス膵島においても p53 の核内への局在化を示したことに関連して Cdkn1a 発現上昇を認めた。

膵細胞の酸化ストレスを軽減することで知られるピオグリタゾンを投与することで、高脂肪食摂取がもたらす翻訳抑制を回復させるかについて検討した。膵免疫染色を用いた解析において高脂肪食飼育マウスで認められた Nitrotyrosine や H2AX の発現増加がピオグリタゾン投与により軽減しており、本実験モデルにおいても酸化ストレスが軽減し、DNA 損傷レベルが減少していることが想定された。ピオグリタゾン投与により高脂肪食飼育マウス膵島の P/M 比は上昇傾向を示し、全般的翻訳活動性の回復が示唆された。細胞機能に重要である insulin, pdx1, Slc2a2, Gck の mRNA は polysome 側にシフトすること

が確認され、これらの分子の翻訳活動性が回復していることが想定された。

高脂肪食飼育マウス膵島における全般的翻訳抑制のメカニズムを明らかにするため、p53 下流ターゲットに着目して検討を行った。p53 経路が Sestrin 活性化を介して mTORC1 活性を抑制することが報告されているため、mTORC1 の下流に位置し、かつ主要な翻訳調節因子として知られる S6 と 4E-BP1 の解析を行った。しかしながら高脂肪食飼育マウス膵島では、通常食飼育マウス膵島と比較して、S6 と 4E-BP1 のリン酸化レベルに有意な変化を認めなかった。p53 に関連する c-myc 活性の抑制により、eIF4E の転写抑制をきたしうることが報告されていることから、次に eIF4E に対する解析を行った。eIF4E 遺伝子発現レベルは高脂肪食飼育マウス膵島において減少していることが確認された。さらに p53 誘導に関連して減少することが過去に示されている、リボゾーム生合成に重要な遺伝子群 (BOP1, EBNA1BP2, NOP56, PA2G4) の発現レベルが、高脂肪食飼育マウス膵島において減少していることが確認された。高脂肪食飼育マウス膵島において、p53 活性化に関連する eIF4E 減少とリボゾーム生合成関連遺伝子の抑制に伴い、全般的翻訳抑制をきたすことが推察された。

<引用文献>

- (1) Hatanaka M, Maier B, Sims EK, Templin AT, Kulkarni RN, Evans-Molina C, Mirmira RG. Palmitate induces mRNA translation and increases ER protein load in islet β -cells via activation of the mammalian target of rapamycin pathway. *Diabetes*. 2014 Oct;63(10):3404-15.
- (2) Hoshino A, Ariyoshi M, Okawa Y, Kaimoto S, Uchihashi M, Fukai K, Iwai-Kanai E, Ikeda K, Ueyama T, Ogata T, Matoba S. Inhibition of p53 preserves Parkin-mediated mitophagy and pancreatic β -cell function in diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Feb 25;111(8):3116-21.
- (3) Loayza-Puch F, Drost J, Rooijers K, Lopes R, Elkon R, Agami R. p53 induces transcriptional and translational programs to

suppress cell proliferation and growth. *Genome Biol*. 2013 Apr 17;14(4):R32.

- (4) Stull, N.D., et al., *Mouse islet of Langerhans isolation using a combination of purified collagenase and neutral protease*. *J Vis Exp*, 2012(67).
- (5) Tersey, S.A., et al., *Islet beta-cell endoplasmic reticulum stress precedes the onset of type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse model*. *Diabetes*, 2012. **61**(4): p. 818-27
- (6) Chakrabarti, S.K., James, J.C. and Mirmira, R.G. *Quantitative assessment of gene targeting in vitro and in vivo by the pancreatic transcription factor, Pdx1. Importance of chromatin structure in directing promoter binding*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(15): p. 13286-93.
- (7) Iype, T., et al., *Mechanism of insulin gene regulation by the pancreatic transcription factor Pdx-1: application of pre-mRNA analysis and chromatin immunoprecipitation to assess formation of functional transcriptional complexes*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(17): p. 16798-807.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

1. Hatanaka M, Anderson-Baucum E, Lakhter A, Kono T, Maier B, Tersey SA, Tanizawa Y, Evans-Molina C, Mirmira RG, Sims EK. Chronic high fat feeding restricts islet mRNA translation initiation independently of ER stress via DNA damage and p53 activation. *Sci Rep*. 2017 Jun 19;7(1):3758. (査読有り)
doi: 10.1038/s41598-017-03869-5
2. Tanabe K, Amo-Shiinoki K, Hatanaka M, Tanizawa Y. Interorgan Crosstalk Contributing to β -Cell Dysfunction. *J Diabetes Res*. 2017;3605178,8. (査読有り)
doi: 10.1155/2017/3605178

[学会発表](計2件)

1. 糖尿病病態における膵細胞翻訳機能解析 幡中 雅行
第58回日本糖尿病学会年次学術総会(招待講演)
2015年05月21日~2015年05月24日
シーモールパレス(山口県下関市)
2. ポリリボゾームプロファイル(PRPF)解析を用いた、高脂肪食投与マウス膵細胞における翻訳制御機構の解析 幡中 雅行
第88回日本内分泌学会学術総会
2015年04月23日~2015年04月25日

ホテルニューオータニ東京（東京都千代田区）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

幡中 雅行 (HATANAKA, Masayuki)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：6 0 5 7 2 5 3 4

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし