

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：32665

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15351

研究課題名(和文) 遺伝子改変インスリン分泌細胞株の効率的作製法開発とインスリン分泌機構解明への応用

研究課題名(英文) Development of an efficient method for generation of genetically modified insulin secreting cells and its application for studies on insulin secretion

研究代表者

石原 寿光 (ISHIHARA, Hisamitsu)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：60361086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：インスリン分泌機構やインスリン分泌細胞のストレス応答、生存のメカニズムを解明するためには、遺伝子発現を修飾する分子生物学的検討が必須であるが、インスリン分泌細胞株では核酸の導入効率が低いという難題がある。この点を克服するために、recombinase-mediated cassette exchange法を用い、インスリン分泌MIN6細胞を改変した。すなわち、外来性の遺伝子が必ず遺伝子発現効率の高いゲノム上の位置へ導入されるようにplatform遺伝子をゲノム内に設置した。この方法を用い、100種類近い遺伝子発現修飾MIN6細胞を作製し、インスリン分泌に重要な新規遺伝子を同定した。

研究成果の概要(英文)： Genetic modification of insulin secreting cells is a powerful strategy to study mechanisms of insulin secretion and of cell death. However, one of the disadvantages encountered in using these cells is the low transfection efficiency of nucleotides. To circumvent the difficulties, we have established a very efficient system based on the recombinase-cassette exchange for generation of a insulin secreting MIN6-derived master cell line.

A recipient platform was generated that has the zeocin-resistant gene flanked with a set of yeast flippase recognition target sites and placed on the genome of MIN6 cells. Overexpression and suppression of gene-of-interest are achieved by delivery with an exchange vector of cDNAs and shRNAs, respectively. Using this cell line, we showed that engineered clones were created within 6 weeks. Moreover, we could generate more than 100 transfectant cell lines and identified novel genes involved in regulation of glucose-stimulated insulin secretion.

研究分野：代謝学

キーワード：インスリン分泌機構 膵 細胞 遺伝子発現修飾 recombinase

1. 研究開始当初の背景

全ゲノム相関解析により、90 近い 2 型糖尿病の遺伝子変異が報告されたが、興味深いことに、そのほとんどが、インスリン分泌機能や膵β細胞の生存機構に關与するものであった。このような背景から、β細胞のインスリン分泌機構を詳細に理解すること、ならびにβ細胞の生存・死のメカニズムを解明する事は、糖尿病の更なる病態解明や創薬標的の同定のために重要である。

細胞の機能を解明する上で、分子生物学的方法は、非常に強力な手法である。薬剤誘導的な発現システムや RNA 干渉法、近年のゲノム編集技術は、分子生物学的方法による細胞機能解析を強力に後押ししている

しかし、インスリンを分泌する膵β細胞やその細胞株は、核酸の導入効率が非常に低いという欠点がある。発現した蛋白の細胞内局在を調べる実験のように数十個の細胞を検討すれば十分な場合には、効率の低さは問題にならない。しかし、インスリン分泌能や細胞内代謝を検討する場合には、70~100%の細胞に遺伝子が導入される必要がある。

2. 研究の目的

従来、インスリン分泌細胞株を用いて、安定的遺伝子過剰発現細胞株を樹立し、インスリン分泌への効果を検討するまでに、約 10 週間の時間とクローン選別の労力を要した。最近、このような時間と労力をかけずに遺伝子過剰発現細胞株を樹立する方法を開発した。本研究では、これを発展させて、遺伝子発現を抑制・脱落させた細胞株を簡便に作製する方法も確立する。そして、100 個以上の遺伝子について、過剰発現あるいは発現低下させて、インスリン分泌の詳細なメカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

マウス由来のインスリン分泌細胞株である MIN6 にテトラサイクリン応答性転写因子 Tet3G を発現させた細胞株を作製し、さらに zeocin 耐性遺伝子をもった acceptor platform をそのゲノム上にランダムに設置し、より高い発現を可能とするクローンを選択する。Platform には、一組の FRT(Flip-recombinase (Flp) recognition target)が含まれており、Flp がこの site を目印として、同様の FRT をもった様々な donor plasmid の任意の遺伝子を交換・挿入できるようにする。さらに Cas9 nuclease を発現するユニットをもった plasmid を導入し、platform に任意の guide RNA 発現ユニットを導入し、ゲノム編集を起こさせる。また、microRNA に埋め込んだ形の shRNA を発現させることにより、薬剤誘導的な RNA 干渉の誘導により、遺伝子発現を抑制した細胞株を作製する。

我々は、グルコースに対するインスリン分泌能が高い MIN6 細胞株と低い細胞株を有している。その遺伝子発現の違いを microarray 解析で、検討したところ、1,000 個近い遺伝子で発現量に違いが認められた。そこで、これらに対し、実際

に遺伝子発現の差がインスリン分泌能の差の原因になっているかを、遺伝子発現を修飾した細胞を前記の細胞をもとに作製し、検証する。

4. 研究成果

Recombinase-mediated cassette exchange 法を応用して、遺伝子修飾 MIN6 細胞株を効率よく作製することを可能にした。図 1 のような Zeocin 耐性 cDNA を FRT 配列で挟んだ遺伝子を MIN6 細胞に導入し、その後図 2 に示す cassette exchange vector に搭載した発現ユニットをゲノム内の一定の位置 (platform) に 90% 以上の確率で導入できるようにした。

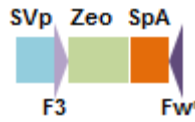


図1 platform 遺伝子

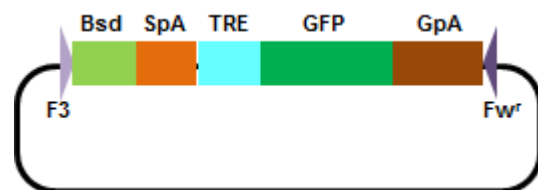


図2 過剰発現のための cassette exchange vector

また、図 3 のように、microRNA に埋め込んだ shRNA を発現させることにより、遺伝子発現を抑制することも可能となった (図 4)。

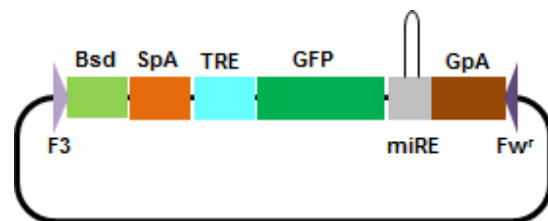
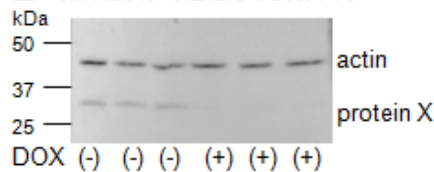


図3 発現抑制のための cassette exchange vector

図4 薬剤誘導的遺伝子発現抑制



システムを検証するために、膵β細胞での解糖系の律速酵素であるグルコキナーゼを過剰発現あるいは発現抑制を試みたところ、予想どおりにグルコキナーゼタンパクの増減が認められ、それに伴いインスリン分泌の増強および低下が認められた。

従来であれば、MIN6 細胞の安定的遺伝子導入株を作製するには、約 10 週間以上を有し、一度に 2 - 3 個の遺伝子を検討することが上限であったが、本システムは非常に効率が良いため、遺伝子発現修飾のインスリン分泌への影響を推定するためには、約 6 週間で、しかも、一度に 5 - 10 個の遺伝子を扱うことができる (論文投稿中)。

次に、図5に示すようなインスリン分泌のグルコース応答能の良いクローンと悪いクローンで microarray 解析を行い、両群で発現に違いを認める遺伝子を抽出した。

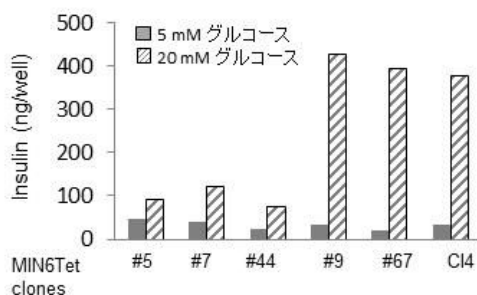


図5 MIN6サブクローンでのグルコース応答能の違い

その結果、両群間で発現が大きく異なる遺伝子が約1,000個存在した。それらは、

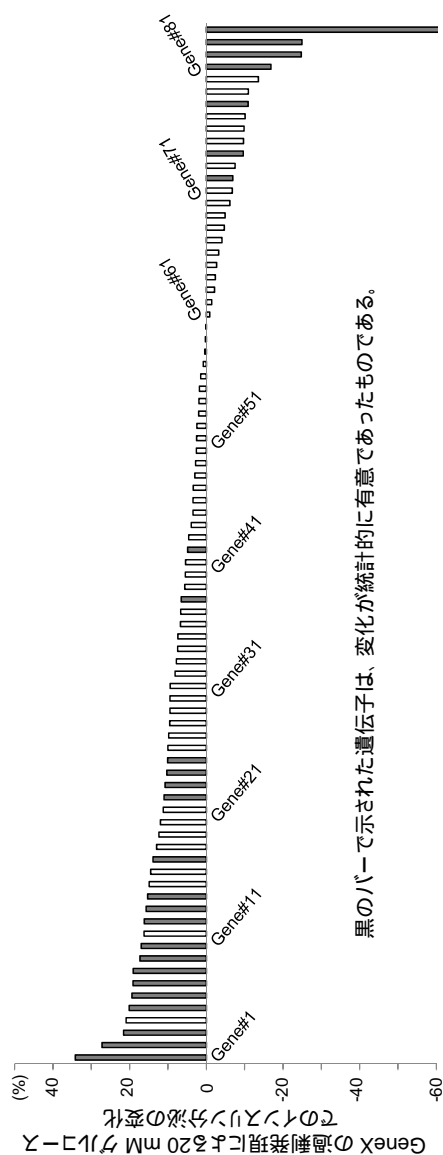


図6 遺伝子の過剰発現がインスリン分泌能に及ぼす効果の半網羅的解析

annotation されているものが約 650、annotation

されていないものが約 200、lncRNA などが約 150 個であった。annotation されている遺伝子を過剰発現する細胞株を約 100 種類作製し、インスリン分泌に対する効果を検討した（一部を図6に示す）。その結果、いくつかの遺伝子が直接インスリン分泌能の増減にかかわっている可能性が示唆された。

さらに、この platform を設置した MIN6 細胞に、切断活性は持たないが guide RNA の存在下で、ゲノム DNA に結合することができる dCas9 タンパクを薬剤誘導的に発現させることに成功した。この細胞の platform に guide RNA を発現させる遺伝子を cassette exchange で導入させることにより、薬剤誘導的に遺伝子発現の抑制が起こることを確認した（CRISPRi システムの構築）。

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 6 件）

Nakatsu Y, Mori K, Matsunaga Y, Yamamotoya T, Ueda K, Inoue Y, Mitsuzaki-Miyoshi K, Sakoda H, Fujishiro M, Yamaguchi S, Kushiyama A, Ono H, Ishihara H, Asano T. The prolyl isomerase Pin1 increases β cell proliferation and enhances insulin secretion. J Biol Chem. 査読有. 2017, In press.

Fujishiro M, Horita A, Nakagawara H, Mawatari T, Kishigami Y, Tominaga Y, Moriyama M, Ishihara H. Severe hypertriglyceridemia possibly masked acute pancreatitis and led to a difficult diagnosis in an obese patient with ketoacidosis- onset type 2 diabetes. Internal Medicine. 査読有. 2017, In press.

Ishihara H, Yamaguchi S, Nakao I, Okitsu A, Asahina S. Efficacy and safety of ipragliflozin as add-on to insulin in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus (IOLITE): a multi-centre, randomized, placebo-controlled, double-blind study. Diabetes Obes Metab. 査読有, 18, 2016, 1207-1216, doi:10.1111/dom.12745.

Ishihara H, Wollheim CB. Is zinc an intraislet regulator of glucagon secretion? Diabet Int. 査読有, 7, 2016, 106-110, doi:10.1007/s13340-016-0259-x.

Shinjo T, Nakatsu Y, Iwashita M, Sano T, Sakoda H, Ishihara H, Kushiyama A, Fujishiro M, Nishimura F, Asano T. High-fat diet feeding significantly attenuates anagliptin-induced regeneration of islets of Langerhans in streptozotocin-induced diabetic mice. Diabetol Metab Syndr. 査読有, 7, 2015, 50. doi: 10.1186/

s13098-015-0047-y.

Shinjo T, Nakatsu Y, Iwashita M, Sano T, Sakoda H, Ishihara H, Kushiya A, Fujishiro M, Fukushima T, Tsuchiya Y, Kamata H, Nishimura F, Asano T. DPP-IV inhibitor anagliptin exerts anti-inflammatory effects on macrophages, adipocytes, and mouse livers by suppressing NF- κ B activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 査読有, 309, 2015, E214-223. doi: 10.1152/ajpendo.00553.2014.

〔学会発表〕(計 10 件)

Ishihara H, Furukawa A, Tanaka A, Kosuda M, Yamana M, Nagasawa A, Yamaguchi S. Using recombinase-mediated cassette exchange to engineer MIN6 insulin-secreting cells with a tetracycline-regulated expression system. The 53rd EASD annual meeting 採択決定. 2017 年 9 月 11 日 ~ 15 日. Lisbon (Spain).

小須田南, 田中彩, 古川麻美, 堀田瑛子, 山名碧, 大塚雄一郎, 藤城緑, 石原寿光. インスリン分泌 MIN6 細胞でのグルコース応答性インスリン分泌における炭酸脱水酵素の役割. 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2017 年 5 月 18 日 ~ 20 日. 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市).

山口賢, 堀田瑛子, 山名碧, 小須田南, 田中彩, 古川麻美, 石原寿光. インスリン分泌における Cited4 の役割. 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2017 年 5 月 18 日 ~ 20 日. 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市).

盛川愛, 藤城緑, 岡本真由美, 江頭富士子, 石原寿光. 膵島十二指腸切除 14 年後に抗 GAD 抗体高値が確認された後期高齢 1 型糖尿病の一例. 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2017 年 5 月 18 日 ~ 20 日. 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市).

小池将夫, 河野玄太, 荒井秀仁, 田中彩, 古川麻美, 松島えり子, 大川原奈々, 山口賢, 江頭富士子, 石原寿光. 後期高齢者に発症した劇症 1 型糖尿病の 1 例. 第 54 回日本糖尿病学会関東甲信越地方会. 2017 年 1 月 21 日. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

Ishihara H, Yamaguchi S, Nakao I, Okitsu A, Asahina S. Efficacy and safety of ipragliflozin as add-on to insulin in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus (IOLITE): a multi-centre, randomized, placebo-controlled, double-blind study. The 76th Scientific Session of American Diabetes Association. 2016 年 6 月 10 日 ~ 14 日. New Orleans (U.S.A.).

山口賢, 石原寿光. Establishment of gene

transfer system based on RMCE in MIN6 and findings of novel genes involved in insulin secretion. 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2016 年 5 月 19 日 ~ 21 日. 京都国際会議場(京都府・京都市).

田中彩, 山口賢, 堀田瑛子, 山名碧, 小須田南, 古川麻美, 大塚雄一郎, 江頭富士子, 石原寿光. メトホルミン内服中の 2 型糖尿病患者における DPP-4 阻害薬と SU 薬のグルカゴン動態への影響の比較・検討. 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2016 年 5 月 19 日 ~ 21 日. 京都国際会議場(京都府・京都市).

大塚雄一郎, 西田弥生, 山口賢, 浅井聰, 石原寿光, 高橋泰夫. 脂質異常症と高血圧症 2 型糖尿病患者における脂質改善薬の糖代謝および腎機能に及ぼす影響に関する実臨床での検討. 第 30 回日本糖尿病合併症学会. 2015 年 11 月 27 日 ~ 28 日. 愛知県産業労働センター ウィンク愛知(愛知県・名古屋市).

Furukawa A, Tanaka A, Kosuda M, Otsuka Y, Yamaguchi S, Ishihara H. Screening by RMCE-based generation of MIN6 cell transfectants identifies novel genes important for glucose-stimulates insulin secretion. KEYSTONE SYMPOSIA on Molecular and Cellular Biology. 2015 年 10 月 26 日 ~ 29 日. ウェスティン都ホテル京都(京都府・京都市).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

<http://www.med.nihon-u.ac.jp/department/dmet>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原 寿光 (ISHIHARA, Hisamitsu)

日本大学・医学部・教授

研究者番号: 60361086

(2) 連携研究者

大塚 雄一郎 (OTSUKA, Yuichiro)

日本大学・医学部・助手

研究者番号: 40748399