

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19513

研究課題名(和文)新規インスリン分泌制御因子による膵細胞機能・インスリン感受性制御機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the role of a novel regulator of insulin secretion

研究代表者

西 清人(Nishi, Kiyoto)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：30749362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：糖代謝は、膵細胞におけるインスリン分泌と、末梢臓器におけるインスリン感受性のバランスによって制御され、その破綻によって糖尿病が引き起こされる。申請者は、多機能タンパク質ナルディライジン(NRDC)の遺伝子改変マウスを解析し、NRDCが膵細胞の機能や分化の維持、末梢臓器における耐糖能・インスリン感受性の制御、にそれぞれ深く関わっていることを明らかにした。また、それらの成果の一部をDiabetes誌(米国糖尿病学会誌)に発表した。

研究成果の概要(英文)：Type 2 diabetes (T2D) is characterized by impaired insulin secretion from pancreatic beta-cells and insulin resistance of the target tissues, such as liver, adipose tissue and muscles.

We analysed NRDC (N-arginine dibasic convertase; Nardilysin)-deficient mice and found that NRDC controls both insulin secretion and insulin sensitivity. Then, we generated organ-specific (pancreatic beta-cell, liver and adipose tissue) NRDC-deficient mice and found that (1) NRDC regulates pancreatic beta-cell function and identity, (2) NRDC regulates insulin sensitivity in both liver and adipose tissue. Part of these results was published in "Diabetes" journal.

研究分野：医歯薬学

キーワード：インスリン 糖代謝 エネルギー代謝 転写調節

1. 研究開始当初の背景

近年、膵細胞への分化に重要な転写因子である PDX1、MafA、NKx6.1 の発現が、糖尿病モデル動物や 2 型糖尿病患者の膵島において減少しており、これらの発現を上昇させることが糖尿病の治療につながると期待されている。(Guo 他 J Clin Invest 2013)

NRDc は申請者の所属する研究グループによって増殖因子 HB-EGF の結合タンパク質として同定されたメタロプロテアーゼである (Nishi 他 EMBO J. 2001)。我々は、NRDc が ADAM などのプロテアーゼの活性化を介して HB-EGF、TNF- α などの広範な膜タンパク質のシェディングを増強することを明らかにし、NRDc 欠損マウスの解析により、NRDc がシェディング調節因子として、中枢および末梢神経の軸索・髄鞘形成 (Ohno 他 Nat. Neurosci. 2009)、胃がんの進展 (kanda 他 EMBO Mol Med 2012)、アミロイドプラーク産生 (Ohno 他 Neurobiol Aging 2013) などを *in vivo* で制御することを明らかにしてきた。

NRDc は主に細胞質に存在する可溶性の酵素で、明らかなシグナルペプチド、核移行シグナルは有さないが、細胞外や核内へ移動することがわかっている。最近我々のグループでは、同分子が核内で転写調節に関わっていることを明らかにした。NRDc ホモ欠損マウス (nrd1-/-) は褐色脂肪組織における熱産生亢進を呈したが、その分子機構として、NRDc が転写コアクチベーター PGC-1 α との結合を介して熱産生分子 UCP1 の転写を抑制していることを明らかにした (Hiraoka 他 Nat. Commun. 2014)。一方、ヒストン H3 結合タンパク質の網羅的解析から NRDc が同定され、NRDc が H3K4me2 に特異的に結合すること、NCoR/SMRT 転写リプレッサーと複合体を形成し転写制御にかかわっていることも明らかにした (Lin 他 JBC 2012)。また、他のグループからは、NRDc のプロテアーゼ活性が、細胞傷害性 T 細胞における抗原プロセッシングに必要であることが報告されており (Kessler 他, Nat Immunol. 2011)、NRDc は、その局在特異的 (細胞外-シェディング活性化、核内-転写調節、細胞質-プロテアーゼ) に異なる機能を持つ多機能タンパク質であることが示唆されている。

以上のような多機能タンパク質 NRDc が糖代謝において果たす役割を明らかにするために糖負荷試験を行ったところ、nrd1-/- ではインスリン分泌反応が著明に減弱していることがわかった。次に、nrd1-/- の表現型 (前述した軸索・髄鞘形成不全、低体温以外にも、成長遅延などを示す) の二次的な影響を除外するために、単離膵島、細胞特異的 NRDc 欠損マウス (KO) を用いた解析を行った。

nrd1-/- 膵島では、KCI に対する反応は保たれていたものの糖負荷に対するインスリン分泌反応が著明に減弱していた。KO に対する

糖負荷試験では、nrd1-/- と同様に著明なインスリン分泌反応の減弱と耐糖能異常を認め、膵細胞の NRDc がインスリン分泌に重要な役割を果たすことが確認できた。

nrd1-/- 膵島における遺伝子発現を見ると、GLUT2 や Glucokinase などグルコースの取込みや利用に関わる遺伝子群の発現が低下していた。それらの遺伝子上流にある膵細胞特異的転写因子群について解析したところ、特に MafA の発現が低下していることがわかった。また、細胞株である MIN6 を用いてクロマチン免疫沈降法 (ChIP) を施行したところ MafA の enhancer 領域のクロマチンに NRDc が結合していることがわかり、細胞において、NRDc が MafA の発現調節を介してインスリン分泌を制御していることが示唆された。

さらに、KO の膵島では細胞/細胞比の有意な上昇を認めた。遺伝子発現をみると Glucagon だけでなく Ngn3 (膵内分泌幹細胞のマーカー遺伝子) の発現も上昇しており、細胞の脱分化 (dedifferentiation) や分化転換 (transdifferentiation) が起こっている可能性が考えられた。

一方、nrd1-/- はインスリン分泌反応がほぼ消失しているにもかかわらず、糖負荷後の血糖はそれほど高値ではなく、インスリン負荷試験からも nrd1-/- のインスリン感受性は亢進していると考えられた。また、NRDc 欠損マウス (Nrdc -/-) では、関節炎などのモデルによる炎症の程度が軽度である。さらに、マウス胃癌モデル、ヒト胃癌標本の検討からは、NRDc が TNF- α -IL6 経路を制御することで胃癌の進展に寄与することが明らかになっている (Kanda 他 EMBO Mol Med 2012)。以上のことから、NRDc が肥満状態においても慢性炎症の惹起を介して耐糖能、インスリン感受性悪化に関与する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

以上の背景と研究成果から、本研究では、(1)膵細胞の分化維持、(2)膵細胞の機能維持、(3)末梢臓器におけるインスリン感受性、に NRDc が果たす役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)NRDc が膵細胞の分化維持に果たす役割の解明:

ROSA26-ECFP マウス (cre が発現した細胞でのみ ECFP 遺伝子が ON になるマウス) を用いてインスリン陽性細胞 (膵細胞) の lineage tracing を行った。また、realtime RT-PCR 法を用いて、KO の膵島における遺伝子発現を解析した。

(2) NRDC が膵 細胞の機能維持に果たす役割の解明:

NRDC の過剰発現、NRDC や MafA のノックダウン、を行った膵 細胞株を樹立し、同細胞株を用いて、クロマチン免疫沈降法、ルシフェラーゼアッセイを行った。また免疫沈降法を行い、膵 細胞特異的転写因子群と NRDC による複合体形成について解析した。

(3) NRDC が末梢臓器におけるインスリン感受性に果たす役割の解明:

Albumin-Cre マウス、Adiponectin-Cre マウス、リゾチーム M1-Cre マウスを用いて臓器(肝臓、脂肪組織、マクロファージ)特異的 NRDC 欠損マウス(LiverKO、AdipoKO、M KO)を樹立し、糖負荷試験、インスリン負荷試験などの解析を行った。

4. 研究成果

(1) NRDC が膵 細胞の分化維持に果たす役割の解明:

前述のように、KO 膵島では 細胞の比率が増加していた。増加した 細胞の起源を明らかにするために、ROSA26-ECFP マウス(cre が発現した細胞でのみ ECFP 遺伝子が ON になるマウス)を用いてインスリン陽性細胞(膵 細胞)の lineage tracing を行い、コントロール(NRDCwt/wt: RIPcre+: R26ECFP+)と KO(NRDCflox/flox: RIPcre+: R26ECFP+)マウスの組織像を比較した。すると、KO 膵島では一部のグルカゴン陽性細胞(細胞)が ECFP 陽性となっており、一度インスリン陽性となり膵 細胞へと分化した細胞が、細胞へと分化転換を起こしたことがわかった。また、Ngn3、Aldh1a3 など脱分化した膵 細胞に特徴的な遺伝子の発現も上昇していた。以上の結果から、NRDC は膵 細胞の機能だけでなく、分化維持にも関与していることがわかった。

(2) NRDC が膵 細胞の機能維持に果たす役割の解明:

膵 細胞株で NRDC の過剰発現と MafA のノックダウンを組み合わせて解析したところ、NRDC 過剰発現による Ins1、Ins2 の発現亢進は、MafA に依存していることがわかった。さらに、MafA を欠損した膵島で KO 膵島と同様に膵 細胞の脱分化・分化転換がおこることが報告されていることから、膵 細胞における NRDC の働きには MafA が深く関与すると考えられた。そこで、膵 細胞株(MIN6)を用いてクロマチン免疫沈降法、ルシフェラーゼアッセイを施行したところ、NRDC が MafA の enhancer 領域(MafAR3)に結合し、MafAR3 の enhancer 活性を正に制御することがわかった。一方、GM6001(ADAM/MMP 阻害剤)によって細胞表面の NRDC の作用を阻害しても、MafA の発現は変化しなかった。以上の結果か

ら、膵 細胞の NRDC は核内で MafAR3 の転写活性を調節することで MafA の発現を制御していることがわかった。

NRDC による MafA 発現の制御機構を明らかにするため、MafAR3 に結合することが報告されている転写因子(Pdx1、NKx6.1、NeuroD1 など)と NRDC の相互作用を免疫沈降法によって検討した。すると、NRDC は Islet1 と特異的に複合体を形成することがわかった。さらに、NRDC をノックダウンした膵 細胞株(MIN6)でクロマチン免疫沈降法を行ったところ、NRDC のノックダウンによって MafAR3 上の Islet1 が特異的に減少する(Pdx1 や NeuroD1 は変化しない)ことがわかった。NRDC と Islet1 について種々の変異体を用いて解析を行ったところ、高度酸性ドメインを欠損した NRDC、LIM ドメインを欠損した Islet1、で複合体形成が著明に障害された。さらに、それらの変異体の過剰発現は、野生型の過剰発現に比べて MafA の発現上昇が軽度であった。以上の結果から NRDC による MafA の発現制御には、NRDC、islet1 間の相互作用が重要であることがわかった。

以上の検討から、膵 細胞の NRDC が、Islet1 と協調して MafA 発現を調節することで、膵 細胞機能および分化の制御に重要な役割を果たすことが明らかになり、Diabetes 誌に発表した。

(3) NRDC が末梢臓器におけるインスリン感受性に果たす役割の解明:

AdipoKO にインスリン負荷試験を行ったところ、負荷後の血糖値は Adipo-KO マウスにおいて有意に低値であり、NrDC-/-マウスと同様に Adipo-KO マウスのインスリン感受性が良好であることが分かった。また、AdipoKO と NrDC-/-に高脂肪高シヨ糖食を負荷すると、いずれのマウスにおいても白色脂肪への炎症細胞浸潤が軽減した。一方、M KO ではインスリン感受性の改善、白色脂肪への炎症細胞浸潤が軽減、のいずれも認めなかった。

LiverKO に糖負荷試験を行ったところ、LiverKO では耐糖能が良好であることがわかった。さらに解析を進めたところ、肝臓のナルディライジンが肝臓だけでなく、臓器間コミュニケーションの制御を介してエネルギー代謝に重要な役割を果たしていることを示唆するデータも得られた。

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)

Kasai Y, Toriguchi K, Hatano E, Nishi K, Ohno M, Yoh T, Fukuyama K, Nishio T, Okuno M, Iwaisako K, Seo S, Taura K,

Kurokawa M, Kunichika M, Uemoto S, Nishi E. "Nardilysin promotes hepatocellular carcinoma through activation of signal transducer and activator of transcription 3." **Cancer Sci**, epub ahead of print (doi: 10.1111/cas.13204), 2017. (査読あり)

Nishi K, Sato Y, Ohno M, Hiraoka Y, Saijo S, Sakamoto J, Chen PM, Morita Y, Matsuda S, Iwasaki K, Sugizaki K, Harada N, Mukumoto Y, Kiyonari H, Furuyama K, Kawaguchi Y, Uemoto S, Kita T, Inagaki N, Kimura T, Nishi E.

"Nardilysin is required for maintaining pancreatic beta-cell function." **Diabetes**, 65号, pp3015-27, 2016. (査読あり)

[学会発表](計 13 件)

Nishi K, Sato Y, Ohno M, Saijo S, Sakamoto J, Chen P, Morita Y, Matsuoka T, Kita T, Inagaki N, Kimura T, Nishi E. Nardilysin is a Critical Regulator of Pancreatic β -Cell Function 第79回日本循環器学会学術集会 (2015年4月24-26日、大阪)

西清人, 西英一郎
Nardilysin is a critical regulator of glucose-stimulated insulin secretion 新学術領域研究「生命素子による転写環境とエネルギー代謝のクロストーク制御」平成27年度班会議 (2015年6月14-16日、熊本)

Nishi K, Inagaki N, Nishi E. Nardilysin is Required for Maintaining Function and Identity of Pancreatic β -Cells Keystone symposia "Diabetes: New Insights into Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies (T2)" (2015年10月25-29日、京都)

Nishi K, Sato Y, Ohno M, Hiraoka Y, Saijo S, Sakamoto J, Chen P, Matsuoka T, Kita T, Inagaki N, Kimura T, Nishi E. Nardilysin is essential for the maintenance of pancreatic β -Cell function and identity 第38回日本分子生物学会年会 (2015年12月1-4日、神戸)

西清人, 稲垣暢也, 西英一郎.

Nardilysin regulates glucose metabolism through insulin secretion 第21回アディポサイエンス・シンポジウム (平成28年8月20日、大阪)

西清人, 大野美紀子, 西城さやか, 森田雄介, 松田真太郎, 稲垣暢也, 西英一郎. ナルディライジンによる膵細胞機能・分化制御機構の解明 第37日本肥満学会 (平成28年10月7日~8日、東京)

西清人, 佐藤雄一, 大野美紀子, 平岡義範, 西城さやか, 坂本二郎, 陳博敏, 森田雄介, 松田真太郎, 北徹, 稲垣暢也, 木村剛, 西英一郎. Nardilysin Regulates Glucose Homeostasis via the Maintenance of Pancreatic β -Cell Function and Identity. 第39回日本分子生物学会年会 (平成28年11月30日~12月2日、横浜)

松田真太郎, **西清人**, 森田雄介, 西城さやか, 大野美紀子, 西英一郎, Nardilysin in Adipose tissue regulates insulin sensitivity. 第39回日本分子生物学会年会 (平成28年11月30日~12月2日、横浜)

森田雄介, 大野美紀子, **西清人**, 西城さやか, 松田真太郎, 西英一郎 ナルディライジンのゲノムワイドな標的遺伝子の同定と細胞周期制御における意義 第39回日本分子生物学会年会 (平成28年11月30日~12月2日、横浜)

西城さやか, 平岡義範, 大野美紀子, **西清人**, 森田雄介, 松田真太郎, 北徹, 木村剛, 西英一郎 褐色脂肪組織に発現するナルディライジンは体温恒常性維持機構において重要な役割を示す 第39回日本分子生物学会年会 (平成28年11月30日~12月2日、横浜)

大野美紀子, 陳博敏, 日和佐隆樹, **西清人**, 西城さやか, 森田雄介, 松田真太郎, 桑原康秀, 尾野亘, 今井逸雄, 井上勝美, 村井達哉, 北徹, 木村剛, 西英一郎 急性冠症候群におけるナルディライジン Nardilysin の診断バイオマーカーとしての有用性の検討 第39回日本分子生物学会年会 (平成28年11月30日~12月2日、横浜)

西清人, 大野美紀子, 西城さやか, 森田雄介, 松田真太郎, 坂本二郎, 陳博敏, 木村剛, 西英一郎 "Nardilysin Critically Controls Insulin

Secretion and Glucose Metabolism via the Transcriptional Regulation of MafA and GLUT2.”

第81回日本循環器学会学術集会
(平成29年3月16日～18日、金沢)

松田真太郎, **西清人**, 森田雄介, 西城さやか, 大野美紀子, 西英一郎,
Nardilysin in Adipose tissue regulates insulin sensitivity.

第81回日本循環器学会学術集会
(平成29年3月16日～18日、金沢)

〔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：
<http://kyoto-u-cardio.jp/kisokenkyu/sentan-bunshi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西 清人(Nishi, Kiyoto)
京都大学医学部附属病院・医員
研究者番号：30749362

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者