

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09850

研究課題名（和文）遺伝子発現修飾酵素 細胞株の大規模作製とオミクス解析によるインスリン分泌機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of insulin secretory mechanisms through large scale generation of genetically-modified insulin secreting cells and omics analysis

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） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：糖尿病の原因となる膵細胞からのインスリン分泌障害について、研究した。具体的には、インスリン分泌細胞でのブドウ糖の代謝を障害して、インスリン分泌能にどのような変化が起こるかを検討した。また、インスリン分泌が低下した細胞で発現量に変化が認められたテトラスパニン分子群の役割を検討した。ブドウ糖の代謝に影響を与えると、糖尿病発症初期の様にインスリン分泌は低下するが、インスリン含有量が増加傾向となった。また、テトラスパニン分子群の量を変化させると、インスリン分泌に影響を受けることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、インスリン分泌細胞において、ブドウ糖の代謝に障害を与えるとミトコンドリアでの代謝が低下し、インスリン分泌が低下するが、インスリン含有量はむしろ増加する可能性が示唆された。これらは、糖尿病初期に認められる現象と類似しており、そのメカニズムをさらに解析して介入できるようにすることは、糖尿病の発症予防に役立つ方策を考案する上で重要であると考えられた。一方、インスリン分泌の低下した細胞で変動したテトラスパニン分子の一部は、インスリン分泌障害の結果ではなく、原因になっている可能性が考えられ、今後の治療ターゲットとして有望であると考えられた。

研究成果の概要（英文）： In this project, we have studied mechanisms of impaired insulin secretion underlying diabetes pathogenesis. We have modulated expression of glucose-metabolizing enzymes in insulin secreting cells. In addition, since we have found that Tspan molecular family members are modulated in poorly responding insulin secreting cells, we studied Tspan proteins. We identified glucose-metabolizing enzymes and a member of the Tspan family plays important roles in insulin secretion.

研究分野：代謝学

キーワード：膵島 インスリン メタボローム トランスクリプトーム

## 1. 研究開始当初の背景

全ゲノム相関解析により、100 個近い 2 型糖尿病の易感受性遺伝子が報告されたが、興味深いことに、その多くが膵 β 細胞の機能に関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解明することは、糖尿病の病態解明や創薬標的の同定のために重要である。

細胞はトランスクリプトーム、プロテオーム、フォスフォプロテオーム、メタボローム、リピドームなど多重のオミクス、さらにはイオン動態など多重の階層にまたがる情報ネットワークにより制御されている。膵β細胞からのグルコースによるインスリン分泌においても、このオミクスのダイナミズムを理解することが重要である。近年、これらのオミクスを解析する技術は飛躍的に進歩し、インスリン分泌細胞についても、オミクス解析を報告する論文が発表されている。しかし、これらの研究で、同定される数百を超える遺伝子、タンパク、リン酸化部位の役割を評価・検証することができず、これまでは単にこれらを同定するにとどまっている。評価・検証にあたっては、オミクス解析で重要な要素の候補となった特定の部位に攪乱を生じさせ、その応答を観察することが一つの方法である。すなわち、応答にあたるインスリン分泌への効果を評価する必要がある。インスリン分泌を高感度で正確に評価する方法は、遠回りであるが、原始的なインスリンそのものを測定するイムノアッセイである。多数の細胞に対し、均一に攪乱を入れる方法としては、遺伝子の安定導入細胞株の作製が実際的である。アデノウイルスベクターによる遺伝子導入は、一定量以上のアデノウイルスの感染が障害を与えるなどの欠点がある。そこで、我々は、インスリン分泌における様々な分子の役割を検討するために、インスリン分泌細胞株 MIN6 をもとにマスター細胞株を樹立し、遺伝子発現修飾インスリン分泌細胞株を効率的かつ大規模に作製する方法を開発し、研究の準備を整えた。

## 2. 研究の目的

グルコースによるインスリン分泌では、グルコース代謝で生じる ATP が  $K_{ATP}$  チャネルを閉鎖し、引き続き起こる電位依存性カルシウムチャネルの開口により流入するカルシウムがトリガーとなって開口放出を引き起こす。したがって、グルコースの代謝が重要であるが、ATP だけでなくミトコンドリア TCA サイクル代謝物が重要である可能性も示唆されている。ピルビン酸シャトル経路は、このような TCA サイクル代謝物を生成し、また細胞質へ移行させるために重要である。そこで、ピルビン酸シャトルを構成する重要な酵素であるピルビン酸カルボキシラーゼ (Pcx) およびイソクエン酸脱水素酵素 1 型 (Idh1) の発現を修飾した細胞株を作製し、インスリン分泌に対する効果を検討することを第一の目的とした。

ミトコンドリアでの ATP 産生を起こすグルタミン (Gln) + ロイシン (Leu) の刺激でも、インスリン分泌は惹起されることからミトコンドリアでの ATP 産生が重要であると考えられるが、一方解糖系が何等かの役割を担う可能性も考えられる。そこで、解糖系の役割を解明するために、解糖系の重要な酵素グルコキナーゼ (Gck)、グリセロリン酸キナーゼ 1 (Pgk1)、ピルビン酸脱水素酵素触媒サブユニット 1 (Pdha1) の発現を抑制させて、インスリン分泌やインスリン産生への影響を検討することを 2 つめの目的とした。

また、当教室で単離した MIN6 細胞のサブクローンの中に、グルコース応答性が高いサブクローンと低いサブクローンがあるが、これらのクローンを検討したところ、グルコース応答性の高いクローンと低いクローンの中で、発現が大きく異なる遺伝子が認められた。その中にテラスパニン (tetraspanin) 分子群の分子が複数存在した。そして、TspanC8 subfamily に属するのテラスパニン 33 は、ヒト 2 型糖尿病患者の膵島の解析により、インスリン分泌に重要である可能性が、最近示されているので、TspanC8 subfamily 分子の役割を解析することを 3 つめの目的とした。

## 3. 研究の方法

MIN6 細胞にテトラサイクリン依存性転写因子 (Tet3G) を発現させたクローンにテトラサイクリン応答エレメントをもったプロモーター (TRE3g) 下に Pcx あるいは Idh1 の cDNA を接続した遺伝子を発現させた。同様に、Pcx あるいは Idh1 に対する shRNA を発現する遺伝子を導入した。これにより、Pcx あるいは Idh1 を過剰発現あるいは発現抑制する細胞株を作製し、インスリン分泌などへの影響を検討した。

続いて、解糖系の役割を検討するために、Gck の過剰発現あるいは発現抑制細胞を作製し検討した。また、Pgk1 および Pdha1 については、発現抑制細胞を作製して検討した。また、これらの細胞において、グルコース刺激時の細胞内代謝産物を抽出し、外部組織に受託解析を依頼し、メタボロームの解析を行った。

TspanC8 subfamily 分子の解析には、まず RT-PCR により、TspanC8 subgroup のメンバー (5, 10, 14, 15, 17, 33) の MIN6 細胞における発現を半定量的に測定した。その後、Tspan5 と Tspan33 について、siRNA により、発現を抑制して、インスリン分泌への影響を検討した。また、Tspan33 の過剰発現細胞株を作製し、プロテオームの変化を受託解析にて、行った。

## 4. 研究成果

### ピルビン酸シャトルのインスリン分泌における役割

Pcx cDNA を TRE3g 下流につないだ遺伝子の MIN6 細胞染色体への挿入は、ドキシサイクリ

ンによる Pcx タンパクの約 3 倍の増加をもたらしたが、インスリン分泌への影響を認めなかった。また Pcx に対する shRNA の発現は、Pcx タンパク量を 25% 程度まで低下させたが、インスリン分泌の影響を与えなかった。これまでの報告では、Pcx に対する阻害剤がインスリン分泌を抑制するという報告が散見されるが、阻害薬の特異性は常に問題になるところであり、Pcx 阻害薬の場合も当てはまるのかもしれない。また、最近ヒト膵島では Pcx の発現が低いことがわかり、Pcx の役割の重要性に疑問が投げかけられているが、そのことを支持する結果と考えられた。また、Idh1 の過剰発現も発現抑制もインスリン分泌に影響を与えなかった。これまで、Idh1 に対する shRNA を発現する細胞株を樹立してインスリン分泌が低下するとの報告がある。しかし、その研究では、今回の我々の研究と異なり、薬剤誘導性の発現修飾システムではないため、テストの細胞株と対照の細胞株が異なっている。インスリン分泌細胞においては、細胞株ごとの variation が大きいので、結果の解釈は非常にむずかしく、困難であると考えられる。我々の研究の様に一つの細胞株を用い、薬剤添加の有無で、目的タンパクの発現量が異なる細胞を作製し、検討すべきであると考えられる。一方で、これらの分子の発現抑制はタンパク質レベルで 20~30% であるため、より強力な発現抑制を行わないと、その効果が認められない可能性は否定できない。Knockout 細胞株を作製しての検討を考慮中である。

### 解糖系のインスリン分泌・インスリン合成における役割

Gck, Pfkfb3, Pdha1 に対する doxycycline 誘導的 shRNA の発現は、対応するタンパクの発現を 10%~30% に低下させた。Gck を過剰発現させると、1 時間の 20 mM グルコース刺激でのインスリン分泌量は、正常細胞より多かったが、ATP 含量の低下が認められた。培養液を滲流させる実験系を開発し、解析したところ、

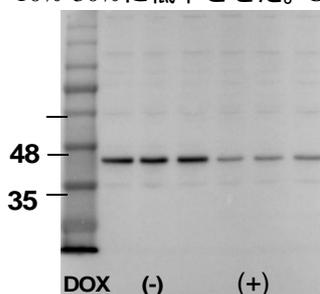


図 1. Pdha1 の発現抑制

Gck 過剰発現細胞では、刺激開始直後の 10 分間でインスリン分泌の非常に大きな山が生じ、その後分泌は正常細胞より低値となるのが観察された。Gck の発現抑制は、20 mM グルコースの 1 時間の刺激によるインスリン分泌を約 50% に低下させ、インスリン含有量には影響を与えなかった。

Pdha1 の発現抑制(図 1)では、インスリン含有量が約 2 倍に増加し、細胞含有量に対するインスリン分泌は、有意に低下した。また、Pfkfb3 の発現抑制では、インスリン含有量が約 1.5 倍に増加し、細胞含有量に対する分泌量としては、変化を認めなかった。

20 mM グルコースで 1 時間刺激した際の細胞抽出液のメタボロームの解析では、Pfkfb3 および Pdha1 の場合に、TCA サイクル中間体の低下と ATP/ADP 比の低下が認められた。また、Gck の発現抑制では、解糖系中間体の低下が認められたのに対し、Pfkfb3 および Pdha1 の発現抑制では、解糖系中間体の増加が認められた。解糖系中間体の増加とインスリン産生の関係は、1990 年代初めに提唱されている。その後これを支持するデータは発表されていないが、今回の観察は、解糖系中間体から発してインスリン合成を促進させるシグナルの存在を示唆すると考えられる。

### TspanC8 family のインスリン分泌における発現

TspanC8 subgroup のメンバー (5, 10, 14, 15, 17, 33) の MIN6 細胞における発現を半定量的に測定した。図 2 に示す通り、Tspan5 の発現量が最も高く、Tspan10 の発現は、ほぼ 0 であり、最も発現が低いのが Tspan33 であった。そこで、Tspan5 と Tspan33 について、siRNA によりその発現を抑制して、検討した。どちらの siRNA の導入も、当該遺伝子の mRNA を約 3 分の 1 に減らした。そして、インスリン分泌に対する効果を検討すると、Tspan5 の発現抑制は、インスリン分泌もインスリン含有量にも影響を与えなかった。一方 Tspan33 の発現抑制は、グルコースによるインスリン分泌を約 40% 減らしたが、KCl に対する分泌は不変で、インスリン含有量にも変化は認めなかった。

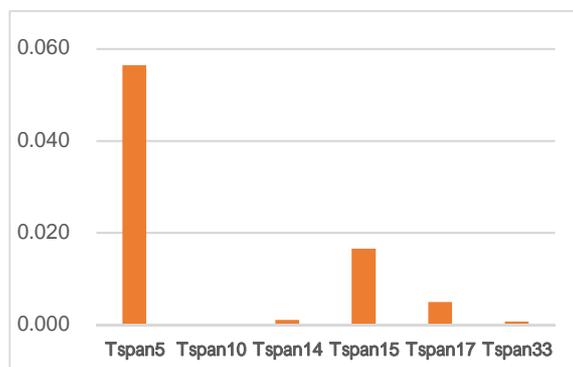


図 2 MIN6 細胞における TspanC8 family の発現

さらに、Tspan33 の過剰発現細胞株を作製し、検討した。Tspan33 の発現を誘導するとインスリン分泌の増強が認められた。この細胞におけるプロテオームを正常細胞と比較すると、いくつかのシャペロンタンパクの発現の変化が認められた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakatsu Y, Matsunaga Y, Yamamotoya T, Ueda K, Inoue MK, Mizuno Y, Nakanishi M, Sano T, Yamawaki Y, Kushiyama A, Sakoda H, Fujishiro M, Ryo A, Ono H, Minamino T, Takahashi SI, Ohno H, Yoneda M, Takahashi K, Ishihara H, Katagiri H, Nishimura F, Kanematsu T, Yamada T, Asano T.	4. 巻 26
2. 論文標題 Prolyl isomerase Pin1 suppresses thermogenic programs in adipocytes by promoting degradation of transcriptional co-activator PRDM16	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 3221-3230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.02.066.	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 Yamamotoya T, Nakatsu Y, Kushiyama A, Matsunaga Y, Ueda K, Inoue Y, Inoue MK, Sakoda H, Fujishiro M, Ono H, Kiyonari H, Ishihara H, Asano T.	4. 巻 7
2. 論文標題 Trk-fused gene regulates pancreatic beta-cell mass and insulin secretory activity.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-13432-x.	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 Nakatsu Y, Mori K, Matsunaga Y, Yamamotoya T, Ueda K, Inoue Y, Matsuzaki-Miyoshi K, Sakoda H, Fujishiro M, Yamaguchi S, Kushiyama A, Ono H, Ishihara H, Asano T	4. 巻 292
2. 論文標題 The prolyl isomerase Pin1 increases beta-cell proliferation and enhances insulin secretion	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 11886-11895
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M117.780726.	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kosuda M, Yamaguchi S, Nakasawa A, Yamana M, Koike M, Nishioka H, Ishihara H.
2. 発表標題 Overexpression screening identifies mitochondrial carbonic anhydrase 5b as an important regulator of glucose-stimulated insulin secretion in beta-cells
3. 学会等名 American Diabetes Association 79th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山名碧、藤城緑、藤城緑、山口賢、江頭富士子、藤城緑、渡邊健太郎、石原寿光
2. 発表標題 MIN6細胞における解糖系中間体によるインスリン産生制御
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 山口賢、長澤瑛子、山名碧、小須田南、石原寿光
2. 発表標題 膵細胞におけるChrono遺伝子の機能解析
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 河野玄太、藤城緑、久志本優、池田迅、田中翔、岡本真由美、江頭富士子、小川克彦、鈴木裕、中山智祥、石原寿光
2. 発表標題 異なる耐糖能障害の形成を呈した筋緊張性ジストロフィー1型の兄妹例
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 田中彩、古川麻美、小須田南、山名碧、山口賢、石原寿光
2. 発表標題 ブドウ糖応答性の異なるMIN6細胞サブクローンのトランスクリプトーム解析によるインスリン分泌に重要な遺伝子の探索
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口賢、田中彩、小須田南、山名碧、長澤瑛子、石原寿光
2. 発表標題 インスリン分泌におけるCITED4の機能解析
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018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	渡邉 健太郎  (WATANABE Kentaro)  (80373017)	日本大学・医学部・准教授   (32665)	
研究 分担者	藤城 緑  (FUJISHIRO Midori)  (50420211)	日本大学・医学部・助教   (32665)	