

機関番号：17401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591226
 研究課題名（和文） 小児期メタボリック症候群の肝・膵幹細胞におけるカルシウムシグナルの役割
 研究課題名（英文） Role of calcium signaling on the hepatic and pancreatic stem cells in the animal model of metabolic syndrome during childhood.
 研究代表者
 中村 公俊（NAKAMURA KIMITOSHI）
 熊本大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：30336234

研究成果の概要（和文）：

Calreticulin は肝細胞、膵臓β細胞、脂肪細胞などにおいて、糖、脂質代謝の調節に関与している。本研究では、時間、組織特異的 calreticulin の過剰発現を tamoxifen により誘導可能なトランスジェニックマウスを作成した。そして、calreticulin 欠損マウスと、時間、組織特異的 calreticulin の過剰発現マウスのカルシウムシグナルにおける機能の解析を遺伝子発現やタンパク質の機能の調節に重要なカルシウムシグナルの観点から解析した。

研究成果の概要（英文）：

Calreticulin(CRT) is a Ca²⁺-binding protein of the endoplasmic reticulum and essential for cardiac development. Cardiac-specific overexpression of calreticulin by α-myosin heavy chain promoter results in complete heart block and sudden death in transgenic mice. Here, to investigate further mechanism of calreticulin, we generate transgenic mice that cause temporal and spatial overexpression of calreticulin using cre-loxP system. The mice were cross-bred with Nkx2.5-Cre mice which express cre recombinase under control of Nkx2.5 promoter, a transcription factor essential for early cardiac development. Overexpression of calreticulin was associated with PR interval and QRS interval prolongation, bradycardia, sudden death between 6-week-old and 10-week-old. Furthermore, some of the Nkx2.5-CRT transgenic mice revealed marked edema in 7-week-old. In conclusion, overexpression calreticulin in the heart is associated with a decrease in HCN1 expression and calreticulin plays an important role of HCN1 gene regulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：メタボリック症候群、幹細胞、内胚葉、カルシウムシグナル

1. 研究開始当初の背景

Calreticulin(CRT)はほぼすべての組織の小胞体内に存在するカルシウム結合蛋白であり、その主な機能としては細胞内カルシウムホメオスタシスの維持やシャペロン活性があげられる。Calreticulin ノックアウトマウスは、心臓の発生に必要な転写因子の発現が障害され胎生致死である。一方、心筋細胞において calreticulin を過剰発現させると、生後 3 週前後に進行性の徐脈、房室ブロックを起こして死亡する。今回我々は、組織の発生や機能獲得における calreticulin の役割を解明するために cre-loxP システムを用いて任意の組織特異的に calreticulin を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製した。特に、心臓発生における calreticulin の役割をさらに解明するために、心臓発生に必要な転写調節因子である NKx2.5 のプロモーター下に calreticulin を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製した。このトランスジェニックマウスを解析することにより、calreticulin の発生、機能獲得における役割を明らかにすることが可能となった。

2. 研究の目的

メタボリックシンドロームは、肥満、高脂血症、高血圧や糖尿病などの合併によって起こる動脈硬化のハイリスク群である。最近このメタボリックシンドロームの発症が小児期にまでさかのぼって指摘されることが明らかになってきた。私はこれまでにカルシウムシグナルの調節タンパクである calreticulin の欠損マウス、過剰発現マウスの作成と、その表現型の解析をおこなってきた。その結果、calreticulin は肝細胞、膵臓β細胞、脂肪細胞などにおいて、糖、脂質代謝の調節に関与していることが明らかになった。一方で私は、肝細胞、膵内分泌細胞へと分化する内胚葉系幹細胞の分離、分化誘導法を確立した。そこで本研究では、calreticulin 欠損マウスと、時間、組織特異的 calreticulin の過剰発現マウスから内胚葉系幹細胞を確立し、そのカルシウムシグナルにおける機能の解析を行う。そしてメタボリックシンドロームの発症のメカニズムを、遺伝子発現やタンパク質の機能の調節に重要なカルシウムシグナルの観点から解明する。さらに小児期発症メタボリックシンドロームの治療に応用しうる肝臓、膵臓、脂肪細胞などの障害の発症の基本概念を確立することを目標とする。

3. 研究の方法

Cre-loxP システムを使って、組織特異的に calreticulin を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製した。CAG プロモーター下に 2 つの loxP 配列で挟まれたクロラムフ

ェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子とストップコドンを持ったプラスミドに、pcD-CRT-HA プラスミド(Nakamura et al. JCI 2001) 由来の CRTcDNA を挿入した。このプラスミドには HA tag を挿入しているので、HA tag を検出することにより、トランスジェン由来の calreticulin が発現していることが確認できる。このプラスミドを用いてトランスジェニックマウス作成用のトランスジェニックマウスとした。作成した loxP-CRT トランスジェニックマウスはと心臓発生初期に発現する転写調節因子である NKx2.5 プロモーターのコントロール下に cre recombinase を発現させた NKx2.5-cre マウス (Victor Chang Cardiac Research Institute Dr. R. P. Harvey より供与) とを交配させて、心臓特異的に calreticulin を過剰発現するトランスジェニックマウス (NKx2.5-CRT トランスジェニックマウス) を作製した。全ての動物実験は、熊本大学医学部附属動物実験施設 (Center for Animal Resources and Development, Kumamoto University and animals) の実験動物ガイドライン (Guide for Care and Use of Laboratory Animals) に沿って行った。

4. 研究成果

NKx2.5-CRT トランスジェニックマウスの心臓の形態を観察すると、野生型マウスと比べて、両心室、両心房の内腔が拡大していた。トランスジェニックマウスの心筋細胞におけるこれらの変化は、拡張型心筋症および心不全に特徴的な変化である (Perriard et al. Trends Cardiovasc. Med. 2003)。心臓の mRNA を用いた quantitative real-time PCR を行ったところ、野生型と比べてトランスジェニックマウスの心臓では心不全のマーカーである ANP, BNP が有意に増加していた。肥大型心筋症のマーカーである α -MHC、 β -MHC はトランスジェニックマウスと野生型マウスの間では有意差は認めなかった。NKx2.5-CRT トランスジェニックマウスで観察された諸臓器のうっ血は心不全によるものと考えた。さらに loxP-CRT トランスジェニックマウスと、albumin-cre マウスとを交配した。loxP-CRT トランスジェンに HA tag を挿入しているので、HA tag を検出することにより、トランスジェン由来の calreticulin が発現していることが確認できる。そこで、albumin-CRT トランスジェニックマウスの脳、心臓、胸腺、肺、肝臓、胃、膵臓、脾臓、腸管、腎臓、それぞれの組織のタンパクを抽出して、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。その結果、albumin-CRT トランスジェニックマウスの肝臓特異的にトランスジェン由来の calreticulin が発現していることを確認

した。

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16件)

- ① Nakamura K et al.、Improved assay for differential diagnosis between Pompe disease and acid alpha-glucosidase pseudodeficiency on dried blood spots、Molecular Genetics and Metabolism、査読有、103、2011、12-17
- ② Nakamura K et al.、Newborn Screening for lysosomal disorders、merican Journal of Medical Genetics、査読有、157巻、2011、63-71
- ③ 中村公俊、先天性アミノ酸代謝異常症高チロシン血症、日本臨床 別冊 肝・胆道系症候群 I 肝臓編(上)、査読無、2010、486-489
- ④ 中村公俊、アミノ酸代謝異常症、尿素サイクル異常症、糖原病の新しい治療法、小児内科、42巻、査読無、2010、1191-1194
- ⑤ 中村公俊、Fabry 病の疫学と診断、神経内科、査読無、73巻、2010、168-172
- ⑥ Nakamura K et al.、erebral hemorrhage in Fabry's disease、Journal of Human Genetics、査読有、55巻、2010、259-261
- ⑦ 中村公俊 他、血中アミノ酸分析によって診断できる先天性アミノ酸代謝異常症、日本臨床「広範囲 血液・尿化学検査 免疫学的検査」 III 生化学的検査、査読有、67巻、2009、625-629
- ⑧ 大浦敏博 他、テトラヒドロビオプテリン(BH4)反応性高フェニルアラニン血症に対する天然型 BH4 製剤塩酸サプロプテリンの適正使用に関する暫定指針、日本小児科学会雑誌、査読有、133巻、2009、649-653
- ⑨ 中村公俊 他、遺伝性高チロシン血症、小児疾患診療のための病態生理 2、小児内科、査読有、41増刊号、2009、341-344
- ⑩ Fujii H et al.、Prevalence and Cardiovascular Features of Japanese Hemodialysis Patients with Fabry Disease、Am J Nephrol、査読有、16巻2009、527-535
- ⑪ Nakamura Y et al.、Glycine regulates proliferation and differentiation of salivary-gland-derived progenitor cells、査読有、Cell Tissue Res、336巻、2009、203-212
- ⑫ Kumamoto S et al.、High frequency of acid alpha-glucosidase pseudodeficiency complicates newborn screening for glycogen storage disease type II in the Japanese Population、査読有、Mol. Genet. Metab、97巻、2009、190-195
- ⑬ Nakamura et al.、Glycine regulates proliferation and differentiation of salivary-gland-derived progenitor cells、Cell Tissue Res、査読有、336巻、2009、203-212
- ⑭ Mitsubuchi et al.、Inborn errors of proline metabolism、J Nutrition、査読有、138巻、2008、2016S-2020S
- ⑮ Kurome et al.、Production Efficiency and Telomere Length of the Cloned Pigs Following Serial Somatic Cell Nuclear Transfer、J. Reproduction and Development、査読有、54巻、2008、254-258
- ⑯ Kurome et al.、Production of cloned pigs from salivary gland-derive progenitor cells、査読有、10巻、2008、277-286

[学会発表] (計11件)

- ① 中村公俊 他、ろ紙血を用いたファブリー病のスクリーニング、第52回日本先天代謝異常学会、2010年10月22日、大阪国際会議場(グランキューブ大阪)
- ② 中村公俊、Screening for Fabry Disease in Japan、ヨーロッパ先天代謝異常学会、2010年9月1日、Istanbul Convention and Exhibition Center、イスタンブール、トルコ
- ③ 中村公俊 他、ろ紙血を用いたファブリー病のスクリーニング、第37回日本マス・スクリーニング学会、2010年8月28日、ワークピア横浜
- ④ 中村公俊 他、STEM CELL THERAPY FOR DIABETES MELLITUS : SALIVARY GLAND DERIVED PROGENITORS、第16回日本遺伝子治療学会学術集会、2010年7月1日、栃木県総合文化センター
- ⑤ 中村公俊 他、Glycine regulates the cell proliferation and differentiation of tissue stem cells and mouse embryonic stem cells、第16回日本遺伝子治療学会学術集会、2010年7月1日、栃木県総合文化センター
- ⑥ Nakamura et al.、Newborn Screening for Fabry Disease、第50回日本先天代謝異常学会、2008年11月6日、米子コンベンションセンター
- ⑦ Hattori et al.、Novel mutations of GLA gene identified in screening of Fabry disease、第50回日本先天代謝異常学、2008年11月6日、米子コンベンションセンター
- ⑧ 中村公俊 他、ワークショップ1 治る腎炎、治らない腎炎 ファブリー病、第38回日本腎臓学会西部学術大会、2008年

9月26日、ウィルあいち、名古屋

- ⑨ Nakamura et al.、Newborn Screening for Fabry Disease in Japan、Society for Study of Inborn Error of Metabolism、2-5 Sep、2008、Lisboa Congress Centre、Lisboa、ポルトガル
- ⑩ 中村公俊 他、ろ紙血を用いたファブリー病のスクリーニング、第35回日本マススクリーニング学会、2008年8月29日、ホテル一畑、松江
- ⑪ 中村公俊 他、ろ紙血を用いたファブリー病のスクリーニングの試み、第111回日本小児科学会、2008年4月26日、東京国際フォーラム

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 公俊 (NAKAMURA KIMITOSHI)
熊本大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：30336234

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：