

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 5 年 4 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17515

研究課題名（和文）細胞におけるプリン受容体シグナルが細胞内代謝・インスリン分泌に与える影響の解析

研究課題名（英文）Analysis of the effect of purinergic signaling on intracellular metabolism and insulin secretion in beta-cells

研究代表者

内田 啓一郎（Uchida, Keiichiro）

京都大学・高等研究院・特定研究員

研究者番号：80869701

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は、ベータ細胞におけるプリン受容体シグナルがインスリン分泌に与える影響に着目し、メカニズムの解明を目指したものである。膵ランゲルハンス島のトランスクリプトーム解析からは意外にも炎症関連の関与が示唆された。VNUTを欠損したマウスのマクロファージは微量のLPSに対する炎症性サイトカインの産生が低下していた。通常の状態でも門脈血は腸管に由来する菌体成分が検出されることを考慮すると、マウスの表現型の一部は炎症細胞のプリンシグナルの変化に依存する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メタボリックシンドローム関連疾患である2型糖尿病や非アルコール性脂肪肝疾患は世界的に増加傾向であり、これらの根本にある疾患メカニズムの理解と治療法の改善は急務である。本研究成果は細胞から分泌されるヌクレオチドと、その受容体であるプリン受容体を介した炎症細胞の機能修飾が存在することを示唆しており、これらの生理・病態生理におけるアプローチがメタボリックシンドロームの改善の手掛かりとなりうる可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：In this study, I focused on the effect of purinergic signaling on insulin secretion in beta-cells and tried to elucidate the mechanism. Transcriptomic analysis of pancreatic islets of VNUT deficient unexpectedly suggested the involvement of inflammation. Macrophages from VNUT-deficient mice had reduced production of proinflammatory cytokines in response to low dose of LPS. Considering that bacterial components derived from the intestinal tract are detected in portal vein blood, it was suggested that part of the mouse phenotype may depend on changes in purinergic signaling of inflammatory cells.

研究分野：内分泌・代謝

キーワード：VNUT マクロファージ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

膵ランゲルハンス島(ラ氏島)は血糖調節の中核をなすホルモンであるインスリンを分泌し、適切な分泌制御機構により血糖値は比較的狭いレンジに保たれ、生体におけるグルコース代謝のホメオスタシスが維持されている。この機能不全の代表的な表現系が糖尿病であり、血糖値の上昇を背景とした様々な合併症を引き起こす疾患である。高い有病率、合併症が致命的・QOLを大きく障害するものであること、一人当たり年間 24.7 万円という経済的負担の観点から、この疾患の病態進展に関するメカニズムの解明と治療法の開発は急務である。

細胞においてインスリンと ATP が共分泌されることは古くから知られており、申請者の所属する研究室は以前より細胞間シグナル伝達物質としてのプリン化合物の役割に着目し、インスリン小胞への ATP の輸送に必須のタンパク質である VNUT を欠損させたマウス作成し、VNUT のノックアウトはインスリン分泌を増加させることを報告した(Sci Rep. 4:6689 2014.)。しかし野生型マウスから単離したラ氏島において RNA 干渉を用いて VNUT を減少させた検討では、逆にインスリン分泌を減少させることが報告されており(Endocrinology. 154:675-684, 2013.)。その分泌変化の機構は完全に理解されたとは言い難い。また分泌された ATP はオートクライン・パラクラインで細胞膜上のプリン受容体に結合し作用すると考えられているが、複数の種類のプリン受容体が細胞上にあることが報告されており(Br J Pharmacol. 98:875-882, 1989, Am J physiol. 1257:E473-478, 1989, Diabetes. 48, 2171-2181, 1999, Sci Rep. 8:8926, 2018. etc、図 1) どの受容体が重要なのかは明確になっていない。

インスリン分泌機構は、分泌するか否かを決定する "triggering pathway" と、どの程度の量を分泌するかを制御する "amplification pathway" に分けて理解されるようになってきている。これまで "triggering pathway" の機構についてはよく解明されてきたが、"amplification pathway" は複雑な経路で(図 2)理解は不十分であり、近年のインスリン分泌機構解明の中心となっている。近年、グルコース中間代謝産物、グルタミン酸などのアミノ酸、脂肪酸等の細胞内代謝産物が amplification pathway において重要な役割を担うことが報告されている(Pharmacol Ther. 179:17-30, 2017.)。またプリン受容体を介した細胞内シグナルが細胞内代謝変化に影響を与えることが示唆されている。一例を挙げると、G タンパク共役型受容体である P2Y6 受容体の活性化により、脂肪酸合成の律速段階を担う酵素であるアセチル CoA カルボキシラーゼがリン酸化されることが報告されている(Biochem Pharmacol. 85:991-998, 2013.)。このことはプリン受容体からのシグナルが細胞内代謝を変化させることでインスリン分泌の調節を担っている可能性を示唆する。細胞においてプリンシグナルがインスリン分泌に如何に関わるかを解明することは、糖尿病に対する新機序のインスリン分泌促進薬の開発に繋がります。

## 2. 研究の目的

本研究は ATP 分泌の欠如がプリン受容体を介し細胞内代謝を変化させインスリン分泌を増加させたとの仮説に基づき、VNUT 欠損インスリン分泌細胞株を作成、メタボローム・トランスクリプトーム解析を用いてその変化を掌握し、インスリン分泌におけるプリンシグナルの役割を明確化することを研究目的とする。

## 3. 研究の方法

### 実験 1. VNUT 欠損インスリン分泌細胞株の作成

プリン受容体からのシグナルの包括的な欠損がタンパクリン酸化の状態および細胞内代謝に如何なる影響を及ぼすのかを網羅的に把握すべく、メタボローム解析およびトランスクリプトーム解析を用いて代謝産物の流れを理解することを研究目的とする。そのための手段として VNUT 欠損マウスのラ氏島の抽出液を用いて解析を行うことが第一に考えられるが、得られる検体が少量であり、再現性の高い解析に必要な検体を確保するのは困難である。実際にこれまでにマウスのラ氏島を用いてメタボローム解析・リン酸化プロテオーム解析を行った文献は認めない。そこで申請者はマウスのインスリン分泌細胞株である MIN6 において、CRISPR-Cas9 の技術を用いて VNUT をノックアウトした細胞株を樹立し、その細胞株を用いて解析を行い、対照の細胞株との比較により細胞の代謝変化を捉える方針とする。オフターゲット効果低減のために、sgRNA と Cas9 タンパク質の複合体をエレクトロポレーションにて導入し、標的配列のシーケンシング、qPCR、ウェスタンブロッティングにてノックアウトを確認する。

### 実験 2. VNUT 欠損インスリン分泌細胞株における ATP・インスリン分泌および細胞内カルシウムの評価

実験 1 にてに作成した VNUT 欠損細胞株においてグルコースにより ATP・インスリン分泌を刺激し、ルシフェリン・ルシフェラーゼを用いた蛍光アッセイで ATP 分泌量を測定し、ATP 分泌増加が欠如していることを確認する。その際に分泌されたインスリンを ELISA にて測定し、インスリン分泌を評価する。加えて triggering pathway おいて最終的に増加するカルシウムについても、Fura-2 およびマイクロプレートリーダーを用いて計測を行い、プリングナルの triggering pathway への関与についても明らかにする。

実験 3 . VNUT 欠損インスリン分泌細胞株の作成とメタボローム・トランスクリプトーム解析  
実験 1 にてに作成した VNUT 欠損細胞株の抽出液を用いてオミクス解析を行う。得られた細胞内代謝変化の結果についてより精度の高い結果を担保するために、メタボローム解析だけでなく代謝産物の代謝を担う酵素についてのトランスクリプトーム解析を組み合わせる。また先に述べた P2Y6 受容体を介したアセチル CoA カルボキシラーゼのリン酸化は 15 分程度で起こることがわかっており、早期の代謝酵素の修飾を介する代謝変化を捉えられない可能性もある。その場合にはリン酸化プロテオーム解析をメタボローム解析と組み合わせて細胞内代謝を行う方向に変更する。

#### 4 . 研究成果

##### 実験 1 . VNUT 欠損インスリン分泌細胞株の作成

当初、マウスのインスリン分泌細胞株である MIN6 において、CRISPR-Cas9 の技術を用いて VNUT をノックアウトした細胞株の樹立を試みたが、MIN6 では低細胞濃度に希釈することで生存率が著しく低下することが判明した。代替として低細胞数への希釈に耐え、single cell cloning が可能であったラットのインスリン分泌細胞株である INS-1 へと使用する細胞株の変更を行った。またオフターゲット効果低減のために、sgRNA と Cas9 タンパク質の複合体をエレクトロポレーションにて細胞内へ導入する予定であったが、実際に施行したところ、変異導入効率が著しく低く、変異細胞株の入手が困難であったために、gRNA および Cas9 タンパク質をコードするベクターをエレクトロポレーションを用いてトランスフェクションを行う方針へ転換し変異効率の上昇をえた。トランスフェクション後に single cell cloning を行い、ゲノム DNA を再抽出し、in vitro での再切断実験にて変異株のスクリーニングを行い、同定した複数の変異見込み細胞株群を複数同定した。これらの細胞株群に対してそれぞれシーケンスにて VNUT の遺伝子である slc17a9 の遺伝子変異を確認した。上記に加え別途 2 種類の gRNA をコードするベクターを作成し、同様の方法にて作成、シーケンスにて確認を行った(図 1)。

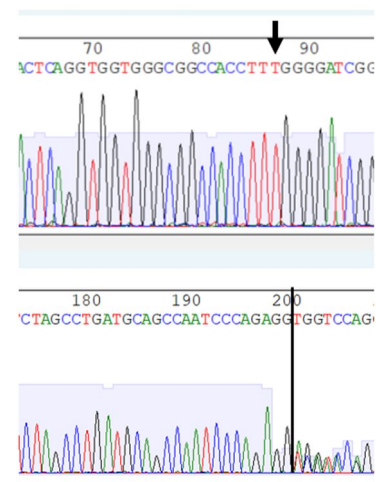


図 1 シーケンスによる  
遺伝子変異導入の確認

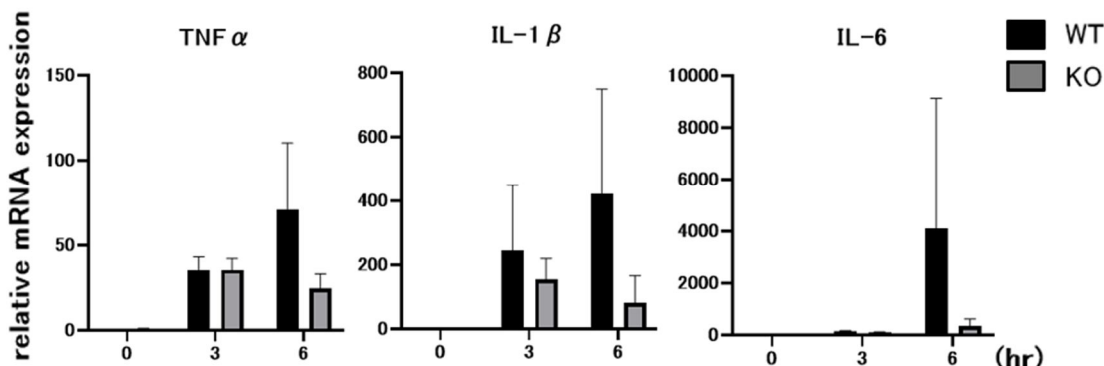
##### 実験 2 . VNUT 欠損インスリン分泌細胞株における ATP・インスリン分泌および細胞内カルシウムの評価

実験 1 にて複数のインスリン分泌細胞株のクローンを得た。複数のクローンでインスリン分泌の確認を行ったが、インスリン分泌能は元となった細胞株と比較して、増加しているものもあれば、減少しているものも存在した。同一の細胞クローンでもクローニングにより多様性が発生することが報告されており、クローンのインスリン分泌の評価では実際に VNUT 欠損の影響を見ているのかクローンの表現型を見ているのかの判断が困難であることがわかった。

実験 3 . VNUT 欠損インスリン分泌細胞株の作成とメタボローム・トランスクリプトーム解析  
実験 2 をうけ、上記の細胞株でメタボローム解析を行う意義は乏しいと判断したために、VNUT 欠損マウスのトランスクリプトーム解析を行う方針とした。変動遺伝子について GO 解析を行った結果、免疫に関与する遺伝子が多く変動している事実を突き止めた。ランゲルハンス島内にもマクロファージを中心としたマクロファージが存在しており、近年インスリン分泌との関連や 細胞の増殖との関連が示唆されている。また免疫細胞にも VNUT は発現していることとランゲルハンス島の RNA-seq の結果を合わせて考えると、ランゲルハンス島全体の表現型はマクロファージ に由来する可能性も考慮する必要が出てきた。従って VNUT 欠損マウス由来のマクロファージの表現型を確認する方針へ変更した。

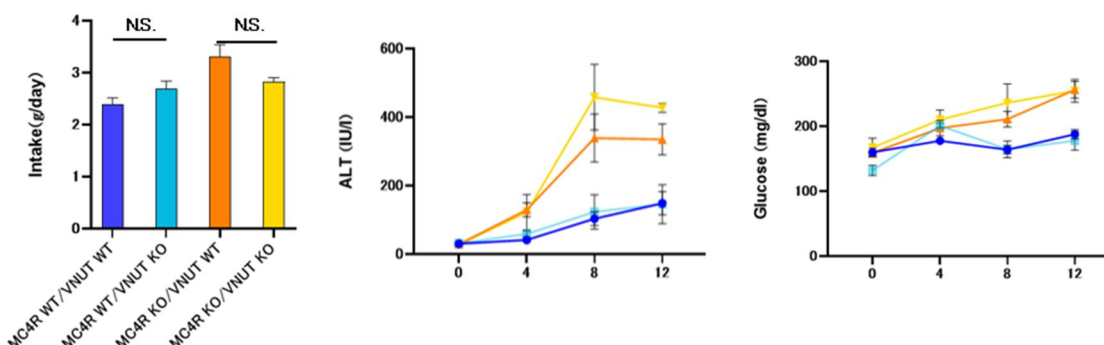
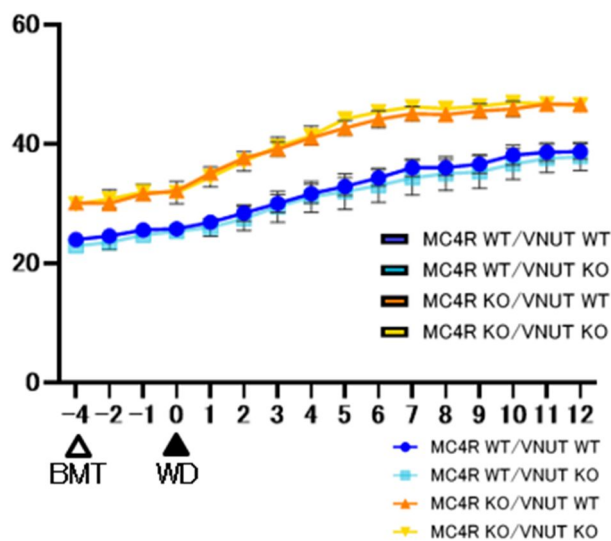
#### 実験 4 . VNUT 欠損細胞由来のマクロファージの表現型解析

VNUT および野生型マウスの骨髄より細胞を回収し、L929 の培養上清を用いてマクロファージへ分化させた。後に LPS を負荷し、経時的に mRNA を回収し、qPCR にて炎症性サイトカインの変動を評価した。その結果、高濃度の LPS 刺激では VNUT と野生型マウスの間で差を認めなかったが、低濃度の LPS 刺激では VNUT のマクロファージは野生型と比較して炎症性サイトカインの発現が減弱する傾向が認められた。



#### 実験 5 . VNUT 欠損骨髄移植マウスの代謝解析

実験 4 をの結果を踏まえ、マクロファージの VNUT が代謝に与える影響を検討するために、野生型マウス、および NASH の表現型を呈する MC4R 欠損マウスに、VNUT 欠損マウスまたは野生型マウス由来の骨髄を移植し、高脂肪食を与え、代謝関連指標の解析を行った。結果として体重・摂食量・肝逸脱酵素・随時血糖に有意な差を認めず、VNUT 欠損マウスの表現型がマクロファージに由来しない可能性を示唆した。しかしながら骨髄由来マクロファージは放射線感受性が高いが、組織常在性マクロファージは放射線抵抗性であり、骨髄移植では完全に遺伝子型を置換できていない可能性も示唆された。以上からさらなる詳細な解析のためには組織特異的な遺伝子欠損マウスの作成が必要と考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 1. Takeichi Y, Miyazawa T, Sakamoto S, Hanada Y, Wang L, Gotoh K, Uchida K, Katsuhara S, Sakamoto R, Ishihara T, Masuda K, Ishihara N, Nomura M, Ogawa Y	4. 巻 64
2. 論文標題 Non-alcoholic fatty liver disease in mice with hepatocyte-specific deletion of mitochondrial fission factor.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diabetologia.	6. 最初と最後の頁 2092-2107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00125-021-05488-2	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内田啓一郎
2. 発表標題 細胞におけるATP分泌の意義の解明
3. 学会等名 第58回日本糖尿病学会九州地方会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------