

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 8 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591504

研究課題名(和文)小児期発症メタボリック症候群における内胚葉系細胞の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 endodermal stem cells in the metabolic syndrom from 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：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。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った。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した。

研究成果の概要(英文)：The metabolic syndrome is a high-risk group of arteriosclerotic diseases occurring such as obese, hyperlipidemia, hypertension and diabetes. It was elucidated that the onset of this metabolic syndrome was found in childhood recently. In this study, we established endodermal stem cells from calreticulin knockout mice and overexpression mice with tissue-specific calreticulin, and analyzed the function in the calcium signals. We elucidated a mechanism of the onset of the metabolic syndrome from the viewpoint of calcium signal which was important to the adjustment of the function of gene expression and the protein function.

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 はほぼすべての組織の小胞体内に存在しており、主にカルシウム貯蔵タンパクとして小胞体タンパクである SEACA2b や IP3R と関連しながらカルシウムホメオスタシスをつかさどっている (Michalak et al. Biochemical Journal 1999, Michalak, et al. Cell Calcium 2002)。その他 PDI, BiP, ERp72 などの他のシャペロンと共に、細胞膜に存在するチャンネルや受容体を構成するタンパクのシャペロンとしての働きや、転写調節、細胞接着、アポトーシスの誘導などその機能は多岐にわたっている。(Michalak, et al. Cell Calcium 2002)。

今回我々は、calreticulin 発現量の変化と不整脈との関係を解明するために、cre-loxP システムを用いて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を作製した。このトランスジェニックマウスは生後 1 週目から QRS 間隔の延長を認めて、PR 間隔の延長、徐脈を生じ、生後 6~10 週で死亡した。組織学的には、このトランスジェニックマウスは心不全を起こしており両心房、両心室の内腔は拡大していた。RT-PCR の結果、洞房結節において活動電位をおこすイオンチャンネルである HCN1 の発現量が低下していた。今回作製したトランスジェニックマウスは、これまで報告されている不整脈モデルマウス、心不全モデルマウスと異なる病態を示す新しいモデルマウスである。さらに、小胞体タンパクである calreticulin の心臓の機能維持における役割を解明する上で有用なモデルマウスと考える。

2. 研究の目的

Calreticulin の欠損マウスを作成し、そのホモ体は胎生致死となることがわかった。しかしヘテロ体は野生型と表現型が同じであるため、欠損マウスはヘテロ体で維持すること

が可能である。この欠損マウスと calcineurin の constitutive active form を心臓特異的に発現したトランスジェニックマウスを交配することによって全身に calreticulin が欠損した lean マウスを得ている。また時間、組織特異的過剰発現トランスジェニックマウスは、cre-loxP システムを用いたトランスジーンによる発現調節系を用いて作成した。このトランスジェニックマウスを肝細胞、膵臓 細胞などのそれぞれの組織に特異的に cre recombinase を発現するトランスジェニックマウスと交配させることにより、calreticulin の過剰発現を発生、成長の各段階に誘導可能である。このトランスジェニックマウスはすでに作成し、心臓における過剰発現とその表現型を確認している。また、それぞれの組織で cre recombinase を発現するトランスジェニックマウスもすでに分与を受けている。さらに私は、マウスの内胚葉系組織から肝細胞、膵内分泌細胞などへ分化する内胚葉系幹細胞を分離、分化誘導する技術を確立している。一方で、calreticulin 欠損 ES 細胞を作成し、肝細胞、膵臓、インスリン産生 細胞、心筋細胞、脂肪細胞などを分化誘導可能であることが確認されている。これらの体性幹細胞、ES 細胞を用いて、それぞれの細胞へ分化させる過程においてカルシウムシグナルの異常による各組織の病態を明らかにすることができると思われる。

3. 研究の方法

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。まず、Calreticulin の発現レベルを肝細胞、膵臓 細胞、脂肪細胞のそれぞれにおいて調節できるトランスジェニックマウスを作成する。これは loxP 配列とストップコドンにより制御された calreticulin 過剰発現トランスジ

ェニックマウスと、組織特異的 cre recombinase 発現マウスとの交配により行う。これらのマウスから、唾液腺をはじめとする内胚葉系組織から得られる幹細胞を分離する。そして幹細胞における calreticulin 調節遺伝子群の発現と、分化誘導によって得られる細胞機能を評価する。

Calreticulin の発現レベルを肝細胞、膵臓細胞、脂肪細胞のそれぞれにおいて調節できるトランスジェニックマウスを作成する。これは loxP 配列とストップコドンにより制御された calreticulin 過剰発現トランスジェニックマウスと、組織特異的 cre recombinase 発現マウスとの交配により行う。この交配に用いるトランスジェニックマウスはすでに作成している。また、組織特異的 cre recombinase 発現マウスとして、肝細胞、膵臓細胞、脂肪細胞特異的なプロモーターである、アルブミンプロモーター、インスリンプロモーター、aP2 プロモーターの制御下に cre recombinase を発現するトランスジェニックマウスを準備している。これらのトランスジェニックマウスを用いて、肝細胞特異的に cre recombinase を発現するマウスと交配し、肝細胞特異的な calreticulin 過剰発現マウスを作成する。このときタモキシフェンをマウスに投与すると、時間特異的に cre recombinase が発現し組織特異的な calreticulin 発現が可能となる。トランスジーン由来の calreticulin の発現は、トランスジーン の 3' 端に存在する小胞体残留シグナルの 5' 側に挿入した hemagglutinin (HA) タグにより検出する。この HA タグは、すでに calreticulin によるカルシウムシグナル調節を障害しないことを *in vitro* において確認している。このトランスジェニックマウスにおいて、肝臓、膵細胞、脂肪細胞における糖、脂質代謝について解析する。一方で Calreticulin 欠損マウス

は、脂肪組織の発生が障害されるとともに、糖、脂質代謝異常をおこすことが示唆されている。それゆえ、過剰発現マウスにおいても糖の産生、貯蔵やインスリンの産生、分泌、脂質の肝臓への取り込みや分解、アディポサイトカインの産生などに異常をきたすことが予想される。さらに、これらのマウスから、唾液腺をはじめとする内胚葉系組織からすでに確立した方法を用いて内胚葉系幹細胞を分離する (Hisatomi and Nakamura et al. Hepatology 2004, Matsumoto and Nakamura et al. Clon Stem Cells 2006)。そして幹細胞における calreticulin 調節遺伝子群の発現と、分化誘導によって得られる細胞機能を評価する。これらの方法を用いることによって、calreticulin 欠損マウス、過剰発現マウスの内胚葉系幹細胞を分離し、そのカルシウムシグナルの解析をおこなうことが可能となる。膵臓細胞特異的に cre recombinase を発現するマウスと交配し、膵臓細胞特異的な calreticulin 過剰発現マウスを作成する。また、脂肪細胞特異的なプロモーターである aP2 プロモーターの制御下に cre recombinase を発現するマウスとも交配を行い、脂肪細胞特異的な calreticulin 過剰発現マウスを作成する。これらのマウスにおいても表現型を解析する。心筋細胞特異的に cre recombinase を発現するマウスと交配することにより、心臓特異的な calreticulin 過剰発現マウスを作成している。このマウスは cre-loxP システムを利用することにより繁殖系としての維持が可能となり、解析に十分な個体数や心筋細胞を集めることが可能となる。次に、この組織特異的 calreticulin 過剰発現トランスジェニックマウスの脂肪細胞、膵臓ラ氏島、血管内皮細胞、心筋細胞を分離する。脂肪細胞の分離にはコラゲナーゼ/KRB バッファーによる細胞分散を用いた初代培養法、ラ氏島の分離にはコラゲナーゼによるラ氏島回収法、血管内皮細胞の分離には PSP 培養

法などを用いる。これらの過剰発現細胞では、カルシウムシグナルの異常による糖、脂質代謝異常、細胞膜レセプターやチャンネルの異常による代謝制御の異常などが出現することが考えられる。これらの異常を、アディポサイトカイン、血糖、血中インスリンや脂質の変化、細胞膜レセプターの発現量や糖鎖による修飾異常の有無、細胞内カルシウム濃度の変化などを解析することにより評価する。

4. 研究成果

1: トランスジェニックマウスの表現型

loxP-CRT トランスジェニックマウスと、Nkx2.5-cre トランスジェニックマウスとを交配した結果、生まれてくるマウスの数は野生型マウスの交配で生まれる数と明らかな差はなかった。loxP-CRT トランスジーンに HA tag を挿入しているため、HA tag を検出することにより、トランスジーン由来の calreticulin が発現していることが確認できる。そこで、Nkx2.5-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、Nkx2.5-CRT トランスジェニックマウスの心臓特異的にトランスジーン由来の calreticulin が発現していることを確認した。

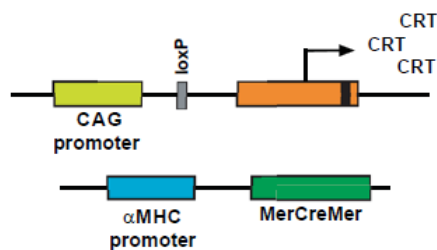
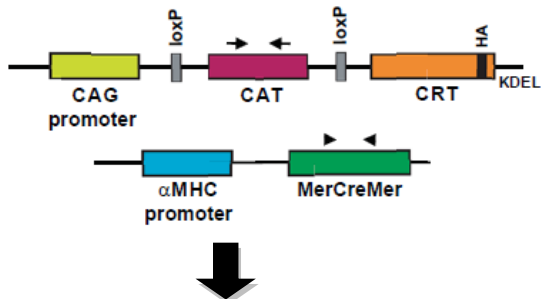


図1 時間、空間的 calreticulin 過剰発現マウスの作成 タモキシフェン投与により任意の時期に calreticulin の過剰発現を誘導することが可能である

脳、胸腺、肺、肝臓、胃、膵臓、腸管、腎臓にトランスジーン由来の calreticulin は発現していなかった。脾臓にはトランスジーン由来の calreticulin がわずかに発現していた (data not shown)。また、Nkx2.5-CRT トランスジェニックマウスと野生型マウス、それぞれの心室からタンパクを抽出し、抗 calreticulin 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。Densitometry を用いた発現量の解析の結果、Nkx2.5-CRT トランスジェニックマウスの心室では野生型マウスの心室と比較して、calreticulin が約 44 倍過剰発現していた。Nkx2.5-CRT トランスジェニックマウスの胎生 15 日目と生後 1 週目における全身および心臓の形態を観察したが明らかな異常は認めず、生後 6 週目までは野生型マウスと同様な体重増加を示した (生後 6 週目の Nkx2.5-CRT トランスジェニックマウス雄の体重 18.4 ± 1.5 g ; 平均 \pm 標準偏差 (n=11)、野生型マウス雄の体重 19.76 ± 1.7 g ; 平均 \pm 標準偏差 (n=9)、生後 6 週目の Nkx2.5-CRT トランスジェニックマウス雌の体重 17.2 ± 2.6 g ; 平均 \pm 標準偏差 (n=9)、野生型マウス雌の体重 17.2 ± 1.3 g ; 平均 \pm 標準偏差 (n=12))。しかし、Nkx2.5-CRT トランスジェニックマウスは生後 6~10 週で突然死することが分かった。突然死した Nkx2.5-CRT トランスジェニックマウスの中には、生後 7 週目頃に著明な

浮腫を呈するマウスが存在した。

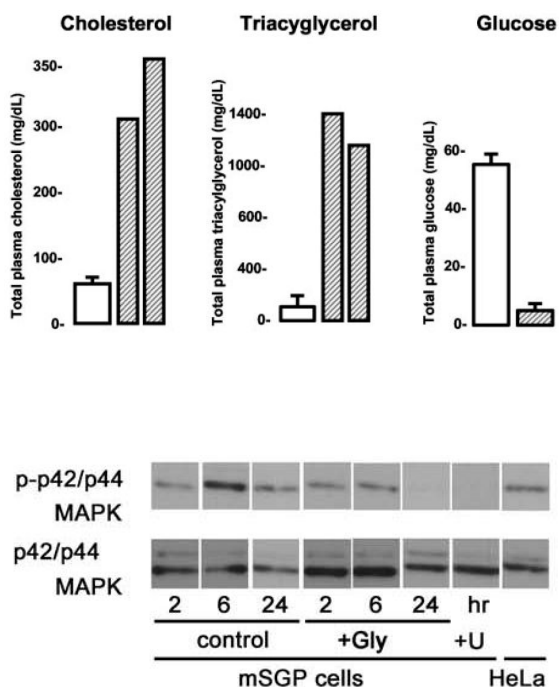


図2 Calreticulin 欠損マウスにおける糖・脂質代謝異常：Calreticulin 欠損マウス(斜線)では高脂血症と低血糖を認めた。内胚葉系幹細胞のリン酸化シグナルにより細胞増殖が制御される。

2：各組織の形態、組織像

Nkx2.5-CRT トランスジェニックマウスと野生型マウスの間で心臓の重量の差はなかった(生後3週目における Nkx2.5-CRT トランスジェニックマウスの心臓の重量 $38.3\text{mg} \pm 1.9\text{mg}$; 平均 \pm 標準偏差 (n=3)、野生型マウスの心臓の重量 $40.6\text{mg} \pm 1.1\text{mg}$; 平均 \pm 標準偏差 (n=3)、生後7週目における Nkx2.5-CRT トランスジェニックマウスの心臓の重量 $60.6\text{mg} \pm 5.8\text{mg}$; 平均 \pm 標準偏差 (n=3)、野生型マウス $66.9\text{mg} \pm 1.7\text{mg}$; 平均 \pm 標準偏差 (n=3))。生後7週目の Nkx2.5-CRT トランスジェニックマウス、野生型マウスの心室、心房の切片を用いて、ヘマトキシリン&エオジン染色を行った。Nkx2.5-CRT トランスジェニックマウスの心筋細胞の形態を見ると、細胞の空胞化やひ薄化は認められず、野生型マウス

スと比べて心筋細胞の形態に変化は見られなかった。Nkx2.5-CRT トランスジェニックマウスの心室、心房の切片を用いてPAS染色を行ったところ、野生型マウスと比べて心筋細胞の形態およびPAS陽性細胞に変化はなかった。また、生後7週目の Nkx2.5-CRT トランスジェニックマウスにおける肺、肝臓、脾臓、腎臓の組織を用いてヘマトキシリン・エオジン染色を行った。野生型マウスと比較して、Nkx2.5-CRT トランスジェニックマウスの肺、脾臓、腎臓、肝臓の間質にうっ血が見られたが、各臓器の形態に変化はなく、組織の壊死や変性は見られなかった。特に肺の組織像を見ると、間質の毛細血管の拡張を伴ううっ血が見られた。肺胞浮腫は見られなかった。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。

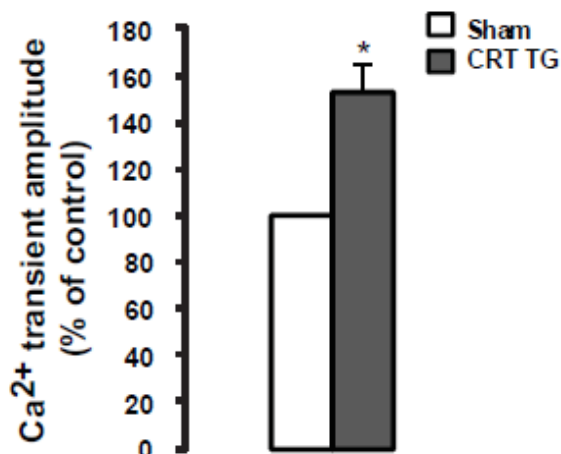


図3 時間的空間的 calreticulin 過剰発現マウスの細胞においてカルシウムシグナルは著明に増加している。

3：アポトーシス解析

生後5週目、7週目の Nkx2.5-CRT トランスジェニックマウス、野生型マウスのそれぞれの心室、心房のパラフィン切片を用いて、

TUNNEL 染色(ApopTag^RPlus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit)を行った。Nkx2.5-CRT トランスジェニックマウスの心室、心房を観察すると TUNNEL 染色陽性の細胞数は、野生型マウスの TUNNEL 染色陽性の細胞数と差はなかった

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7件)

Nakamura K, Sekijima Y, Nakamura K, Hattori K, Nagamatsu K, Shimizu Y, Yazaki M, Sakurai A, Endo F, Fukushima Y, Ikeda S p.E66Q Mutation in the GLA Gene is Associated with a High Risk of Cerebral Small-Vessel Occlusion in Elderly Japanese Males. Eur J Neurol 21, 49-56. (2014) DOI 10.1111/ene.12214 査読有

Kido J, Nakamura K, Matsumoto S, Mitsubuchi H, Ohura T, Shigematsu Y, Yorifuji T, Kasahara M, Horikawa R and Endo F Current status of hepatic glycogen storage disease in Japan: clinical manifestations, treatments and long-term outcomes. J. Hum. Genet. 58, 285-292 (2013) doi: 10.1038/jhg.2013.17 査読有

Lee D, Oka T, Hunter B, Robinson A, Papp S, Nakamura K, Srisakuldee W, Nickel BE, Light PE, Dyck JRB, Lopaschuk GD, Kardami E, Opas M, and Michalak M Calreticulin induces dilated cardiomyopathy. Plos One 8, e56387 (2013) 査読有

Yamamoto A, Nakamura K, Matsumoto S, Iwai M, Shigematsu Y, Tajima G, Tsumura M, Okada S, Mitsubuchi H, Endo F. VLCAD deficiency in a patient who recovered from VF, but died suddenly of an RSV infection. Pediatr Int. 55, 775-778 (2013) 査読有

Inoue T, Hattori K, Ihara K, Ishii A, Nakamura K, Hirose S Newborn screening

for Fabry disease in Japan: Prevalence and genotypes of Fabry disease in a pilot study. J. Hum. Genet. 58, 548-552 (2013) doi: 10.1038/jhg.2013.48. 査読有

Tanaka T, Mochida T, Maki Y, Shiraki Y, Mori H, Matsumoto S, Shimbo K, Ando T, Nakamura K, Endo F, Okamoto M. Interactive network analysis of the plasma amino acids profile in a mouse model of hyperglycemia. Springerplus. 2, 287 (2013) 査読有

Fujisawa D, Nakamura K, Mitsubuchi H, Ohura T, Shigematsu Y, Yorifuji T, Kasahara M, Horikawa R and Endo F Clinical features and management of organic acidemias in Japan. J. Hum. Genet. 58, 769-774 (2013) doi: 10.1038/jhg.2013.97 査読有

[学会発表](計3件)

Screening for Fabry Disease in Japan Kimitoshi Nakamura, MD, Kumamoto University Hospital, Japan 2013 Joint Meeting of the Newborn Screening and Genetic Testing Symposium and the International Society for Neonatal Screening. May 5-10, 2013 Atlanta Marriott Marquis, Atlanta, GA, USA

Urea Cycle Amino Acids, Properties and Clinical Application. Role of Citrulline and Urea Cycle Disorders. Kimitoshi Nakamura, The 8th Asia Pacific Conference on Clinical Nutrition, June 10, 2013 The Tokyo Bay Maihama Hotel Club, Tokyo, Japan

Urea Cycle Disorders in Japan. Kimitoshi Nakamura, SHARE Meeting 2013, June 27, 2013 Mövenpick Hotel Amsterdam City Centre, Amsterdam, Netherlands

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