

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 31 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592021

研究課題名(和文)ダイレクトRNAシーケンスとメカノセンサーを用いた糖代謝関連転写因子の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of glucose related transcriptional factors using direct RNA sequence and mechanosensor

研究代表者

土谷 まり子 (TSUCHIYA, MARIKO)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00266826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：mafB siRNA で発現を抑制(in vivo)して、そのprofileをマイクロアレイで検討した結果と、c-maf siRNA による結果の比較では、膵においてはNupr1, Ddit の上昇と、Hsp8の減少は共通であった。mafB siRNA transfected cell について、3次元培養では極性の形成の亢進がみられ、scratch assayによるストレス下での増殖速度は低下がみられた。LC-3,P62抗体染色でautophagyは活性化がみられ、TSODマウスの膵ラ氏島ではしだいにDNAJC3の染色で発現上昇が認められ、ラ氏島内のmafB陽性細胞の発現上昇を伴った。

研究成果の概要(英文)：Gene profiling performed after in vivo modulation of mafB expression levels revealed up regulation of Nupr1 and Ddit3 and downregulation of Hsp8 in mafB siRNA-treated pancreas. Transfection of mafB siRNA to pancreatic cells (AsPC-1, BxPC3) prominently accelerated autophagy, as assessed by LC3 expression using immunostaining, regardless of small changes in cell cycling (BrdU uptake), cell senescence (beta Gal staining), and apoptosis (Tunnel assay). Regarding cell function, although no difference was observed during the steady state, cell proliferation under the stress condition, as assessed by cell scratch assay, was markedly diminished in mafB-suppressed cells. Addition of quercetin restored cell migration and proliferation. In addition, the restoration of autophagy was accompanied by suppression of Nupr1 and ATF6 by quercetin treatment in mafB siRNA-treated cells. Large mafB modulates biological cell activity such as autophagy or response to ER stress under disrupted glucose metabolism.

研究分野：医歯薬学

キーワード：mafA mafB siRNA c-maf

1. 研究開始当初の背景

膵臓 (adult) では mafA mRNA が低下すると、Insulin mRNA は低下し、脳では mafA mRNA が低下すると、GH や体液電解質、摂食、睡眠リズムに関連する遺伝子の発現が変わる (Int. J. Biomed. Sci. 2011)。糖代謝関連転写子 mafA, mafB は糖代謝の状態によって、それに関連する遺伝子の発現制御を行っており、転写制御を介して、糖代謝にかかわる動的平衡を構築していくと考えられる。

研究の端緒は、膵 (fetus) の a 細胞、b 細胞の分化に関わる転写因子としての large maf の検討から始まった。このような発生時の転写因子の発現が成体で誘導しうるのか、その機能などについて検討をすすめた。Adult rat では膵切除後の再生時に PDX-1 陽性細胞の出現 (膵前駆細胞) が認められるが、虚血再灌流膵 (adult rat) についても PDX-1, mafA, mafB, c-maf の mRNA の著明な上昇がみられる。このような生体のストレス応答性は、遺伝子のプロファイルの変化を伴う。ストレスに応じて特異的な転写因子が活性化され、細胞はトランスクリプトームの改変を介してストレスに対応する。ストレスに対して恒常性を維持するための応答性は多くの生活習慣病の発症と関わる。このような応答性 (遺伝子プロファイルの変化) をコントロールして疾患の治療につなげることができないか、また、成体の large maf の発現の誘導と、発生時の発現は同一ではないが、組織再生に結びつくようなプログラムに結び付けることができないかなどの検討を試みた。

2. 研究の目的

転写因子 maf mRNA の変化という情報が何を伝え、どのような機能変化に至るかの情報を得ることで疾患のコントロールへとつなげること

発生、分化における役割と、adult における機能維持の役割と比較しながら、より効果的な代謝プロファイルのリプログラミングの

検討

技術的には、細胞一つ一つの変化が追隨できるようなマーカーと、それを経時的に可視化できる方法が必要とされ、より精度の高い方法の検討。

3. 研究の方法

In vivo siRNA, in vitro の siRNA で、生体の変動の幅での mRNA の調節変化を検討

1) In vitro

mafB siRNA transfected cells (AsPC-1, BxPC-3 cell line)

mafA siRNA transfected 3T3-L1 cells を使用。

a) 発現

主に抗体による免疫染色で検討

b) Cell activity

3D-culture, Tunnel assay, BrdU uptake, beta-Gal 染色、migration assay, scratch assay などを行って cell polarity, cell differentiation, cell growth, apoptosis 等について検討した。LC-3, P62, DNAJC3 抗体などによる染色を行って、autophagy, ER-response について検討した。

2) In vivo モデル

糖尿病 (高血糖、インスリン抵抗性、脂肪肝) NASH のモデルマウスである

TSOD mouse (control:TSNO mouse),

mafB siRNA injected mouse

(hydrodynamic methods),

c-maf siRNA injected mouse

(hydrodynamic methods) などを使用

4. 研究成果

a) 発現

免疫染色

mafB siRNA transfected cells は、コントロールに比べて

Alpha-, beta-catenin は細胞辺縁での発現が増加し、F-actin は細胞質フィラメントを認め、GSK-3beta も分布変化をみている。

- b) cell activity
 mafB siRNA transfected cells を 3 次元で培養すると、コントロールに比べて、Na-K ATPase (basal marker), PKCzeta (apical marker) の増強がみられ、細胞極性の形成に関わる変化がみられた。Scratch assay では mafB siRNA transfected cells の増殖速度は低下するが、通常の条件下の増殖速度はコントロールと変わらない。BrdU とりこみではわずかに陽性細胞が増えるが、tunnel 染色による陽性細胞はコントロールと比べて大きな変化がない。Beta-Gal 染色も変化がない。
- c) Quercetin
 通常の growth curve では変化は見られないが、scratch assay による mafB siRNA transfected cell の増殖速度の低下は、Quercetin 付加で回復がみられた。
- d) autophagy
 mafB siRNA injected mouse
 mafB siRNA (in vivo) で発現抑制した pancreas をマイクロアレイで検討した結果と c-maf siRNA による結果を比較すると、共通の遺伝子がみられ、Nupr1, Ddit3 の上昇と、HSP8 の減少であり、autophagy 関連遺伝子である。膵 a 細胞特異的転写因子とされる mafB の膵における作用を autophagy 活性との関連で検討した。
 mafB siRNA transfected cell (AsPC-1, BxPC3 cell) について LC-3, P62 抗体で autophagy の活性を見ると細胞質の顆粒状染色が増加して活性化がみられた。
 高血糖、脂肪肝を呈した TSOD マウスの膵のラ氏島ではしだいに DNAJC3 の染色では発現上昇が認められ、ラ氏島内の mafB 陽性細胞 の発現上昇を伴った。
 mafB (large maf) が Autophagy や ER-stress に対する反応性の調節に関

与している可能性があり、疾患の病態の形成にかかわると考えられた。

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 1 件)

Mariko Tsuchiya, Ryoich Misaka, Kosaku Nitta and Ken Tsuchiya Transcriptional factor, Mafs and their biological roles. World Journal of Diabetes 査読有, vol6(1): 175-183, 2015 DOI 10.4239/wjd.v6.il.175

[学会発表](計 4 件)

Mariko Tsuchiya, Ryoichi Misaka, Kosaku Nitta and Ken Tsuchiya Large mafs modulate autophagic activity and ER-stress in diabetic pancreas. 75th scientific session of American Diabetes Association 5-9/06/2015 Boston, MA

Mariko Tsuchiya, Ryoichi Misaka, Kosaku Nitta and Ken Tsuchiya Klotho coordinates with transcriptional factors mafs in the differentiation and establishment of cell integrity of pancreatic/adipose cells. 73rd scientific session of American Diabetes Association 21-25/06/2013 Chicago, IL

Mariko Tsuchiya, Ryoichi Misaka, Kosaku Nitta and Ken Tsuchiya The WNT signal pathway plays pivotal roles in the differentiation of pancreatic cells in coordination with maf transcriptional factors. 72nd scientific session of American Diabetes Association 6-12/06/2012 Philadelphia, PA

Mariko Tsuchiya, Ryoichi Misaka, Kosaku Nitta and Ken Tsuchiya Transcription factor mafB and functional link to E-cadherin expression in b cell differentiation. 71st scientific session of American Diabetes Association 24-28/06/2011 San Diego, CA

[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：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土谷 まり子 (TSUCHIYA MARIKO)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00266826

(2) 研究分担者

研究者番号：

(3) 連携研究者

土谷 健 (TSUCHIYA KEN)

東京女子医科大学・医学部・臨床教授

研究者番号：00246472