

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460366

研究課題名(和文) 新生児一過性糖尿病原因候補遺伝子の機能解析 - エピジェネティック制御との関連

研究課題名(英文) Functional analyses of Zac1: a candidate gene for chromosome 6q24-related transient neonatal diabetes mellitus

研究代表者

上田 裕紀 (UEDA, Hironori)

大阪大学・医学系研究科・特任准教授

研究者番号：90543463

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)：ZAC1(PLAGL1)は、6q24新生児一過性糖尿病のインプリント異常領域に存在し、CD4陽性制御性Tリンパ球の機能形成する転写因子である。しかしながら、その機能に関しては必ずしも明らかでない。本研究では、Cre/loxPシステムを用いてZac1欠損脾細胞株(MIN6)とCD4陽性Tリンパ球を作製した。両細胞機能にZac1欠損による大きな差は認められなかった。MIN6において、Zac1はEgr1, Shh, cFos, Sst等の遺伝子やノンコーディングRNAの発現量を変化させた。成熟両細胞種においてZac1の代償機構が存在すると考えられ、分化・発生における機能解析が必要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Chromosome 6q24-related transient neonatal diabetes mellitus (6q24-TNDM) is defined as TNDM caused by genetic aberrations of the imprinted locus at 6q24. ZAC1 (also known as PLAGL1) is the gene which is located within the critical minimal 6q24-TNDM region. Zac1 has also been reported as a transcriptional factor to determine the characteristic CD4 (+) regulatory T cells signature. However, the function of Zac1 is still elusive. We generated Zac1 deficient pancreatic -cell lines (MIN6) and CD4 (+) T cells by using the Cre/loxP-induced conditional knockout system. The changes of cell functions were not largely different in both wild-type and Zac1-deficient MIN6 and CD4 (+) T cells. In MIN6 cells, Zac1 alters the expression of several genes and non-coding RNAs, including Egr1, Shh, cFos, and Sst. These data suggested that the redundancy of the Zac1 function existed in both mature cell types. Further studies to elucidate the Zac1 function in the development of these cells will be required.

研究分野：糖尿病の成因

キーワード：新生児一過性糖尿病 Zac1 Plagl1 MIN6 CD4+ T cells TNDM conditional knockout 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

(1) 難治性疾患克服研究事業の研究奨励疾患でもある新生児一過性糖尿病は[1]、生直後1ヶ月間の高血糖(インスリン依存性)を示し、半数は、3ヶ月で自然治癒するが、半数は糖尿病となる疾患である。また、ほとんど全例が成人で、2型糖尿病を発症する。根本的な治療法はないため長期介護が必要となる症例がほとんどである。新生児一過性糖尿病の中で、最も多い染色体6q24に関連する新生児一過性糖尿病は(Chromosome 6q24-related transient neonatal diabetes mellitus (6q24-TNDM) or TNDM1)、染色体6q24領域の父性ダイソミー、父性重複、インプリント調節領域(6q24)のメチル化異常などの先天的なゲノム異常が原因とされている。これまでの研究で、6q24-TNDMの最小重要原因領域内に唯一存在する蛋白質をコードする遺伝子として、転写因子ZAC1 (Zinc finger protein which regulates Apoptosis and Cell cycle arrest1) (=Pleiomorphic adenoma gene-like 1(PLAGL1))が同定されている[2]。ZAC1遺伝子は父親からの遺伝子のみが発現しているインプリント遺伝子であり、この発現制御はZAC1遺伝子の近傍に存在するインプリンティング制御領域のDNAのメチル化によって制御されていることが知られている[3]。また、ブドウ糖刺激に対してインスリン分泌能が保たれている膵細胞株(MIN6)においては、保たれていない細胞株に比べてZac1遺伝子の発現量が多いことが見出されていた[4]。さらに、インプリンティング制御領域のメチル化DNAを解析したところ、ブドウ糖刺激に対してインスリン分泌能が保たれているMIN6細胞株では、片側のアリルしかメチル化されていないのに対し、ブドウ糖刺激に対してインスリン分泌能が低下しているMIN6細胞株においては両方のアリルがメチル化されていることを見出していた[4]。しかしながら、ZAC1遺伝子領域のゲノム異常と新生児一過性糖尿病の多彩な症状の機能的関連は未解明であった。

(2) Zac1は、免疫応答の恒常性維持で重要な役割を果たす制御性Tリンパ球の分子マーカーとして同定されていた[5]。また、Zac1は、CD4陽性Tリンパ球において免疫応答を抑制的に制御するTransforming growth factor- β の存在下で遺伝子発現量が増加し、Zac1を強制発現させるとI12遺伝子の発現が低下することを見出していたが[6]、生体内Tリンパ球における役割は不明であった。

2. 研究の目的

(1) Cre-loxPシステムを用いて生体内膵細胞および膵細胞株において本遺伝子の特異的に欠損させ、膵細胞の分化・機能維持における本遺伝子の役割を解析することを目的とする。

(2) Cre-loxPシステムを用いて生体内CD4陽性Tリンパ球において本遺伝子の特異的に欠

損させ、CD4陽性Tリンパ球の分化・機能維持における本遺伝子の役割を解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)我々が作製したB6-Zac1 flox/floxマウスとRat insulin promoter(RIP)-CreER Tgマウスとを交配し、生体膵細胞特異的Zac1遺伝子欠損マウスを作製した。RIP-CreER Tgマウスは、タモキシフェンによりCreが活性化されることから、生後8週齢でタモキシフェンを投与し、タモキシフェン投与後に投与マウスとタモキシフェン非投与マウスに体重測定やブドウ糖負荷試験による耐糖能やインスリン分泌能の解析など形質の解析を施行した。また、Human insulin promoterの制御化でSV40 T抗原を発現する、IT-6 Tgマウスと交配しZac1-flox/flox膵細胞株を樹立した。そして、アデノウイルスベクターを用いてCreを導入し、Zac1欠損膵細胞株を樹立した。Zac1欠損膵細胞株と非欠損株に対しグルコース濃度依存性(3 mM, 9 mM, 25 mM)インスリン分泌能、グルコース以外の分刺激物質であるKClやExendin4に対する分泌能、インスリン含有量の測定を施行した。また、Cleaved caspase 3アッセイによるアポトーシスの解析、MTT細胞増殖アッセイにより細胞増殖能を解析した。また、DNAマイクロアレイ(アフィメトリクス)で網羅的な遺伝子発現量の解析を施行し、real-time PCRで発現量の差を確認した。

(2) B6-Zac1 flox/floxマウスとCD4-Cre Tgマウスとを交配し、CD4-Cre-Zac1 flox/floxマウスを樹立した。CD4-Zac1-KOマウスとCD4-Zac1-floxマウスに対して、体重測定やブドウ糖負荷試験による耐糖能やインスリン分泌能の解析など形質の解析を施行した。また、1型糖尿病を誘発することで知られている通常より少量のストレプトゾトシン(SZ)少量頻回投与で自己免疫性1型糖尿病の発症誘導を施行した。また、CD4陽性Tリンパ球をマウスより分離・抽出し細胞分画をフローサイトメータで解析した。CD4陽性Tリンパ球の増殖能・生存率をCD3/CD28ビーズとインターロイキン2で刺激し10日間培養後、細胞の生存率をCountess™ II Automated Cell Counter[6]を用いて計測した。

4. 研究成果

(1) 雄性B6-Zac1 flox/floxマウスと雌性Rat insulin promoter(RIP)-CreER Tgマウスと交配し、RIP-CreER-Zac1 flox/wtマウスを作製した。Zac1は、父親由来のアリルしか発現しないインプリンティング遺伝子であり、また、RIP-CreER Tgマウスは、タモキシフェンによりCreが活性化されることから、タモキシフェン投与後の本マウスにおいて生体内膵細胞で特異的にZAC1が欠損していると考えられる。本マウスとタモキシフェン非投与マウスにブドウ糖負荷試験を施行したと

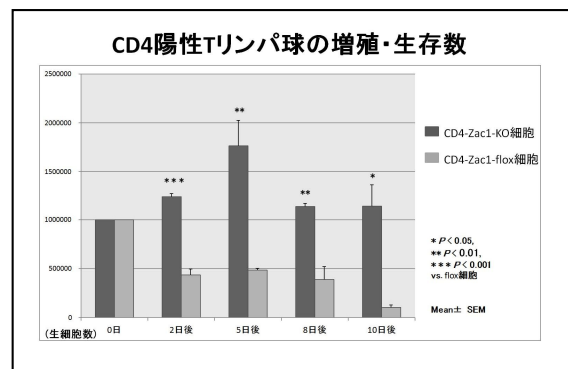
ころ、耐糖能やインスリン分泌能に有意な差は認められなかった。また、体重や成長などにも有意な差は認められなかった。さらに、Zac1 をホモで欠損する RIP-CreER-Zac1 flox/flox を作製した。ヘテロマウスと同様に、タモキシフェン投与・非投与マウスにおいて耐糖能関連形質を解析したが、1年3ヶ月齢の高齢マウスにおいても有意な差は認められなかった。

一方で、B6-Zac1 flox/flox マウスを IT6 Tg マウスと交配することにより、Zac1(flox/flox)-IT6 マウスを得た。このマウスでは、Zac1 の両アレルが flox となり、かつインスリノーマを発症する。Zac1(flox/flox)-IT6 マウス(雄雌2匹)に発生したインスリノーマから膵細胞株(MIN6-Zac1-flox/flox)を計21株樹立した。このうち良好なグルコース刺激に対するインスリン分泌能を示した2株にCre発現アデノウイルスベクターを感染させ、Zac1欠損細胞株(MIN6-Zac1-KO)を得た。定量的RT-PCRとウエスタンブロット法により、Zac1発現およびZac1タンパクがほぼ失われていることを確認した。

樹立した膵細胞株であるMIN6-Zac1-flox細胞株とZAC1を欠損したMIN6-Zac1-KO細胞株との間で、グルコース応答性インスリン分泌やインスリン含量に差はなかった。また、グルコース以外のインスリン分泌刺激物質であるKClやExendin4刺激に対しても分泌能に差が認められなかった。また、Cleaved caspase 3アッセイによるアポトーシスや、MTT細胞増殖アッセイによる細胞増殖能にも差が認められなかった。次に、MIN6-Zac1-flox細胞株とZAC1を欠損したMIN6-Zac1-KO細胞株との間でDNAマイクロアレイ(アフィメトリクス)を行ったところ、MIN6-Zac1-KO細胞株において発現が2倍以上上昇している遺伝子が40個、発現が2倍以上低下している遺伝子が12個得られた。また、MIN6-Zac1-KO細胞株において発現が2倍以上上昇しているノンコーディングRNAが28個、発現が2倍以上低下しているノンコーディングRNAが47個えられた。DNAマイクロアレイで発現量に差が認められた遺伝子の発現量をReal-time PCRで確認したところ、Egr1, Shh, cFos, Sst 遺伝子の発現量に差があることが確認できた。同一コロニーに由来する細胞株の比較解析であることから、これらの遺伝子の発現は、ZAC1により直接制御を受けていると考えられる。

(2) B6-Zac1 flox/flox マウスとCD4-Cre Tg マウスとを交配し、CD4-Cre-Zac1 flox/flox マウスを樹立した。CD4-Zac1-KO マウスとCD4-Zac1-flox マウスに対して、体重測定やブドウ糖負荷試験による耐糖能やインスリン分泌能の解析など形質の解析を施行し、比較検討した。1年以上の高週齢まで観察や解析を施行したが、有意な形質の差は認められ

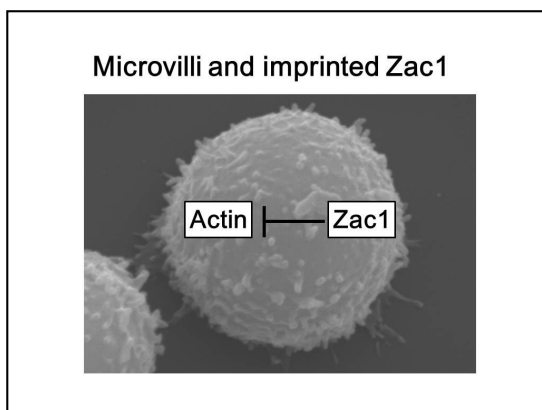
なかった。また、慢性関節リュウマチや円形脱毛症などの自己免疫疾患様の症状も認められなかった。通常より少量のSZ少量頻回投与で自己免疫性1型糖尿病の発症誘導を行い、高週齢までブドウ糖負荷試験を経時的に施行して解析したが、糖尿病の発症率に有意な差は認められなかった。フローサイトメータを用いてCD4陽性Tリンパ球分画分画をCD4-Zac1-flox細胞とCD4-Zac1-KO細胞で解析し比較検討したが、制御性Tリンパ球の代表的なFoxp3分画やCD25分画などに差が認められなかった。従って、CD4陽性Tリンパ球に分化後にZac1を欠損させても、その後の分化には大きな影響を与えないと考えられ、代償機構の存在が考えられる。しかしながら、膵細胞の場合とは異なり両CD4陽性Tリンパ球をCD3/CD28ビーズとインターロイキン2存在下で培養し、培養後2日、5日、8日、10日後に細胞の生存率をCountess™ II Automated Cell Counter[6]を用いて計測したところ、Tリンパ球の増殖能・生存率には差が認められ、CD4-Zac1-KO細胞は、CD3/CD28ビーズとインターロイキン2の増殖刺激に対して反応しやすい状態になっていると考えられる(下図)。従って、Zac1の細胞機能への影響には細胞間格差が存在している可能性が考えられる。



以上のことから、Zac1は、成熟膵細胞や成熟CD4陽性Tリンパ球においてKOされても、膵細胞の機能やCD4陽性Tリンパ球の機能に大きく影響しないことが示唆された。従って、成熟細胞や成熟CD4陽性Tリンパ球には、Zac1遺伝子の機能を代償する機構が存在していると考えられる。今後、膵細胞やCD4陽性Tリンパ球への分化・発生にZac1がどのような役割を果たしているかの解析が必要と考えられる。

一方で、CD4陽性Tリンパ球の培養細胞株であるEL4細胞株とZac1を強制発現させたEL4細胞株との間でDNAマイクロアレイ(アフィメトリクス)を施行し、KEGGパスウェイ解析を施行したところ、Zac1は、細胞骨格の一つであるアクチンシステムの制御に関与している遺伝子群の発現量を変化させることを見出した。従って、Zac1は、アクチンシステム制御に関与している可能性がある。アクチンシステムは、microvilli等の運動を制御

し、Tリンパ球の細胞間コミュニケーションの重要な役割を担っていることが、近年報告されている[7-9]。下図に、研究代表者が撮影したCD4陽性Tリンパ球の走査電顕像を用いて、Microvilliとインプリンティング遺伝子Zac1との関係のPerspectiveを示す。



そこで、本件研究では、MIN6を単層培養して解析したが、機能的な差を見出す為に、単層培養よりインスリン分泌に細胞間コミュニケーション重要になってくる偽膵島[10]を生成させてMIN6-Zac1-flox細胞株とMIN6-Zac1-KO細胞株の機能解析を試みてみたい。さらに、細胞の発生・分化におけるインプリンティング遺伝子Zac1の、ゲノム状態と機能の関係や、細胞間コミュニケーションと細胞骨格への影響を解明していきたい。

<引用文献>

- Nagashima K et al (2017) Epidemiology, clinical characteristics, and genetic etiology of neonatal diabetes in Japan. *Pediatr Int.* 59:129-133. pmid: 27809389
- Docherty LE et al (2010) Further refinement of the critical minimal genetic region for the imprinting disorder 6q24 transient neonatal diabetes. *Diabetologia* 53: 2347-2351. pmid: 20668833
- Arima T et al. (2001) A conserved imprinting control region at the HYMAI/ZAC domain is implicated in transient neonatal diabetes mellitus. *Hum Mol Genet.* 10: 1475-1483. pmid: 11448939
- Yamato E et al. (2013) Microarray analysis of novel candidate genes responsible for glucose-stimulated insulin secretion in mouse pancreatic cell line MIN6. *PLoS One.* 8:e61211. pmid: 23560115
- Fu W et al. (2012) A multiply redundant genetic switch 'locks in' the transcriptional signature of regulatory T cells. *Nat Immunol.* 13:972-80. pmid: 22961053

Hisanaga-Oishi Y, Nishiwaki-Ueda Y, Nojima K, Ueda H. (2014) Analysis of the expression of candidate genes for type 1 diabetes susceptibility in T cells. *Endocr J.* 61:577-88. pmid: 24705559

Ueda H et al (2015) Distinct Roles of Cytoskeletal Components in Immunological Synapse Formation and Directed Secretion. *J Immunol.* 195(9):4117-25. pmid: 26392461

Basu R et al (2016) Cytotoxic T Cells Use Mechanical Force to Potentiate Target Cell Killing. *Cell* 165:100-10. pmid: 26924577

Cai E et al (2017) Visualizing dynamic microvillar search and stabilization during ligand detection by T cells. *Science* 356, eaal3118. pmid: 28495700

Iwasaki M et al. (2010) Establishment of new clonal pancreatic β -cell lines (MIN6-K) useful for study of incretin/cyclic adenosine monophosphate signaling. *J Diabetes Investig.* 1:137-42. pmid: 24843422

5. 主な発表論文等

[学会発表](計3件)

上田裕紀、宮崎純一：転写因子Zac1のTリンパ球内制御ネットワークの解析、1型糖尿病研究会、2014年11月2日、イーグレひめじ あいめっせホール(兵庫県・姫路市)

宮崎早月、上田裕紀、田代文、宮崎純一：Zac1遺伝子ノックアウトMIN6ベータ細胞株の樹立とその解析、日本糖尿病学会年次学術集会、2015年5月21日、海峡メッセ下関(山口県・下関市)

上田裕紀、宮崎早月、田代文、宮崎純一：新生児糖尿病原因候補遺伝子ノックアウトMIN6膵細胞株の樹立、日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、2017年2月10日、はまぎんホール ヴィアマール(神奈川県・横浜市)

[その他]ホームページ等：
https://www.researchgate.net/profile/Hironori_Ueda

6. 研究組織

(1)研究代表者

上田 裕紀 (UEDA, Hironori)
大阪大学・医学系研究科・特任准教授
研究者番号：90543463

(2)研究分担者

宮崎 早月 (MIYAZAKI, Satsuki)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：60452439