

研究題目 VIKING 法を用いた膵β細胞における ChREBP と炎症シグナルの クロストークメカニズムの解明

研究組織

研究代表者：横山 敦（東北大学大学院医学系研究科）

共同研究者：福本 誠二（徳島大学先端酵素学研究所）

【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

膵β細胞においては、高血糖により活性化した ChREBP がβ細胞機能に関与する遺伝子に加えて細胞増殖関連遺伝子の発現を調節し、*in vitro* および *in vivo* においてβ細胞のグルコース依存的な増殖を引き起こすことが報告されている。しかしながら、インスリン抵抗性による持続的な高血糖状態では何らかの理由によりこのグルコース依存的な細胞増殖機構が破綻し、糖尿病の発症に至ってしまう。したがって、ChREBP は糖尿病の発症・進行に関与すると考えられ、糖尿病の創薬標的となり得る因子として注目されているが、現状その解析は世界的にもあまり進んでいない。

これまでに、代表者は膵β細胞における ChREBP と炎症シグナルとのクロストークを見出している。具体的には、炎症性サイトカイン IL-1β で活性化した転写因子 NFκB が ChREBP と核内で相互作用し ChREBP の転写活性を抑制し、結果としてグルコース依存的な細胞増殖を抑制する。さらに、前年度の本共同研究では、ラットβ細胞由来の INS1 832/13 細胞を用いて VIKING 法によるゲノム編集を行い、p65 遺伝子を欠損した INS1 細胞を樹立した。さらにこの p65 ノックアウト INS1 細胞に、DNA 結合ドメインを欠いた p65 変異体、もしくはコントロールとして野生型 p65 を安定発現した細胞株を樹立しレスキュー実験を行うことで、p65 による ChREBP の転写抑制が DNA 結合を介さないトランスリプレッションのメカニズムであることを明らかにしている。

本年度は、p65 により転写抑制される ChREBP 標

的遺伝子の中から、VIKING 法による遺伝子破壊技術を用いて、グルコース依存的な細胞増殖における責任遺伝子を同定することを目的としている。本研究成果は、ChREBP と炎症シグナルとのクロストークメカニズムの解明だけでなく、グルコースによる細胞増殖刺激のメカニズム解明にもつながると考えられ、基礎科学および糖尿病に対する創薬の観点からも重要である。

[1-2] 研究の方法・経過

本年度は、p65 により転写抑制される ChREBP 標的遺伝子の中から、VIKING 法による遺伝子破壊技術を用いて、グルコース依存的な細胞増殖における責任遺伝子を同定することを目的としている。RNA-seq により既に候補遺伝子群は得ているため、このリストの中から遺伝子を順次破壊していく。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

VIKING 法により、INS1 832/13 細胞において ChREBP の既知の標的遺伝子である ChREBP β、加えて RNA シーケンス解析にて浮かび上がっていた候補遺伝子である Msd3、Rgs16 について ChREBP 結合サイトである炭水化物応答配列 (ChoRE) を欠損させた細胞株を樹立した。その結果、ChREBP β の ChoRE 結合サイト欠損株については確かに ChREBP β の発現誘導を完全にキャンセルすることができ (図参照)、グルコース依存的な細胞増殖についても有意な抑制を確認することができた。一方、Msd3、Rgs16 については設計通りの染色体部位を欠損させることには成功したものの、それぞれの遺伝子

の誘導を完全にキャンセルすることはできなかった。この原因としては、欠損した ChoRE が ChREBP 結合サイトとして機能していなかった可能性、ほかに未同定 ChoRE が存在する可能性が考えられた。解決方法としては、ChIP-seq などにより ChREBP の染色体上での結合部位を正確に同定し、再度 VIKING 法にて欠損されることが考えられる。

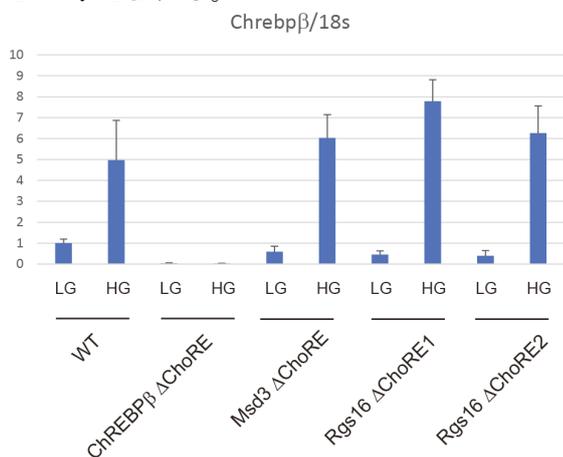


図 グルコース刺激による ChREBP β mRNA 発現量の解析 LG: low glucose (5.5 mM) HG: high glucose (25 mM)

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本年度の実験ではグルコース依存的な β 細胞増殖に関与する責任遺伝子の同定には至らなかったが、本研究課題で用いた実験を継続することで目的遺伝子の同定へと至ることができると考えられる。

上述のように、本研究成果は ChREBP と炎症シグナルとのクロストークメカニズムの解明だけにとどまらず、グルコースによる膵β細胞増殖誘導のメカニズム解明にもつながると考えられ、基礎科学および糖尿病に対する創薬の観点からも波及効果が期待される。

また今回の共同研究から VIKING 法を用いたゲノム編集により任意の遺伝子、もしくは DNA 領域を欠損した細胞株を迅速に樹立する実験系を確立することができた。このことは、本研究の発展のみならず、今後の別の研究プロジェクトにおいても大きな意味をもつと考えられる。すなわち、本共同研究の結果、今後の我々の研究においてゲノム編集を取り入れた実験を組み込むことができ、研究推進の可能性を大きくすることができ非常に意義のある共同研究であった。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表
なし

[3-2] 学会発表
Atsushi Yokoyama
Functional regulation of the glucose-responsive transcription factor ChREBP by inflammatory signals.
公益法人ときわ会 先端医学研究センター 5 周年記念国際シンポジウム、福島県いわき市
2022 年 6 月 5 日

横山 敦
炎症シグナルによるグルコース応答性転写因子 ChREBP の機能制御メカニズムの解明
第 95 回日本内分泌学会学術総会、大分県（オンライン）、2022 年 6 月 2 日

[3-3] 成果資料等

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

今後の展開としては、VIKING 法によるゲノム欠損からグルコース依存的な細胞増殖能の評価を繰り返すことにより、グルコース依存的細胞増殖関連遺伝子を同定したいと考えている。そのためには、ChIP シークエンス解析による ChREBP の結合 DNA 部位の正確な解析が必要になるものと考えられる。