

第 5 回万有医学奨励賞－生活習慣病領域－ 研究成果報告書(追加助成) <概要>

所 属	神戸大学大学院医学研究科 糖尿病・内分泌内科学
氏 名	浅原 俊一郎
研究テーマ	2型糖尿病候補遺伝子 Kcnq1 遺伝子領域による膵β細胞量調節機構の解明

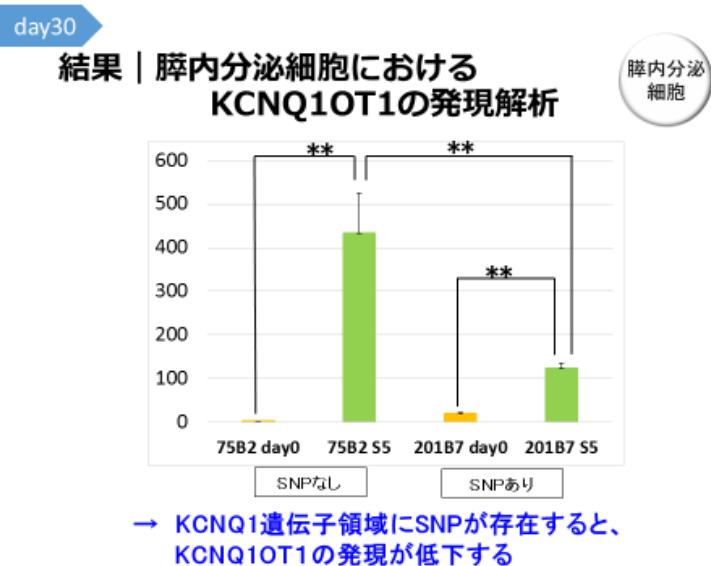
概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを1ページにまとめてください。(図表、写真などの貼付を含む)

[背景・目的] 日本人2型糖尿病患者を対象とした大規模なSNP解析により、KCNQ1遺伝子が2型糖尿病感受性遺伝子として同定されてから10年以上経つが、糖尿病発症のメカニズムについてはまだ十分にわかっていない。我々はKcnq1遺伝子領域内より発現しているnon-coding RNA ‘Kcnq1ot1’発現低下が、エピジェネティクス修飾を介したCdkn1c発現亢進、膵β細胞量減少を引き起こすことを最近報告した(Asahara S et al. PNAS, 2015)。Cdkn1cの発現を調節する転写因子の一つとしてC/EBPβが挙げられるが、我々はC/EBPβが過食や肥満によって膵島に蓄積することを明らかにしている。そこで本研究計画では、Kcnq1ot1発現低下状態で膵β細胞にC/EBPβが蓄積すると、どのような影響が現れるかについて検討を行った。

[方法] Kcnq1ot1発現が減少したKcnq1ot1 truncationマウスとC/EBPβ過剰発現マウスを交配しKcnq1ot1 truncated C/EBPβ過剰発現マウス(KC)を作成した。KCマウスの代謝データ、膵β細胞量の測定を行い、野生型マウス(WT)、Kcnq1ot1 truncationマウス(pA)、C/EBPβ過剰発現マウス(TG)らと比較検討を行った。ヒトiPS細胞として、KCNQ1遺伝子にSNPをもつ201B7細胞株、SNPを持たない75B2細胞株を用いた。

[結果] KCマウスはWT群、pA群ならびにTG群と比較して、有意な随時血糖値の上昇および血清インスリン値の減少が認められ、膵β細胞量においても対照群と比して有意に減少していた。その機序として膵β細胞におけるCdkn1cの発現亢進が考えられたため、膵島におけるCdkn1c発現量を測定したところ、KCマウスの膵島で有意な発現亢進が認められた。これはKcnq1ot1発現が低下していることにより、クロマチン構造の緩みといったエピジェネティクス修飾が変化したことで、C/EBPβがCdkn1cプロモーターに結合しやすくなったためと考えられる。これらの結果から、分子機序としてCdkn1c発現変化が膵β細胞量調節に寄与していると考えられた。

さらに、これらの機序がヒト膵島においても起こっているかを確認すべく、ヒトiPS細胞由来膵内分泌細胞を用いて遺伝子発現解析を行った。その結果、KCNQ1遺伝子にリスクアリルとなるSNPをもつiPS細胞では、KCNQ1OT1の発現低下が確認された(右図)。本研究計画の結果から、遺伝因子(Kcnq1遺伝子変異)と環境因子(C/EBPβ)の相乗効果が著明な膵β細胞不全を誘導することが示唆された。



第 5 回万有医学奨励賞—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <詳細>

所 属	神戸大学大学院医学研究科 糖尿病・内分泌内科学
氏 名	浅原 俊一郎
研究テーマ	2型糖尿病候補遺伝子 Kcnq1 遺伝子領域による膵β細胞量調節機構の解明

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

研究目的

2008年に報告された KCNQ1 の SNP と 2 型糖尿病の関連に関しては、その後世界中の施設で確認され確かなものとなっているが、未だに KCNQ1 と 2 型糖尿病発症の間のメカニズムに関してはよくわかっていない。我々は KCNQ1 のインプリンティング遺伝子としての役割に注目し、Kcnq1 欠損マウスの変異を父方由来と母方由来に分けて解析を行った。その結果、父方由来の変異マウスの膵島では、non-coding RNA 'Kcnq1ot1' の発現低下により細胞周期抑制因子 Cdkn1c の発現が亢進し、膵β細胞不全を引き起こすことが明らかとなった (Asahara S et al. PNAS, 2015)。さらに我々は、Cdkn1c プロモーター領域に C/EBP ファミリーの結合領域である CCAAT モチーフが存在する点に注目した。軟骨細胞では転写因子 C/EBPβ が Cdkn1c の発現を増加させることが報告されている。我々の研究室では以前に、膵β細胞に C/EBPβ が蓄積すると小胞体ストレスに対して脆弱性を示すこと、および糖尿病モデルマウスの膵島において C/EBPβ が蓄積することを報告している (J Clin Invest, 2010)。本研究計画では、C/EBPβ が小胞体ストレスとは独立して、Cdkn1c を介して膵β細胞不全を引き起こす可能性と Kcnq1 遺伝子変異の関連について検討を行った。

研究方法

マウス：Kcnq1ot1 のプロモーター下流に polyA カセットを挿入することにより、全身の Kcnq1ot1 の発現量を抑制した Kcnq1ot1 truncation マウスを用いて解析を行った。食餌は通常食群 (脂肪分 4.8%) と高脂肪食群 (脂肪分 30.3%) に分けてそれぞれ与えた。

膵β細胞特異的に C/EBPβ が過剰発現する膵β細胞特異的 C/EBPβ 過剰発現マウス (Rip-C/EBPβ Tg) を Kcnq1ot1 truncation マウスと交配することにより、Kcnq1ot1 truncated Rip-C/EBPβ Tg マウス (KC マウス) を作成し、解析した。また免疫沈降に適した C/EBPβ 抗体が入手できなかったため、免疫沈降用に HA tag を付加した膵β細胞特異的 HA-C/EBPβ Tg マウスを作成した。

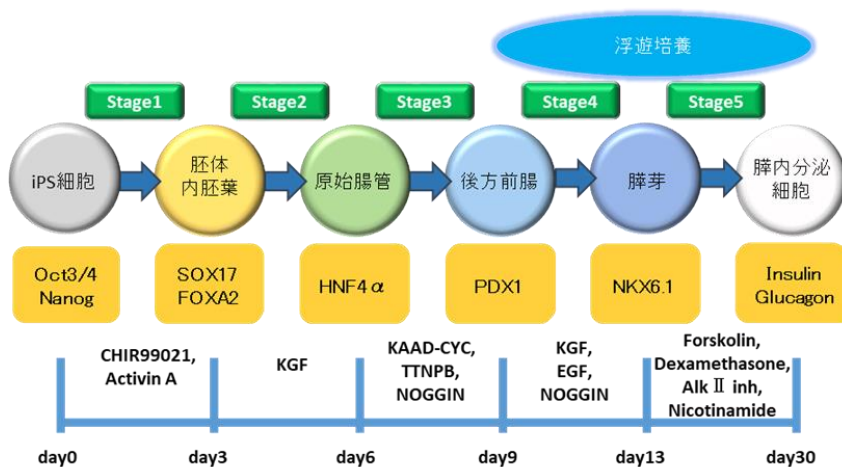
また Cdkn1c floxed マウスと膵β細胞特異的 Cre マウスを交配し、膵β細胞特異的 Cdkn1c ノックアウトマウスを作成・解析した。

細胞培養：マウス膵β細胞株 MIN6 細胞に、Cdkn1c プロモーターの転写活性を評価するプラスミドを用いてルシフェラーゼアッセイを行った。またエピジェネティクス修飾阻害剤として、DZnep (EZH2 阻害剤)、TSA (HDAC 阻害剤)、5-azadC (DNMT 阻害剤) を合わせて MIN6 細胞に負荷実験を行った。

ヒト iPS 細胞：複数のヒト iPS 細胞株において KCNQ1 遺伝子の genotyping を行い、糖尿病発症のリスクアレルとなる SNP を有する 201B7 細胞株と、SNP を有さない 75B2 細胞株 (いずれも神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科 iPS 細胞応用医学講座 青井貴之先生よ

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

り供与) を用いて、膵β細胞への分化誘導実験を行った。分化誘導は、膵発生の段階に沿った既報の分化誘導法をもとに、胚体内胚葉(Stage1)、原始腸管(Stage2)、後方前腸(Stage3)、膵芽(Stage4)、膵内分泌前駆細胞(Stage5-1)、膵内分泌細胞(Stage5-2)と段階的に行った(右図)。



結果

まず MIN6 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイにより、C/EBPβの過剰発現が膵β細胞株においてもCdkn1cプロモーターを活性化することが明らかとなった。

しかしながら MIN6 細胞に C/EBPβを過剰発現させても Cdkn1c の発現亢進は認められず、ルシフェラーゼアッセイとの間に結果の乖離が認められた。Cdkn1cプロモーターは non-coding RNA ‘Kcnq1ot1’によってエピジェネティクス修飾を受けることにより、父親から引き継いだアレルでは Cdkn1c の発現が抑制されていることが知られている。この乖離もエピジェネティクス修飾によるものと考え、Kcnq1ot1によって制御されている EZH2、HDAC1 (ヒストン修飾酵素) および DNMT(DNAメチル化酵素)各酵素の阻害剤を合わせて MIN6 細胞に負荷した状態で C/EBPβの過剰発現を行った。その結果、C/EBPβの過剰発現のみでは Cdkn1c の発現量に変化は認められなかったが、エピジェネティクス修飾阻害剤を加えることによって、有意な発現亢進が認められた。これはヒストン修飾が阻害されたことによるユークロマチン化、および DNA 脱メチル化に伴って C/EBPβが Cdkn1cプロモーターに結合しやすくなった為と考えられた。そこで同様の条件における C/EBPβと Cdkn1cプロモーターとの結合を、ChIP アッセイによって検討したところ、やはり阻害剤を加えた状態において、C/EBPβと Cdkn1cプロモーターの結合が有意に亢進していた。

我々は db/db マウスや Akita マウスの膵島において C/EBPβの発現が亢進していることを明らかにしているが、今回高脂肪食負荷マウスの膵島においても C/EBPβ発現量増加が認められた。すなわち過食や肥満が膵島における C/EBPβ蓄積を促すと予想されるが、Kcnq1ot1 の発現量が低下した状態では、Cdkn1cプロモーターへの結合を介して、Cdkn1c の発現増加による膵β細胞不全がより進展すると考えられる。このことを実証すべく、Kcnq1ot1 truncation マウスと膵β細胞に C/EBPβを過剰発現させた Rip-C/EBPβ Tg を交配することにより、Kcnq1ot1 truncated Rip-C/EBPβ Tg マウス (KC マウス) を作成した。このマウスと Kcnq1ot1 truncation マウス (pA)、Rip-C/EBPβ Tg マウス (TG) および野生型マウス (WT) との比較検討を行った。その結果、KC マウスは 6 週齢の時点から 500mg/dl を超える著明な高血糖、著明な血清インスリン値の低下を認め、膵β細胞量も著しく減少していた。また膵島における Cdkn1c の発現量についても検討を行ったところ、やはり対照群マウスと比較して KC マウスの膵島では有意に発現が亢進していた。マウスの膵島においても C/EBPβと Cdkn1cプロモーターとの結合を確認するために ChIP アッセイで検討したところ、KC マウスの膵島では両者の結合が有意に亢進していることが明らかとなった。

これまでの結果から、Kcnq1ot1 の発現が低下した状態で膵β細胞に C/EBPβが蓄積すると、著明な高血糖および膵β細胞不全を引き起こすことが明らかとなった。しかしながら、遺伝子組み

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

換えによる強制的な C/EBP β 過剰発現では非生理的であり、生理的に C/EBP β が蓄積した場合でも同様の現象が起こるかについて検討した。通常食群と高脂肪食群に分け、Kcnq1ot1 truncation マウス (pA) と野生型マウス (WT) の膵 β 細胞量を測定した。その結果、両食餌群ともに pA 群で膵 β 細胞量は減少するが、高脂肪食群でその差はより顕著になった。

高脂肪食負荷 Kcnq1ot1 truncation マウス (pA) の膵 β 細胞量減少が Cdkn1c 発現亢進によるものであることを証明するため、膵 β 細胞特異的 Cdkn1c ノックアウトマウスを作成し、交配を行った。pA 群の膵 β 細胞において Cdkn1c の発現をヘテロにしたマウス (CKO) では、膵 β 細胞量の完全な回復が認められた。

これまでの検討は全てマウスの組織、細胞を用いたものであり、ヒトでも同様の分子機序が再現されるかについての検討が必要である。そこで、ヒト iPS 細胞を膵 β 細胞に分化誘導し、それらの細胞株を用いて Kcnq1ot1 発現の比較検討を行うこととした。残念ながら、分化誘導によってインスリンの発現は確認されず膵 β 細胞への分化は為し得なかったが、グルカゴンの発現が確認されたことから、膵内分泌細胞への分化誘導を達成した。SNP をもつ 201B7 細胞株と SNP を持たない 75B2 細胞株いずれも iPS 細胞においては KCNQ1OT1 の発現量は低かったが、膵内分泌細胞に分化させることによって、有意に発現の上昇が認められた。しかしながら、SNP を有する 201B7 細胞株では 75B2 細胞株と比べて有意に発現量が低かったことから、KCNQ1 遺伝子の SNP が KCNQ1OT1 発現量に影響している可能性が示唆された。

考察

今回の検討により、Kcnq1ot1 の発現が低下した状態で膵 β 細胞に C/EBP β が蓄積すると、Cdkn1c の発現増加に伴って著明な膵 β 細胞不全を呈することが明らかになった。

Kcnq1ot1 発現変化が Kcnq1 遺伝子領域の変異という遺伝因子によるものと仮定すれば、C/EBP β の蓄積は過食や肥満などの環境因子によるものと考えられる。すなわち、遺伝因子と環境因子の相乗効果 (Gene-Environment Interaction) によって 2 型糖尿病発症を示す新規モデルになる可能性がある。わが国では戦後、脂質摂取率が急激に上昇しており、2 型糖尿病患者の急増と相関している。脂質摂取の増加はインスリン抵抗性増大のみならず、膵 β 細胞不全に直接作用していることも考えられ、今回の機序がその一端を担っているかもしれない。そのように考えると、KCNQ1 の SNP (リスクアレル) を持つ人の中でも、脂質摂取量の多寡により発症危険率も大きく変わる可能性がある。将来的には、遺伝子診断の結果を栄養指導に取り入れることの有効性を示す根拠になることが期待される。

今後の課題

ヒトで報告されている KCNQ1 の SNP は全てイントロンに存在するものであり、その分子生物学的意義は現在も議論されているところである。我々は、Kcnq1 遺伝子内の変異を父親から引き継ぐことによって Kcnq1ot1 の発現低下、Cdkn1c の発現亢進が起こることをマウスとマウス膵 β 細胞株を用いて示したが、実際のヒト膵 β 細胞においても同様の機序が成り立つかについては定かではない。今回、ヒト iPS 細胞を用いて膵内分泌細胞を作成し、KCNQ1 のリスクアレルの有無によって KCNQ1OT1 発現量を検討したが、異なる細胞株であるため、SNP 以外の因子が影響している可能性を否定できていない。今後はゲノム編集によりリスクとなる SNP を編集することで、同一の細胞株であっても KCNQ1OT1 発現に影響が現れるかどうか検討を進めていきたい。

第 5 回万有医学奨励賞－生活習慣病領域－
研究成果報告書(追加助成) <発表実績/予定一覧>

所 属	神戸大学大学院医学研究科 糖尿病・内分泌内科学
氏 名	浅原 俊一郎

1. 論文発表実績	
<ul style="list-style-type: none"> ・ 掲載年次順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究追加助成金交付後のものに限る。 ・ 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。 ・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。 ・ 国内外雑誌を問わない。 ・ 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 	
① <論文 PDF 添付あり>	
1	Kanno A, <u>Asahara S</u> , Kawamura M, Furubayashi A, Tsuchiya S, Suzuki E, Takai T, Koyanagi-Kimura M, Matsuda T, Okada Y, Ogawa W, Kido Y. Early administration of dapagliflozin preserves pancreatic β -cell mass through a legacy effect in a mouse model of type 2 diabetes. J Diabetes Investig, in press. 査読有
2	Yano H, Sakai M, Matsukawa T, Yagi T, Naganuma T, Mitsushima M, Iida S, Inaba Y, Inoue H, Unoki-Kubota H, Kaburagi Y, <u>Asahara S</u> , Kido Y, Minami S, Kasuga M, Matsumoto M. PHD3 regulates glucose metabolism by suppressing stress-induced signalling and optimising gluconeogenesis and insulin signalling in hepatocytes. Sci Rep. 8(1):14290, 2018 査読有
3	Bartolomé A, García-Aguilar A, <u>Asahara S</u> , Kido Y, Guillén C, Pajvani UB, Benito M. MTORC1 Regulates both General Autophagy and Mitophagy Induction after Oxidative Phosphorylation Uncoupling. Mol Cell Biol. 37(23) e00441-17, 2017 査読有
4	Kawada Y, <u>Asahara S</u> , Sugiura Y, Sato A, Furubayashi A, Kawamura M, Bartolome A, Terashi-Suzuki E, Takai T, Kanno A, Koyanagi-Kimura M, Matsuda T, Hashimoto N, Kido Y. Histone deacetylase regulates insulin signaling via two pathways in pancreatic β cells. PLoS One. 12: e0184435, 2017 査読有
② <論文 PDF 添付なし>	
1	<u>Asahara S</u> . Neuronatin and glucose-induced stress in pancreatic β cells. J Diabetes Investig. Commentary, in press. 査読有
2	<u>Asahara S</u> , Ogawa W. SGLT2 inhibitors and protection against pancreatic beta cell failure. Diabetol Int. Editorial, in press. 査読有
3	Takai T, Matsuda T, Matsuura Y, Inoue K, Suzuki E, Kanno A, Kimura-Koyanagi M, <u>Asahara S</u> , Hatano N, Ogawa W, Kido Y. Casein kinase 2 phosphorylates and stabilizes C/EBP β in pancreatic β cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 497:451-456, 2018 査読有
4	Watanabe H, Inaba Y, Kimura K, <u>Asahara S</u> , Kido Y, Matsumoto M, Motoyama T, Tachibana N, Kaneko S, Kohno M, Inoue H. Dietary Mung Bean Protein Reduces Hepatic Steatosis, Fibrosis, and Inflammation in Male Mice with Diet-Induced, Nonalcoholic Fatty Liver Disease. J Nutr. 147:52-60, 2017 査読有

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ・ 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究追加助成金交付後のものに限る。 ・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ・ アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。 ・ 国内外を問わない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2018年3月	GCN2, a type2 diabetes mellitus susceptibility gene, is associated with the regulation of pancreatic beta cell mass. <u>Asahara S.</u> UW・UO・KU The 2nd International Joint Symposium in Honolulu.
2	2017年12月	Effect of removal of glucotoxicity by SGLT2 inhibitor dapagliflozin on the gene expression in pancreatic beta cells. <u>Asahara S.</u> , Ohashi Y, Kido Y. International Diabetes Federation2017.
3	2017年6月	Analysis of Pathogenic Mechanism by Susceptibility Genes of T2DM Using Human iPS Cells. Shimono N, <u>Asahara S.</u> , Kido Y. 77th Scientific Sessions of American Diabetes Association.
4	2017年3月	Regulation of pancreatic beta cell mass through type 2 diabetes susceptibility genes. <u>Asahara S.</u> AIBIS 2017.
3. 投稿、発表予定(投稿中の論文も含める)		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	2019年6月	Early administration of dapagliflozin preserves pancreatic beta cell mass through an epigenetic modification in a mouse model of type 2 diabetes 79th Scientific Sessions of American Diabetes Association
2	2019年6月	Identification of the regulatory mechanism of mTORC1 signaling activity in pancreatic β -cells in GCN2 knockout mice 79th Scientific Sessions of American Diabetes Association.
3		
4		