

インスリン分泌細胞の機能・分化増殖に関する研究、糖尿病網膜症に関 わる新規分子の探索、および統合的解析のための臨床パネルの構築

主任研究者 安田 和基 国立国際医療センター研究所・部長

研究要旨：糖尿病の発症・進展において重要な、「インスリン抵抗性に対する膵β細胞の代償とその破綻」のメカニズムを解析するための基盤的な系を構築する。まず、機能的な膵β細胞が生体内で作られる過程に注目し、「新生仔ブタ膵」を対象に、2つのアプローチを行った。第一に、未分化な内分泌前駆細胞の候補を高効率で得る目的で、セルソーターを用いて SP (side population) 細胞を単離し解析した。長期培養が可能なこと、glucagon, somatostatin, PP (pancreatic polypeptide) の発現まで分化を誘導できることを示したが、網羅的な発現解析などにより、内分泌細胞のみにコミットした細胞集団とは異なる特徴も見られた。次に、成熟した膵β細胞の指標であり、その障害が糖尿病の発症に非常に重要な、「グルコース反応性インスリン分泌 (GSIS)」に注目し、培地条件を調節して新生仔ブタ膵内分泌細胞が GSIS を獲得する *in vitro* 系を確立した。

一方、高度に機能分化した膵β細胞における、遺伝子発現調節機構の分子機序解明のために、膵β細胞特異的な遺伝子発現調節の世界で初めて膵内分泌細胞由来完全長 cDNA ライブラリーを作成し、約 1 万クロンの解析を行った。転写開始点の microheterogeneity、新規の転写産物、さらに non-coding RNA 候補、なども得られ、新たな「RNA WORLD」の存在が示唆された。

糖尿病合併症については、高グルコース濃度で培養した網膜色素上皮細胞の培養上清中に、網膜内皮細胞に対する血管新生促進活性を認め、この本体が ANGPTL4 であること、糖尿病網膜症を生じる SDT ラットの網膜色素上皮細胞でも発現亢進が見られること、を示した。糖尿病網膜症の発症進展に関わる有力な新規分子と考え、特許申請を行った。

主任研究者として、本研究全体の成果を吟味して臨床へ還元するために、個体レベルの統合的な解析を可能にする臨床パネルの構築を行った。

A. 研究目的

過食・高脂肪食・運動不足などの環境因子によってインスリン抵抗性を生じて、

相対的インスリン分泌不全を来さなければ糖尿病を発症しない。慢性に進行する糖尿病の経過において、その発症・進展に最

も重要なのは、「膵β細胞の機能障害」あるいは「インスリン抵抗性に対する膵β細胞の代償の破綻」である。平成17年度に、「脂肪毒性」の視点から膵β細胞の質的代償機構とその不全の分子メカニズムに考察を加えたので、本年度は、「新生仔ブタ膵」を対象に、きわめて高度に分化したいわゆる「成熟した」膵β細胞が作られるステップに注目し、その分子機構の解明を試みた。

日本では、研究を目的としたヒト膵組織の大量入手は不可能であるが、この点ブタ膵は、入手する過程で、量の点でもまた倫理的問題がほとんどない。しかも、インスリン分泌反応のパターンがマウスなどに比べてよりヒトに近いとされるので、ヒト膵β細胞の研究の代替材料として非常に適しており、我々もこれまで、ブタ膵内分泌細胞を用いた研究を行ってきた。

今回我々が「新生仔ブタ膵」に注目した理由は以下の通りである。第一に、新生仔ブタでは、2つの膵原基（腹側膵と背側膵）がまだ完全に融合していない、組織発生の最終段階にあることから、盛んにβ細胞が供給されつつあると考えられる。すなわち、細胞の増殖、分化の盛んな未熟な内分泌細胞や膵内分泌前駆細胞が、成体ブタに比べて豊富に存在している可能性があり、その単離・解析に適していると考えた。この膵幹細胞・内分泌前駆細胞については、インスリン抵抗性への代償に限らず、生理的なインスリン分泌パターンを有するβ細胞を体内で半永久的に供給するリソースとして

も注目されるが、存在は推定されているもののその本体はほとんど明らかでない。

第二に、「グルコース反応性インスリン分泌（GSIS）」は、成熟した膵β細胞の指標であり、その障害が糖尿病の発症に非常に重要な条件とされているが、「新生仔ブタ膵」ではこのGSISが十分発達していない。したがって、「新生仔ブタ膵」からGSISを獲得する「最終成熟過程」を*in vitro*で再現できれば、その段階の分子機構の解析に非常に有益と考えられた。

さて、こうして生じた、高度に機能分化したインスリン分泌臓器である膵β細胞は、きわめて特徴的な遺伝子発現調節機構を有することが知られている。たとえば、インスリンやアミリンなど、膵β細胞特異的に発現する遺伝子が存在するほか、機能的に非常に重要な遺伝子のなかには、グルコキナーゼやHNF4αなどβ細胞特異的なエクソンおよびプロモータを利用する遺伝子もある。糖を中心とした代謝制御システムや、糖尿病の病態の解析においても、その遺伝子発現調節機構の解明は、きわめて重要である。近年転写因子からの研究が盛んであるが、「RNA world」と呼ばれる、従来の予想よりはるかに複雑かつ多様な転写産物の世界が注目されている。そこで、膵β細胞の完全長cDNAライブラリーを作成して、特異的な遺伝子転写調節の分子基盤を解明する。

また、糖尿病患者の慢性の経過において、問題となるのは合併症であり、生命予後だ

けでなく、QOL や健康寿命などにも深く関係する。ここでは、いくつかの分子や細胞の関与が報告されているがまだ全貌が明らかでない糖尿病網膜症に注目し、高血糖からの新規の分子メカニズムを探るために、網膜色素上皮細胞に注目した昨年度からの系を進展させ、得られた有望な血管新生促進因子の更なる解析を行った。

糖尿病・代謝疾患の病態は非常に複雑であり、こうした基盤的な研究成果を、個体レベルで検証し臨床へ還元するには、これまでのようにゲノム・トランスクリプトーム・プロテオームなど各レベルでの成果を個別に検討するのでは不十分である。そこで、こうしたさまざまな知見を統合して、動的な病態を真に理解するための臨床パネルを作成する。

B. 研究方法

1) 臍組織幹細胞・内分泌前駆細胞の単離同定と、その分子的解析（協力研究者：谷口繁生、土谷健）

近年、Hoechst33342 色素の高排出能を指標として分離される SP (side population) 細胞群に、多分化能を有する組織幹細胞が多く含まれると報告され、抗体を用いない簡便で高効率な幹細胞回収法として注目されている。そこで、新生仔ブタ(生後3日以内)臍から、SP 細胞を回収してその性質を検討した。

(1) リベラーゼ、および Histopaque 1077 を用いた密度勾配遠心をかけて得られた、

内分泌細胞が豊富な集団から、SP 細胞を得て回収した。その単離方法の詳細は、昨年度の報告書に記載したので省略するが、今回は SP 細胞の判断基準の一つである、Verapamil 処理によりその集団が消えるかどうかも検討した。回収した SP 細胞は、1 コもしくは数十コずつ、何種類かのコーティングされた培養プレートにまき、DMEM/F-12 (1:1) 混液をベースとした培養液中で培養を行った。

(2) SP 細胞および培養細胞の性質を、遺伝子発現パターンから解析した。平成17年度は、我々が作製したブタプライマーを用いた RT-PCR を用いたが、今回は、Affymetrix 社の GeneChip システムを用いて、網羅的な遺伝子発現解析を行った。上記 SP 細胞、およびソーティングにかけなかった non-SP 細胞からそれぞれ RNA を抽出したのち、T7 による増幅反応を利用した two-cycle labeling kit を用いて cRNA プローブを作製し、Porcine Genome Array (約 23,250 コのブタ転写産物を含む) を用いて、網羅的な遺伝子発現解析を行った。

(3) SP 細胞について、20 個ずつ、あるいは単一細胞の状態での長期培養を試みた。また、さまざまな増殖因子や化合物 (EGF、bFGF、activin A、betacellulin、GLP-1、HGF、IGF-I、retinoic acid、nicotinamide、forskolin など) を添加した条件や、コーティング素材の異なるプレートを用いて、ホルモン産生内分泌細胞への分化条件を検討した。

2) 膵β細胞におけるグルコース反応性インスリン分泌獲得系 (in vitro 成熟系) の確立 (協力研究者: 谷口繁生、土谷健) 一般に新生児の膵β細胞は、GSIS が十分発達していることが知られている。生後急速に GSIS を獲得する仕組みは十分わかっていないが、胎生期に比べ、生後、より高いグルコース濃度の環境にさらされること、授乳などによりタンパクなどの栄養素や、さまざまな生理活性物質に触れること、などが、一因と考えられている。いずれにしてもこの過程を in vitro で再現できれば、「生理的に」成熟する過程の分子機構の解明に役立つと考えられる。すでにラットなどでは、新生児の膵内分泌細胞を、高めのグルコース濃度にさらすことで、GSIS を獲得するという報告がある。そこで、新生児ブタ膵を用いて、同様のモデルの作成を試みた。

(1) 生後24時間以内の新生児ブタ膵を細切後、リベレースで消化し、その後細胞懸濁液に対して Histopaque-1077 を用いた密度勾配遠心を行い、必要な内分泌細胞の層を回収した。得られた細胞は、10%FBS、10mMnicotinamide を含み、グルコース濃度が 2.8mM または 11.1mM の RPMI 培地で、2日間または7日間培養した。

(2) 上記細胞について、バッチインキュベーション法にて、グルコース刺激、脱分極刺激 (50mMKCl)、アミノ酸刺激 (10mMロイシン)、cAMP 刺激 (5μM Forskolin)

で、60分刺激し、インスリン分泌を測定した。上清に分泌されたインスリンおよびインスリン含量は、ブタインスリン ELISA キット (シバヤギ) で測定し、分泌量は含量あたりで表示した。

(3) 上記の2種類のメディウムで培養した新生児ブタ膵内分泌細胞について、RNA を抽出し、遺伝子発現パターンを検討した。網羅的な遺伝子発現解析は、Affymetrix 社 GeneChip システムを用いた。

3) 膵内分泌細胞由来完全長 cDNA ライブラリーの作成とその解析 (協力: 日立計測器サービス (現: 日立ハイテクノロジーズ) グループ)

膵β細胞の機能調節の分子基盤を解明するために、Vector-capping 法 (DNA Res 12:53-62, 2005) にて、完全長 cDNA ライブラリーを作成し、そのクローンの解析を行った。平成17年度にブタ膵内分泌細胞から作成したライブラリーの preliminary な解析では、インスリンとグルカゴンで大部分を示し新規クローンの単離が困難だったため、現時点で最も生理的な膵β細胞に近いとされるラット INS-1D 細胞 (Dr Wollheim、及び東京大学関根信夫博士より供与) を用いた。

(1) ラット INS-1D 細胞から抽出した total RNA 10 μg から、完全長 cDNA ライブラリーを作成し、ランダムピックした約 1.1 万クローンについて、5'-側 one pass シークエンス解析を行った。日立ハイテク

ノロジーズの協力を得て、クローンをクラスタ化したのち、既報の転写開始点との比較を行った。

(2) 新規クローンとおもわれるうち、いわゆる polyA 型の non-coding RNA (以下 ncRNA) の候補については、全身の臓器分布を定性的 RT-PCR でみたほか、膝で in situ hybridization (ISH) を行い膝における発現を検討した。

(3) 同じく新規の興味深いクローンについて、INS-1D 細胞でノックダウンを行い、GSIS に及ぼす影響をみた。

4) 網膜色素上皮細胞を用いた、糖尿病網膜症に関する新たな分子メカニズムの検討 (協力研究者：横内裕敬)

網膜色素上皮細胞 (Retinal pigment epithelial cell: 以下 RPE 細胞) は、神経組織である感覚網膜と、脈絡膜との間にあって、さまざまな機能を有している。糖尿病網膜症における役割は、ほとんど解析されていないが、血管新生抑制因子である PEDF (pigmented epithelial cell derived factor) を分泌すること、増殖性網膜症などで病態に寄与する VEGF (vascular endothelial growth factor) などの発現が亢進していること、が知られている。また増殖性硝子体網膜症においては、RPE 細胞が硝子体内に遊走し、PDGF-like protein で増殖刺激を受け fibroblast 様細胞に transform し、コラーゲンとともに増殖膜を形成することが要因とされている。網膜

症に関する新たな生理活性物質を探索する目的で、RPE 細胞に注目して以下の実験を行った。

(1) RPE 細胞のモデルとして汎用されているヒト ARPE-19 細胞 (ATCC, No. CRL-2302) を、140mg/dℓ (LG)、315mg/dℓ (HG) と異なる濃度のグルコースを含む DMEM/F12 培地で 48 時間培養した後、その培養上清をヒト網膜血管内皮細胞 (Cell System RE cells, 大日本製薬: Lot RI-181) に添加して、血管新生作用を検討した。具体的には、管腔形成 (BD バイオコートアンギオジェネシス血管内皮細胞 tube 形成アッセイシステム (354149)) を用い、MetaMorph にて定量化して検討した。

(2) Affymetrix 社 GeneChip システム Human Genome U133A, B アレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析により (平成 17 年度)、ARPE-19 細胞において HG 培地で発現が誘導される遺伝子のうち、ANGPTL4 に注目した。市販のリコンビナントヒトタンパクを用い、ヒト RE 細胞に対する血管新生作用を検討した。先の、管腔形成 (BD バイオコートアンギオジェネシス血管内皮細胞 tube 形成アッセイシステム (354149)) のほか、増殖 (ナカライテスクー Cell Count Reagent SF (07553-15))、遊走 (BD バイオコートアンギオジェネシス血管内皮細胞遊走アッセイシステム (354143))、浸潤 (BD バイオコートアンギオジェネシス血管内皮細胞浸潤アッセイシステム (354141))、透過性 (Chemicon - In vitro vascular

permeability Assay Kit (71000-00 ECM640)) の5項目について検討した。ポジティブコントロールとして、ヒト VEGF タンパク (293-VE: R&D Systems) を用いた。

(3) ARPE-19 細胞に、ANGPTL4 の siRNA またはネガティブコントロールの siRNA をトランスフェクションした状態で、HG 培地で培養した上清について、前期(1)のようにヒト RE 細胞に対する血管新生 (管腔形成) 促進作用を定量化した。

(4) 糖尿病網膜症を発症することが知られている SDT (Spontaneous Diabetic Torii) ラットおよびコントロールの SD ラットの網膜において、の in situ hybridization (ISH) を施行した。

(倫理面への配慮)

研究に用いたヒト試料は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」「臨床研究に関する倫理指針」に準拠し、倫理委員会の承認および本人の同意を得て使用した。

C. 研究結果

1) 臍組織幹細胞、内分泌前駆細胞の単離同定と、その分子的解析

(1) 新生仔ブタ臍からの SP 細胞回収
SP 細胞を回収する際のインキュベーション時間、使用する色素濃度については、平成17年度までに新生仔ブタ臍に適した条件検討を終了し、再現性よく SP 細胞を得ることができていた (収量は約 0.1%-0.5%) が、今回 SP 細胞の指標

のひとつとされる、Verapamil による SP 分画の消失がみられるかどうかを検討した。結果として、100 μ M の Verapamil では、SP 分画の減少は見られたが十分ではなく、消失あるいは著明な減少を生じるには、150 μ M 以上の濃度が必要であった。

(2) 臍由来 SP 細胞の増殖

得られた SP 細胞を単離し、培養により増殖させることも可能であった。コーティング素材の異なる数種類の培養プレートを用いて検討を行い、type I collagen をコートしたプレートで、細胞の高い増殖能を確認した。さらに、細胞の培養液についても、10% ウシ胎仔血清を含む DMEM/F-12 (1:1) 混液を用いることにより、細胞がよく増殖することがわかった。10% に満たない確率ではあるが、SP 細胞 1 コから増殖するものも見られた。また、増殖する細胞においては、2ヶ月以上継代培養可能であり、増殖能の高いものでは、3年以上の継代が可能であった。

(3) 臍由来 SP 細胞における遺伝子発現の解析 (RT-PCR)

RT-PCR により、単離したばかりの SP 細胞群について発現遺伝子を調べたところ、まず、SP 細胞としての性質を示す要因と考えられている *abcg2/bcrp1* (ABC トランスポーター) の高い発現が確認できた。また、分化した細胞の存在を示唆する内分泌ホルモンの発現も

見られた。さらに、何度かの発現遺伝子解析の結果、大部分のものに pdx-1 の発現が見られなかったものの、およそ半分の割合で、neurogenin3 の発現が見られた。

(4) 膵由来 SP 細胞の増殖・分化にともなう遺伝子発現の解析 (図 3)

培養により増殖する細胞は、insulin や glucagon のようなホルモンの発現は見られなくなったが、多くの細胞において pdx-1 の発現が見られるようになり、neurogenin3 の発現も見られた。ただ、ほぼ全ての細胞群において、somatostatin (δ 細胞のマーカー)、pancreatic polypeptide (PP 細胞のマーカー)、amylase などの発現も見られたことから、一部に継代培養の過程において分化してしまう細胞が存在すると予想された。さらに、培養期間が6ヶ月を超える細胞においては、大部分で内分泌ホルモンの発現は見られなくなる。現在、増殖する細胞を insulin 発現細胞へと分化誘導するために、培養液へのいくつかの成長因子の添加を試みたり、培養プレートを変えてみるなどその方法を検討中である。

(5) Gene Chip システムを用いた膵由来 SP 細胞のトランスクリプトーム解析

SP 細胞は少ないので、回収される RNA は微量であるが、two-cycle target labeling 法による増幅の結果、

GeneChip 解析が可能となった。ブタアレイを用いた SP 細胞と non-SP 細胞の比較解析により、SP 細胞において発現が増加・減少している遺伝子が、それぞれおよそ 130 コと 70 コ見出された。SP 細胞は非常に不均一であり、インスリン以外の内分泌ホルモンの発現まで誘導可能だが、他の系統の細胞マーカーも強く発現しているなど、古典的な組織幹細胞の概念で理解し切れない可能性もある。

2) 膵 β 細胞におけるグルコース反応性インスリン分泌獲得系 (in vitro 成熟系) の確立

(1) インスリン分泌プロファイル 生後 24 時間以内の新生仔ブタ膵から分離した内分泌細胞について、11.1mM グルコース (11.1G) および 2.8mM グルコース (2.8G) 培地で平面培養し、GSIS および他の分泌刺激に対する反応を検討した。

培養開始 7 日目で、2.8G 群は全く GSIS を示さなかったが、11.1G 群では約 5 倍に GSIS が見られた。ほかの分泌刺激に対する反応は図 1 の通りである。

(2) 遺伝子発現パターンの検討

上記モデルについて、7 日めの 11.1G 群、2.8G 群で、候補遺伝子および網羅的な遺伝子発現を検討した。GSIS やインスリン分泌に関係する機能遺伝子について、個別で検討した。グルコースセンサーとされるグル

コキナーゼをはじめ、これまでGSISに関係するとされた分子については、あまり変化がなかった。ただし、たとえば調節性分泌経路の成熟に関係すると考えられるプロセッシング酵素 PC1/PC3 および PC2 の発現が著明に上昇しており、「機能的成熟」との関連は示唆された。

3) 膵内分泌細胞由来 cDNA ライブラリーの作成とその解析

(1) INS-1D 細胞由来 cDNA ライブラリーについて、シーケンスが得られた約 9000 クローンのうち、インサートが確認されたものは 89%、本法の原理を応用して(転写開始点の G が付加などから)完全長 cDNA と判定されるクローンは約 70%にのぼった。もっとも頻度が高かったクローンはインスリン 1 であり、アミリン、タンパク変換酵素(PC1/3、PC2)なども多かった。全体は 3329 クラスターに分類され、うち singleton は約 2200 であった。

(2) これらについて既存のデータベースに対する BLAST サーチなどの検討を行うと、既知遺伝子だが、既報より上流に転写開始点が存在するクローン、いずれの遺伝子とも明らかな相同性を有さない新規遺伝子と思われるクローンなども存在した。さらに、明らかな ORF をもたないと見られる non-coding RNA の候補も存在した。これらの中には、ISH にて膵島に発現するもの、あるいは INS-1D 細胞のノックダウンで GSIS に影響を与える傾向が見られるものな

どがあった。現在 siRNA については off-target effect の除外を慎重にすすめているところである。

4) 糖尿病網膜症における網膜色素上皮細胞の役割の検討

高グルコース下で培養した ARPE-19 細胞の上清は、ヒト RE 細胞に対して、明らかに血管新生(管腔形成)促進活性があり、高グルコース下の培養上清や、高グルコース単独、などの RE 細胞への効果より遥かに大きい(図 2)。したがって、ARPE-19 細胞について、グルコースにより発現・分泌が誘導される血管新生促進因子の存在が示唆された。

低グルコース、および高グルコース下で培養した ARPE-19 細胞のトランスクリプトーム比較では、高グルコース下で発現が亢進している 19 プロブのうち、昨年度の研究から、分泌タンパクであり、血管新生作用を持つ可能性のあるものとして、ANGPTL4 に着目した。リコンビナントの ANGPTL4 タンパクは、ヒト RE 細胞に対して、管腔形成だけでなく、増殖・遊走・浸潤作用があり、驚くべきことに、VEGF とほぼ同等の活性を持っていた。ちなみの、透過性については、十分な検討ができず、今後の課題である。

ANGPTL4 が、ARPE-19 細胞の培養上清にみられた血管新生促進活性の主体であるかどうかについて、あらかじめ ANGPTL4 をノックダウンした ARPE-19 細胞では、高グルコ

ース下で培養しても、その上清の活性が70%程度低下したため、ANGPTL4が活性の主体であろうと結論づけた。ただし、同時に寄与度はやや小さいながらも、他の因子の関与も予想された。

最後に、in vivoで同様の減少がみられるかどうかを、網膜症が進展するSDTラットの、高血糖初期の動物(17週齢)網膜で、ISHで検討した。正常対照としたSDラットの網膜と比較すると、内顆粒層ではともに発現が見られたが、RPE細胞では、SDラットで全く発現が見られないのに対し、SDTラットでは、明らかに発現が亢進していた。

5) 臨床パネルの作成

これまで、ミレニアムプロジェクト(糖尿病患者約800名、対照約500名)やプロテオームファクトリー事業等で、臨床情報を整備したパネルを構築してきたが、上記の目的のために、さらに多角的な解析が可能な臨床のリソースづくりを進めており(厚生労働省バイオリソースバンク構想)、ゲノムと血清のペア、同一患者での治療入院前後での血清、などを進めている。

D. 考察

1) 膵由来SP細胞の単離・培養と、その分子的解析

インスリン分泌障害をとともなう2型糖尿病に対して現状では、外因性にインスリンを投与したり、残存する膵内分泌細胞を刺激して内因性のインスリンを分泌させたり

する治療法が広く行われている。しかし理想的には、内在する膵内分泌前駆細胞を増殖、分化、維持させ、機能的な膵内分泌細胞を十分保つことにより、生理的なインスリン分泌パターンを再現することが、合併症の発症および進行を防止する、最も効果的な治療法であると考えられる。しかしその「前駆細胞」「幹細胞」の性質は明らかでなく、またそこから機能的な膵β細胞への効率的な分化メカニズムもよくわかっていない。

我々は、ブタ膵におけるSP細胞の存在を確立した。基本的に、膵を取り出し内分泌細胞がenrichされた細胞群を分離してから、一晚培養したのちにSP細胞を分離回収している。Verapamilの感受性は組織により一定でないことが知られているが、今回のように感受性があまり高くない場合、それが全体としての分化度・増殖性に関係するのか、あるいは典型的なSPと非典型的な細胞群が混在しているのか、今のところあきらかでない。

自己複製能、あるいはそれに準じた性質を示唆するかもしれない事実として、回収したSP細胞を培養したのちふたたびSP fractionを検討すると、その割合が増える、ということがあげられる。今回まさにそうであったが、あまりにSPのfractionがメジャーになりすぎること、このSPの割合の増加は必ずしも組織幹細胞に必須あるいは共通の性質ではないことなどから、解釈は慎重であるべきだろう。

増殖能、に関しては、以前よりプレートの表面コーティングや、培地の増殖因子などの条件も含めてこれまで検討してきたとおりで、単一細胞から最大2年増殖・生存した細胞もある。これが、自己複製による増殖であるかは不明で、GeneChipを用いた preliminary な検討では、細胞の遺伝子発現パターンはやや変化しているようである。長期に生存した細胞が、当初のような分化能をたもっているのかどうかとあわせ、次年度十分解析する予定である。

分化能、についてだが、まず回収した SP 細胞群の分化度についてみると、RT-PCR による発現遺伝子を見る限り、膵内分泌ホルモン、外分泌細胞、繊維芽細胞、膵管細胞などのマーカー、および、様々な分化段階の転写因子の発現が見られるなど、いくつかの種類または異なった分化段階にある細胞が混在した不均一な集団であると予想された。

一方、現在までに、さまざまな分化誘導法の検討を行ってきたが、未だインスリンを発現する最終的な分化を誘導するには至っていない。次の成熟モデルでの成果をうまく融合できれば、インスリン発現細胞への分化誘導も可能になると考えられる。

以上より現段階では、われわれの SP 細胞の中には、増殖能の高い細胞が存在するが、未分化な膵組織幹細胞／内分泌前駆細胞を enrich し高比率で分離する方法として、本当に有用であるかどうかは、やや慎重

重であるべきだろう。これまでの報告との比較を表1に示す。SPフラクションとしての自己複製能の傾向、および長期継代可能な細胞の存在は見られるが、幹細胞の条件となる、多分化能を保った自己複製はまだ証明できていない。未分化な内分泌前駆細胞の候補ではあるが、非常に不均一であり、他の系統の細胞マーカーも強く発現しているなど、古典的な組織幹細胞の概念で理解し切れない可能性もある。

今後、網羅的遺伝子発現解析のデータマイニングも含め、さらなる詳しい分子的解析、および長期継代培養の影響などの検討が必要である。

2) 膵β細胞の、in vitro 成熟系の開発

膵β細胞におけるグルコース反応性インスリン分泌 (GSIS) は、その機能的成熟の指標であり、糖尿病患者では発症前から異常が見られ病因上も注目されている。また膵β細胞の再生医学においても、このGSISを獲得するステップはメカニズムが不明の点が多く、大きなハードルとなっている。GSIS 障害を呈するモデル系は数多いが、こうしたGSISを獲得する生理的な経過を再現する系は、実はほとんど存在しなかった。

今回、グルコース濃度のみという単純な条件の違いで成熟の有無がきれいに分けられた。非常に再現性がよいので、分子的解析に適していると考えられる。

GeneChipで発現の差が認められたがこれまでβ細胞機能との関連があきらかでなか

ったものも多く、したがって、これらの得られた分子の機能的意義の探索、あるいはその転写制御調節の解析、などは、膵β細胞の秘密に迫る可能性を秘めていると期待される。

3) 膵内分泌細胞由来完全長 cDNA ライブラリーの作成とその解析

完全長 cDNA ライブラリーの有用性については昨年度の報告書でも論じたので省略するが、転写開始点、転写ネットワーク解析のほか、近年注目されている、従来の予想よりはるかに複雑な「RNA world」の全貌を知るために非常に強力なツールである。しかし膵β細胞についてはその量の少なさのためにこれまで報告がなく、事実上われわれのライブラリーが世界で初めてと言えよう。今回用いた Vector-capping 法は、微量の RNA からでも PCR による増幅を用いずにライブラリー作製が可能なこと、転写開始点を高率にとらえられることが、大きな特徴であり、膵β細胞には非常に適しているといえる。

今回発見された、転写開始点の「microheterogeneity」は、primer extension 法や RNase protection 法、あるいは 5'-RACE など転写開始点を決めていた頃から現象としては知られていた。その生理的な意義はあきらかでないが、たとえば今回インスリン遺伝子で TATA box より上流に転写開始点がみられたクローンなどもあり、細胞のおかれた状況によっては意味

があるのかもしれない。

今後は特に転写調節エレメントに注目し、「膵β細胞特異的」な転写調節領域の解析、分化増殖に関わる調節領域、栄養素やシグナルなどの反応性領域の探索を、in silico 解析をも駆使して行いたい。

また今回特記すべきは、タンパクをコードしない「non-coding RNA」の候補で、INS-1D 細胞だけでなく、膵島でも発現がみられたものがあつたことである。ほ乳類においても、こうした「non-coding RNA」が発生・分化・細胞機能において何らかの重要な役割を持つことが推定されているが、代謝との関係はあきらかでない。ノックダウンにより、GSIS に影響をあたえる可能性を示すクローン、糖尿病モデルで発現が変化しているように見えるクローンもあり、これまで報告のなかった機能調節機構、代謝と RNA world の関係などが垣間みられて興味深い。今後、当研究班の Sendai ラットでの経時変化など、病態における意義を解明したい。

こうした解析により、膵β細胞における全く新規の遺伝子発現調節機構や新しい機能をもつ遺伝子・タンパクが明らかになり、糖尿病代謝疾患の本質の理解にも資すると期待される。

4) 糖尿病網膜症における網膜色素上皮細胞の役割の検討

糖尿病合併症は血管病と考えられるが、今回網膜症関連で、我々の検討により、以

下のことが示された。ARPE-19 細胞はグルコース濃度上昇にともない、RE 細胞に対する血管新生促進活性を持つ物質を上清に分泌していること、siRNA を用いた実験により、上記培養上清の活性本体の大部分は ANGPTL4 であるということ、ANGPTL4 は確かにグルコース濃度上昇にともない ARPE-19 細胞で発現が誘導されており、リコンビナント ANGPTL4 タンパクは RE に対して VEGF に匹敵する程度の血管新生活性をもつこと、などである。

ANGPTL ファミリーは、アンジオポエチンに構造的に類似したタンパク群だが、Tie2 など既知のアンジオポエチン受容体に結合しない。血管新生についても、促進作用をもつもの、抑制作用をもつもの、いずれの作用も明らかでなかったり、系により結果が異なるもの、などがある。興味深いのは、代謝に関する作用をもつ分子があることで、脂質異常のモデルマウス (KK/San) の原因遺伝子として同定された ANGPTL3、やはり代謝作用をもつ ANGPTL6 などがあげられる。ANGPTL4 も、ノックアウトマウスの解析などから、脂質に対する作用が知られ、つい最近、ヒトで ANGPTL4 遺伝子の大規模な resequencing により多型と血中脂質異常との関係が示された (Nat Genet2007)。

ANGPTL4 の発現に関しては、PPAR γ アゴニストで発現が上昇することが報告されており、別名 PAPPAR- protein と呼ばれていた。また、糖尿病状態では血中濃度が低下、あるいは主な分泌源である肝での発現が低下

するという報告もあり、われわれの解析により、すくなくとも ARPE-19 細胞については、グルコース濃度上昇にともない、VEGF より強く、かつ速やかに発現が増加した (平成 17 年度 TaqMan など確認) というのは予想外の結果であるが、組織特異的な発現制御を受けている可能性もある。また、すくなくとも網膜血管内皮に対しては、VEGF に匹敵するほどの血管新生促進作用をもつことも、我々の解析ではじめて、しかし明確に示された。

最大の課題は、今回の現象が in vitro で、しかも ARPE-19 細胞という特定の株のみで生じている現象ではないかという懸念であったが、少なくとも SDT ラットの RPE 細胞で、高血糖初期において発現が増加していたことは示された。糖尿病網膜症の進展にどの程度関与しているかは、今後の課題だが、網膜色素変性症における抗 VEGF 療法のように、直接の治療標的とできる可能性もあり、今後の展開が注目される。

なお、以上のことから、平成 17 年 11 月に特許出願をおこなった。今後、ヒト糖尿病網膜症の硝子体液中で濃度が上昇しているかどうかなどを検討してゆきたい。

5) 臨床パネルの作成

最終的に、糖尿病を個体レベルで「成因 + 病期」としてとらえるためには、遺伝因子解析のためのゲノム解析、病期をとらえるためのトランスクリプトーム、プロテオーム解析、詳しい経時的な臨床情報をあわ

せた解析などが必要になる。このうち、病期の解析について、糖尿病では、罹患した臓器そのものは得られず、血清・尿程度しか実用的にえられないが、ゲノムや臨床情報とあわせて統合的に解析する必要がある。今回、構築しているパネルは、こうした目的に大変有用なものとして期待される。

E. 結論

「インスリン抵抗性に対する膵β細胞の代償とその破綻」のメカニズムを解析するための基盤的な系を構築した。まず「量的代償」の基盤として、新生仔ブタ膵から SP (side population) 細胞を単離することにより、未分化な内分泌前駆細胞の候補を高効率で得た。一方「質的代償」については、膵β細胞株を用いて、グルコース反応性インスリン分泌が低下するがアポトーシスは増加しない脂肪毒性の系を構築し、アディポネクチンがそのβ細胞機能を改善させることを示した。さらに膵β細胞特異的な遺伝子発現調節の分子機序解明のために、世界で初めて膵内分泌細胞由来完全長 cDNA ライブラリーを作成し、クローンの解析を行った。

一方糖尿病合併症については、網膜色素上皮に注目して糖尿病網膜症に関わる可能性のある新規候補分子を同定した。

さらに本研究全体の成果を吟味して臨床へ還元するために、個体レベルの統合的な解析を可能にする臨床パネルの構築を行った。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1 論文発表

- 1) Tsuchiya M, Yoshida T, Taniguchi S, Yasuda K, Maeda A, Hayashi A, Tanaka J, Shigemoto M, Nitta K, Tsuchiya K: *In vivo* suppression of mafA mRNA with siRNA and analysis of the resulting alteration of the gene expression profile in mouse pancreas by the microarray method. **Biochem Biophys Res Commun**, 356(1):129-135, 2007.
- 2) Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Maekawa K, Hasegawa R, Suzuki K, Yanagawa T, Kajio H, Kuzuya N, Noda M, Yasuda K, Tohkin M, Sagawa J-I. Genetic variations of the ABC transporter gene *ABCC3* in a Japanese population. **Drug Metab Pharmacokinet**, *in press*.
- 3) Kamei Y, Suganami T, Kohda T, Ishino F, Yasuda K, Miura S, Ezaki O, Ogawa Y. *Peg1/Mest* in obese adipose tissue is expressed from the paternal allele in an isoform-specific manner. **FEBS Lett**, 581(1):91-6, 2007.
- 4) Yamashita R, Fujiwara Y, Ikari K, Hamada K, Otomo A, Yasuda K, Noda M, Kaburagi Y. Extracellular proteome of human hepatoma cell line, Hep G2 analyzed using two-dimensional liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Mol**

Cell Biochem, in press.

- 5) Tsuchiya M, Taniguchi S, Yasuda K, Nitta K, Maeda A, Shigemoto M, Tsuchiya K. Potential roles of large maf s in cell lineages and developing pancreas. **Pancreas** 32(4):408-16, 2006.
- 6) Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Maekawa K, Saeki M, Kamatani N, Kajio H, Kuzuya N, Yasuda K, Sawada J. Novel genetic variations and haplotypes of hepatic nuclear factor 4 α (*HNF4 α*) found in Japanese type II diabetic patients. **Drug Metab Pharmacokinet** 21(4):337-346, 2006.
- 7) Yasugi E, Horiuchi A, Uemura I, Okuma E, Nakatsu M, Saeki K, Kamisaka Y, Kagechika H, Yasuda K, Yuo A. PPAR γ ligands stimulate myeloid differentiation and lipogenesis in the human leukemia NB4 cells. **Dev Growth & Differentiation**, 48(3):177-88, 2006.

2. 学会発表

(国内)

- 1) 安田和基：「慢性疾患としての糖尿病の病期に注目した病態の解析と、新たな診断・治療法の探索」ヒトゲノム・再生医療等研究推進事業研究成果発表会『先端医学研究の進歩と今後—ゲノム解析、遺伝子治療、再生医療研究はどこまで進歩したか？問題はどこにあるのか？—』平成18年2月24日、東京。
- 2) 前川京子、福島（上坂）浩実、頭金正博、長谷川隆一、梶尾裕、葛谷信明、安田和基、鎌谷直之、鈴木佳寿子、柳川達生、斎藤嘉朗、澤田純一：「日本人における薬物代謝酵素 CYP2C9 の遺伝子多型の探索及びハプロタイプ解析」日本薬学会、平成18年3月、仙台。
- 3) 斎藤嘉朗、福島（上坂）浩実、前川京子、長谷川隆一、梶尾裕、葛谷信明、安田和基、鎌谷直之、鈴木佳寿子、柳川達生、頭金正博、澤田純一：「日本人における薬物代謝酵素 CYP2C19 の遺伝子多型探索及びハプロタイプ解析」、同上。
- 4) 安田和基、谷口繁生、泉和生、鏑木康志、杉山雅英、梶陽介：「INS-1 細胞由来完全長 cDNA ライブラリー作成の試み」、第49回日本糖尿病学会年次学術集会、平成18年5月、東京。
- 5) 横内裕敬、山本修一、鏑木康志、安田和基：「高グルコース環境におけるヒト網膜色素上皮細胞の遺伝子発現の検討」、同上。
- 6) 谷口繁生、大河原久子、土谷健、土谷まり子、大河内仁志、鏑木康志、安田和基：「新生仔ブタ脾臓から単離した SP (side population) 細胞」、同上。
- 7) 長谷川智恵、須永泰弘、安田和基、清野進：「インスリン分泌細胞株における cAMP 反応性遺伝子の網羅的解析」、同上。
- 8) 安田和基：「ゲノムワイド関連解析による2型糖尿病感受性遺伝子の同定：ミレニアムプロジェクト糖尿病サブチームからの報告」、同上。
- 9) 安田和基：「網膜色素上皮細胞における、高グルコースによる遺伝子発現変化の解析」、第5回 Tokyo Diabetes Seminar、平成18年7月、東京。
- 10) 井狩高平、山下亮、浜田圭子、安田和基、鏑木康志：「IRS-1, IRS-2 高発現ヒト肝細胞のプロテオーム解析」、日本ヒトプロテオーム機

構第4回大会、平成18年7月、東京。

- 11) 山下亮、井狩高平、浜田圭子、安田和基、鏑木康志：「尿タンパク質の前処理と2D DIGEによる解析」、同上。
- 12) 谷口繁生、大河原久子、土谷健、土谷まり子、大河内仁志、鏑木康志、安田和基：「新生仔ブタ膵臓から単離されるSP(side population)細胞についての検討」、同上。
- 13) 井狩高平、山下亮、浜田圭子、大友明日香、安田和基、鏑木康志：「IRS-1, IRS-2 高発現ヒト肝細胞のプロテオーム解析」、同上。
- 14) 浜田圭子、山下亮、井狩高平、大友明日香、安田和基、鏑木康志：「インスリン/IGF 受容体による遺伝子発現制御の比較解析」、同上。
- 15) 斎藤嘉朗、福島(上坂)浩実、前川京子、埴岡伸光、成松鎮雄、鎌谷直之、梶尾裕、葛谷信明、野田光彦、安田和基、澤田純一：「日本人における酸化ストレス関連遺伝子多型探索及びハプロタイプ解析」、同上。
- 16) 安田和基、谷口繁生、泉和生、鏑木康志、尾山和信、杉山雅英、梶陽介：「Vector-capping法によるINS-1細胞由来完全長cDNAライブラリーの作成と解析」、第18回分子糖尿病学シンポジウム、平成18年12月9日、松山。
- 17) 岡村匡史、矢延理絵子、谷口繁生、清水有紀子、新矢恭子、安田和基、笠井美雪：「非肥満型糖尿病モデルLEA/SENDAIラットのインスリン分泌不全病態」、第21回日本糖尿病動物研究会、平成19年2月8-10日、盛岡。

(国外)

- 1) Tsuchiya M, Yoshida T, Taniguchi S, Yasuda K, Maeda A, Shigemoto M, Tsuchiya K. In vivo

suppression of MafA mRNA using siRNA and resulting alteration of gene expression profile in mouse pancreas by microarray analysis. 66th Annual Scientific Sessions of American Diabetes Association, Washington, D. C. (USA), Jun, 2006.

- 2) Maekawa K, Fukushima-Uesaka H, Tohkin M, Kajio H, Yasuda K, Sawada J-I: Four novel defective alleles and comprehensive haplotype analysis of CYP2C9 in a Japanese population. (第16回ミクロソームと薬物酸化に関する国際会議、ハンガリー、Sep, 2006)
- 3) Yasuda K, Taniguchi S, Izumi K, Kaburagi Y, Oyama K, Sugiyama M, Kaji Y. Construction of a full length cDNA library from INS-1 cells by Vector-Capping method. EASD Islet Study Group Symposium 2006, Elsinore (Denmark), Sep, 2006.
- 4) Kato N, Yanai K, Makaya M, Nabika T, Katsuya T, Fujioka A, Yasuda K, Yamori Y, Kobayashi T, Ogihara T, Yazaki Y. : Integrative large-scale candidate gene analysis of atherosclerotic diseases. 国際高血圧学会、2006.
- 5) Yasuda K, Taniguchi S, Izumi K, Kaburagi Y, Oyama K, Sugiyama M, Kaji Y. Construction of a full length cDNA library from INS-1 cells by Vector-Capping method. Rachmiel Levine Diabetes Symposium 2006, Long Beach (USA), Nov, 2006.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を
含む） 2006-295820 ）

安田和基、横内裕敬「糖尿病網膜症の治療
方法」平成 18 年 10 月 31 日に出願（特願

図 1 ; Insulin secretion from neonatal porcine pancreatic cells cultured with low or high glucose for 7 days

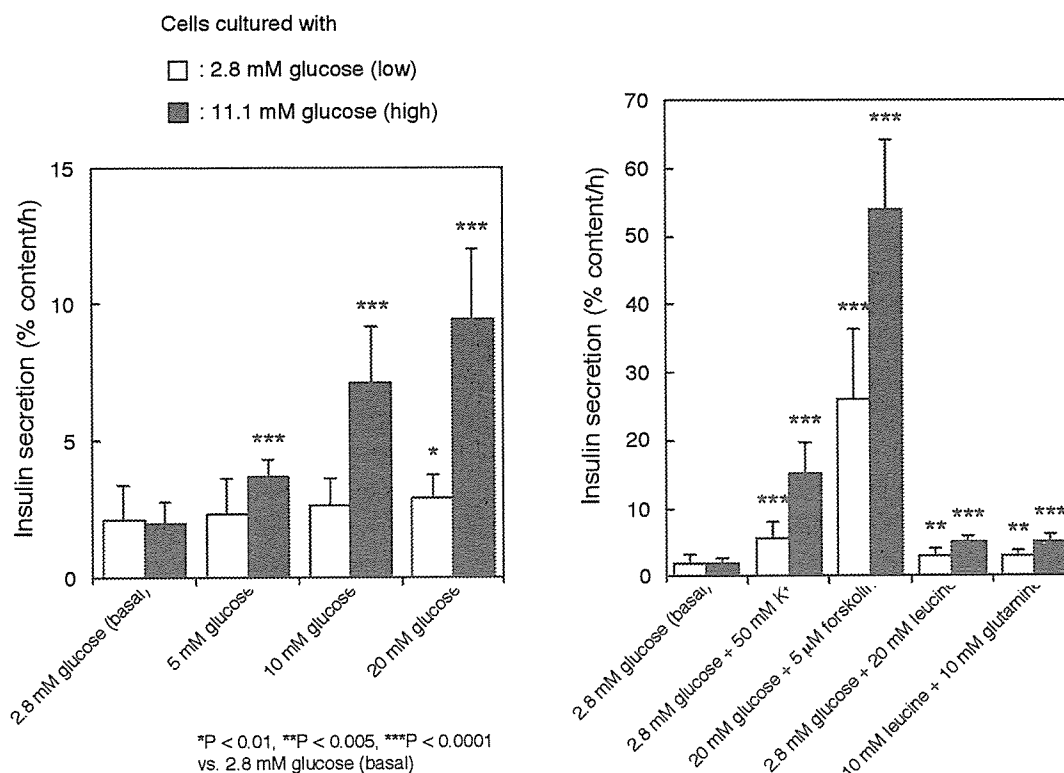


表 1 : Side population (SP)細胞についての報告

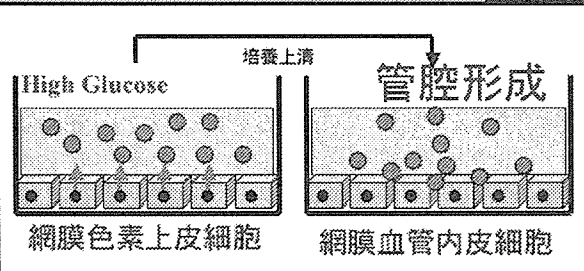
現在までにSP細胞の存在が報告されている組織

骨髄、皮膚、肺、筋肉、心臓、肝臓、腎臓、精巣、脳、乳腺、気道、膵臓

	過去の成績	新生仔ブタ膵SP細胞
SP細胞の性質検討 stem cellとしての性質検討 (microarrayなどによる解析)	SP細胞において発現変化している遺伝子についての報告はあるが、abcg2/bcrp1以外に、いわゆる「stemness遺伝子」の様な組織をこえて共通なマーカーはほとんどない。	他の報告と一致する遺伝子はほとんどないが、変化遺伝子の実験ごとの再現性はある。 SP細胞1コから増殖した細胞は、もとのSP細胞群と共通に変化している遺伝子が少ない。
増殖能・自己複製能	培養により増殖 (single cell sortingからの増殖についての報告は1コ)	10%以下の確率ではあるが、single cell sortingしたSP細胞からの増殖がみられる。 1コから増殖した細胞は、ほとんどのものが長期継代可能である。
分化能・多分化能	多くは、 分化能・多分化能を持つと報告	継代中の細胞は、amylase、vimentin、cytokeratin7、E-cadherin、pdx-1などの発現がみられ、分化誘導によりglucagon、somatostatin、pancreatic polypeptideの発現がみられるようになる。

図 2 : 糖尿病網膜症の新規の病態候補の発見

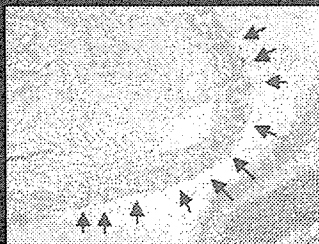
網膜血管新生in vitroモデル



網羅的発現解析etc

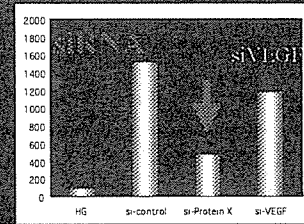
高グルコースで発現が誘導される、新規の網膜血管新生促進因子ANGPTL4の同定

糖尿病網膜症モデルにおける局所発現



VEGFに匹敵する強いIn vitro網膜血管新生促進活性

ANGPTL4 VEGF



ANGPTL4:代謝と血管新生をつなぐ物質

⇒ ヒト糖尿病網膜症への関与の検討へ

厚生労働科学研究費補助金
慢性疾患としての糖尿病の病期に注目した病態の解析と、新たな診断・治療法
の探索
平成18年度分担研究報告書

インスリン・シグナル伝達のプロテオーム解析
分担研究者 鏑木 康志 [国立国際医療センター・研究所・室長]

研究要旨

インスリンと同様の効果を持つ内服可能な薬剤の分子標的になりうるシグナル蛋白を同定するために、プロテオーム解析の手法を用いてインスリン受容体チロシン・キナーゼの基質であるIRSと相互作用する蛋白、IRS高発現が核内での発現に影響を与える蛋白、IRSのインスリン刺激前後での翻訳後修飾を網羅的に解析する。今年度は各IRSに固有なシグナル経路検索のために、IRS高発現肝細胞をプロテオーム解析し、糖新生に関与するphosphoglucomutaseのIRS1高発現による増加を認めめた。また、IRS3固有の細胞増殖抑制機構解明のためにIRS高発現細胞からの核抽出液を解析し、各細胞間あるいはインスリン刺激により有意に変動する蛋白スポットを150個程度検出した。同定された蛋白の多くは、RNA代謝、蛋白合成を制御する蛋白であった。また、長鎖飽和脂肪酸による長時間刺激にて膵β細胞でのインスリン分泌が低下するため、この分子機構を解明するために膵β細胞株の細胞抽出液をプロテオーム解析し、ミトコンドリアで脂質代謝に関与する複数の蛋白を同定した。このため、細胞質分画及びミトコンドリア分画を用いてさらにプロテオーム解析し、有意に変動を認めるさらに多くのスポットを細胞質分画（増加：28，減少：9）、ミトコンドリア分画（増加：41，減少：25）にて検出した。平成19年度は多次元LC-MS/MSを用いたリン酸化、グリケーション等の翻訳後修飾を受けたペプチドの解析する系を用いて、IRSのインスリン刺激前後での翻訳後修飾を網羅的に解析する。また、これまでの解析にて同定された蛋白について発現増加あるいは抑制によるインスリンに特異的な生物学的作用への影響を培養細胞等にて検証する。

A. 研究目的

I: インスリン・シグナル伝達

多くの成長因子の受容体の細胞内の情報伝達機構では、受容体自身のチロシン・キナーゼ活性によって自己リン酸化した受容体のホスホチロシン残基へのシグナル伝達蛋白の結合が重要と考えられているが、インスリンやIGF-1による情報伝達ではシグナル伝達物質がチロシンリン酸化したIRS (insulin receptor substrate)等の細胞内基質に結合するのが特徴であり、これがインスリン作用に特異的な代謝作用の分子生物学的基盤の一因と考えられてきた。IRS knockout mouseの解析結果から各臓器にてシグナル伝達に果たす役割は、各IRSによって大きく異なることが判明したが、その分子生物学的基盤についてはほとんど明らかにされていない。

本計画では、各IRSのインスリンによる生物学的作用での役割の違いを培養細胞にて詳細に検討し、その原因となるIRSの各ドメインと相互作用する分子、シグナル蛋白

を二次元電気泳動、pull-down法を用いたプロテオーム解析を組み合わせた手法で同定する。最近、IRS下流の経路は癌細胞の増殖やアポトーシス抑制といった代謝以外の生命現象をも制御していることが報告されている。このため本研究では、糖尿病に関連した代謝作用と、癌細胞の増殖等の代謝以外のインスリン作用を詳細に比較検討し、内服可能なインスリンと同様の効果を持つ薬剤の分子標的となる蛋白の発見を目指す。

II: インスリン抵抗性

糖尿病患者の90%以上を占める2型糖尿病はインスリン分泌低下及びインスリン抵抗性が合併することで発症する多因子性疾患であり、その患者数は戦後30年間で2.5倍以上に急増している。この短期間に糖尿病関連遺伝子の頻度が急上昇したとは考えにくく、食生活の欧米化、生活の都市化等のライフスタイルの変化といった環境因子の変化が原因と考えられている。特に近年の

食生活上の変化としては、摂取カロリーの増加よりも脂肪摂取の比率の上昇（エネルギー比にて25%以上）が特徴である。このため、高脂肪食によるインスリン抵抗性の原因の解明が、2型糖尿病及びこれに起因した糖尿病性合併症、大血管障害の克服のために必須である。

インスリン抵抗性の病態には、加齢によるエネルギー代謝の変化として筋における糖取り込みの低下、肝での糖新生及び糖放出の亢進、脂肪組織での糖取り込み亢進及び脂肪蓄積が関与している。近年、遊離脂肪酸が全身でのインスリン抵抗性を亢進させるメディエーターとして着目されているが、長鎖脂肪酸は短期的に膵β細胞からのインスリン分泌を促進することでも知られている。本研究では、膵β細胞での長鎖脂肪酸による短時間処理によるインスリン分泌促進、長時間処理によるブドウ糖応答性インスリン分泌低下(GSIS)について、これらの現象に関与する蛋白をプロテオーム解析による網羅的な検索にて同定し、長鎖脂肪酸による膵β細胞での相反する生理作用の分子機構の解明を目標とする。

B. 研究方法

I: インスリン・シグナル伝達

インスリンと同様の効果を持つ内服可能な薬剤の分子標的になりうるシグナル蛋白を同定するために、プロテオーム解析の手法を用いた新規シグナル蛋白の網羅的探索を、インスリン受容体チロシン・キナーゼの基質であるIRSと相互作用する蛋白(1)、IRS高発現が核内での発現に影響を与える蛋白(2)、IRSのインスリン刺激前後での翻訳後修飾(3)について行う。(1)については、既に作製済みのIRS高発現肝細胞を用いてIRS-1、IRS-2と相互作用する蛋白をpull-down法により網羅的に解析する。(2)については、本研究室で既に作製したインスリン受容体とIRS-1またはIRS-3を高発現したCHO-IR細胞で核抽出液を精製して、蛋白プロファイルの2D-DIGEによる二次元電気泳動ゲル上のディファレンシャル解析を行い、有意な変化を有する蛋白をLC-MSにて同定する。(3)については、多次元LC-MS/MSを用いたリン酸化、グリケーション等の翻訳後修飾を受けたペプチドの解析する系を確立し、IRSのインスリン刺激前後での翻訳後修飾を網羅的に解析する。平成19年度に(1)～(3)の解析で同定された蛋白について、インスリンに特異的な生物学的作用に果たす役割を培養細胞、実験動物にて検証する。

II: インスリン抵抗性

ラット膵β細胞株 INS-1 を長鎖飽和脂肪酸 (palmitate)にて長時間(120時間)処理した

系を用いて、処理した細胞の total cell lysate, cytosol 分画及び mitochondria 分画を二次元電気泳動により解析し、長鎖飽和脂肪酸により発現量の変動する蛋白を網羅的に検索する。有意に変動するスポットから LC-MS/MS にて蛋白を同定する。

短時間の脂肪酸処理による膵β細胞からのインスリン分泌促進の分子機構については、前年度の実験結果から、短時間の palmitate 処理時に GSIS が促進し、acylation inhibitor (cerulenin)によって抑制されたことから、GSIS を制御する palmitoylated protein をビオチンラベル後に精製して網羅的に検索する系を確立する。

C. 研究結果

I: インスリン・シグナル伝達

(1) 本研究室で作製した IRS-1 あるいは IRS-2 を高発現したヒト肝癌由来 HepG2 細胞を用いてインスリン刺激後、細胞抽出液を二次元電気泳動にて解析し、インスリン依存性に発現変動するスポットを確認して LC-MS にて同定した。抗 IRS 抗体を用いた免疫沈降法により得られたタンパク質を SDS-PAGE にて解析し、インスリン依存性に IRS-1 高発現のみで発現誘導される蛋白の一つとして phosphoglucosyltransferase が同定された。また、IRS に結合する蛋白を検索するために、抗タグ抗体、各 IRS 特異抗体を用いて免疫沈降を行ない、インスリン依存性に IRS と相互作用する蛋白を検出する条件を検討した。また、抗ホスホチロシン抗体免疫沈降物の 1D SDS-PAGE の泳動パターンから各 IRS 高発現細胞で異なったチロシンリン酸化パターンを確認し、蛋白同定を試みた。

(2) CHO-IR 細胞での IRS 高発現による細胞周期制御の検討の結果、IRS-1 高発現では細胞周期に変化は見られなかったが、IRS-3 高発現ではインスリン依存性の S 期及び G2/M 期への移行が有意に抑制された。IRS-3 高発現では、IRS-1 高発現と比較してインスリン刺激による Akt, MAP kinase の活性化に変化はなく、免疫染色での解析結果では IRS-3 が IRS-1 と比較して選択的に核に局在していることから、核内での IRS-3 特有の経路が細胞周期抑制に関与すると考えられた。このため作業仮説として、各 IRS が核内で相互作用する蛋白が異なると考え、各 IRS 高発現細胞からの核抽出液の蛋白プロファイルを二次元電気泳動によるディファレンシャル解析(2D-DIGE)にて解析した。その結果、インスリン刺激前後あるいは各細胞間で有意に変動する蛋白スポットを総計約150個検出し、LC-MS にて同定した。同定された蛋白を gene ontology にて機能分類した結果では、hnRNP K 等の RNA 代謝、TCTP 等の蛋白合成に関与する蛋白が多かったが、細胞分裂に関与する RhoGDI 等のシグナル蛋白も同定された。