

高効率遺伝子導入を可能とする
インスリン分泌細胞株の樹立と応用
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系糖尿病内科学専攻

古川 麻美

修了年 2015 年

指導教員 石原 寿光

I. 【緒言】

糖尿病とは、インスリン作用の不足により起こる慢性高血糖を主徴とし、種々の特徴的な代謝異常を伴う疾患群である[1]。1型糖尿病は免疫学的機序あるいは原因不明のメカニズムによって膵β細胞が広範に破壊されることによるインスリン欠乏が病態の基本である。一方、日本国において、糖尿病全体の90%近くを占める2型糖尿病は、インスリン分泌低下とインスリン感受性低下の両者が発病に関わっている。ゲノムワイド相関解析により、現在までに90を超える遺伝子異常が報告されているが、それらは膵β細胞でのインスリン分泌機能やβ細胞の生存機構に関与したものがほとんどであった[2]。このような背景に鑑みて、β細胞のインスリン分泌機構を詳細に理解すること、およびβ細胞の生存・死のメカニズムを解明することは、糖尿病の病態解明や創薬標的の同定のために重要であり、さらに将来のβ細胞の遺伝子治療・再生医療に重要な情報を提供する可能性がある。

膵β細胞の機能を解明する上で、分子生物学的方法は強力な手法である。しかしインスリンを分泌するβ細胞やその細胞株に核酸を導入する際には、導入効率が非常に低いという欠点がある。アデノウイルスベクターを用いる方法は強力な方法であるが、作製に時間がかかる、一定量以上のアデノウイルスの細胞障害性も懸念される。

これらの問題点を克服するため、効率的に遺伝子導入インスリン分泌細胞株を作製する方法の開発を試みた。そのために、導入したい遺伝子が染色体上の特定の位置に挿入されるように、マウス由来のインスリン分泌細胞株であるMIN6細胞[3]の染色体に、acceptor配列を設置した。Acceptor配列には、Flip recombinase recognition target (FRT)配列が含まれ、同様のFRT配列をもつdonor plasmidのDNAと、Flip recombinaseの存在下で交換される[4]。

II. 【目的】

本研究は、インスリン分泌細胞のインスリン分泌機構や生存・死のメカニズムを解析するために、種々の遺伝子を高効率で染色体上に導入可能とするインスリン分泌細胞株を樹立させ、その有用性を検証することを目的とする。

III. 【方法】

MIN6 細胞は 15% fetal bovine serum、100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin を含む Dulbecco's modified Eagle's medium で、5% CO₂ の条件下で培養した。インスリン分泌の検討は、 2×10^5 の MIN6 細胞を 24-well プレートの 1 well ごとに播き、ドキシサイクリン (1 µg/ml) を加えて 48 時間培養した後、様々なグルコース濃度の刺激に対する一時間の分泌量を測定した[5]。プラスミドの構築は標準的な分子生物学的方法に従い、MIN6 細胞への核酸の導入は、Nucleofector (Lonza) を用いたエレクトロポレーションにより行った。Rosa26 locus に対する zinc finger nuclease を発現する mRNA は、Sigma-Aldrich より購入した。

Southern blotting および Western blotting では、化学発色キット (Roche あるいは Bio-Rad) を用いて、バンドを検出した。総 RNA 分画を RNeasy kit (Qiagen) を用いて抽出し、ReverTra Ace (Toyobo) を用いて逆転写を行った。膵β細胞型グルコキナーゼおよび、GPRC5C の開始コドンから終止コドンまでを増幅する PCR primers を用い、cDNA のクローニングおよび発現レベルの推定に用いた。

IV. 【結果】

染色体の Rosa26 locus を挿入位置に選択し、同部位に切断をいれる zinc finger nuclease を使用した。Zinc finger nuclease を発現させるとともに、acceptor を搭

載した plasmid を、あらかじめテトラサイクリン依存的に転写が起こるようにした MIN6 細胞に導入した。Acceptor には zeocin 耐性遺伝子を持たせて、zeocin 耐性によって acceptor が染色体に組み込まれた細胞を選別した。Zeocin 耐性となった 16 個のクローンのうち、3 クローンが PCR および Southern blot 解析により正しく Rosa26 locus に組み込まれたと考えられた。Acceptor と合致した野生型および変異型 FRT 配列をもち、その間に blasticidin 耐性遺伝子と導入したい配列をいれた donor plasmid をこのクローンに対して導入し、blasticidin によって選別すると green fluorescence protein (GFP) を発現する細胞が得られた。しかし、細胞ごとの発現レベルが疎らであった。

そこで染色体の任意の位置に挿入し、その結果、転写活性の高い染色体の位置に挿入され、交換反応後の GFP の発現が高くなったクローンを選択する方法をとった。MIN6 細胞の染色体に acceptor をランダムに組み込ませ、zeocin 耐性クローンのプールに対し、blasticidin 耐性遺伝子と GFP cDNA を持つ donor plasmid-1 を導入した。GFP が高いレベルでかつ均一に発現するクローンを選択した。得られたクローンは zeocin 感受性となっているが、これをもう一度、zeocin 耐性遺伝子と red fluorescent protein (RFP) をもつ donor plasmid-2 によって、zeocin 耐性に変換させたところ、90-95%の細胞で変換が成功していた。90%以上の純度で、遺伝子の交換が行われるので、クローンのプールでもインスリン分泌や代謝パラメーターの測定に耐えうるものと考えられた。

このように樹立したインスリン分泌細胞株での遺伝子導入システムが応用可能かどうかを検証するために、遺伝子導入の効果が知られているグルコキナーゼの cDNA を用いた。その結果、これまでの報告と同様に、中間レベルのグルコース濃度でのインスリン分泌が増強することが観察された。

次に、グルコースによるインスリン分泌に重要な役割を担う分子を探索する一歩として、オーファン G 蛋白共役受容体である GPRC5C の遺伝子導入を試みた。グルコースによりインスリン分泌の増加が認められ、GPRC5C がインスリン分泌に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

V. 【考察】

遺伝子導入によって、過剰発現させたり、発現を抑制したりすることは、細胞の機能を解析する上で不可欠な研究手法である。本研究で開発した方法を用いることにより、cDNA を入手してから最初のインスリン分泌の実験結果を得るまでに、従来であれば 8~10 週間を要したところを、5~6 週間に短縮することができた。また、従来の方法では、20~40 個のクローンを解析して、高発現クローンを探さなければならないが、本システムでは十分量の発現が得られるので、その労力を費やす必要はない。クローンのプールで解析を進めている間に、4~6 クローンを増やして、後に確認実験を行なえば良いと思われる。一度に数種類から、10 種類の遺伝子を一人の研究者が扱うことも可能と考えられる。今回の検討では、遺伝子の過剰発現のみを検討したが、short hairpin RNA を発現させることによる蛋白発現の抑制も今後検討していく [6]。さらに、CRISPR (clustered regulatory interspaced short palindromic repeat)-Cas9 (CRISPR-associated nuclease 9) システムを用い、遺伝子のノックアウトも検討していく [7]。

今回作製された acceptor を持つインスリン分泌細胞株では、acceptor の染色体上の位置はいまだ不明である。今後、acceptor サイトが挿入された位置を検討する必要があると考える。

本システムが機能することを検証するために、従来の方法での遺伝子導入株の樹立が報告されているグルコキナーゼの過剰発現を行った [8]。グルコースに

よるインスリン分泌への影響が同様であることを認め、本システムが機能することが検証された。

また、オーファン G 蛋白共役受容体である GPRC5C がインスリン分泌能を高める役割を担っている可能性が予想されたため[9,10]、本システムを用いて、GPRC5C を発現する細胞株を作製した。クローン集団においてインスリン分泌が有意に上昇しており、インスリン分泌に重要な役割を担っている可能性が示唆された。GPRC5C がどのように、インスリン分泌を修飾しているのかに関しては、不明である。膵 β 細胞は様々な分子を分泌しているので、オートクラインのメカニズムでインスリン分泌を制御する可能性が考えられる。これらの点は今後の課題であるが、メタボローム解析[11]も加えて検討したいと考えている。

膵 β 細胞でのインスリン分泌機構は複雑であり、精力的な検討がなされているがいまだ全貌は明らかでない。インスリン分泌メカニズムの全貌や β 細胞のストレス応答のメカニズムを明らかにすることは、創薬のターゲットの同定[12]や将来の β 細胞の再生医療[13]にとって、重要な情報を与える可能性を持っている。

VI. 【まとめ】

膵 β 細胞の研究を推進するために、効率的に遺伝子を導入できる MIN6 細胞株を樹立した。また、オーファン受容体である GPRC5C の過剰発現により、本システムが応用可能であることを示すとともに、GPRC5C がインスリン分泌に重要な役割を果たしている可能性を明らかにした。

【引用文献】

- [1] Seino Y, Nanjo K, Tajima N, Kadowaki T, Kashiwagi A, Araki E, Ito C, Inagaki N, Iwamoto Y, Kasuga M, et al. The Committee of the Japan Diabetes Society on the diagnostic criteria of diabetes mellitus. Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetology International*. 1: 2-20, 2010.
- [2] Hara K, Shojima N, Hosoe J, Kadowaki T. Genetic architecture of type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*. Epub ahead of print, 2014.
- [3] Miyazaki J, Araki K, Yamato E, Ikegami H, Asano T, Shibasaki Y, Oka Y, Yamamura K. Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology*. 127: 126-132, 1990.
- [4] Turan S, Zehe C, Kuehle J, Qiao J, Bode J. Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) - a rapidly-expanding toolbox for targeted genomic modifications. *Gene*. 515: 1-27, 2012.
- [5] Ishihara H, Asano T, Tsukuda K, Katagiri H, Inukai K, Anai M, Kikuchi M, Yazaki Y, Miyazaki JI, Oka Y. Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets. *Diabetologia*. 36: 1139-1145, 1993.
- [6] Stegmeier F, Hu G, Rickles RJ, Hannon GJ, Elledge SJ. A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102: 13212-13217, 2005.
- [7] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 339: 819-823, 2013.
- [8] Wang H, Iynedjian PB. Modulation of glucose responsiveness of insulinoma beta-cells by graded overexpression of glucokinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94: 4372-4377, 1997.
- [9] Amisten S, Salehi A, Rorsman P, Jones PM, Persaud SJ. An atlas and functional analysis of G-protein coupled receptors in human islets of Langerhans. *Pharmacol Ther*. 139: 359-391, 2013.
- [10] Soni A, Amisten S, Rorsman P, Salehi A. GPRC5B a putative glutamate-receptor

candidate is negative modulator of insulin secretion. *Biochem Biophys Res Commun.* 441: 643-648, 2013.

[11] Guay C, Joly E, Pepin E, Barbeau A, Hentsch L, Pineda M, Madiraju SR, Brunengraber H, Prentki M. A role for cytosolic isocitrate dehydrogenase as a negative regulator of glucose signaling for insulin secretion in pancreatic β -cells. *PLoS One.* 8: e77097, 2013.

[12] Ahrén B. Islet G protein-coupled receptors as potential targets for treatment of type diabetes. *Nat Rev Drug Discov.* 8: 369-385, 2009.

[13] Zhang F, Wen Y, Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet.* 23(R1): R40-R46, 2014.