

膵 β 細胞からのインスリン分泌における
Tspan33 の役割 (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

長澤 瑛子

修了年 2019 年

指導教員 石原 寿光

【背景】

日本をはじめ、世界の糖尿病人口は爆発的に増え続けている [1]。2 型糖尿病は、複数の遺伝因子と、肥満や過食といった複数の環境因子の影響を受け、膵 β 細胞からのインスリン分泌不全と、骨格筋・脂肪細胞・肝臓におけるインスリン抵抗性の両者がさまざまな程度に関与し、発症する [2]。ゲノムワイド関連解析 (Genome Wide Association Study : GWAS) によりこれまで 80 以上の 2 型糖尿病疾患感受性遺伝子領域が同定されているが [3]、機能的意義が明らかなものは少なく、これらの背景からも、糖尿病の発症メカニズム、治療を考える上で、膵 β 細胞のインスリン分泌に関連する遺伝子の抽出・検討が重要であると考えられる。

当教室では、膵 β 細胞におけるインスリン分泌に重要な役割を果たす遺伝子を同定することを目的として、インスリン分泌細胞株である MIN6 細胞由来の、インスリン分泌能の良い 3 つのサブクローンと比較的低下した 3 つのサブクローンの両群間で DNA マイクロアレイ解析を行った [4]。その結果、両群で発現が異なる遺伝子の中に、*Tspan33* が認められた。*Tspan33* は、テトラスパニン C8 ファミリー (*TspanC8*) と呼ばれる分子群に属する膜 4 回貫通型蛋白質である。興味深いことに最近、Fadista J 等により、*TSPAN33* は 2 型糖尿病患者においてインスリン分泌に影響を与える遺伝子の候補として見出された [5]。しかし、そのメカニズムについての詳細な検討はなく、 β 細胞におけるインスリン分泌機構を解明するうえで検討する必要があると考え、*Tspan33* に着目した。

当教室では、MIN6 細胞の遺伝子発現を修飾することによって、インスリン分泌機構を詳細に解明することを目指している。目的遺伝子の発現を効率よく行うため、ゲノムの特定の位置に単一コピーの遺伝子を 90-95% の確率で挿入できる Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) 法を応用した方法を開発した [6]。この方法により目的遺伝子の機能解析の研究は容易に可能になった。

【目的】

インスリン分泌細胞株である MIN6 細胞の *Tspan33* の発現を変化させ、膵 β 細胞からのインスリン分泌における *Tspan33* の役割を検討する。

【方法】

Tspan33 を Doxycycline (Dox) 誘導的に過剰発現する細胞株 (MIN6*Tspan33* 細胞) を作成し、Dox なしと、Dox 1 $\mu\text{g/ml}$ で *Tspan33* を過剰発現させ、*Tspan33* のインスリン分泌への効果を検討した。具体的には mRNA、タンパク発現をリアルタイム PCR 法およびウエスタンブロット法を用いて解析し、インスリン分泌実験にてインスリン分泌、含有量の解析を行った。*Tspan33* のノックダウンには、*Tspan33* およびコントロールに対する siRNA オリゴヌクレオチドを用いて解析した。

【結果】

MIN6*Tspan33* 細胞で *Tspan33* を過剰発現させると、*Tspan33* の相対的 mRNA の発現量は 516.6 ± 51.9 倍 ($p = 0.0153, n = 3$) に増加した。しかし、ウエスタンブロット法による *Tspan33* タンパク発現の解析では 32 kDa 付近にバンドは確認できなかった。インスリン分泌は、5 mM グルコース刺激では有意な変化を認めなかったが (61.3 ± 13.3 ng/well/hr (Dox なし) vs. 74.1 ± 21.4 ng/well/hr (Dox 1 $\mu\text{g/ml}$), $p = 0.5879, n = 4$)、12.5 mM では 1.18 倍 (290.9 ± 85.9 vs. 342.6 ± 73.0 , $p = 0.0484, n = 4$)、20 mM で 1.13 倍 (490.9 ± 66.5 vs. 556.2 ± 63.2 , $p = 0.0026, n = 4$) に増加した。*Tspan33* タンパクの発現解析ができなかったため、*Tspan33* の N 端または C 端に FLAG タグを付けた MIN6*Tspan33*FLAG 細胞を作成し、免疫染色を行った。FLAG タグを C 端に付けた細胞の方が、*Tspan33* が細胞膜に局在していることが観察されたため、以降の実験に用いた。MIN6*Tspan33*FLAG 細胞で *Tspan33* を過剰発現させるとインスリン分泌は、5 mM グルコース刺激で 1.94 倍 (60.0 ± 4.4 ng/well/hr (Dox なし) vs. 116.1 ± 2.3 ng/well/hr (Dox 1 $\mu\text{g/ml}$), $p = 0.0051, n = 3$)、20 mM で 1.52 倍 (737.2 ± 41.2 vs. 1120.5 ± 204.2 , $p = 0.0253, n = 3$) に増加した。次に MIN6*Tspan33* 細胞と MIN6*Tspan33*FLAG 細胞の違いを

検討するため、インスリン含有量を測定したところ、MIN6Tspan33 細胞では 1.07 倍と変化を認めなかったが (3419.5 ± 352.0 ng/well (Dox なし) vs. 3642.1 ± 349.1 ng/well (Dox 1 μ g/ml), $p = 0.1561$, $n = 4$)、MIN6Tspan33FLAG 細胞では 1.38 倍に増加した (2874.9 ± 968.6 vs. 3972.3 ± 980.7 , $p = 0.0413$, $n = 4$)。また、Tspan33 の抗体濃度を十分に濃くしたところ、Tspan33 タンパクの発現を解析することが可能となり、MIN6Tspan33FLAG 細胞で Tspan33 タンパクが強く発現することが認められた。

次に、インスリン分泌が増加する要因を検討するため、MIN6Tspan33FLAG 細胞を Dox なしと、Dox 1 μ g/ml で Tspan33 を過剰発現させた細胞を、 $n = 1$ のパイロット実験として DNA マイクロアレイ解析を行った。Tspan33 過剰発現細胞でいくつかの小胞体ストレス応答分子の mRNA の発現の低下が確認されたため、ウエスタンブロット法で小胞体ストレス応答分子の発現を解析した。MIN6Tspan33FLAG 細胞では、ATF6 は 0.92 ± 0.08 倍 ($p = 0.3250$, $n = 3$)、GRP78 は 0.87 ± 0.17 倍 ($p = 0.4356$, $n = 3$)、IRE1 α は 0.91 ± 0.09 倍 ($p = 0.3373$, $n = 3$) で変化を認めなかったが、P-IRE1 α は 0.61 ± 0.06 倍 ($p = 0.0039$, $n = 4$)、XBP-1 は 0.57 ± 0.01 倍 ($p = 0.0008$, $n = 3$)、P-PERK は 0.60 ± 0.07 倍 ($p = 0.0178$, $n = 3$)、P-eIF2 α は 0.79 ± 0.05 倍 ($p = 0.0289$, $n = 3$)、ATF4 は 0.68 ± 0.07 倍 ($p = 0.0337$, $n = 3$)、4E-BP1 は 0.51 ± 0.07 倍 ($p = 0.0145$, $n = 3$) に減少した。一方 MIN6Tspan33 細胞ではいずれも変化を認めなかった。次に MIN6 細胞をケミカルシャペロンである 4-phenylbutyric acid (4-PBA) で処理して小胞体ストレスを抑制させたところ、5 mM グルコース刺激では 0.92 倍で変化を認めなかったが (37.1 ± 1.5 ng/well/hr (4-PBA なし) vs. 34.0 ± 1.4 ng/well/hr (4-PBA 1 mM), $p = 0.1087$, $n = 3$)、12.5 mM で 1.26 倍 (218.0 ± 40.8 vs. 274.4 ± 43.0 , $p = 0.0306$, $n = 3$)、20 mM で 1.11 倍 (384.4 ± 22.2 vs. 427.6 ± 32.8 , $p = 0.0486$, $n = 3$) に増加した。しかし、インスリン含有量は 0.96 倍 (2086.5 ± 439.8 ng/well (4-PBA なし) vs. 1941.6 ± 186.1 ng/well (4-PBA 1 mM), $p = 0.7291$, $n = 3$) で変化を認めなかった。

最後に、Tspan33 がインスリン分泌に重要である可能性をさらに検証するため、Tspan33 をノックダウンして同様の検討を行った。Tspan33 の mRNA は 0.59 ± 0.18 倍 ($p = 0.0125$, n

=5) に減少した。インスリン分泌は 5 mM グルコース刺激では 1.10 倍で変化を認めなかったが (45.6 ± 2.8 ng/well/hr (Control siRNA) vs. 50.1 ± 3.9 ng/well/hr (Tspan33 siRNA), $p = 0.0757$, $n = 6$)、20 mM で 0.60 倍 (401.0 ± 38.1 vs. 239.5 ± 20.7 , $p = 0.0004$, $n = 6$) に減少した。しかし、インスリン含有量は 1.11 倍で変化を認めなかった (2230.6 ± 134.9 ng/well (Control siRNA) vs. 2474.6 ± 202.1 ng/well (Tspan33 siRNA), $p = 0.1175$, $n = 6$)。小胞体ストレス応答分子の発現についても検討を行ったが、発現は増加しなかった。

【考察】

Tspan33 の発現修飾によってインスリン分泌の変化が認められたことから、Tspan33 がインスリン分泌にとって重要な役割を果たしている可能性が示唆された。そして、Tspan33 の発現とインスリン分泌には正の相関が認められ、インスリン分泌の増加はインスリン含有量が増加することで生じることが示唆された。インスリン分泌を増加させる要因として小胞体ストレス応答分子に着目したところ、Tspan33 を過剰発現させると小胞体ストレス応答の上流となる P-PERK、P-IRE1 α の発現が低下し、その下流の転写因子の発現も低下していた。また、小胞体ストレス抑制作用をもつ 4-PBA を MIN6 細胞に付加したところインスリン分泌が増加した。これらのことから、Tspan33 は小胞体ストレスそのものを減弱させ、インスリン合成を増加させて、インスリン分泌の増加に寄与すると考えられる。一方、siRNA で *Tspan33* を抑制するとインスリン分泌は低下したが、小胞体ストレス応答分子は増加しなかった。これは *Tspan33* の mRNA は 6 割程度にしか抑制されなかったため、Tspan33 の発現が小胞体ストレスに影響するほど低下していなかった可能性がある。また、Tspan33 を過剰発現させるとインスリン含有量が増加したが、4-PBA で小胞体ストレスを抑制させても変化を認めなかったことから、小胞体ストレスとは別のメカニズムでインスリン分泌を増加させる可能性も考えられ、今後検討を要する。

【結語】

Tspan33 は MIN6 細胞においてインスリン分泌を正に制御する。その制御機構として、一部、小胞体ストレスを介するメカニズムが考えられるが、すべてを説明することは出来ず、今後他のメカニズムの検討も必要と考えられる。

【引用文献】

1. IDF DIABETES ATLAS – 8TH EDITION, International Diabetes Federation, 2017.
2. 糖尿病診断基準に関する調査検討委員会: 糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告, 糖尿病, 55: 485-504, 2012.
3. Imamura M, Takahashi A, Yamauchi T, Hara K, Yasuda K, Grarup N, et al: Genome-wide association studies in the Japanese population identify seven novel loci for type 2 diabetes, Nat Commun, 7: 1-12, 2016.
4. 田中 彩: 膵β細胞由来細胞株 MIN6 からのグルコース濃度依存的インスリン分泌能を規定する新規遺伝子の同定, 日本大学医学研究科博士課程 学位論文, 2015.
5. Fadista J, Vikman P, Laakso EO, Mollet IG, Esguerra JL, Taneera J, et al: Global genomic and transcriptomic analysis of human pancreatic islets reveals novel genes influencing glucose metabolism, Proc Natl Acad Sci U S A, 111: 13924-29, 2014.
6. 古川麻美: 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その応用, 日本大学医学研究科博士課程 学位論文, 2015.