

研究報告書

「細胞内環境操作法による疾患モデル細胞の創成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月

研究者: 加納 ふみ

1. 研究のねらい

本研究では、細胞型試験管セミインタクト細胞およびそのリシール技術を駆使して、以下の3つのねらいを持った細胞内生命現象の定量的可視化再構成系の構築を目指す。

1. 細胞内構造が保たれた環境で、生命現象を再構成する: 細胞の中の生体分子は、オルガネラや細胞骨格が作り出す構造の中で、様々な分子と相互作用しながら、その機能を発揮している。そこで、細胞の中の構造を保ち、生体分子の作用環境が最適化された状態で、生命現象を再構成し、細胞内のオルガネラ・細胞骨格系が作るコンフィギュレーションに依存した生命現象に必要な因子を特定・検証できるようにする。

2. 攪乱された分子ネットワークの中で生命現象を再構成する: 細胞の中の分子群が織りなすネットワークは、成長因子やストレスといった外部からの刺激や、細胞周期や概日時計といった内部からの要請にตอบสนองして、変化する。細胞内の分子ネットワークが様々な要因により攪乱され続け、常態のネットワークと異なる平衡状態となったとき、それが病態発現時の細胞内環境に移行したと言える。そこで、攪乱された分子ネットワークを再現し、その中で生体分子のふるまいを検証できる再構成系を確立し、その攪乱に関わる因子の探索・検定が可能な細胞アッセイ系を作る。

3. 細胞内で生起する生命現象を「形態」を指標に定量的に再構成する: 細胞内の「形態」に関わる生命現象—生体分子の局在化や輸送、オルガネラや細胞骨格のダイナミクスなど—は、今まで基本コンポーネントや構造タンパク質の同定を中心に進められ、他の事象から切り離されて研究されることが多かった。しかし、細胞の生体分子はネットワークの中に組み込まれているという視点から考えると、細胞内の状態変動が「形態」の変化に反映されることは容易に想像できる。また、むしろ逆に、「形態」を見ることで、細胞内の状態を推測できる可能性がある。そこで様々な再構成された生命現象を、「形態」変化を指標に定量性を持って解析する一般的手法を構築し、「形態」変化から細胞の状態を判断する系を構築する。

以上の観点から本研究では、攪乱された細胞内分子ネットワークを持つ細胞系のプロトタイプとして、病態が再現された「疾患モデル細胞」を構築する。細胞レベルで再現された疾患状態に対して生化学的・細胞生物学的・網羅的解析を実施し、形態—分子を結ぶ病態研究のための新規ツール・コンセプトを提案する。

2. 研究成果

(1) 概要

細胞膜可逆的穿孔法であるセミインタクト細胞リシール法を駆使し、分子ネットワークが攪乱

された疾患モデル細胞プロトタイプとして、糖尿病肝臓あるいは膵βモデル細胞を構築した。これらの細胞では疾患を反映した細胞内生命現象（インスリン抵抗性やインスリン分泌不全など）が起こり、糖尿病組織で生起する病態を細胞レベルで再現できた。また、糖尿病態で攪乱されたシグナル伝達や細胞内オルガネラ・細胞骨格形態変化を糖尿病肝臓モデル細胞で検出し、シグナル伝達分子、細胞骨格、初期エンドソームによって構成される構造体（ドメイン）形成が糖尿病肝臓モデル細胞では顕著に阻害されていた。よって、この構造体の形成有無が糖尿病態を示す一つの形態的指標として有用である可能性が示唆された。さらに、マイクロアレイ解析により、糖尿病モデル細胞特異的に発現変動する遺伝子群を抽出し、その中でも2つを糖新生に関与する新規遺伝子として同定することができた。本方法は細胞質の種類を変えることにより、様々な病態モデル細胞構築に応用できる汎用性の広いものである。今回の糖尿病モデル細胞構築により、細胞質交換法は攪乱された分子ネットワークをもつ細胞内環境を再現し、その形態的・分子的揺動を検出し、さらにはその攪乱に関与する因子を探索するために適した方法論の一つであることを示すことができた。

(2) 詳細

(研究項目1) セミンタクト細胞リシール技術を用いた疾患モデル細胞の構築

ヒト子宮頸癌由来培養細胞 HeLa 細胞、ラット肝臓由来培養細胞 H4IIEC 細胞、マウス膵β細胞由来培養細胞 MIN6 細胞を用いた、糖尿病モデル細胞の構築に成功した。まず、各細胞のセミンタクト化（ストレプトリシン O 処理濃度・時間など）・リシール化（カルシウムイオン処理濃度・時間など）条件検討を行い、80-90%がコンスタントにリシールされうる条件を確定した。リシール細胞ではオルガネラ・細胞骨格の形態がほぼインタクト細胞と同一であること、またセミンタクト化・リシール化によって負荷される細胞ストレス（p38 MAPK などの活性化）はリシール後 30-60 分でほぼ沈静化すること、リシール MIN6 細胞からもグルコース刺激に応じてインスリン分泌が誘起されることも見いだした。

(研究項目2-A) 疾患を反映した細胞内生命現象の再構成

糖新生関連遺伝子 PCK1 (phosphoenolpyruvate carbixykinase) や G6PC (glucose-6-phosphatase) は、インシュリン刺激依存的に転写阻害されることが知られており、この反応の正常性が体全体の糖代謝制御機構において極めて重要である。そこで正常・糖尿病モデル H4IIEC 細胞を用いて、インシュリン刺激依存的な PCK1, G6PC の転写阻害を定量的に、PCR を用いて検証した。まずリシール H4IIEC 細胞におけるインシュリン依存的 PCK1 転写阻害は細胞質濃度に依存することを見だし、この結果は導入する細胞質依存的な PEPCK 転写状態が変化しうることを示唆した。次に、正常あるいは糖尿病モデル細胞を用いてインシュリン刺激依存的な PCK1 および G6PC の転写量を検証したところ、糖尿病モデル細胞においてはインシュリン刺激依存的による転写量の減少が正常モデル細胞に対して少ないことがわかった。このことは糖尿病モデル細胞での糖新生関連遺伝子の転写阻害が「起こりづらい」ことを意味しており、糖尿病肝臓の状態（「インスリン抵抗性」として知られている典型的糖尿病フェノタイプ）を細胞レベルで再現できたことになる。さらに、正常肝臓モデル細胞に

においてはリシール後 1~24 時間後のいずれの時間においてもインスリン依存的な PCK1 発現抑制が見られたのに対し、糖尿病モデル細胞では 1 時間後に見られたインスリン応答性阻害が 12 時間後まで継続し、24 時間後になってようやく WT 細胞と同じ程度まで PCK1 発現が抑制された。この結果から、糖尿病モデル細胞質依存的なインスリン応答性阻害はリシール後 12 時間もの長い時間継続することが明らかとなった。

さらに、正常あるいは糖尿病モデル H4IIEC 細胞を用いたインスリン依存的なグルコース産生能の低下について検証した。興味深いことに、糖尿病細胞質を導入したリシール H4IIEC 細胞においては、インスリン存在下でもグルコース産生が低下せず、むしろ~200%まで上昇することが明らかとなった。以上のことから、糖尿病肝臓モデル細胞においてグルコース産生が攪乱され典型的なインスリン抵抗性の状態を反映していることが示唆された。上記の結果からも、糖尿病肝臓モデル細胞においては糖代謝が異常となっていると考えられる。

(研究項目2-B)シグナル分子ネットワークの再構成

リシール糖尿病モデル細胞におけるシグナル伝達およびその攪乱について検討した。H4IIEC 細胞を一晩血清抜き培地で培養した後セミインタクトにし、正常あるいは糖尿病肝臓細胞質を導入し、正常あるいは糖尿病モデル細胞を作成した。リシール後この細胞をインスリン刺激し、その下流に惹起される MAPK シグナル、Akt シグナルの活性化を Western blotting 法によりリン酸化 MAPK あるいはリン酸化 Akt を検出し調べた。その結果、MAPK リン酸化量は正常と糖尿病モデル細胞で差がなかったのに対し、Akt は糖尿病モデル細胞特異的にリン酸化が阻害されていることがわかった。これらの結果は、キナーゼリン酸化可視化プローブを用いたシグナル伝達可視化実験によっても検証できた。MAPK リン酸化可視化プローブ EKAR および Akt リン酸化可視化プローブ Eevee は、それぞれ CFP と YFP の間に MAPK あるいは Akt リン酸化モチーフをもつタンパク質プローブである。リン酸化時の起こる CFP-YFP 間 FRET 効率変化を検出することで、細胞内の MAPK あるいは Akt のリン酸化状態を可視化することができる。EKAR あるいは Eevee リコンビナントタンパク質を大腸菌に発現させ精製し、正常あるいは糖尿病肝臓細胞質とともにセミインタクト H4IIEC 細胞に添加した。リシール後細胞をインスリン刺激し、EKAR の FRET 効率を顕微鏡下で測定したところ、正常・糖尿病モデル細胞とも EKAR のリン酸化が同程度誘導されたことがわかった。それに対し、糖尿病モデル細胞ではインスリン刺激依存的な Eevee プローブの活性化が正常モデル細胞に比較して阻害されることを見いだした。以上のことから、インスリン刺激依存的な Akt 活性化は糖尿病肝臓モデル細胞で阻害されることが明らかになった。また、今回のようなシグナル伝達系に反応する蛍光性プローブを用いる際問題となる「発現量の不均一性」を、本リシール細胞を用いて回避できる可能性があることも認識できた。

またインスリン刺激後にリン酸化 Akt の蛍光抗体法を行ったところ、インスリン添加後 5 分以内という短時間に形質膜付近に Akt が濃縮されたドメインが形成されることがわかった。このドメインにはリン酸化された(活性化した)Akt が濃縮されており、インスリン刺激後 5-15 分で急激に形成され、30 分以内になくなることがわかった。正常あるいは糖尿病モデル細胞で Akt 活性化ドメイン形成を定量化したところ、糖尿病モデル細胞では Akt ドメインが明らかに構

築されにくくなっていることがわかった。インスリン刺激による Akt 活性化ドメイン形成に関わる現象を探索するため、さまざまな細胞内構造体・オルガネラマーカーで蛍光抗体法を行った。その結果、Akt 活性化ドメインはアクチンと共局在すること、そしてエンドソームマーカー EEA1 と一時的に共局在することを見いだした。エンドソームには脂質の1つホスファチジルイノシトール 3 リン酸(PI3P)が特異的に濃縮していることが知られているが、(2-C)で後述するように、糖尿病モデル細胞ではこの PI3P が減少していることを見いだしている。そこで糖尿病肝臓モデル細胞における PI3P 減少と Akt 活性化ドメイン形成阻害との間につながりがあるかどうか調べるため、FYVE リコンビナントタンパク質を利用することとした。FYVE とはタンパク質の PI3P 結合モチーフである。この FYVE タンパク質の GST 融合リコンビナントタンパク質を大量にリシール細胞に導入して FYVE を大量に PI3P に結合させることにより、PI3P 減少と同じ効果が得られるものと考えた。まず GST あるいは GST-FYVE リコンビナントタンパク質を正常肝臓細胞質とともにリシール H4IIEC 細胞に導入した。この条件でインスリン刺激を行い、FYVE タンパク質による Akt 活性化ドメイン形成への影響を検証した。その結果 FYVE 導入細胞では、i) Akt リン酸化(活性化)が顕著に減少、ii) Akt 活性化ドメイン形成が阻害、iii) インスリン刺激前から PCK1 および G6PC の発現が減少し、さらにインスリンに応答した mRNA 量の低下も阻害されることを見いだした。これら(特に iii))は典型的な糖尿病態の細胞のフェノタイプである。以上の結果より、糖尿病態発現細胞では、初期エンドソーム膜上の脂質(PI3P)量の減少と、Akt シグナル伝達系の攪乱が起こっている可能性が示唆された。興味深いことは、Akt 活性の攪乱は肝細胞における「インスリン抵抗性」発現の原因として注目されていることであり、本実験結果は糖尿病態発現時における肝細胞でのシグナル伝達攪乱経路を初めて明らかにしたものとなった。

(2-C)細胞内モルフォダイナミクスの再構成とその攪乱の検証

正常と糖尿病モデル細胞の細胞内オルガネラや細胞骨格の形態を、蛍光抗体法を用いて比較したところ、初期エンドソームマーカーである EEA1 が糖尿病モデル細胞ではシグナルが减弱していることが分かった。EEA1 はエンドサイトーシスに関与することが知られているため、リシール HeLa 細胞を用いて、細胞外からの分子の取込過程エンドサイトーシス過程について検証を行った。A)EGF 受容体の分解過程、B)トランスフェリン受容体のリサイクリング過程、C) コレラ毒素のゴルジ体への逆行輸送過程について調べたところ、糖尿病マウス肝臓細胞質を導入した糖尿病モデルリシール HeLa 細胞では、コレラ毒素の逆行輸送過程が p38 MAPK の活性依存的に阻害されることを明らかにした。糖尿病モデル細胞における p38 MAPK の活性化は細胞がストレス状態下にあることを意味し、また p38 MAPK 活性化によるエンドソーム局在脂質ホスファチジルイノシトール-3-リン酸 (PI3P)の減少がコレラ毒素輸送阻害とカップルすることを見いだした。以上の結果は、「本研究のねらい」で述べた 1, 2, 3 の目的を正常・糖尿病モデル細胞を用いて実施した例となっている。つまり、糖尿病態という細胞内環境を持った細胞を作成し(ねらい2)、その細胞内シグナル伝達経路の攪乱(ねらい2)やそれを原因とする小胞輸送系路の攪乱(ねらい1)、オルガネラ形態の異常の検出(ねらい3)を行い、糖尿病発現に関わる新規因子の存在を明らかにした。以上の結果は、国際誌 PLoS ONE に論文として発表した。

(3) リンシール糖尿病モデル肝臓細胞の遺伝子発現解析

正常あるいは糖尿病モデル肝臓細胞のマイクロアレイ解析を行った。その結果、17688 遺伝子の中から、2時間という短時間の細胞質暴露でも正常と糖尿病モデル細胞で発現変動する遺伝子を複数抽出できた。そのうち、real time PCR および western blotting により糖尿病モデル細胞での mRNA・タンパク質発現上昇・減少を2つの遺伝子で確認できた。これらの遺伝子を RNAi による発現抑制あるいは過剰発現すると、インスリン依存的な PCK1・G6PC の発現抑制の阻害およびグルコース産生のインスリン応答性が失われ、糖尿病モデル細胞と同様の糖代謝の攪乱が観察された。

3. 今後の展開

現在までに、インスリン抵抗性という病態フェノタイプが再現された糖尿病モデル細胞構築に成功し、病態関連候補因子群を絞り込むことができている。特に Akt シグナル伝達異常とエンドソーム膜上の PI3P 量減少とのカップリングが FYVE タンパク質大量導入実験により示唆されたことから、今後は初期エンドソーム膜に結合する EEA1 のように PI3P 結合ドメインを持つタンパク質に注目し、病態に関わる因子を同定していきたいと考えている。また、マイクロアレイ解析より、糖尿病細胞質依存的に発現変動する遺伝子を抽出してきており、実際これらのうち2つのタンパク質がインスリン依存的な糖新生酵素発現抑制にも関与することを見いだしている。今後はこれらのタンパク質発現の糖尿病モデルマウス週齢依存的な変化などを調べ、病態マーカーとして有用であるかどうかを明らかにする。

また、リンシール細胞を用いたライブラリースクリーニング系を確立できたので、実際に化合物スクリーニングを開始したいと考えている。まずは既に使用されている糖尿病改善薬を用いてスモールスケールで予備的実験を進め、スクリーニング系としての問題点などを洗い出す。それらを克服した後に、市販薬1000種の低分子化合物ライブラリーを用いてスクリーニングを遂行する予定である。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者) 本研究では細胞内構造体が存在する環境で、分子ネットワークが攪乱された細胞系として、セミインタクト細胞リンシール法による疾患モデル、病態モデル細胞の作製を目指した。本研究ではそのプロトタイプとして、糖尿病肝臓あるいは膵βモデル細胞構築を行い、病態に即したフェノタイプ(肝臓ではインスリン応答異常、膵β細胞ではインスリン分泌異常)をそれぞれのモデル細胞で観察することができ、細胞レベルでの病態再現に成功した。これにより「細胞質交換法」は攪乱された分子ネットワークを持つ細胞の再構成系として有用であることを示すことができた。さらに、糖尿病肝臓モデル細胞の性状解析の結果から、インスリンシグナル伝達の異常およびそれに対応した Akt ドメイン形成阻害を見出した。Akt ドメインはインスリン刺激後一過性に形成されるドメインであり、形態検出が短時間で簡便にできることが特徴である。よって、病態の指標となる形態・構造変化を見つけるという当初の目的に対し、シグナ

ル伝達異常を反映するドメイン生成の有無はこのコンセプトの良い実施例となりうると考えている。さらには、病態関連新規因子の探索についても、有力な2つのタンパク質をマイクロアレイ解析から抽出し、その機能を細胞レベルで検証することができた。以上の結果は、研究開始当初の目的や開発項目を概ね満たすものと考えている。その一方で、現在の研究環境では、個体での機能確認などの実験を行うことは難しく、実際への病気個体との関連を示すことについては課題が残っている。細胞レベルでの機能解析のさらなる充実を踏まえた上で、共同研究先を探し、本方法での新規因子発見を個体研究へと結びつける道筋を模索していきたい。その一つの方法として、病態モデル細胞を用いた薬物スクリーニングがあると考えている。これまでに96wellフォーマットで病態モデル細胞作成のプロトコール決定や遺伝子発現定量、細胞画像取得法などをこのさきがけ研究期間中に確立できたので、これを用いてドラッグリポジショニングなどのスクリーニングを行い、新薬発見や個体への応用を目指したい。

(2) 研究総括評価

セミンタクト細胞リシール法を駆使し、分子ネットワークが攪乱された疾患モデル細胞プロトタイプとして、糖尿病肝臓あるいは膵・モデル細胞を構築しました。この成果は、その応用、特に、病態モデル細胞を用いた薬物スクリーニングを含め、高いポテンシャルを秘めています。

タンパクの状態から構造を一細胞レベルで見っていく事により、さらに、多くの発展の余地があり、セミンタクト細胞を用いなければ、知り得なかったという事象を見出して、この技術のさらなる展開を期待しています。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Kano, F., Nakatsu, D., Noguchi, Y., Yamamoto, A., Murata, M. A Resealed-Cell System for Analyzing Pathogenic Intracellular Events: Perturbation of Endocytic Pathways under Diabetic Conditions. PLOS ONE. 2014. 7 (8), e44127.
2. Fujiki, K., Shinoda, A., Kano, F., Sato, R., Shirahige, K., Murata, M. PPAR γ -induced PARylation promotes local DNA demethylation by production of 5-hydroxymethylcytosine. Nature Communications. 2013. 4. Article number: 2262.
3. Sugawara, T., Kano, F., Murata, M. Rab2A is a pivotal switch protein that promotes either secretion or ER-associated degradation of (pro)insulin in insulin-secreting cells. Scientific Reports. 2014. 4, Article number: 6952.
4. Nakatsu, D., Horiuchi, Y., Kano, F., Noguchi, Y., Sugawara, T., Takamoto, I., Kubota, N., Kadowaki, T., Murata, M. L-cysteine reversibly inhibits glucose-induced biphasic insulin secretion and ATP production by inactivating PKM2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2015 Feb 23. pii: 201417197..
5. Taguchi, Y., Imaoka, K., Kataoka, M., Uda, A., Nakatsu, D., Horii-Okazaki, S., Kunishige, R., Kano, F., Murata, M. Yip1A, a Novel Host Factor for the Activation of the IRE1 Pathway of the Unfolded Protein Response during Brucella infection. PLOS Pathogens. 2015.in press.

(2)特許出願

研究期間累積件数:4件(3件非公開)

1.

発明者: 村田昌之、加納ふみ

発明の名称: 高脂血症または糖尿病マーカー、及び創薬スクリーニング方法

出願人: 神奈川科学技術アカデミー

出願日: 2012/3/31

出願番号: 特願 2012-083075

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 加納ふみ. リシール細胞技術を用いた疾患モデル細胞の構築とその解析. 第27回バイオメディカル分析化学シンポジウム(若手研究者シンポジウム)、2014年8月21日、帝京大学板橋キャンパス
2. 加納ふみ、村田昌之. セミインタクト細胞リシール技術を用いた病態モデル細胞の構築. 第65回日本細胞生物学会大会シンポジウム、2013年6月19日、名古屋.
3. Masayuki Murata, Fumi Kano. A Resealed-Cell System for Analyzing Pathogenic Intracellular Events: Insight into Signal Transduction Cascade in Hyperlipidemic or Diabetic Cells. The 25th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2012), Nov. 27, 2012, Nagoya.
4. Kano, F., Murata, M. (2013) The Semi-Intact Cell System and Methods for Cell Resealing: a Novel Systems Biology Tool to Elucidate Protein Networks with Spatio-Temporal Information. *Advances in Systems Biology*. 2(1): 6-14.
5. 加納ふみ、堀内雄太、野口誉之、村田昌之. (2012) セミインタクト細胞リシール技術を用いた病態モデル細胞創成とその細胞工学的応用. *細胞工学*、秀潤社、Vol. 31 No. 12, 1376-1382.