

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591051
 研究課題名 (和文) 膵β細胞におけるフォークヘッド転写因子の核内転写活性調節機構の解明
 研究課題名 (英文) Analysis of mechanism of transcriptional regulation by forkhead transcription factor in pancreatic β-cell
 研究代表者
 中江 淳 (NAKAE JUN)
 慶應義塾大学・医学部・准教授
 研究者番号：00344573

研究成果の概要：

本研究では 2 型糖尿病での膵β細胞におけるインスリン分泌の相対的低下の発症に着目した。今回我々は、フォークヘッド転写因子 FoxO1 に焦点を絞り、その活性型および抑制型変異体を膵β細胞で特異的に過剰発現させるマウスを作製しその表現型を解析するとともに、生体内での膵β細胞での遺伝子変化に与える影響を検討した。膵β細胞特異的に活性型 FoxO1 を過剰発現させると空腹時の高血糖を認めた。また、抑制型 FoxO1 を *Lepr^{db/db}* マウスのβ細胞において過剰発現させると耐糖能の改善が認められた。β細胞においては p27 遺伝子の発現には影響は認められなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：FoxO1、糖尿病学、膵β細胞、Rosa26、*Lepr^{db/db}* マウス

1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病は、肝臓、脂肪組織、骨格筋などの末梢組織のインスリン抵抗性と膵β細胞のインスリン分泌不全により、発症する。インスリンは、肝臓においては、glucose 6-phosphatase (以下、*G6PASE*) 及び phosphoenolpyruvate carboxykinase (以下、*PEPCK*) 遺伝子の発現を抑制し、糖産生を低下させる。脂肪組織、骨格筋においてはブドウ糖の取込みを促進させる。膵β細胞の機能においてもインスリンが重要な働きを担っていることは、インスリン受容体基質(以下、

IRS)-2 ノックアウトマウスにおいてβ細胞の増殖が低下し、糖尿病を発症することや、膵β細胞特異的インスリン受容体(IR) ノックアウトマウスおよび IR/インスリン様成長因子-1 受容体(以下、IGF-1R) ダブルノックアウトマウスが膵β細胞の機能不全により、糖尿病を発症することからも明らかである。しかしながら、膵β細胞におけるインスリンおよび IGF-1 シグナルの破綻が、実際に同細胞の機能を低下させるにいたる分子メカニズムに関しては不明な点が多い。

近年、インスリンの転写調節作用に關与す

様々な転写因子が報告されている。フォークヘッド転写因子 FOXO ファミリー (FOXO1, FOXO3A, FOXO4)は、インスリン、IGF-1 により、PI3-kinase、Akt を介してリン酸化され、核内から細胞質へ転出され、その転写活性が抑制される転写因子である。FoxO1 はマウスにおいて、肝臓、脂肪組織、骨格筋、視床下部、膵β細胞に発現している。肝臓においては、*G6PASE* の発現亢進により、糖産生を増加させ、脂肪細胞の分化抑制、視床下部においては、摂食調節ペプチドの転写に関わっていることが報告されている。膵β細胞における FOXO1 の作用に関しては、以前我々は、肝臓及び膵β細胞特異的活性型 FoxO1 過剰発現トランスジェニックマウス (*Ttr-S253A FoxO1-305*)において、*Pdx-1* 遺伝子の発現が低下し、膵β細胞の増殖が抑制されていることを報告した。さらに、FoxO1 が末梢組織のインスリン抵抗性に対するβ細胞の代償性肥大を抑制することが報告されている。我々は、野生型マウスの genetic background における活性型 FoxO1 のβ細胞における過剰発現のみでは、糖尿病発症には至らないことを、C57bl6 マウスとの back cross を繰り返すことにより確認した。しかしながら、*Lepr^{db/db}* マウスにおいて、活性型 FoxO1 を膵β細胞において過剰発現させた場合 (*Lepr^{db/db}-Ttr S253A-305*)、摂食量が *Lepr^{db/db}* と同じであるにも関わらず、体重および白色脂肪組織重量の低下、グルコース刺激に対するインスリン分泌の低下、β細胞における *Pdx-1*、インスリンの発現低下を認め、通常の *Lepr^{db/db}* マウスよりも早期に糖尿病を発症することを見いだした。*Ttr-S253A* で用いた変異型 FoxO1 は Akt リン酸化部位の一つである Serine253 を Alanine に置換したものであり、恒常的に核内に留まり (constitutively nuclear) *in vitro* では恒常的に活性があることが示されている。しかし、genetic background の相違により、phenotype に著しい違いをもたらすことは、FoxO1 の核内における活性調節の存在が示唆される。同様の現象は *C.elegans* においても認められている。*C.elegans* においては、FoxO1 の homologue である DAF-16 の3つの Akt リン酸化部位すべてを Alanine に置換した constitutively nuclear type の変異体 (DAF-16aAM) は、野生型 *C.elegans* において過剰発現させても、寿命は延長しないが、IR の homologue である DAF-2 変異体で過剰発現させた場合寿命の延長が認められる。以上のことから、FoxO1 が転写活性をフルに発揮するには、核内にとどまることのみでは不十分であることは明白である。しかしながら、その分子メカニズムに関しては解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、FoxO1 の核内における転写活性調節メカニズムを明らかにすることである。既に報告されているように、FoxO1 は、Akt によるリン酸化による抑制以外に、CBP/p300 によるアセチル化、Sirt1 による脱アセチル化が転写活性調節に重要である。しかし、実際にマウス生体内の組織を用いてなされた研究は報告されていない。本研究では、野生型および *Lepr^{db/db}* マウスの膵β細胞において constitutively nuclear type FoxO1 (T24A/S253A/S316A; 以下、3A-FoxO1) を過剰発現させ、3A-FoxO1 の結合蛋白および翻訳後修飾を比較することにより、新たなβ細胞における機能不全発症のメカニズムを明らかにし、その機構を抑制しうる分子を同定する。以上のように、本研究は、2型糖尿病の創薬開発へつながりうると考えられる。本研究では、上記の *Ttr S253A-305* マウスが、膵β細胞のみならず肝臓においても、変異型 FoxO1 が過剰発現していることを考慮にいれ、新たに、膵β細胞のみで constitutively nuclear type の変異型 FoxO1 (3A-Fox O1) を過剰発現させるマウスを使用する。我々は、既に homologous recombination により、3A-FoxO1 cDNA を *Rosa26* genomic locus へノックインさせたマウス (*Rosa26-3A FoxO1*) を作製した。

このマウスは、Cre recombinase の存在下で組織特異的に 3A-FoxO1 を過剰発現させる。褐色脂肪組織特異的 Cre recombinase 過剰発現トランスジェニックマウスを用いた検討では、mRNA レベルで内因性 FoxO1 の3倍程度の過剰発現が認められている。*Rosa26-3A FoxO1* をラットインスリンプロモーターで Cre recombinase を過剰発現させるトランスジェニックマウス (*Ins Cre*) とかけあわせ、*Rosa26-3A FoxO1-Ins Cre* を得ることで、膵β細胞特異的な変異型 FoxO1 過剰発現による糖代謝への影響の解析が可能となる。膵β細胞特異的 FoxO1 の過剰発現マウスの作製は、未だ報告されていない。

以上のように、本研究の特色、独創的な点には、1) FoxO1 の転写活性調節が、主に subcellular localization で規定されるとされてきたことに対し、結合蛋白、翻訳後修飾を含めた核内での FoxO1 に対するある種の events が、その活性に大きな影響を与えるということをその phenotype から充分類推しうる点 (*Lepr^{db/db}-Ttr S253A-305* と *Ttr S253A-305* の phenotype の比較) 2) 膵β細胞特異的 FoxO1 過剰発現マウスを *Rosa26* ノックインマウスにより得ている点 (このマウスにより、臓器特異的または時間特異的 FoxO1 過剰発現マウスを得ることができ、同様の実験を各組織を用いて行うことが可能であり、研究を進展させうる)、3) ノックインした変異型 FoxO1 には、Flag タグがついて

いるため、ブルダウンが容易である点などがあげられる。以上本研究により、膵β細胞機能不全時における同細胞における FoxO1 結合蛋白の同定および翻訳後修飾が明確になると考えられ、インスリン抵抗性における膵細胞機能不全の一因を明らかにしうると考えられる。本研究を進展させていくことは2型糖尿病の創薬開発への一端であると考えられる。

3. 研究の方法

<平成19年度>

(1)膵β細胞特異的 constitutively nuclear FoxO1(3AFoxO1) 過剰発現マウス (*Rosa26-3AFoxO1-InsCre*)の作製
すでに作製した constitutively nuclear FoxO1 ノックインマウス(*Rosa26-3AFoxO1*)を Cre recombinase を膵細胞特異的に発現する *Ins Cre* マウスと交配する。

(2)constitutively nuclear FoxO1(3AFoxO1)を膵β細胞特異的に発現する *Lepr^{db/db}* マウス (*Lepr^{db/db}-Rosa26-3AFoxO1-InsCre*)の作製

Rosa26-3AFoxO1-InsCre を *Lepr^{db/+}* マウス と 掛 け 合 わ せ 、 *Lepr^{db/+}-Rosa26-3AFoxO1-InsCre* マウスを得る。さらに *Lepr^{db/+}-Rosa26-3AFoxO1-InsCre* マウスを *Lepr^{db/+}* マウスと掛け合わせるにより、*Lepr^{db/db}-Rosa26-3AFoxO1-InsCre* を得る。

(3)*Rosa26-3AFoxO1-InsCre* および *Lepr^{db/db}-Rosa26-3AFoxO1-InsCre* マウスからの膵島の単離

Lepr^{db/db} マウスが明らかな糖尿病を発症しない週齢である生後5-6週の *Rosa26-3AFoxO1-InsCre* およ

び *Lepr^{db/db}-Rosa26-3AFoxO1-InsCre* マウスより膵島を単離する。

(4)得られた膵島を既報に従い、溶解し、抗 Flag 抗体により免疫沈降する。その後、SDS-PAGE により電気泳動し、銀染色を行い、*Rosa26-3AFoxO1-InsCre* および *Lepr^{db/db}-Rosa26-3AFoxO1-InsCre* マウスより得られたバンドを比較し、*Lepr^{db/db}-Rosa26-3AFoxO1-InsCre* 特異的なバンドの出現、または消失を検討する。

4. 特異的なバンドを切り出し、タンパク質同定分析を行う。

<平成20年度>

(1) 活性型 FoxO1 発現マウス *Lepr^{db/db}CNFoxO1Ins* の糖代謝の解析

腹腔内ブドウ糖負荷試験を6, 9, 12, 16週齢で施行し、*Lepr^{db/db}* マウスに比べ、耐糖能が悪化していないかを検討する。

(2)変異型 FoxO1 発現による膵β細胞内における遺伝子発現変化の検討

1)6-9 週齢の *Lepr^{db/db}* マウスおよび *Lepr^{db/db}CNFoxO1Ins* マウスの膵臓のβ細胞の大きさ、インスリン発現、PDX1 発現を組織学的に検討する。

2)上記マウスより膵島を単離し、RNA を抽出し、microarray 解析を施行し、遺伝子発現の変化を、apoptosis, cell cycle, autophagy, oxidative stress など既知の FoxO1 標的遺伝子および発現量の変化の大きい遺伝子の有無を解析する。標的遺伝子として報告されていない遺伝子があればその解析を進める。

3)12-16 週齢の *Lepr^{db/db}* マウスおよび *Lepr^{db/db}D256FoxO1Ins* マウスについて、同様に解析を進める。

3. 膵β細胞における FoxO1 結合蛋白の探求
変異型 FoxO1 の N 末端には FLAG タグを付加してあるので、6-9 週齢の *Lepr^{db/db}* マウスおよび *Lepr^{db/db}CNFoxO1Ins* マウスまたは 12-16 週齢の *Lepr^{db/db}* マウスおよび *Lepr^{db/db}D256FoxO1Ins* マウスより、膵島を単離し、抗 FLAG 抗体により免疫沈降し、銀染色により、変異型 FoxO1 に特異的なバンドの有無を解析し、特異的と判断された場合は、蛋白のアミノ酸配列を決定し、結合蛋白を同定する。同定された蛋白が、報告されていない蛋白であればその解析をさらに進める。

4. 研究成果

本研究では2種類の FoxO1 変異体、すなわち、活性型である constitutively nuclear (CN) FoxO1 と抑制型である truncated ($\Delta 256$)FoxO1、を *Rosa26* genomic locus にノックインさせた組織特異的 FoxO1 トランスジェニックマウス(*R26^{flxneo}CNFoxO1* および *R26^{flxneo} $\Delta 256$ FoxO1*)をまず作製した。両マウスをそれぞれ膵β細胞特異的に Cre recombinase を発現する *InsCre* トランスジェニックマウスとかけ合わせ、膵β細胞特異的に変異型 FoxO1 を発現するマウス (*CNFoxO1Ins* および *$\Delta 256$ FoxO1Ins*)を得、さらに、*Lepr^{db/+}* マウスとかけ合わせるにより、*Lepr^{db/db}CNFoxO1Ins* および *Lepr^{db/db} $\Delta 256$ FoxO1Ins* マウスを得て、それぞれ *Lepr^{db/db}* マウスとその表現型を比較した。

Rosa26-3AFoxO1-InsCre マウスは、2ヶ月時において空腹時の血糖の高値を認めた。*Rosa26- $\Delta 256$ FoxO1-InsCre* マウスは、2ヶ月時の耐糖能はコントロール群と差を認めなかった。

一方、*Lepr^{db/db} $\Delta 256$ FoxO1Ins* マウスは *Lepr^{db/db}* マウスに比べ、摂食時の血糖の低下、腹腔内ブドウ糖負荷試験における耐糖能の改善、インスリン分泌の上昇が認められた。また、糖尿病を発症した *Lepr^{db/db}* マウスに認められる膵β細胞の縮小の遅延が認められた。

しかしながら、FoxO1 の標的遺伝子の一つでβ細胞において重要な働きを有する p27 蛋白の発現には変化は認められなかった。以上のことは、抑制型の FoxO1 を膵β細胞特異的に過剰発現させることで *Lepr^{db/db}* マウスにおけるβ細胞の退縮過程に何らかの影響を及ぼしたと考えられる。現在、同細胞における p27 以外の FoxO1 標的遺伝子発現の検討を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

1. Fukatsu Y, Noguchi T, Hosooka T, Ogura T, Kotani K, Abe T, Shibakusa T, Inoue K, Sakai M, Tobimatsu K, Inagaki K, Yoshioka T, Matsuo M, Nakae J, Matsuki Y, Hiramatsu R, Kaku K, Okamura H, Fushiki T, Kasuga M. Muscle-specific overexpression of heparin-binding epidermal growth factor (EGF)-like growth factor increases peripheral glucose disposal and insulin sensitivity. **Endocrinology**. 2009 Mar 5. [Epub ahead of print]
2. Takemori H, Katoh Hashimoto Y, Nakae J, Olson EN, Okamoto M. Inactivation of HDAC5 by SIK1 in AICAR-treated C2C12 myoblasts. **Endocr J**. 2009 Mar;56(1):121-30.
3. Nakae J, Cao Y, Oki M, Orba Y, Sawa H, Kiyonari H, Iskandar K, Suga K, Lombes M, Hayashi Y. Forkhead transcription factor FoxO1 in adipose tissue regulates energy storage and expenditure. **Diabetes**. 2008 Mar;57(3):563-76.
4. Nakae J, Oki M, Cao Y. The FoxO transcription factors and metabolic regulation. **FEBS Lett**. 2008 Jan 9;582(1):54-67.

[学会発表](計15件)

中江 淳、曹 永恒、伯野史彦、竹森 洋、林 祥剛、伊藤 裕、高橋伸一郎。FoxO1 結合蛋白 P13 は Crtc の転写活性を抑制する。第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会 2009 年 5 月 22 日(大阪)

曹 永恒、中江 淳、林 祥剛、春日雅人。摂食・エネルギー代謝調節における POMC および AgRP ニューロン TSC2 の役割の検討。第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会 2009 年 5 月 22 日(大阪)

中江 淳、曹 永恒、伯野史彦、竹森 洋、奥窪理沙、林 祥剛、伊藤 裕、高橋伸一郎。FoxO1 結合蛋白 P13 は FoxO1 および Crtc の転写活性を抑制することにより糖・エネルギー

代謝を調節する。第 82 回日本内分泌学会学術総会 2009 年 4 月 23 日(前橋)

曹 永恒、中江 淳、林 祥剛、春日雅人。摂食・エネルギー代謝調節における POMC および AgRP ニューロン TSC2 の役割の検討。第 82 回日本内分泌学会学術総会 2009 年 4 月 23 日(前橋)

中江 淳。FoxO1 結合蛋白による糖・エネルギー代謝調節。第 5 回宮崎サイエンスキャンプ。2009 年 2 月 20-22 日(宮崎)

中江 淳、伊藤 裕。インスリン作用における FOXO1 とその活性調節。第 43 回糖尿病学の進歩。2009 年 2 月 20-21 日(松本)

中江 淳、曹 永恒、伯野史彦、竹森 洋、沖 美与、Kristy Iskandar、林 祥剛、高橋伸一郎。FoxO1 結合蛋白 P13 は FoxO1 のアセチル化を増強させることにより転写活性を抑制する。第 31 回日本分子生物学会第 81 回日本生化学会合同大会。2008 年 12 月 9-12 日(神戸)

Nakae J。A novel dual repressor regulates insulin sensitivity through interaction with FoxO1 and TORC2. International Symposium on Pathway/Network to Disease and Drug Discovery Specially Focused on Nuclear Receptors and Metabolic Syndrome. October 22-24, 2008 (Tokyo)

中江 淳、曹 永恒、伯野史彦、竹森 洋、沖 美与、Kristy Iskandar、菅 耕二、林 祥剛、高橋伸一郎。FoxO1 結合蛋白 P13 は FoxO1 のアセチル化を増強させることにより転写活性を抑制する。第 29 回日本肥満学会 2008 年 10 月 17-18 日(大分)

曹 永恒、中江 淳、沖 美与、春日雅人。摂食・エネルギー代謝調節における POMC ニューロン TSC2 の役割の検討。第 29 回日本肥満学会 2008 年 10 月 17-18 日(大分)

中江 淳、曹 永恒、菅 耕二、沖 美与、Kristy Iskandar、林 祥剛。脂肪組織における FoxO1 結合蛋白 P13 過剰発現の糖代謝・エネルギー代謝に与える影響の検討。第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会 2008 年 5 月 22-24 日(東京)

Kristy Iskandar、曹 永恒、沖 美与、張 長亮、中江 淳。POMC および AgRP ニューロンにおける FoxO1 の摂食調節作用の検討。第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会 2008 年 5 月 22-24 日(東京)

曹 永恒、中江 淳、沖 美与、楯谷三郎、小川涉、Kristy Iskandar、張 長亮、春日雅人。POMC および AgRP ニューロンにおける PDK1 の摂食調節作用の検討。第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会 2008 年 5 月 22-24 日(東京)

Nakae J, Cao Y, Suga K, Oki M, Iskandar K. Identification and functional analyses

of a novel FoxO1-binding protein. Keystone
Symposia. February 19-24, 2008 (Banff,
Canada)

中江 淳、曹 永恒、菅 耕二. インスリ
ン抵抗性における転写因子 FOXO ファミリー.
第 42 回糖尿病学の進歩. 2008 年 2 月 15-16
日 (高松)

(3)連携研究者
なし

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

中江 淳 (NAKAE JUN)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：00344573

(2)研究分担者

なし