

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591054  
 研究課題名（和文）  
 インスリン遺伝子発現機序の解明と新たな膵β細胞の再生  
 研究課題名（英文）  
 Mechanisms of insulin gene expression and regeneration of pancreatic beta-cell  
 研究代表者  
 石田 俊彦（ISHIDA TOSHIHIKO）  
 香川大学・医学部・教授  
 研究者番号：50159737

研究成果の概要：糖尿病の病因はインスリンの作用不足であり、進行した病態では膵β細胞からのインスリン合成／分泌不全が生じる。インスリン遺伝子転写の生理的刺激は血中糖濃度の変化であり、インスリン遺伝子プロモーター内にグルコース応答領域が数カ所存在している。我々は新たな転写因子 PREB がグルコース応答領域に結合してインスリン遺伝子転写を促進することを明らかにした。さらにグルコース応答に関与する glucokinase を調節することで、膵β細胞の機能改善をおこなうことを明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：内分泌代謝

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：インスリン、グルコース応答性、β細胞、glucokinase, 転写因子 PREB

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病の病因はインスリンの作用不足であり、進行した病態では膵β細胞からのインスリン合成／分泌不全が生じる。我々は膵β細胞におけるインスリン遺伝子転写機構について検討してきた。インスリン遺伝子転写の生理的刺激は血中糖濃度の変化であり、インスリン遺伝子プロモーター内にグルコース応答領域が数カ所存在している。現

在までにグルコース応答領域に結合する転写因子がいくつか報告されているが、我々は PDX-1 がサイトカインに反応してインスリン遺伝子発現を制御すること (Eur J Biochem 2000)、また新たな転写因子 PREB がグルコース応答領域に結合してインスリン遺伝子転写を促進することを明らかにした (Diabetologia 2006)。またグルコースによ

るインスリン遺伝子発現の細胞内情報伝達系として CaMKK/CaMKIV カスケードを新規に同定してきた(Diabetes 2004)。これらの研究の最終目的は糖尿病患者の治療方法の改善にある。そこで現在までの研究を利用して新たな膵β細胞の再生実験を計画した。膵β細胞の再生実験は国内外の研究室でおこなわれており、ES細胞(embryonic stem cell)から膵β細胞が分化誘導されること、膵臓の外分泌細胞または腸管の未分化細胞からインスリン分泌細胞が誘導できること、肝細胞、骨髄幹細胞から誘導できることが知られている。しかし、グルコース応答性インスリン分泌の機序の詳細はわかっておらず、グルコース応答性インスリン分泌細胞も確立されていない。

## 2. 研究の目的

グルコース応答機構の解明に関しては、細胞内情報伝達系としてのCaMKK/CaMKIVカスケードの詳細を明らかにする。CaMKK/CaMKIVカスケードの標的転写調節因子の同定をおこなう。また、インスリン遺伝子プロモーター内にはグルコース応答領域(cis-element)し、新たな転写因子 PREBがグルコース応答領域に結合してインスリン遺伝子転写を促進することを報告してきた。今回の検討では、PREBがグルコースに应答する機序および詳細な転写調節メカニズムの解析をおこなう。これらの研究を進展させて、グルコース応答性インスリン遺伝子転写の情報伝達系および転写の master regulator を同定していく予定である。最終的には“糖毒性”の細胞内メカニズムを解析し、グルコース感受性を有した新しい膵β細胞の再生を目指している。

## 3. 研究の方法

(グルコース刺激によるインスリン遺伝子転写に関わる細胞内情報伝達系)

グルコース刺激に対応して活性化されインスリン遺伝子転写を促進する経路として calcium-calmodulin dependent protein kinase cascade (CaMKK/CaMKIV)を新規に同

定し報告してきた。本年度はこの経路の果たす役割について検討する。インスリン分泌作用と CaMKK/CaMKIV pathway の役割についての検討もおこなう。

(1)、膵β細胞内にインスリン分泌顆粒とCaMKK, CaMKIVの共存を共役焦点レーザー顕微鏡にて検討する。

(2)、グルコース刺激におけるCaMKK/CaMKIVのリン酸化について経時的に観察する。

(3)、CaMKK/CaMKIVの特異的阻害剤であるSTO-69を添加し、グルコース刺激時のインスリン転写活性、mRNA, インスリン分泌について検討する。

(4)、CaMKK/CaMKIV pathwayのコンポーネント、CaMKK, CaMKIVのconstitutive active, dominant negative formの遺伝子導入により、グルコース刺激に対するインスリン分泌に与える影響について検討する。

(5)、CaMKK, CaMKIVそれぞれに対するsiRNA法による細胞内 knock downをおこなう。このような膵β細胞におけるグルコースに対するインスリン遺伝子転写、分泌におよぼす影響について検討し、CaMKK, CaMKIVそれぞれの活性化機構、役割について検討する。

(グルコース応答性インスリン遺伝子転写因子の同定とグルコセンサーGlucokinase遺伝子与える影響について検討する)

インスリン遺伝子プロモーター内にグルコース応答領域が数カ所存在する。現在までにグルコース応答領域に結合する転写因子がいくつか報告されているが、我々は新たな転写因子PREB (prolactin regulatory element binding protein)がグルコース応答領域に結合してインスリン遺伝子転写を促進すること発見した。またPREBの標的遺伝子グルコセンサーGlucokinase(GK)遺伝子について検討をおこなった。

(6)、転写因子PREBの膵β細胞における発現をインスリン, GKとの共存として免疫染色にて確認する。

(7)、PREB遺伝子導入によるインスリン, GK遺伝子転写活性化について reporter gene assay法にて検討する。またグルコース反応

性インスリン遺伝子転写を仲介する element (glucose-response element; GRE) の deletion mutant の解析より、PREB 結合領域の特定をおこなう。

(8)、転写因子PREBの活性化機構に関しては、CaMKK/CaMKIV pathwayが主体になっていることを報告している。さらに、活性化の分子機構に関して、mutagenesisの手法をもちいてPREBの構造ドメインの解析をおこなう。

(9)、PREB 結合領域を EMSA, foot print 法にて同定し、同領域に recruitment してくる他の転写因子群に関しても CHIP assay にて同定する。

(10)、インスリン分泌細胞株において siRNA の手法により、PREB を knock down し、グルコース刺激によるインスリン、GK 転写、分泌に及ぼす影響に関して検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1). グルコース応答性に関与する転写因子 PREB の同定

インスリン遺伝子プロモーター内にグルコース応答領域が数カ所存在する。現在までにグルコース応答領域に結合する転写因子がいくつか報告されているが、我々は新たな転写因子 PREB (prolactin regulatory element binding protein) がグルコース応答領域に結合してインスリン遺伝子転写を促進することを見つけた。また PREB は Glucokinase (GK) 遺伝子の発現を増加させることが明らかになった。GK は膵β細胞ではグルコセンサーとして働き、グルコース応答性インスリン分泌に重要な役割をはたすことを報告されている。今回の実験により PREB の過剰発現により GK 発現が上昇することを明らかにした。また PREB の過剰発現は、GK の蛋白発現を亢進するのみならず、GK 活性を亢進させた (J cell mol med (in press))。GK 遺伝子は cAMP により発現が上昇することが知られている。そこで PREB を knock down することで cAMP による GK の活性化はなくなることが判明した。最終的には PREB が結合する領域が GK promoter 内に存在することを

ChIP assay にて確認した。以上のことより、転写因子 PREB はグルコース刺激にตอบสนองし、インスリンのみならず GK 活性を上昇させることより、グルコース応答性に重要な役割を果たすことが判明した。

##### (2). グルコース応答性インスリン分泌即 h 新薬の細胞内情報伝達に関する検討。

GLP-1 は消化管ホルモンであり、グルコース応答性にインスリンを分泌するインクレチンの代表である。GLP-1 は欧米では臨床応用されており、我が国でも治験が終了している。我々は、GLP-1 が細胞内情報伝達系 CaMKK/CaMKIV pathway を活性化することを見いだした。我々は以前に CaMKK/CaMKIV pathway がグルコース応答性インスリン遺伝子転写を仲介する細胞内情報伝達系であることを報告している (Diabetes 2004)。さらには GLP-1 によって活性化させる CaMKK/CaMKIV pathway はインスリン遺伝子転写だけでなく、GK 遺伝子転写、遺伝子発現、酵素活性を上昇させるところを報告した (Diabetes, Obesity & Metabolism (in press))。

##### (3). GK 活性化機構

グルコース応答性インスリン分泌に GK が重要な役割をになうことはこれまでの研究および我々の実験結果も示している。そこで GK 活性化機構野詳細について検討した。GK の活性化に関しては、IGF-I による活性化がよく知られているが、詳細は不明であった。我々は膵β細胞株 INS-1 細胞を使用して IGF-1 による細胞内情報伝達系について検討した。様々な細胞内情報伝達系の阻害剤を使用し、IGF-I の GK 活性化機構の細胞内情報伝達系が PI3K/Akt であることが判明した。活性化型 Akt, PI3L-p85 の遺伝子導入で GK 遺伝子転写が上昇することが判明した。PI3K/Akt の刺激は核内の転写因子 FoxO1 を活性化し、核外へ移行を促進する。FoxO1 は GK 遺伝子に対しては抑制的に調節しているが、抑制がとれることにより、GK 遺伝子の活性化が進むことが判明した。最終的には FoxO1 の GK promoter への結合領域の同定をおこない、

結合部位の遺伝子変異にて IGF-I による GK 活性化機構が消失することを確認した (Endocrinology 2007)。以上の結果を総合するとグルコース応答性インスリン分泌細胞の作成には GK 遺伝子活性化が必須であり、GK 活性化機序としては、CaMKK/CaMKIV pathway、PI3K/Akt などの細胞内情報伝達系の活性化、転写因子 PREB の活性化が必要であることが判明した。臨床応用が期待されている GLP-1 はこの機序を活性化する因子として重要であり、今後の研究が期待される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 26 件)

1. Li J, Murao K, Imachi H, Yu X, Muraoka T, Kim JB, Ishida T. PREB, prolactin regulatory element binding protein is involved in cAMP-mediated adiponectin gene expression in 3T3-L1 cells. *J Cell Mol Med* (査読有り)
2. Nishiuchi T, Imachi H, Murao K, Fujiwara M, Muraoka T, Kikuchi F, Nishiuchi Y, Kushida Y, Haba R, Ishida T. Co-existence of glucagonoma with recurrent insulinoma in a patient with multiple endocrine neoplasia-type 1 (MEN-1). *Endocrine* (査読有り)
3. Murao K, Imachi H, Yu X, Muraoka T, Hosomi N, Dobashi H, Ishida T. The transcriptional factor PREB mediates MCP-1 transcription induced by cytokines in human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* (査読有り)
4. Murao K, Li J, Imachi H, Muraoka T, Masugata H, Zhang GX, Kobayashi R, Ishida T, Tokumitsu H. Exendin-4 regulates Glucokinase expression via CaMKK/CaMKIV pathway in pancreatic  $\beta$  cell line. *Diabetes Obesity & Metabolism* (査読有り)
5. Imachi H, Murao K, Ohtsuka S, Fujiwara M, Muraoka T, Hosokawa H, Ishida T. A case of Dunnigan-type familial partial lipodystrophy (FPLD) due to lamin A/C (LMNA) mutations complicated by end-stage renal disease. *Endocrine*. 35:18-21, 2009 (査読有り)
6. Nishiuchi T, Imachi H, Fujiwara M, Murao K, Onishi H, Kiguchi T, Takimoto H, Kushida Y, Haba R, Ishida T. A case of non-Hodgkin's lymphoma primary arising in both adrenal glands associated with adrenal failure. *Endocrine*. 35:34-37, 2009 (査読有り)
7. Fujiwara M, Imachi H, Murao K, Muraoka T, Ohyama T, Miyai Y, Kushida Y, Haba R, Kakehi Y, Ishida T. Improvement in renal dysfunction and symptoms after laparoscopic adrenalectomy in a patient with pheochromocytoma complicated by renal dysfunction. *Endocrine*. 35:57-62, 2009 (査読有り)
8. Zhang GX, Kimura S, Murao K, Shimizu J, Matsuyoshi H, Takaki M. Role of neuronal NO synthase in regulating vascular superoxide levels and mitogen-activated protein kinase phosphorylation. *Cardiovasc Res*. 81:389-399, 2009 (査読有り)
9. Ahmed RAM, Murao K, Imachi H, Yoshida K, Dobashi H, Hosomi N, Ishida T. c-Jun N-terminal kinases inhibitor suppresses the TNF- $\alpha$  induced MCP-1 expression in human umbilical vein endothelial cells. *Endocrine*. 35:184-188, 2009 (査読有り)
10. Ahmed RAM, Murao K, Imachi H, Yu X, Li J, Wong NCW, Ishida T. Human scavenger receptor class type B1 is regulated by activators of peroxisome proliferators-activated receptor- $\gamma$  in hepatocytes. *Endocrine*. 35:233-242, 2009 (査読有り)
11. Masugata H, Senda S, Goda F, Yamagami A, Okuyama H, Kohno T, Hosomi N, Yukiiri K, Noma T, Kiyomoto H, Murao K, Nishiyama A, Kohno M. Tissue Doppler echocardiography for predicting arterial stiffness assessed by cardio-ankle vascular index. *Tohoku J Exp Med*. 217:139-146, 2009. (査読有り)
12. Masugata H, Senda S, Goda F, Yamagami A, Okuyama H, Kohno T, Hosomi N, Yukiiri K, Noma T, Murao K, Kohno M, Itoh S. Decline of plasma brain natriuretic peptide during enzyme replacement therapy in a female patient with heterozygous Fabry's disease. *Tohoku J Exp Med*. 217:169-174, 2009 (査読有り)
13. Murao K, Yu X, Imachi H, Cao WM, Chen K, Matsumoto K, Nishiuchi T, Wong NC, Ishida T. Hyperglycemia suppresses hepatic scavenger

receptor class B type I expression.  
*Am J Physiol Endocrinol Metab.* 294:E78-87,  
2008 (査読有り)

14. Murao K, Imachi H, Yu X, Cao WM, Nishiuchi T, Chen K, Li J, Ahmed RA, Wong NC, Ishida T. Interferon- $\alpha$  decreases expression of human scavenger receptor class BI, possible HCV receptor in hepatocytes.  
*Gut.* 57:664-671, 2008 (査読有り)

15. Matsumoto K, Murao K, Imachi H, Nishiuchi T, Cao WM, Yu X, Li J, Ahmed RA, Iwama H, Kobayashi R, Tokumitsu H, Ishida T. The Role of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Cascade on MIP-1 $\alpha$  Gene Expression of ATL Cells.  
*Experimental Hematology.* 36:390-400, 2008 (査読有り)

16. Murao K, Imachi H, Muraoka T, Fujiwaha M, Kushida Y, Haba R, Ishida T. Isolated follicle-stimulating hormone (FSH) deficiency without mutation of the FSH $\beta$  gene and successful treatment with human menopausal gonadotropin.  
*Fertil Steril.* 90:2012.e17-9, 2008 (査読有り)

17. Iwama H, Hori Y, Matsumoto K, Murao K, Ishida T. ReAlignerV: web-based genomic alignment tool with high specificity and robustness estimated by species-specific insertion sequences.  
*BMC Bioinformatics.* 9:112-116, 2008 (査読有り)

18. Muraoka T, Murao K, Imachi H, Yu X, Li J, Wong NC, Ishida T. PREB regulates transcription of pancreatic glucokinase in response to glucose and cAMP  
*J Cell Mol Med.* Aug 9, 2008 [Epub ahead of print] (査読有り)

19. Murao K, Imachi H, Yu X, Cao WM, Muraoka T, Dobashi H, Hosomi N, Haba R, Iwama H, Ishida T. The transcriptional factor prolactin regulatory element-binding protein mediates the gene transcription of adrenal scavenger receptor class BI via cAMP.  
*Endocrinology.* 149:6103-6112, 2008 (査読有り)

20. Imachi H, Murao K, Cao WM, Muraoka T, Nishiuchi T, Dobashi H, Hosomi N, Iwama H, Ishida T. The prolactin regulatory element-binding regulates the of 11-hydroxylase gene.

*Biochem Biophys Res Commun.* 376:531-535,  
2008 (査読有り)

他

[学会発表] (計 35 件)

1. 藤原真子、井町仁美、村尾孝児、村岡都美江、串田吉生、羽場礼次、石田俊彦: 根治手術後にミトタン少量投与を開始した副腎皮質癌の1症例。  
第8回日本内分泌学会四国支部学術集会、2008年9月20日、高松

2. 村岡都美江、藤原真子、村尾孝児、井町仁美、菊池史、吉本卓生、祖父江理、原大雅、門田球一、串田吉生、田岡利宜也、杉元幹史、清元秀泰、羽場礼次、笈善行、石田俊彦:  $^{131}\text{I}$ -MIBGシンチ・FDG-PET陽性の副腎皮質腫瘍の1例。第8回日本内分泌学会四国支部学術集会、2008年9月20日、高松

3. 村尾孝児、井町仁美、村岡都美江、西内崇将、藤原真子、土橋浩章、石田俊彦: 胸腺ナース細胞から副甲状腺細胞への分化誘導の試み。  
第8回日本内分泌学会四国支部学術集会、2008年9月20日、高松

4. 菊池史、村岡都美江、藤原真子、村尾孝児、井町仁美、島村美恵子、出口一志、正木勉、石田俊彦: 遅発型糖原病II型の1症例。  
第8回日本内分泌学会四国支部学術集会、2008年9月20日、高松

5. 井町仁美、菊池史、村尾孝児、村岡都美江、藤原真子、吉本卓生、森信博、田中宏和、石田俊彦: 抗GAD抗体陽性の妊娠糖尿病の一例。  
第8回日本内分泌学会四国支部学術集会、2008年9月20日、高松

6. 村尾孝児、井町仁美、村岡都美江、石田俊彦: 脂肪細胞アデポネクチン発現におけるHDL受容体の役割。  
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

7. 井町仁美、村尾孝児、村岡都美江、藤原真子、菊池史、石田俊彦: 血管内皮細胞において酸化LDLはHDL受容体発現を抑制する。  
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

8. 村岡都美江、村尾孝児、井町仁美、藤原真子、菊池史、石田俊彦: INS-1細胞においてExenatideの作用にIslet-brain 1 (IB1)が関与する。

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

9. 西内崇将, 村尾孝児, 井町仁美, 北中則子, 村岡都美江, 西内由紀子, 松本謙介, 石田俊彦: エリスロポイエチンのHEL細胞におけるHDL受容体CLA-1発現に及ぼす影響と作用について.

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

10. 村尾孝児, 井町仁美, 村岡都美江, 北中則子, 西内崇将, 石田俊彦: 転写因子PREBは血管平滑筋細胞におけるABC-A1遺伝子発現を増強する.

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

11. 村尾孝児: 研究奨励賞受賞講演: High-density lipoprotein (HDL) 受容体 (scavenger receptor class BI/CLA-1) の同定および臨床的機能解析

第81回 日本内分泌学会学術総会、平成20年5月18日、青森

12. 李軍華, 井町仁美, 村尾孝児, 石田俊彦: PREB、プロラクチン調節配列結合タンパク質は3T3-L1細胞におけるcAMP媒介アディポネクチン遺伝子発現に関与する (PREB, prolactin regulatory element binding protein is involved in cAMP-mediated adiponectin gene expression in 3T3-L1 cells).

第81回日本内分泌学会学術総会、2008年5月16-18日、青森

13. 村岡都美江, 村尾孝児, 井町仁美, 藤原真子, 菊池史, 石田俊彦: INS-1細胞においてExenatideの作用にIslet-brain 1 (IB1) が関与する.

第81回日本内分泌学会学術総会、2008年5月16-18日、青森

14. 井町仁美, 村尾孝児, 村岡都美江, 藤原真子, 石田俊彦: 酸化LDLによるHDL受容体発現調節について.

第81回日本内分泌学会学術総会、2008年5月16-18日、青森

15. 藤原真子, 井町仁美, 村尾孝児, 田岡利宜也, 杉元幹史, 竹林隆介, 出石邦彦, 筒井邦彦, 坂東健次, 羽場礼次, 村岡都美江, 菊池史, 笈善行, 鈴木康之, 石田俊彦: 家族性褐色細胞腫の一例.

第81回日本内分泌学会学術総会、2008年5月16-18日、青森

16. Rania Ahmed, 村尾孝児, 井町仁美, 村岡都美江, 石田俊彦: チアゾリジンジオンはhepG2細胞においてヒトスカベンジャー受容体クラスBタイプI (SR-BI) 発現を増強する

(Thiazolidinedione increase the expression of human scavenger receptor class B type I (SR-BI) in hepG2 cells.

第81回日本内分泌学会学術総会、2008年5月16-18日、青森

17. 村尾孝児, 井町仁美, 村岡都美江, 北中則子, 李軍華, 藤原真子, 陳可, Rania A.M. Ahmed, 石田俊彦: 血管内皮細胞におけるHDL受容体SR-BI/CLA-1を介するeNOSの活性化に与える代謝性因子の影響.

第9回糖尿病合併症とVascular Biology研究会、2008年3月1日、東京

他

〔図書〕 (計 1 件)

村尾孝児、井町仁美、村岡都美江、石田俊彦: 診断と治療社、糖尿病学の進歩 2008 83-87、2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 俊彦 (ISHIDA, TOSHIHIKO)

香川大学・医学部・教授

研究者番号: 50159737

(2) 研究分担者

村尾 孝児 (MURAO, KOJI)

香川大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 20291982

徳光 浩 (TOKUMITSU, HIROSHI)

香川大学・医学部・准教授

研究者番号: 20237077

井町仁美 (IMACHI, HITOMI)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 80380187