

令和 4 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08988

研究課題名(和文) 膵細胞、細胞のidentityの維持におけるFCoRとFoxo1の協調的関与

研究課題名(英文) FCoR-Foxo1 Axis Regulates alpha-cell and beta-cell identity

研究代表者

小谷 紀子(Kodani, Noriko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師(非常勤)

研究者番号：50625332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Foxo1結合蛋白として同定されたFoxoCoRepressor(FCoR)は、アセチル化を介してFoxo1の活性を抑制する。FCoRは膵細胞への分化に関わるArxの発現をプロモータ領域のメチル化を介して抑制することで、膵細胞量を制御することを認めた。一方で、Foxo1はArxのプロモータ領域に結合し、Arxの発現を促進した。Fcork0では膵細胞から細胞へのconversionを認め、FCoRは膵細胞の維持に必要であることが示唆された。本研究により、膵島におけるFCoR-Foxo1 axisが膵細胞、膵細胞のidentityおよび細胞量の制御に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵内分泌前駆細胞が膵細胞および細胞へ分化を遂げる過程は厳密にコントロールされており、多くの転写因子が関与する。Foxo1は様々なインスリン感受性臓器において非常に多くの遺伝子の転写活性を制御する。これを可能にしているのが臓器毎に働くFoxo1結合タンパク質であり、FCoRは膵島においてFoxo1結合蛋白として同定された初めてのタンパク質である。したがって、FCoR-Foxo1 axisによる糖代謝の機能解析を行うことにより、糖代謝機構を明らかにしていくことで、糖尿病の病態解明につながる新たな知見を得ることができると考える。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic endocrine cell development into differentiated a- and b-cells is highly regulated and involves multiple transcription factors. However, the mechanisms behind the determination of a- and b-cell masses remain unclear. We have previously shown that Foxo1 CoRepressor (FCoR) inhibits Foxo1 activity by acetylation. Here we show that FCoR regulates the master a-cell regulatory transcription factor, Aristaless related homeobox (Arx), by DNA methylation and controls a-cell mass from the embryonic phase. Fcork0 mouse exhibited b-to-a-cell conversion, suggesting that FCoR is also required to maintain b-cell. Our findings suggest that the FCoR-Foxo1 axis regulates pancreatic a-cell and b-cell identity.

研究分野：Diabetes, endocrinology and metabolism

キーワード：Pancreatic islets Transcription factor DNA methylation

## 1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病ではグルカゴン分泌の亢進、細胞量の増加を認めることが報告されているが、そのメカニズムは解明されていない。膵島における膵細胞、細胞の identity の維持の分子メカニズムを知ることは、糖尿病の病態生理を理解し、新しい治療方法を探索していく上で重要である。

転写因子 Foxo1 は膵臓をはじめとして、肝臓、骨格筋、脂肪細胞、視床下部そして腸管内分泌細胞のさまざまなインスリン感受性臓器において糖・エネルギー代謝に重要な役割を担う。Foxo1 は種を超えて高度に保存されており、Foxo1 の生理的役割の重要性が示唆される。膵臓では、細胞増殖を抑制、インスリン分泌抑制に関与する一方で、細胞保護作用を有している。Foxo1 は細胞の identity の維持に必要であり、Foxo1 非存在下では高血糖や酸化ストレスなどの条件下で dedifferentiation や transdifferentiation が起きること<sup>1)</sup>、また、胎生期の Foxo1 の働きがその後の細胞機能に影響することなどが報告されている<sup>2)</sup>。Foxo1 の機能障害と2型糖尿病の関連が示唆されているが、その分子メカニズムについてはまだ十分に解明されていない。膵細胞、細胞の“plasticity”についても多くの議論がなされており、膵島細胞の identity 維持のためメカニズムの解明が必要である。

当研究室では新規タンパク質である Foxo1Corepressor (FCoR)を同定しており、FCoR が Foxo1 のアセチル化を介してその活性を抑制することを報告している<sup>3)</sup>。したがって、膵島における糖代謝調節に FCoR と Foxo1 の働きがどのように寄与しているかという点に注目した機能解析は、これまで報告されている Foxo1 が関与する糖代謝、エネルギー代謝機構に新たな知見を加えることが出来ると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、膵細胞および細胞量の調節、インスリンおよびグルカゴン分泌の分子メカニズム機構について明らかにし、糖尿病の発症機序の解明および新たな治療法の探索につなげることを目的とする。

高脂肪食下のマウス、レプチン受容体欠損マウスでは、膵島の蛍光免疫染色により FCoR の発現低下を認め、FCoR は糖尿病の病態に深く関与していると考えられた。これまでの解析により FcorKO では耐糖能異常、インスリン抵抗性、インスリン分泌低下およびグルカゴン分泌亢進、そして細胞量の増加を認めた。また、FcorKO では、細胞への分化にかかわる Aristaless-related homeobox(Arx)の発現が上昇することを認めた。膵細胞は膵島に占める細胞量が少ないこともあり未解明のことがまだ多い。そこで、本研究において細胞への分化にかかわる Arx の発現調節および膵細胞量の調節機構の解明を、FCoR-Foxo1 axis の関与を軸に、明らかにすることを目的とする。また、FcorKO においてインスリン分泌低下をみとめており、膵細胞における FCoR-Foxo1 axis の関与についても機能解析を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) FCoR と Foxo1 による Arx の発現調節の epigenetics の解明

#### DNA メチル化酵素、脱メチル化酵素の関与

FCoR は、Arx の UR2 プロモータ領域のメチル化を亢進し Arx の発現を抑制し、その一方で Foxo1 はメチル化を抑制し Arx の発現を亢進する。これまで Foxo1 がメチル化に関与するという報告はない。この機序解明のために、DNA メチル化酵素 Dnmt および脱メチル化酵素 Tet の関与を調べる。細胞系の TC および細胞系の Min6 の培養細胞、およびノックアウトマウス (FcorKO、細胞特異的 Foxo1KO) を用いて、各酵素の発現、Arx プロモータ領域への

タンパク結合について解析する。

#### ヒストン H3 のメチル化の関与

Arx の UR2 領域ではヒストン H3K9 のメチル化により高次クロマチン構造が形成され転写は抑制される。また、H3R2 のメチル化は転写抑制、H3K4 のメチル化は転写活性化に働くことが報告されている<sup>4)</sup>。Arx の転写調節においてヒストン H3 のメチル化の関与を調べるために、FCoR および Foxo1 を培養細胞 Min6 および TC において knockdown、あるいは overexpression した系を作製し、ヒストンメチル化の変化を ChIP assay により調べる。

#### (2) FCoR と Foxo1 による 細胞維持機構の解明

これまでに、FcorKO の膵島の蛍光免疫染色において Foxo1 の核内移行を認め、FCoR 非存在下における Foxo1 の活性化が示唆され、単離膵島において FCoR が Foxo1 のアセチル化に関与することを確認した<sup>5)</sup>。FCoR が Foxo1 の活性を fine-tuning することで糖代謝をコントロールしている可能性について検討する。FcorKO における耐糖能およびインスリン分泌の低下は、細胞特異的 Foxo1KO との double knockout mouse (DKO) ではさらに増悪した<sup>5)</sup>。FcorKO において Foxo1 の活性亢進を認めるのであれば、FcorKO では Foxo1 は膵 細胞保護に働き、DKO では Foxo1 によるこの膵 細胞保護の作用を失うため耐糖能が悪化した、という仮説が立てられる。また、FcorKO において 細胞から 細胞への conversion を認めている。つまり、FCoR および Foxo1 はともに 細胞機能の維持に必要であることが示唆される。この仮説を証明するために、培養細胞 TC および Min6、また、FcorKO、細胞特異的 Foxo1KO、および DKO のノックアウトマウスを用いて、細胞機能の維持に関与する transcriptome の変化を調べ、FCoR および Foxo1 との関係を解析する。

#### (3) FCoR と Foxo1 による胎生期の膵 細胞、 細胞への分化調節の検討

胎児の蛍光免疫染色では、FCoR は e14.5 頃よりインスリン陽性細胞およびグルカゴン陽性細胞において発現を認めた<sup>5)</sup>。そして、FcorKO では胎生期(e15.5)から Arx 陽性細胞の増加を認めており、FCoR による Arx の発現調節を介した 細胞量の調節は胎生期から始まっていることが示された。細胞特異的 Foxo1KO は明らかな表現型を示さないが、膵前駆細胞特異的 Foxo1KO では 細胞量の増加が報告されている<sup>1)</sup>。そこで、胎生期の分化の過程において膵 細胞、 細胞の分化 調整に FCoR と Foxo1 が協調的に関与する可能性を検討する。FcorKO、膵前駆細胞特異的 FCoR 過剰発現および 細胞特異的 FCoR 過剰発現の transgenic mouse を用いて、胎生期の内分泌前駆細胞の過程から時間経過を追って Foxo1 の発現と局在、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチンおよび PP 陽性細胞の分布、分化に関わる転写因子の発現の変化 (Arx、Pax4、Ngn3、Nkx2.2 等) を蛍光免疫染色により検討する。

## 4. 研究成果

### (1) FCoR と Foxo1 による Arx の発現調節の epigenetics の解明

FCoR は胎生期よりインスリン陽性細胞およびグルカゴン陽性細胞において発現を認めた。Fcor ノックアウトマウス (FcorKO) では糖代謝異常、グルカゴン分泌の亢進そして膵 細胞量の増加を認め、細胞への分化を誘導する転写因子である *Aristaless-related homeobox (Arx)* 遺伝子の発現が有意に上昇した。FcorKO の 細胞特異的に FCoR を過剰発現した FcorKO-Fcor では糖代謝は正常化し、細胞量および Arx 発現量も正常化を認めた。さらに、FcorKO では、膵 細胞から 細胞への変換を認めた。これより、FCoR は Arx の発現を制御することで 細胞量を調整し、FCoR が膵 細胞の維持に必要であることが示唆された。細胞量は胎生 17.5 日より、Arx 陽性細胞は胎生 15.5 日より増加することを認めたことから、FCoR は膵内分泌細胞の分化の過程から Arx の発現および 細胞量の調整に関与することが示唆された。

Arx の発現はプロモータ領域のメチル化によって抑制される。FcorKO では Arx プロモータ領域のメチル化は減少し、細胞特異的 Foxo1 KO では Arx プロモータ領域のメチル化は増加

した(図1)。また、*FcorKO* の細胞特異的に *Foxo1* を knockout したマウス(*DKO*)では、*FcorKO* と比較して、*Arx* プロモータ領域の UR2 region のメチル化は増加し、*Arx* の発現は低下、細胞量の有意な減少を認めた(図1)。膵細胞の *Arx* プロモータ領域には転写抑制因子複合体が結合し、*Arx* の発現を抑制する。*FcorKO* では *Foxo1* は *Arx* プロモータ領域の UR2 region に結合し、転写抑制因子複合体の一つである DNA methyltransferase 3a (*Dnmt3a*)の結合を阻害することを認めた。これより *FcorKO* では *Dnmt3a* が DNA から解離することにより、プロモータ領域のメチル化が減少し、*Arx* の発現が誘導されることが示唆された。

単離膵島において *FcorKO* ではアセチル化 *Foxo1* の減少を認めた(図2)。アセチル化 *Foxo1* は核内で非活性型として存在しており、脱アセチル化されることで活性型となる。つまり、FCoR 非存在下では脱アセチル化した *Foxo1* が活性型として核内で *Arx* の発現を誘導する可能性が考えられる。

図1 Methylation of UR2 region

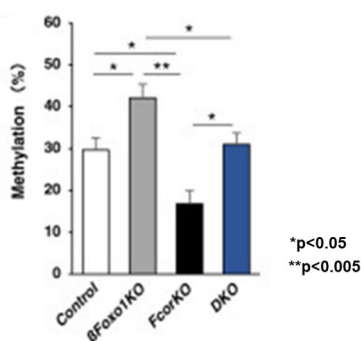
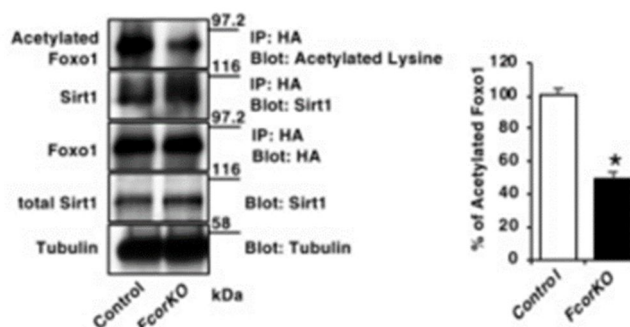
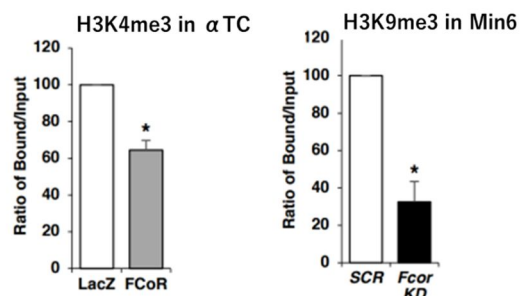


図2 *FcorKO* マウスの単離膵島における *Foxo1* のアセチル化



DNA のメチル化には、ヒストン修飾の関与がある。したがって *Arx* プロモータ領域のヒストンのメチル化について、H3K4me3 抗体および H3K9me3 抗体を用いて ChIP assay を行った(図3)。FCoR を培養細胞 TC において過剰発現すると、*Arx* の発現の活性化に働くヒストンのメチル化(H3K4me3)の減少を認めた。一方で培養細胞 Min6 において *Fcor* をノックダウンすると、発現の抑制に働くヒストンのメチル化(H3K9me3)が減少することを確認した。

図3 *Arx* プロモータ領域のヒストンメチル化



以上のことから、FCoR は *Arx* プロモータ領域の UR2 region の DNA メチル化を促進し、クロマチン構造を閉じることにより、*Arx* の発現を抑制することが分かった。FCoR 非存在下では、*Foxo1* が UR2 region に結合し、DNA メチル化は抑制され、クロマチン構造が開くことで *Arx* の発現が促進されることが分かった。したがって、FCoR と *Foxo1* は協調して *Arx* の発現を調整することが示唆された。

## (2) FCoR と *Foxo1* による 細胞維持機構の解明

-cell lineage tracing を行うために、RIP-Cre:EGFP を導入した *FcorKO* マウス(24週齢)を作製した。共焦点顕微鏡(Olympus Fluoview FV3000)で観察した蛍光染色像の z-stack を 3D 再構築した結果を示す(図4)。EGFP とグルカゴンで共染色される細胞を認め、膵細胞からグルカゴン陽性細胞への conversion が起きていることが示唆された。また、*FcorKO* ではインスリンとグルカゴンで共染色される細胞を認めた(図4)。

FCoR を過剰発現させた TC 細胞では、Pax4、MafA、Ins の発現上昇を認め、Min6 において Fcor ノックダウンした細胞では Pax4、MafA、Ins の発現低下を認めた (図 5)。これより、FCoR は Arx の発現を制し、Pax4 をはじめとする 細胞特異的遺伝子の発現を促進しており、FCoR は 細胞の維持に必要であることが示唆された。

図 4 FcorKO における Lineage tracing

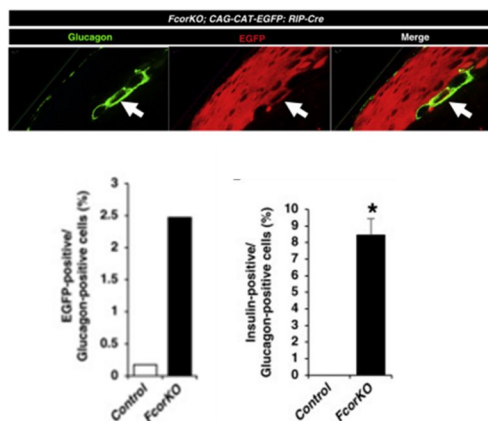
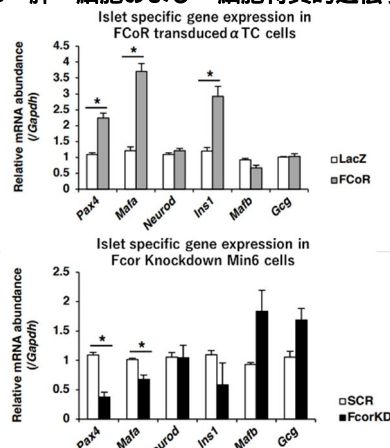


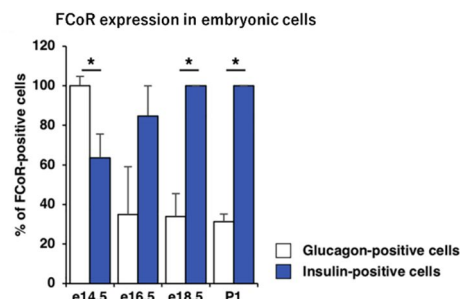
図 5 膵 細胞および 細胞特異的遺伝子発現



### (3) FCoR と Foxo1 による胎生期の膵 細胞、 細胞への分化調節の検討

FCoR は胎生 14.5 日よりインスリンおよびグルカゴン陽性細胞でその発現を認め、次第にグルカゴン陽性細胞での発現は減少し、胎生 18.5 日にはすべてのインスリン陽性細胞において発現を認めるようになる (図 6)。FCoR は neurogenin3 (Ngn3) 陽性細胞において発現を認めないことから、内分泌前駆細胞以降の分化の過程に関与することが示唆された。

図 6 胎生期における FCoR の発現



膵前駆細胞特異的 FCoR 過剰発現および 細胞特異的 FCoR 過剰発現の transgenic mouse を用いた胎生期の解析については、結果を出すに至らなかったため、今後進めていく。

本研究では、Foxo1 が、FCoR と協調して、Arx の発現を調整し、膵 細胞および 細胞の identity の維持に関与しており、また、FCoR が膵 細胞の維持に必要であることが分かった。インスリン感受性臓器において重要な働きを持つ転写因子 Foxo1 の働きは複雑であり、まだ解明されていないことは多い。FCoR の解析を進めることは、Foxo1 を介したエネルギー代謝調節機構の解明に貢献すると考える。

### < 引用文献 >

- 1) Talchai, C. et al., Pancreatic beta cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic beta cell failure. *Cell* 150, 1223-1234 (2012).
- 2) Talchai, S. C. & Accili, D. Legacy Effect of Foxo1 in Pancreatic Endocrine Progenitors on Adult beta-Cell Mass and Function. *Diabetes* 64, 2868-2879 (2015).
- 3) Nakae, J. et al. Novel repressor regulates insulin sensitivity through interaction with Foxo1. *EMBO J* 31, 2275-2295, (2012)
- 4) Dhawan, S. et al., Pancreatic beta cell identity is maintained by DNA methylation mediated repression of Arx. *Dev Cell.* 20, 419-429 (2011)
- 5) Kodani N, Nakae J, Kobayashi M, Kikuchi O, Kitamura T, Itoh H. FCoR-Foxo1 Axis Regulates -Cell Mass through Repression of Arx Expression. *iScience.* 24;23(1):100798. (2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kodani Noriko, Nakae Jun, Kobayashi Masaki, Kikuchi Osamu, Kitamura Tadahiro, Itoh Hiroshi	4. 巻 23
2. 論文標題 FCoR-Foxo1 Axis Regulates -Cell Mass through Repression of Arx Expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2019.100798	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kodani Noriko, Nakae Jun	4. 巻 9
2. 論文標題 Tissue-Specific Metabolic Regulation of FOXO-Binding Protein: FOXO Does Not Act Alone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells9030702	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Noriko Kodani
2. 発表標題 Foxo1-CoFRepressor (FCoR) Regulates Pancreatic Alpha- And Beta-cell Identity by both DNA and Histone methylation
3. 学会等名 第79回アメリカ糖尿病学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	中江 淳  (Nakae Jun)  (00344573)	国際医療福祉大学・医学部・教授    (32206)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------