

平成 22 年 4 月 5 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790644

研究課題名 (和文) 甲状腺ホルモン受容体を介した膵臓 β 細胞増殖メカニズムの解析研究課題名 (英文) Liganded-thyroid hormone receptor- α enhances proliferation of pancreatic β -cells

研究代表者

古屋 文彦 (FURUYA FUMIHIKO)

山梨大学・医学部附属病院・診療助教

研究者番号：90456450

研究成果の概要 (和文)：

我々は器官形成期に、胎児膵臓において甲状腺ホルモン受容体が高容量発現していることを報告してきた。膵 β 細胞に、甲状腺ホルモン受容体発現アデノウイルスベクターを用い甲状腺ホルモン受容体を強制発現させ、30nM T3 を負荷したところ BrdU assay において細胞周期・細胞増殖の進展が見られ、cyclinD1 の発現の増加がみられていた。また、siRNA を用いて cyclin D1 の発現を阻害したところ、甲状腺ホルモン受容体を介した膵 β 細胞の細胞周期・細胞増殖の進展は見られなかった。

研究成果の概要 (英文)：

Lineage tracing studies indicate that replication of existing beta-cells is important for beta-cell proliferation in adult animals. In rat pancreatic beta-cell lines (RIN5F), treatment with 100 nM of thyroid hormone (T3) enhances cell proliferation. This result suggests that T3 is required for beta-cell proliferation or replication.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：膵臓，糖尿病，再生医療，核内ホルモン受容体，甲状腺ホルモン

1. 研究開始当初の背景

甲状腺ホルモン受容体(TR)には α と β のサブユニットが存在する。TR β 遺伝子変異は甲状腺ホルモンに対する反応性が著しく低下する甲状腺ホルモン不応症の病態を呈する。我々はRTH患者家系から同定されたTR β 遺伝子の点変異を Cre-LoxP system を用い遺伝子導入した変異 TR β (β PV) マウス，変異 TR α (α PV) マウスを作成し， β PV マウスにおいて甲状腺濾胞癌の発癌や，PI3K 経路の活性化が誘導されることを報告してきた。さらに， α PV マウスでは PPAR γ 発現の低下に伴い，褐色脂肪・白色脂肪の著しい形勢不全が見られた。また， β PV マウスでは甲状腺や肝臓において細胞周期制御因子の一つである PTTG の蛋白質レベルでの発現増加に伴い，細胞周期や細胞増殖に異常が見られた。このように dominant negative な TR 変異マウス (α PV および β PV マウス) において膵臓，肝臓などの臓器の形成異常が見られ，TR の中胚葉由来臓器の形成に対する影響の存在が考えられている。

2. 研究の目的

(1) TR 変異マウスにおける膵臓，肝臓器官形成の評価

TR 変異マウス (α PV, β PV マウス) における膵臓，肝臓の器官形成を，胎生期，月齢 3・7・11 において形態学的に評価する。胎生期

における膵管，内分泌，外分泌器官の形成過程について組織を採取し形態学的な評価を行う。またマウス膵臓における PI3K 経路下流の転写因子，細胞周期制御遺伝子の発現レベル及び活性化の変化についても経時的に評価する。

TR 変異マウス (α PV, β PV マウス) における血糖値，インスリン分泌能について月齢 3・7・11 において経時的に測定することで膵機能の評価を行う。

野生型マウス，TR α 変異マウス，TR β 変異マウスにおいて，これらの膵臓の形態変化，膵臓の外分泌機能および内分泌機能を比較検討することにより，TR α ，TR β のいずれかが主たる誘導因子として膵臓の器官形成に働いているかを確定することができる。

(2) TR が膵臓器官形成において果たす分化誘導因子としての分子生物学的機序の解明

膵臓の器官形成における TR の作用の機序を解明するために，膵 β 細胞由来の cell line である MIN6 細胞，RIN5F 細胞に対し，アデノウイルスベクターを用い野生型 TR (TR α ，TR β)，変異 TR (α PV, β PV) を強制発現させ，リガンド(T3)存在下，非存在下における細胞周期制御遺伝子の発現量の変化を定量

的 PCR (RT-PCR), Western blot を用いて解析する。更に野生型 TR, 変異 TR 遺伝子導入した MIN6 細胞, RIN5F 細胞においてリガンド(T3)存在下, 非存在下における細胞増殖能の変化, 細胞周期の変化, アポトーシス刺激に対する変化について FACS analysis, RT-PCR 法等を用いて検討する。また, 2つの野生型 TR と変異 TR を用いることで, 膵臓の細胞周期に対して甲状腺ホルモンの作用が TR α , TR β のいずれの受容体を介して行われているのかも解明される。

(3) 膵臓での転写因子 (ISL-1 および Pdx-1) と TR との蛋白-蛋白結合, およびインスリンプロモータ活性に対する相互関係

膵臓形成過程で重要な作用を有する転写因子 ISL-1, Pdx-1 の発現量は胎生期に最も多く, 器官形成期以後はその発現量が減少することが知られている。この発現調節については未だ不明な点が多い。また, ISL-1 については近年, 神経細胞における発現調節に TR と同じ内ホルモン受容体スーパーファミリーに属するエストロゲンホルモン受容体 (ER) との蛋白-蛋白結合が重要な作用を及ぼしていることが報告されている。

そこで, これらの転写因子と TR との蛋白結合, 転写因子蛋白の degradation に対する TR の作用について検討を行い, TR を介した ISL-1, Pdx-1 の発現量調節機構についてのメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 平成 20 年度

①TR 発現アデノウイルスベクターの作成

サイトメガロプロモータにより強制発現される野生型 TR α ・TR β , 変異 TR α ・TR β (α PV・ β PV) 発現アデノウイルスベクターを作

成した。これらのウイルスベクターを強制発現させ, リガンド(T3)存在下, 非存在下における細胞周期制御遺伝子の発現量の変化を定量的 PCR (RT-PCR), Western blot を用いて解析した。更に野生型 TR, 変異 TR 遺伝子導入した MIN6 細胞, RIN5F 細胞においてリガンド(T3)存在下, 非存在下における細胞増殖能の変化, 細胞周期の変化, アポトーシス刺激に対する変化について FACS analysis を用いて解析した。

②野生型マウス, 変異 TR 遺伝子導入マウスに用いた胎児期の膵臓, 肝臓形成過程の形態学的検討および遺伝子発現の検討

TR 変異マウス (α PV, β PV マウス) における膵臓, 肝臓の器官形成を胎児期, 月齢 3・7・11 において形態学的に評価する。胎児期における膵管, 内分泌, 外分泌器官の形成過程について組織を採取し形態学的な評価を行う。またマウス膵臓における TR 蛋白の発現レベル, PI3K 経路下流の転写因子(AKT, GSK, Foxo, Bad)蛋白, 細胞周期制御遺伝子 (PTTG, cyclinD1) 蛋白の発現レベル及び活性化の変化について, Western Blot 法, PI3K assay kit を用いて経時的に評価する。

③変異 TR 遺伝子導入マウスからの膵臓初期培養細胞の作成

上記 1) では, TR および変異 TR 強制発現下での, T3 の細胞周期に対する影響の検討を行う予定である。更に, 内因性の TR(endogenous TR)を介した T3 の細胞周期調節因子, 膵特異的転写因子発現レベルの変化に対する検討を行う。

(2)平成 21 年度

④TR と転写因子 (Pdx-1, ISL-1) との蛋白-蛋白結合, 相互関係の評価と分子生物学的意義についての検討

予備実験の段階であるが, 膵β細胞由来の RIN 細胞, MIN6 細胞では T3 を培養液に添加することで約 5 倍もの細胞増生が誘導される。一方, 同じ中胚葉由来臓器である肝臓由来の HepG2 細胞では, このような T3 を介した著しい細胞増殖の誘導は見られなかった。また, RT-PCR 法での内因性 TR (TR α , TR β) の mRNA の発現量はこれらの 3 つの培養細胞系においてほぼ同量であった。これらの事実は, TR を介した膵臓β細胞の細胞増殖調節に際して, 膵臓におけるその他の転写因子の関与が示唆される。転写因子の一つで, 膵β細胞の細胞増殖を誘導することが報告されている ISL-1 は核内ホルモン受容体 ER との蛋白-蛋白結合の存在が報告され, 運動神経分化への関与が報告されている。GST-pull down assay による *in vitro* レベルでの蛋白-蛋白結合についての検討, 共焦点顕微鏡, 免疫沈降法による *in vivo* レベルでの蛋白-蛋白相互関係についての検討を行っていく。Pdx-1, ISL-1, TR の相互関係, それぞれの転写因子の強制発現下での膵臓β細胞の細胞増殖能の変化についての検討を行った。

4. 研究成果

我々は RTH 患者家系から同定された TR β 遺伝子の点変異を Cre-LoxP system を用い遺伝子導入した変異 TR β (β PV) マウス, 変異 TR α (α PV) マウスを作成し, β PV マウスにおいて甲状腺濾胞癌の発癌や, PI3K 経路の活性化が誘導されることを報告してきた。さらに, α PV マウスでは PPAR γ 発現の低下に伴い, 褐色脂肪・白色脂肪

の著しい形勢不全が見られた。また, β PV マウスでは甲状腺や肝臓において細胞周期制御因子の一つである PTTG の蛋白質レベルでの発現増加に伴い, 細胞周期や細胞増殖に異常が見られた。このように dominant negative な TR 変異マウス (α PV および β PV マウス) において膵臓, 肝臓などの臓器の形成異常が見られ, TR の中胚葉由来臓器の形成に対する影響の存在が考えられている。

胎生期ラット膵臓β細胞において器官形成期に TR α mRNA が成人ラット膵臓とβ細胞と比較して 60 倍もの高容量発現していることを明らかにした。この事実は膵β細胞の増殖に TR が重要な役割を果たしている可能性を示唆するものであり, TR の膵β細胞への作用を検討する目的で TR 発現アデノウイルスベクター (AdTR) を作成し, 膵β細胞株 (RIN5F) に対し AdTR を感染させ TR の遺伝子導入を行った。BrdU assay による細胞増殖能の検討で, TR 導入膵β細胞では非導入細胞と比較して有意に細胞増殖能が誘導されていることが明らかになった。

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 2 件)

1. Fumihiko Furuya : Nongenomic activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling by thyroid hormone receptors. 74 (7) 628-634, Epub 2009. (査読有)
2. Fumihiko Furuya : Activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling promotes aberrant pituitary growth in a mouse model of thyroid-stimulating hormone-secreting pituitary tumors. 149(7) 3339-3345, Epub 2008. (査読

有)

[学会発表] (計 5 件)

1. 古屋 文彦 : Liganded-thyroid hormone receptor induces proliferation of pancreatic β -cells 国際内分泌学会 2010/3/20. 京都.
2. 古屋文彦, 志村浩己, 山下さやか, 遠藤登代志, 小林哲郎 : 甲状腺ホルモン受容体による膵 β 細胞増殖の誘導. 第52回日本甲状腺学会. 2009/11/4. 名古屋.
3. 古屋文彦, 本杉愛, 原口和貴, 高橋満彦, 今井亮, 小林みず江, 小林哲郎 : 外来糖尿病患者および透析糖尿病患者における CAVI(Cardio Ankle Vascular Index)・ABI・SPP・およびASOの危険因子の検討. 第54回(社)日本透析医学会学術集会. 2009/6/5.
4. 古屋文彦, 池岸幸信, 小林哲郎 : 副腎不全が原因と考えられる透析困難症がみられた糖尿病維持透析患者の1例. 第563回日本内科学会関東地方会. 東京都. 2009/06/13.
5. 古屋文彦, 志村浩己, 遠藤登代志, 小林哲郎 : 膵 β 細胞における, 甲状腺ホルモン受容体 α による細胞周期進展と細胞増殖活性化の誘導. 第51回日本甲状腺学会. 栃木県. 2008/11/22.

6. 研究組織

(1)研究代表者

古屋 文彦 (FURUYA FUMIHIKO)

山梨大学・医学部附属病院・診療助教

研究者番号 : 90456450

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

