

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 16 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390276

研究課題名（和文）膵 α 細胞における FoxO1 と ATF3 の役割～高血糖との関わり の 解 明 ～

研究課題名（英文）The roles of FoxO1 and ATF3 in pancreatic alpha cells

研究代表者

北村 忠弘 (KITAMURA TADAHIRO)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：20447262

研究成果の概要（和文）：

2型糖尿病では、食後のインスリン分泌の増加が障害されるとともに、グルカゴン分泌の抑制も障害されている (Muller WA et al. N Engl J Med 1970)。しかしながら、後者のメカニズムに関しては良く分かっていない。申請者はグルカゴン遺伝子の転写を調節する転写因子 ATF3 と FoxO1 に注目し、主に *in vivo* の解析を行った。まず、Glucagon-cre マウスと ATF3 flox マウス、あるいは FoxO1 flox マウスを交配し、それぞれ α 細胞特異的 ATF3 ノックアウトマウス (aATF3 KO) と α 細胞特異的 FoxO1 ノックアウトマウス (aFoxO1 KO) の作製を試みた。しかしながらこれらのマウスの空腹時血糖値、随時血糖値に異常は認められず、血中グルカゴン濃度も正常であった。また、糖負荷試験やインスリン耐性試験においてもコントロール群と有意差がなかった。そこで、組織免疫染色と定量 RT-PCR 法を用いて α 細胞における ATF3 や FoxO1 のノックアウト効率を調べたが、効率は 50%以下であった。そこで、aATF3 KO と aFoxO1 KO の解析は諦め、代わりに慶応大学の中江博士から御供与頂いた Rosa26-flox-stop-flox-FoxO1 マウスと Glucagon-cre マウスを交配し、 α 細胞特異的 FoxO1 ノックインマウスを作製した。このマウスでは血中のグルカゴン値が上昇しており、空腹時血糖に変化はないが随時血糖が有意に高値を示した。また、耐糖能も有意に悪化していた。従って、 α 細胞における FoxO1 がグルカゴン遺伝子転写調節を介して、全身の糖代謝調節に関わっている可能性が *in vivo* でも証明された。一方、ATF3 に関しては Pdx1-cre マウスと交配することで、膵臓と視床下部で ATF3 がノックアウトされるマウスを作成した。このマウスは摂食量の低下とエネルギー消費の亢進から体重が痩せ、その影響でインスリン感受性が高まって耐糖能が改善したが、膵臓においては β 細胞、 α 細胞共に形態学的にも機能的にも変化が認められなかった。従って、 α 細胞機能における ATF3 の寄与は少ないと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

It has been known that type 2 diabetes is caused by not only the dysfunction of pancreatic beta cells but also the dysfunction of alpha cells. However, it is still unclear how alpha cell dysfunction occurs. Previous studies revealed that transcription factor FoxO1 and ATF3 regulates proglucagon promoter activity. Therefore we attempted in this study to elucidate the physiological roles of FoxO1 and ATF3 in pancreatic alpha cells by generating alpha cell specific FoxO1 or ATF3 knockout mice. However, due to the low efficiency of cre expression in alpha cells, we couldn't see any metabolic phenotype in these mice. So, we next generated alpha cell specific FoxO1 knockin (a-FoxO1 KI) mice by using Rosa26 system. In this system, upon cre expression, stop cassette removed and then FoxO1 expression is induced by endogenous Rosa26 promoter. We confirmed alpha cell-specific expression of FoxO1 in these mice. Interestingly a-FoxO1 KI mice showed higher fed blood glucose levels than control mice, which was accompanied with higher plasma glucagon levels. Glucose tolerance test showed impaired glucose tolerance in these mice. We concluded that FoxO1 is a key regulator of glucagon gene expression in alpha cells and contribute to the regulation of glucose metabolism *in vivo*. On the other hand,

with respect to ATF3, we crossed ATF3 flox mice with Pdx1-cre mice, in which cre is expressed in both pancreas and hypothalamus, and generate pancreas- and hypothalamus-specific ATF3 knockout mice (PHT-ATF3-KO). We found that PHT-ATF3-KO mice lean due to decreased food intake and increased energy expenditure, which leads to increased insulin sensitivity and better glucose tolerance. We also revealed that hypothalamic ATF3 regulates *Agrp* transcription via interacting with FoxO1 on the *Agrp* promoter. Therefore, ATF3 in the hypothalamus plays an important role in the regulation of glucose and energy metabolism. However, we couldn't see any change in plasma glucagon and plasma insulin levels. Also, there was no change in glucose responsive glucagon or insulin secretion from islets isolated from PHT-ATF3-KO mice. Furthermore, there was no difference in beta cell mass and alpha cell mass in these mice compared to the control mice. Therefore, we concluded that the physiological role of ATF3 in pancreas is not so significant.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：代謝学、内分泌学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：糖尿病、転写因子

1. 研究開始当初の背景

現在、我が国における糖尿病患者数は、800万人に達する勢いで増加中である。従って、糖尿病に対する新しい治療法の開発が、医学研究者にとって急務となっている。これまで、糖尿病研究者の多くは、2型糖尿病に伴う膵β細胞障害（インスリン分泌障害）に着目し、その分子機序の解明と、β細胞障害を改善する薬剤の開発に力を注いできた。実際、現在の糖尿病薬の多くは、β細胞に作用する薬剤である。しかしながら、2型糖尿病では、α細胞におけるグルカゴン分泌抑制の障害も認められる。通常、食後には、グルカゴン分泌が低下するが、2型糖尿病では、この低下反応が障害されている (Muller WA et al, N Engl J Med, 1970)。一方、ごく最近、Kawamoriらは、α細胞特異的インスリン受容体ノックアウトマウスが、食後の血清グルカゴン値の上昇と食後高血糖を呈することを示し、α細胞におけるインスリン抵抗性が、食後のグルカゴン分泌抑制の障害に関与することを明らかにした (Kawamori et al, ADA abstract #131, 2008)。FoxO1はインスリンシグナルの下流で制御される転写因子であり、グルカゴン分泌抑制障害に関わっている可能性が示唆される。

一方、グルカゴン遺伝子の転写は、古典的には、PKAがグルカゴンプロモーターのCRE(cAMP responsive element)を介して調節することが知られている。その後、Pax6、FoxA2、Brn4などの転写因子もグルカゴンプロモーターを調節することが報告されたが、これらの転写因子は、基本的には、グルコースやインスリンによる調節を受けない。ATF3はATF/CREBファミリーに属する転写因子で、CREを介してグルカゴンの発現を調節している (Wang et al, J Biol Chem 2003)。また、ATF3は酸化ストレスにより、迅速に発現が誘導される (Hai et al, Gene 2001)。しかしながら、α細胞におけるATF3のストレス応答についての報告は未だない。申請者は組織免疫染色を用いて、ATF3がα細胞に特異的に発現していることを確認した。さらに興味深いことに、ATF3はα細胞の細胞質優位に発現していた。ATF3の核-細胞質移行の意義や調節メカニズムについての報告は未だない。

2. 研究の目的

2型糖尿病では、食後のインスリン分泌の増加が障害されるとともに、グルカゴン分泌の抑制も障害されている (Muller WA et al. N Engl J Med 1970)。しかしながら、後者の

メカニズムに関しては良く分かっていない。申請者はグルカゴン遺伝子の転写を調節する転写因子 ATF3 と FoxO1 に注目している。ATF3 は酸化ストレス等で急性に発現が誘導されるストレス応答タンパク質であるが、cAMP responsive element (CRE) を介してグルカゴンの転写を調節することが報告されている (Wang et al, J Biol Chem 2003)。実際に、申請者は膵臓において、ATF3 が α 細胞に特異的に発現していることを確認した。一方、申請者は以前に、 β 細胞においては、FoxO1 は高グルコースによる酸化ストレス依存性に核に移行し、機能することを報告している (Kitamura T et al. Cell Metab 2005) が、最近、 α 細胞においては、FoxO1 がグルカゴンの転写を調節することが報告された (Mckinnon et al. J Biol Chem 2006)。そこで、本研究課題においては、2型糖尿病と ATF3、及び FoxO1 の関係を明らかにし、高グルコースと酸化ストレスの両面から、*vitro* と *vivo* の両方の系を用いて、 α 細胞における ATF3 と FoxO1 の役割を解明したい。本研究課題の成果によっては、2型糖尿病において α 細胞機能が障害される分子メカニズムが明らかとなり、将来の新しいタイプの糖尿病治療薬の開発に貢献する可能性がある。

3. 研究の方法

本研究課題においては、 α 細胞における ATF3 と FoxO1 の動態と役割を *vitro* と *vivo* の両方の系を用いて解析する。まず *vitro* の系としては、aTC 細胞を用いて、高グルコースと過酸化水素添加による ATF3 と FoxO1 の発現レベル (mRNA とタンパク質)、細胞内局在、及び転写活性の変化を調べる。また、アデノウイルス発現系を用いて、aTC 細胞に ATF3 や FoxO1 を過剰発現した場合、あるいは siRNA を用いて ATF3 や FoxO1 をノックダウンした場合のグルカゴン分泌量を測定する。次に、*vivo* の解析としては、まず、2型糖尿病モデルマウスの α 細胞における ATF3 と FoxO1 の発現量、細胞内局在、転写活性、タンパク質翻訳後修飾などについて検討する。さらに、ATF3 と FoxO1 の役割を *vivo* で直接証明する方法として、Cre-loxP システムを用いて、 α 細胞特異的 ATF3 ノックアウトマウス

(a \cdot ATF3 KO) と α 細胞特異的 FoxO1 ノックアウトマウス (a \cdot FoxO1 KO) を作成する。作成したマウスの各種代謝パラメーターの測定と糖負荷試験を行い、その代謝機能を調べるとともに、糖尿病モデルマウスとの交配を行って、糖尿病の程度や耐糖能の変化を解析する。これらの解析により、 α 細胞における ATF3 と FoxO1 の機能、及び糖尿病との関わりを明らかにする。

4. 研究成果

Glucagon-cre マウスと ATF3 flox マウス、あるいは FoxO1 flox マウスを交配し、それぞれ α 細胞特異的 ATF3 ノックアウトマウス (aATF3 KO) と α 細胞特異的 FoxO1 ノックアウトマウス (aFoxO1 KO) を作製した。しかしながらこれらのマウスの空腹時血糖値、随時血糖値に異常は認められず、血中グルカゴン濃度も正常であった。また、糖負荷試験やインスリン耐性試験においてもコントロール群と有意差がなかった。そこで、組織免疫染色と定量 RT-PCR 法を用いて α 細胞における ATF3 や FoxO1 のノックアウト効率を調べたが、効率は 50% 以下であった。現在、Rosa26-eGFP マウスと交配することで、Glucagon-cre マウスの cre 発現効率を検討中である。

次に、既に研究室で所有していた Rosa26-flox-stop-flox-FoxO1 マウスと Glucagon-cre マウスを交配し、 α 細胞特異的 FoxO1 ノックインマウス (a-FoxO1-KI) を作製した。このマウスでは血中のグルカゴン値が上昇しており、空腹時血糖に変化はないが随時血糖が有意に高値を示した。また、耐糖能も有意に悪化していた。次に、aTC-1.6 培養細胞を用いた *vitro* の解析を用いて、FoxO1 がプログルカゴンプロモーターを活性化することをルシフェラーゼアッセイにて確認した。また、クロマチン免疫沈降法にて FoxO1 がプログルカゴンプロモーターの転写開始点から 1.5kb 上流に 4カ所存在する FoxO1 結合可能領域の 1カ所にリクルートしていることを確認した。従って、 α 細胞における FoxO1 がグルカゴン遺伝子転写調節を介して、全身の糖代謝調節に関わっている可能性が *in vitro* と *in vivo* の両方の系で証明された。

一方、ATF3 が膵ラ氏島細胞と視床下部ニューロンで発現しており、低濃度グルコース刺激や絶食によって発現量が増加することを確認した。そこで ATF3 の膵臓と視床下部における生理的役割を明らかにする目的で、Pdx1-cre マウスと ATF3 flox マウスを交配し、視床下部と膵臓で特異的に ATF3 をノックアウトするマウス (PHT-ATF3-KO) を作成した。PHT-ATF3-KO は空腹時と随時の血糖値が有意に低下し、糖負荷試験でも耐糖能が亢進していたが、予想に反し、血中インスリン濃度とグルカゴン濃度は正常で、膵臓の形態学的変化 (α 細胞量や β 細胞量) も伴わなかった。また、PHT-ATF3-KO マウスから単離したラ氏島においてグルコース濃度依存性のグルカゴン分泌とインスリン分泌能を調べたが、どちらもコントロールマウスと違いはなかった。しかしながら、インスリン耐性試験の結果、PHT-ATF3-KO マウスではインスリン感受性が有意に亢進していた。さらに、コントロールマウスに比べ PHT-ATF3-KO マウスの体重

は有意に減少しており、摂食量の減少と酸素消費量（エネルギー消費量）の増加が認められた。運動量には変化がなかった。次に、遺伝子発現解析を用いて視床下部の摂食調節神経ペプチドの発現量を定量した所、PHT-ATF3-KOマウスではAgrpの発現量が減少していた。Npy や Pomc には変化がなかった。また、ルシフェラーゼアッセイの結果、ATF3がAgrpプロモータ活性を促進することが明らかとなった。しかしながら、AgrpプロモータにはATF3結合可能モチーフは含まれておらず、直接的に転写制御する可能性は低いと考えられた。一方、共沈実験によりATF3が転写因子FoxO1と結合することが判明し、クロマチン免疫沈降(ChIP)により、実際にATF3がAgrpプロモータ上のFoxO1結合部位にリクルートすることを確認した。また、siRNAを用いてFoxO1をノックダウンすると、ATF3によるAgrpの転写活性化は抑制された。我々は以前にFoxO1がAgrpの遺伝子転写を直接調節していることを報告しており、今回の結果から、視床下部のATF3は栄養状態を感知して発現が誘導され、FoxO1との結合を介してAgrpの発現を調節することで、摂食量とエネルギー消費を制御していると考えられた。

以上の結果から、視床下部に比べて α 細胞におけるATF3の生理的役割は少ないと考えられた。

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)

[学会発表] (計2件)

1. 小林雅樹、菊池司、李容守、北村忠弘 グルカゴン調節における転写因子FoxO1の生理機能 第85回日本内分泌学会学術総会、2012. 4. 19、名古屋国際会議場(名古屋)
2. 李容守、菊池司、金恵珍、小林雅樹、佐々木努、田中裕二郎、北嶋繁孝、北村忠弘 視床下部、膵臓特異的ATF3ノックアウトマウス 2012. 4. 19、名古屋国際会議場(名古屋)

6. 研究組織

(1)研究代表者

北村 忠弘 (KITAMURA TADAHIRO)
群馬大学・生体調節研究所・教授
研究者番号：20447262

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：