

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 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591133

研究課題名（和文） 2型糖尿病における Mafa の重要性の検討

研究課題名（英文） Evaluation for significant role of Mafa under Type2 diabetic conditions

研究代表者

松岡 孝昭（MATUOKA TAKAAKI）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10379258

研究成果の概要（和文）：

主要なインスリン転写因子であり、糖尿病状態で発現の低下する Mafa の糖尿病状態での重要性を直接評価すべく、膵β細胞において Mafa 発現誘導し得る糖尿病マウスの作製を行った。Mafa 過剰発現糖尿病マウスでは、インスリン分泌能が改善し、耐糖能の改善を認めた。また、同マウスでは膵島量の増大も認められた。これら結果から、糖尿病状態にある膵β細胞において Mafa を特異的に発現維持させることにより膵β細胞機能障害の進展が抑制され、膵島量の維持につながるものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

The insulin gene transcription factor Mafa is known to regulate insulin biosynthesis and secretion, but there is no *in vivo* evidence of the patho-physiological involvement of Mafa in diabetes. To examine how Mafa is critical for glycemic control under diabetic conditions, we generated transgenic mice overexpressing Mafa conditionally and specifically in islet β cells of diabetic mice. The sustained expression of Mafa in diabetic mice resulted in significantly lower plasma glucose and higher plasma insulin levels. In these mice, Mafa restored the expression of *insulin* and other potential Mafa target genes including genes newly identified by microarray analysis, and improved β cell function. In addition, islet mass was significantly restored in these mice. These results demonstrate that restoration of Mafa expression in islet β cells preserves islet β cell function and mass, leading to the improvement of glycemic control in type 2 diabetes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
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：糖尿病・Mafa・膵β細胞・活性酸素・C-Jun

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病患者においてよく認められ

る長期高血糖下での膵β細胞機能障害(糖毒性)、即ちグルコース応答性のインスリン分泌及び合成

能の低下のメカニズムはいまだ明らかではなく、その臨床における重要性からも解明が待たれている。我々はこれまで、膵β細胞におけるインスリン合成に注目し研究を進めており、膵β細胞における糖毒性の一因として、高血糖により惹起される活性酸素がインスリン転写因子の活性を低下させ、インスリン遺伝子発現を低下させること、糖尿病モデルマウスでは、活性酸素を抑制するとインスリン合成が一部回復することなどを報告している。インスリン遺伝子5' 隣接転写調節領域には様々な転写因子が結合し転写活性が調節されているが、その中でも、Pdx1、BETA2、及びC1/RIPE3b1 activatorが、それぞれの binding cis-element に対する mutation study の結果から、インスリン合成において中心的な役割を果たしているのは間違いない。C1/RIPE3b1 activator は、近年我々を含む3つのグループからほぼ同時期にクローニングされ、basic leucine zipper を有する large Maf family のひとつである Mafa であることが判明した。我々はこれまでに、Mafa が他のインスリン転写因子に比べて膵β細胞への発現特異性が高く、他の膵島細胞である α、δ、pp 細胞には発現を認められないこと、膵臓の発生段階においても Mafa の発現はインスリン陽性細胞のみに認められ、インスリン陽性細胞数の急激な増大を示す時期(secondary transition phase)に一致して Mafa の発現が認められるようになること、さらに、膵β細胞の最終的な分化に関わるとされていた Nkx6.1 の K.O.マウスでは、Mafa の発現も認められなくなることなどを報告しており、Mafa はインスリン合成における key factor であると考えている。また、全身での Mafa ノックアウトマウスの結果では、やはりインスリン mRNA 量の低下が認められ糖尿病にいたる。面白いことに Mafa ノックアウトマウスでは、インスリン合成ばかりではなくグルコース応答性インスリン分泌にも有意な低下が認められ、Mafa がインスリン分泌にも関与することが示された。これらの結果からも Mafa の活性・発現の低下が膵β細胞機能を低下させることは容易に想像できる。膵β細胞株を用いた *in vitro* の実験系においては長期の高グルコースへの暴露により、Mafa の発現低下が生じ、それと平行してインスリン遺伝子の発現が低下すること、それらの発現量低下が活性酸素によりもたらされることなどが示されているが、これまで糖尿病状態における *in vivo* での Mafa の重要性は評価されていない。

2. 研究の目的

我々は本研究課題において2型糖尿病状態における *in vivo* での Mafa の重要性を評価することを目的とし、2型糖尿病モデルマウスの膵β細胞への Mafa の過剰発現を予定している。さらに、最近の我々の研究結果から、活性酸素により発現量・活性が増大する c-Jun

が糖尿病モデルマウスの膵島において発現量が増大しており、c-Jun 陽性細胞では Mafa 及びインスリンの発現量が低下していることが明らかとなった。膵β細胞株を用いた検討において、c-Jun の過剰発現は Mafa 蛋白量を著明に低下させることも明らかとなり、c-Jun の発現抑制が糖尿病における膵β細胞機能障害を改善させる可能性についても、c-Jun ノックアウトマウスを用いて検討する予定としている。これらの結果において Mafa の重要性が確認され、その低下のメカニズムに迫れば、今後 Mafa をターゲットとした新たな治療法の開発へと結びつくことも期待している。

3. 研究の方法

(1) 本申請における我々の第一の目的は、2型糖尿病における Mafa の重要性を評価することである。その強力なインスリン遺伝子転写活性化能およびインスリン分泌に関与する可能性からも、2型糖尿病患者での膵β細胞の機能異常に関与している可能性が高いと考えられるが、実際の糖尿病状態において Mafa がどのような動態を示すのかは解明されていない。そこでまず、レプチン受容体異常により過食をきたし2型糖尿病を呈するモデルマウス (C57BL/6J db/db マウス) における Mafa 発現量の経時的変化を免疫組織染色により確認した。Mafa 蛋白量は明らかに糖尿病マウスにおいて週齢を追うごとに低下しており、その低下に一致して、当初インスリン抵抗性に対し代償的高値を呈していた db/db マウスの血漿インスリン値も低下している。さらに db/db マウスの膵島では、Mafa 蛋白の低下している細胞においてインスリン蛋白の発現量も低下していることを確認している。これら結果から、Mafa の糖尿病における病理学的意義がより強く推察されるが、機能異常を来した膵β細胞に随伴した現象とも考えられる。

そこで、明確に Mafa の糖尿病状態での重要性を評価すべく、糖尿病マウスの膵β細胞における Mafa の過剰発現を計画している。この実験のため、既に CAG-CAT-Mafa トランスジェニックマウスの作製を終了している。これは、CAG (chicken β-actin promoter/enhancer と cytomegalovirus immediate-early enhancer とを組み合わせた強力な promoter/enhancer 領域)の下流に、loxP site で挟まれた CAT 遺伝子(stuffer として使用)を、さらに下流に Mafa の coding region を組み込んだ construct を用いて作製したトランスジェニックマウスであり、Cre recombinase が作用した場合にのみ CAT 遺伝子が除かれ、Mafa が CAG プロモーター下に発現するように設計されている。CAG-CAT-Mafa マウスが正常に機能することは、膵内・外分泌及び導管細胞すべてに共通する前駆細胞において胎生期に発現する

PTF-1 のプロモーター下に Cre を発現するマウス (PTF-1-Cre) と CAG-CAT-Mafa とを交配することによって確認しており、本来膵β細胞に限局して発現している Mafa を膵臓全体に発現誘導することに成功している。この CAG-CAT-Mafa と、膵β細胞特異的に Cre recombinase を発現するマウスとの交配により、Mafa を膵β細胞特異的に過剰発現させる計画である。組織特異的 Cre 発現マウスとして、Pdx1^{PST-BST}-CreER (Pdx1 enhancer の中でも膵β細胞特異的発現に必要な転写調節領域の下で、CreER を発現する) マウスを使用し、CAG-CAT-Mafa との交配により、エストロゲン受容体 agonist である tamoxifen 誘導性に膵β細胞に、また、膵β細胞特異的に Mafa を過剰発現させる予定である。前述の db/db 糖尿病マウスの膵β細胞特異的に Mafa を過剰発現させることを目的として、C57BLKs db/db マウスと db 遺伝子以外は同じ遺伝的背景を有する C57BLKs m/m マウス (db/db マウスは不妊) との戻し交配を行い、最終的には、同糖尿病マウスの膵β細胞特異的に Mafa の過剰発現を誘導する予定としている。

(2) 我々は、活性酸素によるインスリン遺伝子転写調節障害に注目し研究を進めてきたが、近年、長期に高グルコース条件下で膵β細胞株を培養すると、Mafa は翻訳後調節を受け蛋白量が低下すること、その背景に活性酸素による障害が存在するとの報告がなされた。我々は活性酸素によりその活性が増大する因子、なかでも p38、JNK、c-Jun に着目し *in vitro* での解析を行っていたところ、膵β細胞株である MIN6 細胞では、プロモーター遺伝子解析上 c-Jun が著明にインスリン遺伝子転写活性を低下させることを確認した。これは以前報告された結果と一致するものであったが c-Jun 発現プロモーターを作製することにより、c-Jun の過剰発現が内因性インスリン遺伝子発現においても抑制的に作用すること、c-Jun が著明に、そして選択的に Mafa 蛋白量を抑制することを新たに見出した。そこで、糖尿病状態での c-Jun 蛋白の発現量を実際に C57BLKs db/db マウスを用いて検討したところ、免疫組織染色上、血漿インスリン値の低下とは逆に発現量が増大していた。これは Mafa 発現とは逆の動態を示しており、C57BLKs db/db や KKAy 糖尿病マウスの膵島では、c-Jun の発現している細胞において Mafa 及びインスリン蛋白の発現量が減少していることが確認された。さらに、c-Jun と Mafa を同時に MIN6 細胞に過剰発現させると、c-Jun によるインスリン遺伝子転写活性抑制作用がほぼ消失した。これら結果から、糖尿病状態での膵β細胞では c-Jun の発現量が増大し、Mafa の発現抑制を介してインスリン発現が低下していることが推測され、糖尿病状態で発現量および活性が増大している c-Jun を抑制すれば膵β細胞機能の低下を抑制し

得るのか? という疑問が生じた。そこで、既に我々が有している floxed c-Jun mice を用いて、糖尿病状態における膵β細胞での c-Jun ノックアウトを計画している。Floxed c-Jun mice では c-Jun locus が loxP site で挟まれており、Cre recombinase により conditional に c-Jun 欠失マウスを作製することが可能である。我々はこれまでに、floxed c-Jun mice と PTF-1-Cre mice との交配により E9 以降の膵臓において c-Jun を欠失させることに成功しているが、膵臓は正常な発生・分化を示し、成体となっても膵臓は正常に発育し、膵β細胞機能にも明らかな障害を認めないことが判明した。これは、正常状態においては c-Jun が膵臓において大きな働きはしていない、もしくは代償が可能であることを示している。この結果から、糖尿病状態の膵β細胞で c-Jun をノックアウトしても膵β細胞機能異常を来す可能性は低いと考えられ、そのノックアウトにより糖尿病で増大している c-Jun の役割を純粋に評価できるものと考えている。

4. 研究成果

(1) CAG-CAT-Mafa と、Pdx1^{PST-BST}-CreER のそれぞれを C57BLKs m/m マウスとの間で 10 世代の戻し交配を行い、さらに C57BLKs db/m との交配を進めることで db/db 糖尿病マウスであり、これら transgene を有するマウス (CAT-Mafa:Pdx1-Cre:db) を作製した。TM 投与前には随時血糖、血漿インスリン濃度および HbA1c 値は、CAT-Mafa:Pdx1-Cre:db とコントロール db/db マウス群との間で差は認められなかったが、TM 投与後、CAT-Mafa:Pdx1-Cre:db マウスでは対照群に対し随時血漿インスリン濃度が有意に高値となり、随時血糖は有意に低値を示した。TM 投与後 8 週目で測定した HbA1c 値も、CAT-Mafa:Pdx1-Cre:db マウスでは対照群より有意に低値を示した。糖負荷試験においても、インスリン分泌能が改善し、耐糖能の改善を認めた。また、免疫組織染色上 CAT-Mafa:Pdx1-Cre:db マウスでは、膵β細胞での Mafa 発現及びインスリン及びβ細胞が保たれていた。一方、対照群との間でインスリン抵抗性に有意差は認められず、耐糖能改善は膵β細胞機能の改善によるものと考えられた。実際に単離膵島を用いた灌流実験によりグルコース応答性インスリン分泌の改善が認められ、膵β細胞への Mafa 過剰発現が膵β細胞機能障害を改善し、結果として耐糖能をも改善することが明らかとなった。Mafa 発現による膵β細胞機能改善のメカニズムを検討すべく、膵島 RNA を用いて Microarray analysis を行ったところ、コントロール db/db マウスと比較して、Mafa 発現誘導により、その標的遺伝子である *insulin* や *Glut2* の他、*GST family* の幾つかの発現増大が認められた。これらは Mafa の膵β細胞株でのノックアウトにより有意に発現が低下してお

り、Mafa は GST 発現を増大することにより膵β細胞機能を保持する可能性が示唆された。さらに、Dithizone 染色を用いて膵臓全体の膵島量を評価したところ、コントロール db/db マウスに比べ、Mafa 発現マウスでは有意な膵島量の増大が認められた。これら結果から、糖尿病状態にある膵β細胞において Mafa を特異的に発現維持させることにより膵β細胞機能障害の進展が抑制され、膵島量の維持につながるものと考えられた。(論文投稿中)

(2) *in vivo*での c-Jun の Mafa および膵β細胞機能への影響を明らかにすべく、c-Jun^{flox/flox} マウスを C57BL/6 m/m マウスとの間で8世代の戻し交配を行い、floxed c-Jun マウスを Ks background とし、C57BL/6 ob/+マウスとの交配により ob/ob 糖尿病マウスとした上で、膵β細胞において c-Jun を欠失させることに成功した。現在、c-Jun^{flox/flox};Pdx1^{PST-BST-CreER};ob/ob マウスを用いて、成体期膵β細胞特異的に c-Jun をノックアウトした影響につき、耐糖能異常を中心に評価している。まだ検討数は充分ではないが、コントロール ob/ob マウスに比べ、血糖値の改善傾向を認めており、c-Jun のβ細胞機能障害への関与が示唆された。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡孝昭 (MATSUOKA TAKAAKI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：10379258

(2) 研究分担者

金藤秀明 (KANETO HIDEAKI)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：80448034

(3) 連携研究者

松久宗英 (MATSUHISA MUNEHIDE)
徳島大学・糖尿病臨床・研究開発センター
・教授
研究者番号：60362737