

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 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：13601
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591853
 研究課題名（和文）エストロゲンの膵β細胞における糖代謝への影響
 研究課題名（英文）The effect of estrogen for carbohydrate metabolism in pancreatic beta cells
 研究代表者
 西尾 真一（NISHIO SHIN-ICHI）
 信州大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：30467146

研究成果の概要（和文）：我々はエストラジオール E2 がハムスターインスリノーマ細胞 HIT-T15 細胞のインスリン mRNA 発現を抑制することを見出した。また estrogen receptor α (ER α) を過剰発現させた HIT 細胞で E2 が濃度依存性にラットインスリンプロモーターの転写を抑制することを確認した。この現象は従来知られている既知の配列を介してのものではなく、E2-ER α が直接転写調節因子 PDX-1 や BETA2 と相互反応して起こることを解明した。

研究成果の概要（英文）：We have demonstrated the treatment of HIT-T15 insulinoma cells with E2 led to the decreased insulin mRNA levels. Transient transfection assays of HIT-T15 cells revealed that ER α repressed transcriptional activity of rat insulin II promoter both in a ligand-dependent and -independent manner. The repression was not mediated by an ERE-like sequence or AP-1 site in the promoter. Instead, transcriptional factor PDX-1 and BETA2 appear to be involved.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：糖尿病内分泌代謝学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：エストロゲン、膵β細胞、転写調節因子、インスリンプロモーター

1. 研究開始当初の背景

近年エストロゲン受容体が肥満やインスリン抵抗性等のメタボリック障害に重要な役割を果たすことがわかってきている。ER ノックアウトマウスを用いた実験から ER α はインスリン感受性や耐糖能異常を改善することによりメタボリック障害に対してそれを是正する働きがある、という報告が出ている。

ER β は脂肪細胞の核内受容型転写因子 PPAR γ の転写活性を抑制することによりインスリンシグナルと糖代謝を負に調整している、という報告がなされた。またエストロゲンを産生できないアロマターゼノックアウトマウスにおいてストレプトゾトシンを用いた酸化ストレスの曝露によりβ細胞のアポトーシスが増大しβ細胞減少が認められるが、

エストロジオールを加えるとアポトーシスが抑制され、糖尿病の発症が減少する。この現象は ER α ノックアウトマウスでは認められず、エストロジオールは ER α を介して膵 β 細胞のアポトーシスを防いでいると考えられる。これらの報告はいずれもエストロゲン受容体がインスリン感受性や耐糖能異常、膵 β 細胞アポトーシスに関与する、という内容である。我々は 2000 年当時膵 β 細胞に大量の ER α が発現することを Q-PCR, ウェスタンブロッティングで確認していた。ER α は β 細胞において重要な役割を果たしているのではないか、膵 β 細胞に存在する ER α が直接インスリン分泌に関与しているのではないか、との仮説を立て、インスリノーマ細胞 (HIT-T15 細胞) を用いたトランスフェクション実験を行った。予想に反して ER α はインスリン遺伝子のプロモーターに作用してその転写活性をエストロゲン依存的に抑制していることが明らかになった。

2. 研究の目的

上記の事象がどのようなメカニズムで起こるのか分子生物学的に解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Northern blotting 法による培養細胞インスリン mRNA 発現の比較: Qiagen RNeasy kit を用い HIT-T15 細胞から mRNA を単離、Amersham kit を用いてインスリン遺伝子に 32P-dCTP をラベルして E2 存在下、非存在下で発現を比較した。GAPDH 遺伝子をコントロールに用いた。

(2) transient transfection 法による機能解析実験: リン酸カルシウム法を用いて様々なデザインした transfection を行った。

(3) Gal4 プラスミドを用いた transfection 法による E2-ER α と転写調節因子の相互作用解析: いくつかの転写調節因子遺伝子を Gal4DNA 結合領域に融合させたキメラ蛋白を作成、E2 存在下、非存在下で ER と co-transfect した。

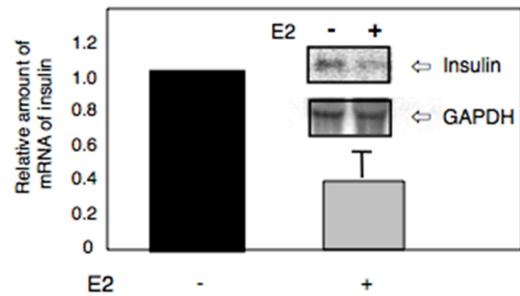
(4) *in vitro* pull down 法による結合実験: Amersham kit を用いて GST-ER, GST-転写調節因子を作成、Promega kit を用いて 35S ラベルした発現ベクターを作り E2 存在下、非存在下で発現を比較した。

なおすべての培養細胞はフェノールレッドフリー、チャコールストリップド培養液を用いて E2 の人為的影響を排除した。

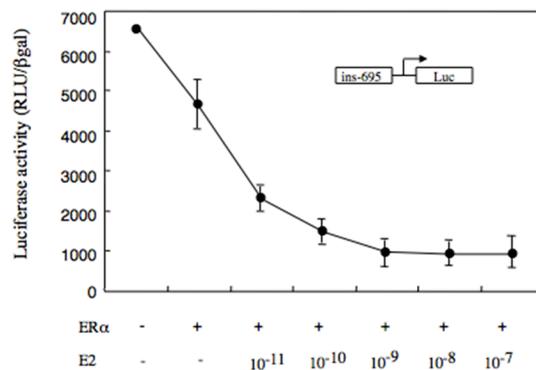
4. 研究成果

(1) 10⁻⁸M の E2 添加によりインスリン mRNA 発現は有意に低下することがわかった。縦軸はインスリン遺伝子の densitometry を GAPDH

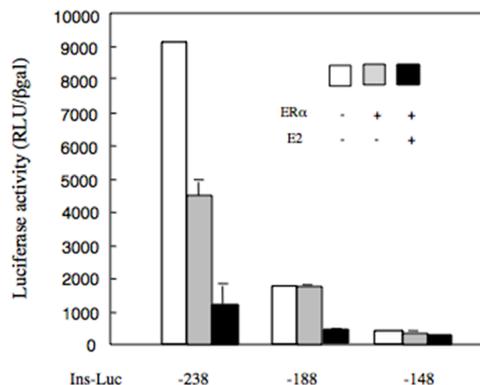
の densitometry で割った相対値。



(2) ① E2 は濃度依存的にラットインスリンプロモーターの活性を抑制した (インスリンプロモーターは転写開始地点から 695bp 上流まで切り出している)。

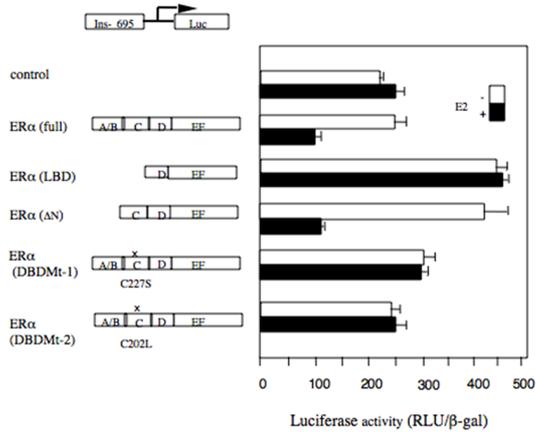


(2) ② プロモーターの deletion assay の結果、E2 の抑制効果は転写開始地点から 148bp から 238bp までの部位が必須であることがわかった。

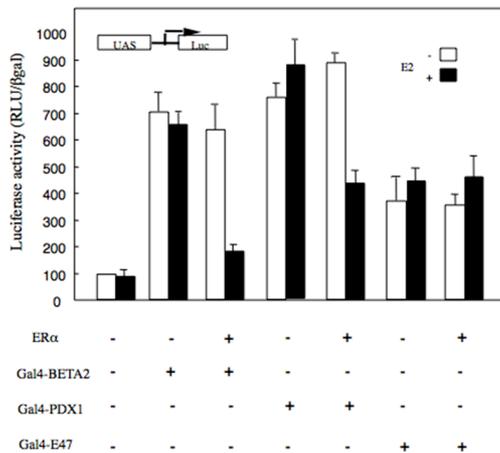


(2) ③ ligand 結合領域の欠失したプロモーターや DNA 結合領域に点突然変異を施したミュータントプロモーターを用いた transfection 実験では E2 の抑制効果は失われた。インスリンプロモーター遺伝子には従来知られている ERE や AP1 site がなく、この現象は E2-ER α が直接インスリンプロモーターに従来知られていない部位で結合して起

きていることがわかった。



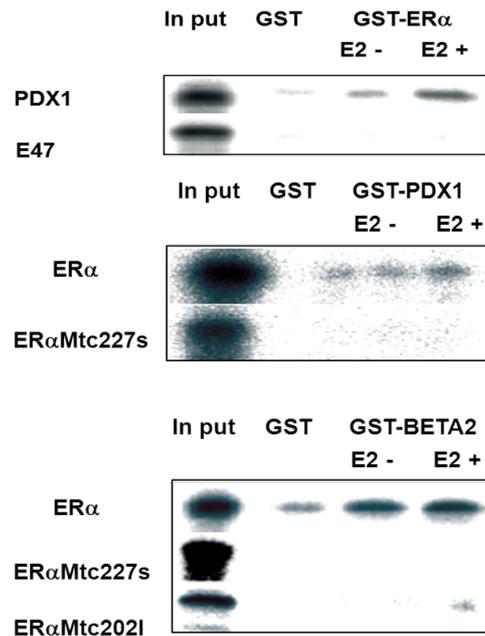
(3) (2) ②の結果から得られた抑制効果に必須のインスリンプロモーター転写開始地点から-148bp~-238bp には膵β細胞特異的転写調節因子である PDX1 や BETA2/E47 が関係することが知られている。そこで我々は E2-ER のインスリンプロモーター抑制にこのような転写調節因子が関与しているのではないかと推測し Gal4-転写調節因子キメラプラスミドを作成、co-transfect したところ ER と PDX1, BETA2 は E2 存在下で UAS-Luc 活性を低下させた。つまり相互作用することが示唆された。一方 BETA2 と複合体を形成する E47 と ER は反応しなかった。



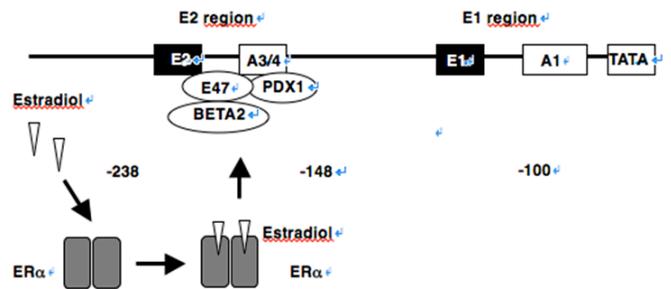
さらに様々な ERα のミュータントと Gal4-PDX1, Gal4-BETA2 との co-transfect 実験で (2) ③同様 ligand 結合領域、DNA 結合領域それぞれが抑制効果に必要であることを確認した。

(4) *in vitro* pull down 法の結果, PDX1, BETA2 は ERα と直接結合していることがわかった。また我々は ERα のポイントミュータントを用いても pull down を行い、ミュータントでは結合は認められないことも確認した。一方

E47 と ERα とは結合が認められなかった。



上記の結果から我々は膵β細胞において E2 は ER と結合して転写調節因子である PDX1 や BETA2 と複合体を形成し、従来知られていた ERE や AP1site を介さず別な場所でインスリンプロモーターに結合し、その転写活性を抑制する、というメカニズムを解明した (下図)。



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 西尾真一、石井宏明、武井真大、鈴木悟、駒津光久

ER α は PDX-1、BETA2 を介してインスリン転写活性を抑制する

日本糖尿病学会、2011 年 5 月 20 日 於：
札幌

- ② 武井真大、西尾真一、四宮健、石井宏明、鈴木悟、駒津光久

ER α は PDX-1、BETA2 を介してインスリン転写活性を抑制する

日本内分泌学会、2011 年 4 月 21 日 於：
神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西尾 真一 (NISHIO SHIN-ICHI)
信州大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：30467146

(2) 研究分担者

駒津 光久 (KOMATSU MITSUHISA)
信州大学・医学部・教授
研究者番号：90221978