

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 5月18日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650090

研究課題名（和文）大 Maf 群転写因子強制発現によるインシュリン産生細胞の分化誘導系の確立

研究課題名（英文）Establishment of induction method for Insulin producing cells by overexpression of large Maf transcription factors.

研究代表者

高橋 智 (TAKAHASHI SATORU)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：50271896

研究成果の概要（和文）：

マウスインシュリンプロモーターにホタルルシフェラーゼを連結した遺伝子を有するトランスジェニックマウス（MIP-luc Tg）を導入し、生体の発光を観察できるIVISを用いることによって、マウス生体内でインシュリンを産生する細胞の検出系を確立した。この検出系を用いて、生体の肝細胞からインシュリンの産生を誘導する因子を探索した。その結果、MafAとPdx1およびNeuroDのアデノウイルスを尾静脈より肝細胞に導入することにより、非常に強いルシフェラーゼの発光が認められた。ルシフェラーゼの発光が認められた肝臓について、免疫染色によりインシュリンタンパク質の産生を確認したところ、肝細胞でのインシュリンの産生が確認された。一方、MafAと同様の機能を有すると考えられたMafBの組み合わせでは、より強い誘導効果は観察されなかった。以上のことからMafA、Pdx1およびNeuroDの転写因子の組合せにより、肝臓の細胞からインシュリンを産生する細胞を再分化させることが可能であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We examined whether *in vivo* bioluminescence imaging (BLI) could monitor the dynamics of insulin promoter activity in extrapancreatic tissues, especially in the liver. To do this, hepatocytes of MIP-Luc mice, in which luciferase reporter gene expresses under the control of mouse insulin gene promoter, were transduced *in vivo* with recombinant adenovirus expressing defined transcription factors related to insulin transcription, Pdx1, NeuroD, and MafA or MafB. The bioluminescent signal from the liver was detected in mice infected with all of three genes until about a week after the infection. Immunohistochemical analysis of the liver infected with combination of Pdx1, NeuroD, and MafA recombinant adenoviruses revealed the presence of some insulin positive cells consistent with the enhanced BLI signal intensity. These results suggest that the BLI signal emitted from the liver region of the MIP-Luc mice is useful for the monitoring the insulin promoter activity and Pdx1, NeuroD, and MafA have activity to induce insulin transcription.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	0	1,900,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	330,000	3,330,000

研究分野：発生工学・実験動物学
科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学
キーワード：実験動物学

1. 研究開始当初の背景

2006年に山中らが、マウスの線維芽細胞に Oct-3/4、Sox-2、c-Myc、Klf4 の4つの転写因子を導入することにより、ES細胞と同様の多能性を有する細胞、iPS細胞を誘導できることを報告した。この研究により、特定の遺伝子の発現を維持することにより、一度分化した細胞を、多分化能を有する細胞へ形質転換できることが示された。この方法を応用することにより、体細胞からインシュリン産生細胞を再分化させることが可能であると考えられる。実際に、ハーバード大学の Melton らが、膵臓の外分泌細胞に MafA、Pdx1 および Ngn3 を導入することにより、インシュリン産生細胞に再分化できることを報告している。再分化したインシュリン産生細胞がどの程度機能的であるかは明らかではないが、少なくとも生体体細胞をインシュリン産生細胞に再分化することは可能であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 生体内でのインシュリン産生細胞の検出系の確立、(2) MafA および MafB の強制過剰発現による生体体細胞のインシュリン産生細胞の再分化誘導系の確立の2点を目標とする。

3. 研究の方法

(1) マウス生体内におけるインシュリン産生細胞の検出方法の開発

マウス生体内でインシュリン産生細胞を検出する方法としては、組織標本作製し、抗インシュリン抗体で染色を行う方法がもっとも一般的であるが、そのような手法ではハイスループットなスクリーニングを行うことが難しいこと、定量的なデータを得ることができないことが問題となる。一方、2005年に Park らが、マウスインシュリンプロモーターにホタルルシフェラーゼを連結した遺伝子を有するトランスジェニックマウス (MIP-luc Tg) を作製し、このマウスが生体内のインシュリン遺伝子の転写をモニターできることを明らかにした (Park S-Y et al. Genesis 2005.)。この方法の利点は、マウス生体内でインシュリンを産生する細胞を個体全体でリアルタイムにモニターできること、正常な機能を有する膵臓β細胞との同一画像上でのインシュリンの産生量の半定量的な比較が可能なことである。Park らの報告では、数十個の MIP-luc Tg 由来のラング

ルハンス島を移植した場合でも検出が可能であり、解析に必要な検出感度は十分得られると考えられる。この検出方法が確立できれば、マウスを生存させたままでハイスループットなスクリーニングを実施することが可能となる。ルシフェラーゼの発光を検出するためには、特殊な検出装置が必要であるが、申請者が所属する筑波大学生命科学動物資源センターには、Xenogen 社の発光/蛍光検出装置である IVIS が導入されている。また Park らが作製した MIP-luc Tg が導入予定であり、生体でのインシュリン産生細胞の検出が可能になる。平成 22 年度には、MIP-luc Tg と検出装置を用いて、生体での膵臓β細胞でのインシュリン産生を最も感度良く検出できる系を確立する。野生型マウスで検出が可能になった場合には、インシュリン転写量が低下している MafA 欠損マウスに MIP-luc Tg を導入し、インシュリンの転写量が減少していることが検出できるかどうかを確認する。また、MIP-luc Tg マウスよりβ細胞を単離し、それらの細胞を野生型のマウスに静注して移植し、どの程度のβ細胞があれば、ルシフェラーゼ発光の検出が可能かを確認する。

(2) 体細胞のインシュリン産生細胞の再分化誘導法の開発

これまでの他のグループの報告から、MafA と Pdx1 および NeuroD を、アデノウイルスでマウスの尾静脈より導入すると、生体の肝細胞がインシュリンを産生するようになることが報告されている (Kaneto H et al, J Bio Chem, 2005)。また申請者らや他のグループの研究から、MafA は膵臓β細胞におけるインシュリンの転写、グルコース輸送単体の Glut2 の発現、インシュリンのプロセッシング酵素である PC1/3 の発現、インシュリン分泌下流の細胞膜へのドッキングに必要な Granuphilin の発現に重要であることが明らかとなっている。従って MafA が発現することが、機能的なβ細胞の形成に必要であると考えられる。一方で、胎生期のβ細胞では MafA ではなく MafB が発現しており、β細胞の発生には MafB が重要であるという可能性も高い。そこで本研究では、MafA と Pdx1 および NeuroD のアデノウイルスでだけではなく、MafB も組み合わせとして用い、どの程度β細胞が再分化誘導できるかを定量的に解析する。

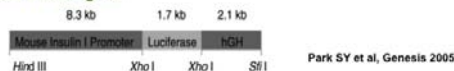
4. 研究成果

(1) マウス生体内におけるインシュリン産生細胞の検出方法の開発

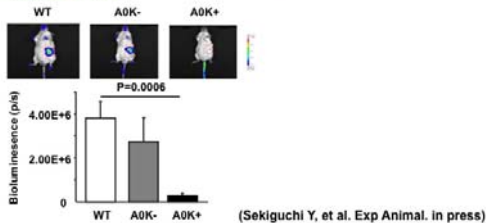
マウスインシュリンプロモーターにホタルルシフェラーゼを連結した遺伝子を有するトランスジェニックマウス (MIP-luc Tg) を導入し、生体の発光を観察できる IVIS を用いることによって、マウス生体内でインシュリンを産生する細胞の検出系を確立した。野生型のマウスで膵臓の部位に一致してルシフェラーゼの発光が認められた。また、インシュリン転写量が低下している MafA 欠損 MafK Tg マウスでは、ルシフェラーゼの活性が低下していることを確認した。これらの結果より、マウス生体内でインシュリンの転写をモニターできる測定計を確立できたと考えられる。

MIP-Luc マウスによる生体内インシュリン転写モニター系の確立

- Construct of transgene



- Monitoring β cell function or mass in living animals with normal or altered metabolic states.

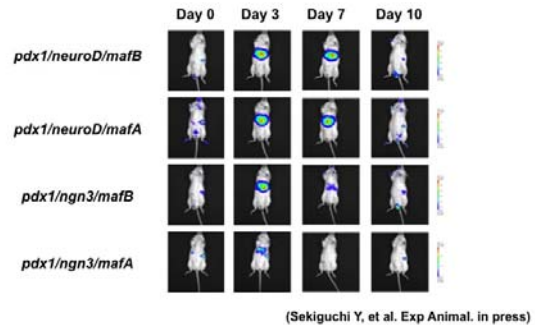


(2) 体細胞のインシュリン産生細胞の再分化誘導法の開発

これまでの報告から、MafA、Pdx1 および NeuroD を、アデノウイルスでマウスの尾静脈より導入すると、生体の肝細胞がインシュリンを産生するようになることが報告されている。そこで、MafA と Pdx1 および NeuroD のアデノウイルスを尾静脈より肝細胞に導入したところ、非常に強いルシフェラーゼの発光が認められた。ルシフェラーゼの発光が認められた肝臓について、免疫染色によりインシュリンタンパク質の産生を確認したところ、肝細胞でのインシュリンの産生が確認された。一方 MafA と同様の機能を有すると考えられた MafB の組み合わせでは、一過性には同様の誘導が認められたが、7日以降の発現は MafA よりも弱いものであった。以上のことから MafA、Pdx1 および NeuroD の転写因子の組み合わせが、MafB、Pdx1 および NeuroD の組み合わせよりも、肝臓細胞からのインシュリンを産生能力が高いことが明らかとなった。しかしこれらの方法では、一度インシュリンを産生ようになった肝臓の細胞は、その形質を維持できず、徐々にインシュリン産生細胞の数が減少するこ

とが明らかとなった。肝臓の細胞には、インシュリンの産生を抑制する転写因子が発現しているものと考えられたので、肝細胞でのインシュリンの発現を抑制している転写因子を探索した。その結果、いくつかの肝細胞特異的な転写因子を同定することができた。また、ATF2 が MafA、Pdx1 および NeuroD の機能を増強する作用があることが明らかとなった。

生体内インシュリン転写モニター系を用いた因子の同定



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 7 件) 全て査読有り

1. Sekiguchi Y, Owada J, Oishi H, Katsumata T, Ikeda R, Kudo T, Takahashi S. Non-invasive monitoring of β -cell mass and fetal β -cell genesis in mouse using bioluminescence imaging. *Exp Animal*. in press. 2012
2. Fujita A, Yoh K, Shimohata H, Morito N, Ojima M, Okamura M, Takahashi S, Yamagata K. A novel diabetes mellitus mouse model, MafA-deficient and beta cell-specific MafK-overexpressing hybrid transgenic mice, developed severe diabetic nephropathy and improved with TCX-116 (candesartan cilexetil) treatment. *Exp Animal*. 61, 49-57, 2012. PMID : 22293672.
3. Kamitani-Kawamoto A, Hamada M, Moriguchi T, Miyai M, Hitoshi S, Ikenaka K, Hosoya T, Hotta Y, Takahashi S, Kataoka K. MafB interacts with Gcm2 and regulates parathyroid hormone expression and parathyroid development. *J Bone Mineral Res*. 26, 2463-2472, 2011. PMID : 21713993
4. Kusakabe M, Hasegawa K, Hamada M, Nakamura M, Ohsumi T, Suzuki H, Kudo T, Uchida K, Ninomiya H, Chiba S, Takahashi S. c-Maf is indispensable for the

microenvironment of definitive erythropoiesis as it forms erythroblastic islands in fetal liver. *Blood* 118, 1374-1385, 2011. PMID : 21628412.

5. Morito N, Yoh K, Maeda A, Nakano T, Fujita A, Kusakabe M, Hamada M, Kudo T, Yamagata K, **Takahashi S**. A novel transgenic mouse model of the human multiple myeloma chromosomal translocation t(14;16)(q32;q23). *Cancer Res.* 71, 339-348, 2011. PMID : 21224354.
6. Nishikawa K, Nakashima T, Takeda S, Isogai M, Hamada M, Kimura A, Kodama T, Yamaguchi A, Owen MJ, **Takahashi S**, Takayanagi H. Maf mediates the age-related switch in mesenchymal cell differentiation. *J Clin Invest.* 120, 3455-3465, 2010. PMID : 20877012.
7. Noso S, Kataoka K, Kawabata Y, Babaya N, Hiromine Y, Yamaji K, Fujisawa T, Aramata S, Kudo T, **Takahashi S**, Ikegami H, Insulin transactivator MafA regulates intra-thymic expression of insulin and affects susceptibility to type 1 diabetes. *Diabetes.* 59, 2579-2587, 2010. PMID : 20682694.

[学会発表] (計 2 件)

1. Sekiguchi Y, Oishi H, Katsumata T, Nagasaki H, Kudo T, **Takahashi S**. *In vivo* monitoring of intra-hepatic insulin gene activity by bioluminescence imaging. 分子生物学会 2012. 12.13-16 横浜.
2. Katsumata T, Oishi H, Sekiguchi Y, Nagasaki H, Ema M, Kudo T, **Takahashi S**. Bioluminescence imaging of novel BAC transgenic mice expressing luciferase reporter gene under the control of the insulin locus. 分子生物学会 2012. 12. 13-16 横浜.

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/anatomy/embryology/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 智 (TAKAHASHI SATORU)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号 : 50271896