

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：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790843

研究課題名（和文）FoxO1によるラ氏島内微小血管、及び代償性 β 細胞過形成の調節メカニズム

研究課題名（英文）The molecular mechanism by which FoxO1 regulates islet vascularization and compensative beta cell proliferation

研究代表者

橋本 博美（横田博美）（HASHIMOTO HIROMI）

群馬大学・生体調節研究所・助手

研究者番号：30323372

研究成果の概要（和文）：

ラ氏島内血管が著明に増加する膵特異的 FoxO1 トランスジェニックマウスから単離したラ氏島において VEGF の発現量が有意に増加していることを確認した。しかしながら、HIF1 α の発現量は変化していなかった。さらに FoxO1 と VEGF の関係を *in vitro* で検討する目的で、培養 β 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイを行った。VEGF には FoxO1 の結合部位を含む領域が存在し、それを含むルシフェラーゼベクターを作製し、解析した所、FoxO1 の用量依存性に VEGF プロモーター活性が上昇した。さらにクロマチン免疫沈降法により実際に FoxO1 が VEGF プロモーターに結合していることを確認した。また、培養 β 細胞にアデノウイルスを用いて活性型 FoxO1 を過剰発現させた所、VEGF の mRNA レベルが有意に増加した。膵特異的 FoxO1 トランスジェニックマウスは β 細胞が著明に減少しているが、インスリン分泌は比較的保たれており、血糖値の上昇、糖負荷試験での耐糖能の悪化の程度は軽度である。その理由として、このマウスのラ氏島では微小血管が増加しているためではないかと考えられた。一方、膵臓特異的 FoxO1 ノックアウトマウスのラ氏島内血管は変化しておらず、ラ氏島における VEGF の発現レベルもコントロールマウスと同程度であった。膵臓特異的 FoxO1 ノックアウトマウスは膵管細胞からの β 細胞の新生が増加しており、高脂肪食負荷時の耐糖能はコントロールマウスに比べて良好である。しかし、ラ氏島内の微小血管の変化はないことから、ラ氏島細胞の FoxO1 はいくつかの異なる機序で β 細胞の量と機能の調節に関与していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Genetic studies revealed that the ablation of insulin/IGF-1 signaling in the pancreas causes diabetes. FoxO1 is a downstream transcription factor of insulin/IGF-1 signaling. We previously reported that FoxO1 haploinsufficiency restored β cell mass and rescued diabetes in IRS2 knockout mice. However, it is still unclear whether FoxO1 dysregulation in the pancreas could be the cause of diabetes. To test this hypothesis, we generated transgenic mice overexpressing constitutively active FoxO1 specifically in the pancreas (TG). TG mice had impaired glucose tolerance and some of them indeed developed diabetes due to the reduction of β cell mass, which is associated with decreased Pdx1 and MafA in β cells. We also observed that TG mice have islet hypervascularities due to increased VEGF-A expression in β cells. We performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays and showed that FoxO1 binds to the VEGF-A promoter. We also showed in luciferase assays that FoxO1 regulates VEGF-A transcription in β cells. When FoxO1 is overexpressed by adenovirus, VEGF-A mRNA level was increased in β TC3 cells. Despite severe reduction of β cells, plasma insulin levels and blood glucose levels as well as glucose tolerance were marginally impaired. We suppose this is due to increased VEGF-A expression and increased islets vascularity in TG mice. We propose that FoxO1 in pancreas plays important roles in the regulation of glucose metabolism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：FoxO1、糖尿病、インスリン

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の初期には、全身の臓器においてインスリン抵抗性が認められるが、膵β細胞の代償性過形成により、インスリン分泌が増加し、血糖値は正常範囲にある。しかしながら、ある時期にβ細胞の過形成が停止し、次いで、むしろβ細胞量が減少に転じることで、糖尿病が発症する（下図参照）。では、なぜある

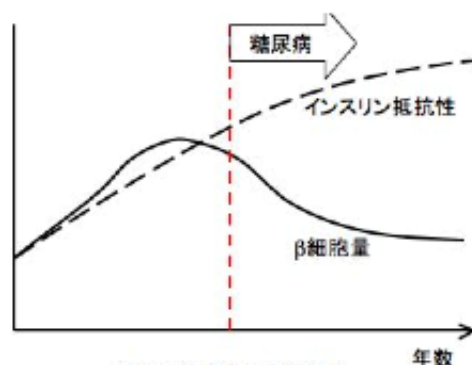


図2 型糖尿病の自然経過

時期にβ細胞の過形成が停止し、その後、むしろ減少するのかについては、不明である（β細胞の疲弊という説明がされてきたが、そのメカニズムは明らかにされていない）。申請者はβ細胞の代償性過形成には、β細胞自体の増殖に加え、ラ氏島内微小血管が重要な役割を果たすと考えている。実際、高脂肪食を与えたマウスにおいて、代償性に肥大したラ氏島内では微小血管が増加しているが、代償しきれずに糖尿病を発症したマウスでは、逆に減少している。また、申請者は膵特異的 FoxO1 トランスジェニックマウスのラ氏島内には、微小血管が著明に増加していることを確認した。

2. 研究の目的

2型糖尿病において、膵β細胞の代償性過形成（ラ氏島肥大）が障害されるメカニズムは不明である。β細胞が過形成される為には、

β細胞自体の増殖に加えて、ラ氏島内微小血管の増殖が重要である。一方、申請者が所属する研究室では、ラ氏島内に微小血管が著明に増加した遺伝子改変マウス（膵特異的 FoxO1 トランスジェニックマウス）を作成した。従って、本研究課題においては、FoxO1 がラ氏島内微小血管の増殖を調節する可能性を検証し、ラ氏島内微小血管の増殖メカニズム、さらには糖尿病において、β細胞代償性過形成が障害されるメカニズムを分子レベルで解明したい。本研究課題の成果によっては、FoxO1 を標的とした新しい糖尿病の治療法に結びつく可能性があり、挑戦的な研究課題といえる。

3. 研究の方法

β細胞の代償性過形成とラ氏島内微小血管の関わり、さらにラ氏島内微小血管形成における FoxO1 の役割を解明する目的で、以下の3つの検討を行った。

1. 糖尿病モデルマウスにおけるラ氏島内微小血管の解析

高脂肪食飼育マウスと db/db マウスの代償性に肥大しているラ氏島において、膵臓組織の免疫染色法と定量 RT-PCR 法を用いて PECAM1 と VEGF の発現量を検討した。

2. 膵臓特異的 FoxO1 トランスジェニックマウスのラ氏島における微小血管と VEGF の解析

申請者は Pdx1 プロモーターの下流に恒常的活性型 FoxO1 を挿入したトランスジーンを用いて膵臓特異的 FoxO1 トランスジェニックマウスを作製した。このマウスの膵臓切片におけるラ氏島内 PECAM1 と VEGF の免疫染色、及び単離したラ氏島を用いて PECAM1 と VEGF の発現量を測定した。次に、これらのマウスの血糖値の測定と、糖負荷試験による耐糖能検査を行った。

3. FoxO1 がラ氏島内微小血管の調節因子であるかどうかの検討

申請者は VEGF のプロモーター領域に FoxO1 結合モチーフが 3 カ所連続した部位が存在することを見出した。そこで、この領域を用いたルシフェーセンスアッセイを行い、FoxO1 が直接 VEGF プロモーター活性を調節し得るかを検討した。

4. 研究成果

1. 糖尿病モデルマウスにおけるラ氏島内微小血管の解析

高脂肪食飼育マウスと db/db マウスの膵臓切片を抗 PECAM1 抗体と抗 VEGF 抗体を用いた免疫染色を行った所、高脂肪食飼育マウスではこれらの染色性が亢進していたが、db/db マウスではコントロールと比べて有意な違いは確認できなかった。一方、これらのマウスからラ氏島を単離し、定量 RT-PCR 法を用いて PECAM1 と VEGF の発現量を検討したところ、図 1 に示す様に高脂肪食飼育マウスのラ氏島では PECAM1 と VEGF の発現が有意に増加していたが、db/db マウスのラ氏島では変化なかった。

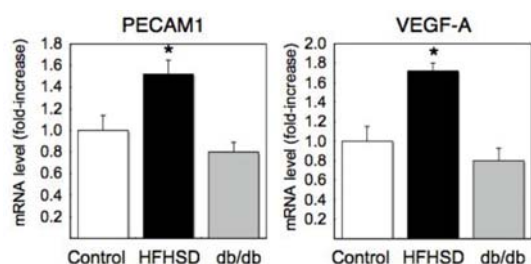


図 1 高脂肪高ショ糖食 (HFHSD) 飼育マウス、db/db マウスのラ氏島における PECAM1 と VEGF の発現量の検討 (定量 RT-PCR 法を用いた解析): 高脂肪高ショ糖食 (HFHSD) 飼育マウスの単離ラ氏島では PECAM1 と VEGF の発現量は有意に増加していたが、db/db マウスのラ氏島における PECAM1 と VEGF はコントロールと比べて差がなかった。

2. 膵臓特異的 FoxO1 トランスジェニックマウスのラ氏島における微小血管と VEGF の解析

膵臓特異的 FoxO1 トランスジェニックマウス (TG) の膵臓切片におけるラ氏島内 PECAM1 と VEGF の発現を免疫染色を用いて検討したところ、図 2 A に示す様に TG で染色性が亢進していた。次に、これらのマウスから単離したラ氏島を用いて定量 RT-PCR 法にて PECAM1 と VEGF の発現量を測定したところ、図 2 B に示す様に TG で有意に増加していた。次に、これらのマウスの血糖値を測定したところ、オスのマウスの一部が糖尿病を発症していることが明らかとなった。しかしながら、メスには糖尿病を発症するマウスは認められなかった。この性差の違いに関しては、現在

検討中である。一方、オスにも正常血糖の TG マウスが存在した為、糖負荷試験を行った所、明らかな耐糖能の障害が認められた。

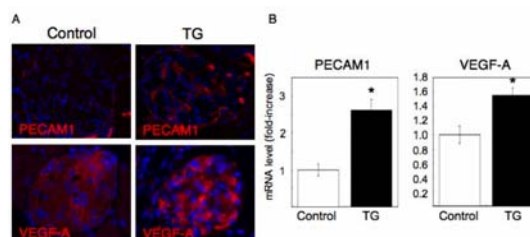


図 2 膵臓特異的 FoxO1 トランスジェニックマウスのラ氏島における PECAM1 と VEGF の発現レベル: 膵臓特異的 FoxO1 トランスジェニックマウス (TG) のラ氏島において、免疫染色と定量 RT-PCR で解析した結果、PECAM1 と VEGF の発現がコントロールに比し、有意に増加していた。

3. FoxO1 がラ氏島内微小血管の調節因子であるかどうかの検討

まず、FoxO1 が VEGF の発現を調節しているかを vitro の系で確認する為に、培養 β 細胞に活性型の FoxO1 (FoxO1-ADA) を発現するアデノウイルスを感染させ、定量 RT-PCR を用いて VEGF の RNA 量を測定したところ、図 3 A に示す様に FoxO1 の発現量依存性に VEGF の発現量が増加していた。また、FoxO1 結合モチーフを含む VEGF プロモーターを用いたルシフェーセンスアッセイを行ったところ、図 3 B に示す様に FoxO1 の発現量依存性に VEGF プロモーター活性が増加することを確認した。

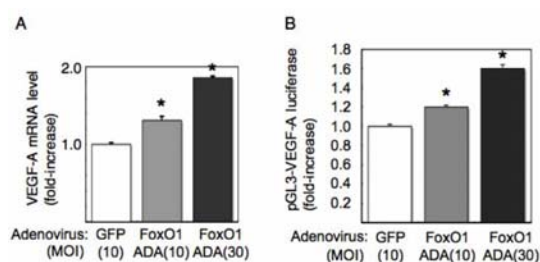


図 3 FoxO1 による VEGF の転写調節: 培養 β 細胞 (β TC3) に アデノウイルスを用いて活性型 FoxO1 を発現させた所、VEGF の RNA レベルが発現量依存性に増加した。さらに β TC3 細胞に VEGF プロモーターを含むルシフェラーゼベクターと活性型 FoxO1 を共発現させた所、FoxO1 発現量依存性に VEGF プロモーター活性が増加した。

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 1 件）

1. Kikuchi O, Kobayashi M, Amano K, Sasaki T, Kitazumi T, Kim H-J, Lee Y-S, Yokota-Hashimoto H, Kitamura Y-I and Kitamura T. FoxO1 Gain of Function in the Pancreas Causes Glucose Intolerance, Polycystic Pancreas, and Islet Hypervascularization. PLoS ONE 7: e32249, 2012. 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 博美 (横田博美) (HASHIMOTO HIROMI)
群馬大学・生体調節研究所・助手
研究者番号：3 0 3 2 3 3 7 2

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：