

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15日現在

機関番号：12301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890027

研究課題名（和文）Pdx1 転写因子複合体によるエピジェネティックな膵β細胞機能調節機構の解明

研究課題名（英文）Epigenetic regulation of pancreatic beta cell function by Pdx1 transcription factor complex

研究代表者

荒木 修 (ARAKI OSAMU)

群馬大学・医学部・医員

研究者番号：80589482

研究成果の概要（和文）：インスリン遺伝子の発現や膵β細胞の維持に重要な役割を果たす転写因子である Pancreas duodenal homeobox gene 1 (Pdx1) に共役する転写因子複合体の同定と機能解析を行い、Pdx1 による転写調節機構の包括的な理解と成熟膵β細胞におけるエピジェネティックな修飾状態を明らかにし、糖尿病におけるエピジェネティックな変化によるβ細胞機能不全のメカニズムの解明につなげるとともに、幹細胞からの膵β細胞分化・再生の指標を得ることを目的として研究を行った。

研究成果の概要（英文）：Pancreatic duodenal homeobox-1 protein (Pdx1) is a transcription factor that plays a critical role in the regulation of pancreatic islet development and insulin gene expression. This study aimed to identify Pdx1 transcription factor complex and characterize its physiological roles in the regulation of insulin gene transcription and epigenetic control of mature beta cell function. The results of this study lead to exploring the underlined mechanism of beta cell failure in diabetes, and identifying the epigenetic hallmark for mature functioning beta cells useful for the characterization of beta cell differentiation and regeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2011年度	1,130,000	339,000	1,469,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

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、膵β細胞、転写因子、エピジェネティクス、発現制御

1. 研究開始当初の背景

現在、糖尿病患者数は世界の成人人口の約5～6%に達し、2025年には、3億8,000万人(2007年より64.7%増)に達すると予想されている。我が国でも患者数

は890万人にのぼり、予備軍を含めると2,000万人を超え、40歳以上の3人に1人が糖尿病または糖尿病予備軍であることが平成18年国民健康・栄養調査速報で発表された。合併症も深刻で、糖尿病性腎症が原因

の透析導入は年間1万6,000人に達し、さらに糖尿病は心筋梗塞や脳卒中の最も重要な原因ともなっており、国も糖尿病対策を疾病対策の中心に据えている。糖尿病ならびに糖尿病合併症の病態の解明、予防ならびに治療法の確立は緊急を要する重要な課題となっている。

糖尿病は、膵臓のβ細胞から血液中に分泌される、唯一の血糖（血液中のブドウ糖濃度）降下作用を持つホルモンであるインスリンの作用不足により生じる、慢性的な高血糖状態を主な徴候とする代謝異常である。その成り立ちは、インスリンを合成・分泌する、膵臓のランゲルハンス島β細胞の破壊・消失がインスリン作用不足の主要な原因である1型糖尿病と、いくつかの遺伝素因に過食（とくに高脂肪食）、運動不足、肥満、ストレスなどの環境要因と加齢が加わり、血中にインスリンは存在してもインスリンの働きが悪くなるか、あるいは膵臓のβ細胞の破壊が生じた訳ではないが、インスリンの分泌量が減少し、結果として血糖値の調節がうまくいなくなる2型糖尿病と、大きく2つに分けられる。

生体で唯一のインスリン分泌細胞である膵β細胞の総量を「β細胞量(β cell mass)」と呼ぶが、1型糖尿病ではβ細胞量が絶対的に減少し、一方、2型糖尿病ではβ細胞量が正常の約45%まで減少していると報告されている。生後、我々の身体がどのように膵β細胞量を維持・調節しているかを明らかにすることは、膵β細胞の減少を最小限に食い止め、さらには膵β細胞を再生し、糖尿病の根治を目指すうえで重要な課題である。

マウスを用いた膵発生の解析では、膵は胎生9~9.5日頃に前腸内胚葉上皮から発芽し、膵臓を構成する各細胞に分化し得る共通の膵前駆細胞を経て、最終分化し、形成される。膵臓は、内分泌細胞(各々、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、パンクレアティックポリペプチド、グレリン産生細胞)、外分泌腺房細胞(アミラーゼ産生細胞)、膵管細胞から構成され、分化・発生の段階は、膵発生を制御する転写因子群の協調的な発現パターンによって厳密に制御されている。内胚葉から膵への器官形成は、多くの転写因子によって構成される複雑なネットワークによってコントロールされており、この中には、遺伝性の若年発症成人型糖尿病(maturity-onset diabetes of the young: MODY)の原因遺伝子も含まれている。

中でもPdx1は膵発生初期における役割に加え、成熟β細胞の機能維持にも重要な役割

を演じており、膵内分泌前駆細胞を経た後、インスリン産生細胞において顕著に発現が高まり、その後、成熟β細胞において高発現を維持し続ける。β細胞特異的Pdx1ノックアウトマウスでは糖尿病を発症し、ヒトにおいてもMODYの原因遺伝子のひとつ、MODY4として同定されている。

Pdx1は他のMODY遺伝子を含む多くの転写因子群から形成される遺伝子ネットワークにより、その発現が調節されている。

β細胞において、Pdx1の発現とその機能がどのようなメカニズムによって維持・調節され、糖尿病発症時にどのようにPdx1機能が阻害されるかを明らかにすることは、糖尿病におけるβ細胞機能不全のメカニズムを明らかにし、その防止策を見いだすために重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究では、Pdx1転写因子複合体を同定しその機能を解明することにより、糖尿病発症時にどのようにPdx1機能が阻害されβ細胞機能不全に至るかを明らかにし、その防止策を見いだすことを目標とし、以下の3点について明らかにすることを目的とする。

- (1) タンデムアフィニティータグ発現精製と質量分析によるPdx1転写因子複合体の同定と転写およびクロマチン修飾に対する活性の機能解析
- (2) クロマチン免疫沈降法(ChIP)とマイクロアレイ(chip)を利用した(ChIP on chip およびトランスクリプトーム解析)膵β細胞におけるPdx1標的遺伝子の同定
- (3) Pdx1を介した膵β細胞のエピジェネティックな制御機構の解明

Pdx1転写因子複合体による転写活性化及び、不活性化、クロマチン構造変換機構の包括的な理解を可能とすることを目的とし、また、成熟膵β細胞におけるエピジェネティックな修飾状態を明らかにすることにより、糖尿病におけるエピジェネティックな変化によるβ細胞機能不全のメカニズムを解明するとともに、人工多能性幹細胞(iPS細胞)、胚性幹細胞、体性幹細胞など、各種幹細胞からの膵β細胞分化・再生の指標を与えることを目的としている。

3. 研究の方法

- (1) タンデムアフィニティータグ発現精

製と質量分析による Pdx1 転写因子複合体の同定と機能解明

マウス膵β細胞株(MIN6 および Beta-TC-6)に哺乳類発現ベクター(pIRESneo)を用い、FLAG-HA-Pdx1を安定発現する細胞株を作成する。FLAG-HA タグはPdx1のN末端に位置するベクターとC末端に位置するベクターの2種類を準備し、ラットインスリンプロモーター下にルシフェラーゼを発現するレポーターを用いて、タグ付加によるPdx1の転写活性化能の変化の有無につき、基礎的検討を行う。

リポフェクション法により、マウス膵β細胞株にFLAG-HA-Pdx1発現ベクターを導入し、G418選択により安定発現株をクローニングする。少なくとも10クローン程度のコロニーをピックアップし、増殖させ、グルコース依存性のインスリン分泌能につき、ELISAにて評価し、反応性の良好なクローンを以降の実験に用いる。トランスフェクションあるいは、G418選択が困難な場合には、レトロウイルスベクター(pMSCVpuroあるいはpMSCVhygro)を用いて遺伝子導入し、安定発現細胞株の選択を行う。

良好なFLAG-HA-Pdx1安定発現細胞株が得られたら、可能な限り少ない継代回数の中に大量培養し、50~100mg程度の核蛋白分画ならびに細胞質蛋白分画を調整し、FLAG抗体ビーズならびにHA抗体ビーズの2段階のイムノアフィニティーピュリフィケーションを行い、Pdx1複合体を精製する。

複数の種類の複合体が存在する可能性を考え、グリセロール濃度勾配遠心を行い、各複合体の分離を試みる。同時に、蛋白電気泳動を行い、複合体構成蛋白を分離し、LC-MS/MSにて各構成蛋白を同定する。同定した蛋白に対する抗体を用いて免疫沈降を行い、各複合体の構成蛋白の組成について解明する。転写共役因子や、クロマチン構造転換因子、ヒストン修飾蛋白などが得られると予想されるが、β細胞特異的な因子が得られれば、その因子にフォーカスしてその後の解析を進めていく

(2) クロマチン免疫沈降法とマイクロアレイを利用した膵β細胞におけるPdx1標的遺伝子の同定

FLAG-HA融合Pdx1安定発現膵β細胞株からの抗FLAG、抗HA、およびネイティブ抗Pdx1抗体によるクロマチン免疫沈降とタイリングマイクロアレイへのハイブリダイズによ

るゲノム上のPdx1結合領域のプロファイリングならびに、siRNAを用いたPdx1ノックダウンβ細胞株とコントロール細胞株(内因性にPdx1を発現)のトランスクリプトーム解析から、Pdx1標的遺伝子の同定を行う。解析には、当検査部所有のアフィメトリクス社GCS 3000Dxマイクロアレイ解析システムを使用する。得られた結果は、同じく当検査部が所有するABI PRISM 7500 FAST Real-time PCRシステムを用いて検証を行う。

(3) 糖尿病β細胞におけるPdx1を介した膵β細胞のエピジェネティックな制御機構の解明

上記(1)、(2)の解析の結果をふまえて、本研究で同定されたPdx1に相互作用するクロマチン構造変換因子のPdx1結合領域へのリクルートメントと、同部位のメチル化、ならびにヒストン化学修飾の解明、さらにはFormaldehyde-assisted isolation of regulatory elements coupled with high throughput sequencing (FAIRE-seq)の手法を用いたオープンクロマチン領域の同定を、2型糖尿病モデルマウスであるdb/dbマウスより分離した膵島β細胞と正常コントロールマウスにおいて比較検討を行い、インスリンならびにグルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)の糖尿病β細胞に対する保護作用におけるPdx1によるエピジェネティックな制御機構の解明を行う。

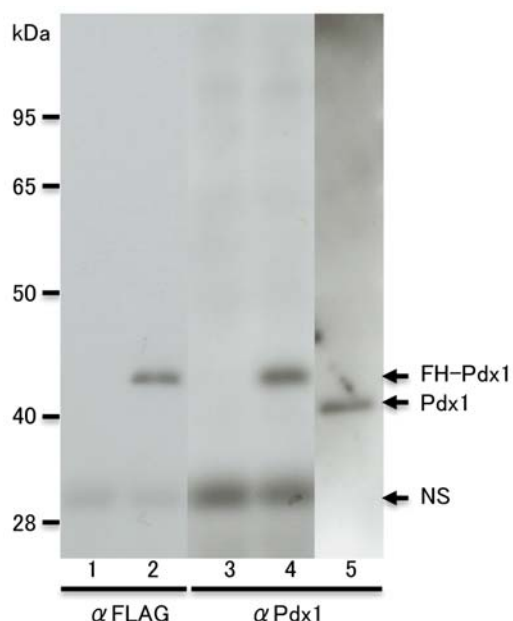
4. 研究成果

マウス膵β細胞株(MIN6 および Beta-TC-6)を培養し、RNAを調整、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応にてマウスPdx1相補的DNAをクローニングした。得られたマウスPdx1相補的DNAのN末端およびC末端、それぞれにFLAG-HAタグを付加し、哺乳類発現ベクターおよび、レトロウイルスベクターを用いてFLAG-HA-Pdx1融合蛋白を安定発現する細胞株を作成した。

樹立した細胞株より、全細胞抽出液および、核蛋白分画、細胞質分画を調整し、ウェスタンブロット法にて、FLAG-HA-Pdx1融合蛋白の発現を確認した(図1)。

アフィニティータグ精製にて、Pdx1転写因子複合体の精製を行い、複合体構成蛋白の同定と機能解析を現在も継続して行っている。

図1：ウェスタンブロット法による
FLAG-HA-Pdx1 融合蛋白の解析



FH-Pdx1: FLAG-HA tagged Pdx1
NS: Non specific
 α FLAG: anti-FLAG antibody
 α Pdx1: anti-Pdx1 antibody

Lane 1, 3: control vector, lane 2, 4:
FLAG-HA tagged Pdx1 expression vector,
lane 5: mouse pancreatic beta cell whole
cell lysate

クロマチン免疫沈降法とマイクロアレイを用いたゲノム上の Pdx1 結合領域のプロファイリング、ならびに Pdx1 標的遺伝子の同定を行うため、マウス膵 β 細胞株を用いてクロマチン免疫沈降法の条件検討をおこなった。密閉式超音波細胞破碎装置により、細胞を破碎し、免疫沈降を行い、マウス膵 β 細胞インスリンプロモーター領域における Pdx1 のリクルートメントを評価し、良好な結果を得るための実験条件を確立した。今後、マイクロアレイを用いた Pdx1 結合領域のプロファイリングならびに、トランスクリプトーム解析を行い、Pdx1 標的遺伝子の同定を行う。

糖尿病モデルマウス膵 β 細胞における Pdx1 機能の解析について、まず、コントロールの非糖尿病マウスより膵島を単離する条件を検討し、単離した膵島のインスリン分泌能の評価方法ならびに Pdx1 蛋白発現の検出およびクロマチン免疫沈降法について条件検討を行った。糖尿病モデルマウス膵 β 細胞機能の評価について、今後引き続き解析を行

っていく。

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 Tsunekawa K, Yanagawa Y, Aoki T, Morimura T, Araki O, Ogiwara T, Kawai Y, Mitani Y, Lezhava A, Yanagawa M, Hayashizaki Y, Murakami M: Association between accumulation of visceral fat and the combination of β 3 adrenergic receptor Trp64Arg, β 2 adrenergic receptor Arg16Gly and uncoupling protein 1 -3826A>G polymorphisms detected by Smart Amplification Process 2. *Endocr J*, 査読有, 58, 2011, 1079-1086

[学会発表] (計 2 件)

- ① 荒木修, C/EBP α , PPAR γ を介した甲状腺ホルモンによる脂肪細胞分化誘導機構の解析、第 84 回日本内分泌学会学術総会、2011. 4. 21、神戸国際展示場 (神戸市)
- ② 荒木修, C/EBP α , PPAR γ を介した甲状腺ホルモンによる脂肪細胞分化誘導機構、第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、2011. 5. 21、ロイトン札幌 (札幌市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 修 (ARAKI OSAMU)

群馬大学・医学部・医員

研究者番号：80589482