

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：44523

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23617011

研究課題名(和文) 栄養代謝調節因子 Foxo1 が制御する膵β細胞機能と寿命、糖代謝の統合的研究

研究課題名(英文) Analysis of Foxo1-regulated genes using Foxo1-deficient pancreatic beta cells

研究代表者

倭 英司 (YAMATO, Eiji)

武庫川女子大学短期大学部・食生活学科・教授

研究者番号：20273667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円、(間接経費) 1,230,000 円

研究成果の概要(和文)：Foxo1遺伝子欠損膵β細胞株を得る目的で、Foxo1 flox/floxマウスとIT6マウスを交配し、その膵腫瘍からFoxo1-flox-MIN6細胞を得た。この細胞にCre発現アデノウイルスを投与し、Foxo1遺伝子欠損膵β細胞株(Foxo1-KO-MIN6細胞)を得ることに成功した。この細胞を用いて、遺伝子の網羅的検討を行い、膵β細胞でFoxo1が制御する遺伝子群の単離を行った。Foxo1は膵β細胞の機能維持に関与すると考えられ、これらの遺伝子群の解析は新たな糖尿病治療の開発に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We produced a beta-cell line with inducible Foxo1 deletion. We generated a conditional knockout mouse line, in which Cre deletes the Foxo1 gene. We then established a beta-cell line from an insulinoma induced in this knockout mouse by the beta-cell-specific expression of SV40T antigen. In this cell line, designated MIN6-Foxo1flox/flox, adenovirus-mediated Cre expression ablates the Foxo1 gene, generating MIN6-Foxo1-KO cells. Using these knockout and floxed cell lines, we found that Foxo1 ablation enhanced the glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) at high glucose concentrations and enhanced beta-cell proliferation. We also conducted DNA microarray analyses of MIN6-Foxo1-KO cells infected with either an adenovirus vector expressing a constitutively active FOXO1 or a control vector and identified several Foxo1-regulated genes. These cells should be useful for further studies on Foxo1's roles in beta-cells and may lead to novel strategies for treatment of type 2 diabetes mellitus.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：統合栄養科学

キーワード：Foxo1 膵β細胞 インスリン分泌 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

膵ベータ細胞機能障害が酸化ストレスにより惹起されることが、我々を含めた多くの研究室から報告されている。抗酸化ストレスタンパク質チオレドキシニン (TRX) は ROS (活性酸素種) を直接消去することや ROS によって傷害された DNA、タンパク質、脂質の酸化状態を回復する作用を持っている。我々は以前に 1 型糖尿病モデル NOD マウスを用いてインスリンプロモーター下にヒト TRX を発現させる NOD-TRX トランスジェニックマウスを作成した。このマウスは膵島炎には影響を与えず、膵ベータ細胞の破壊が抑制されることを我々の教室から報告した (*J Exp Med*: 188, 1455, 1998)。また、この破壊抑制機序が 2 型糖尿病発症にも有効であるか否かを検討する目的で、db/db-TRX マウスを作成した。その結果、db/db-TRX マウスは db/db マウスに比し有意に血清インスリン値が高値で糖尿病状態の改善が認められ、膵インスリン含量の有意な残存が認められた。また、db/db-TRX マウスの膵組織は db/db マウスに比し膵島組織の構造が保持され、Pdx-1 や MafA の核局在が保たれている像が多く認められた (*Antioxid Redox Signal* 10: 43, 2008)。以上の結果から、酸化ストレスは膵ベータ細胞の代謝異常を引き起こし、細胞を破壊あるいは機能不全状態を惹起することが強く示唆された。

Foxo (Forkhead transcription factors) ファミリーは、インスリン受容体シグナル下流に位置し、インスリン/PI3-kinase/AKT 依存的にリン酸化を受け、核から細胞質に移行することでその転写活性が抑制される、インスリン作用の負の調節因子であり、細胞代謝を制御し、酸化ストレス応答や細胞の寿命、細胞死と関係することが知られている。Foxo ファミリーには Foxo1、Foxo3、Foxo4 および Foxo6 が存在するが、中でも Foxo1 は肝臓、脂肪組織、筋肉などのインスリン反応性臓器や膵β細胞において強い発現が見られることから、糖代謝への関与が考えられている。実際、糖尿病モデルマウス (InsR+/-) に対して Foxo1 をヘテロノックアウトするとインスリン抵抗性が改善したという報告や、膵ベータ細胞や肝臓における Foxo1 過剰発現マウスでは耐糖能が低下するという報告がある。さらに、in vitro 膵ベータ細胞に Foxo1 を過剰発現させると、インスリン分泌の低下が起こることが見出されている。これらの報告から、Foxo1 の代謝への影響、特に膵ベータ細胞機能に関係している可能性は極めて高く、本邦のみならず、諸外国の研究者の注目するところである。

2. 研究の目的

膵ベータ細胞の栄養代謝を介するインスリン分泌機構と寿命や糖代謝などの生体に対する Foxo1 の関与を検討する目的で、膵ベータ細胞特異的 Foxo1 ノックアウトマウスの糖代謝を検討する。Foxo1-flox マウスより作出した膵ベータ細胞株から Foxo1 ノックアウト膵ベータ細胞株を得る。この細胞にグルコースやアルギニンなどの nutrient を負荷し、インスリン分泌機能を検討する。また、Foxo1 発現による遺伝子発現を DNA Chip 解析を用い解析し、Foxo1 の下流経路を同定する。これらの方法により、Foxo1 遺伝子の膵ベータ細胞機能に対する役割とその栄養代謝的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

我々は Foxo1 遺伝子座を flox ではさむ形の targeting vector を作成し、定法を用いて Foxo1 flox/flox マウスを得た。我々は以前に膵ベータ細胞特異的に SV40T Ag を発現する IT6 マウスを作成し、その膵腫瘍から膵ベータ細胞株 MIN6 を確立している。この細胞は本邦を含めた諸外国で開発された膵ベータ細胞株の中で、生理的な膵ベータ細胞に近いインスリン分泌応答性を保っており、世界的な標準とされている。そこで、我々は Foxo1 遺伝子欠損膵ベータ細胞株を得る目的で、Foxo1 flox/flox マウスと IT6 マウスを交配し、その膵腫瘍から Foxo1-flox-MIN6 細胞を得た。

この細胞に adenovirus を用いて Cre 蛋白を導入し、Foxo1 ノックアウト MIN6 細胞を得た。この細胞を用いて、インスリン分泌や細胞増殖能を検討した。さらに、得られた Foxo1 ノックアウト MIN6 細胞に Foxo1 を再発現させた細胞を作成し、ノックアウト細胞との間でマイクロアレイを行い、Foxo1 が制御する遺伝子の検討を行った。

4. 研究成果

Foxo1 ノックアウト MIN6 細胞では高グルコースにおいてインスリン分泌が亢進していた。また細胞増殖は亢進しておりアポトーシス細胞も多く認められた。また、マイクロアレイの結果、Foxo1 は Nr4a1 や Fos 遺伝子を抑制することがわかった。

Foxo1 は従来、代謝を抑制し、細胞の寿命を延長させる遺伝子として知られている。われわれの結果でも、Foxo1 ノックアウト細胞では細胞増殖が亢進、アポトーシスが増加したことから、膵ベータ細胞においても Foxo1 は、細胞分裂を抑制し、アポトーシスを抑制して細胞の寿命を延長させている可能性がある。

また、Foxo1 ノックアウト細胞では高グル

コースにおけるインスリン分泌が亢進していた。高グルコースは膵β細胞にとっては酸化ストレスを引き起こし、細胞障害性に働く。Foxo1はこのような状況においてインスリン分泌が過度になりすぎること抑制することにより膵β細胞保護的に働いている可能性がある。

膵β細胞におけるFoxo1の役割は、Foxo1のhaploinsufficiencyまたは機能亢進または機能喪失変異を有するマウスモデルを用いて研究されてきた。これらの研究によりFoxo1はβ細胞の増殖および分化を阻害することが示された。本研究では、我々はホモ接合フロックスFoxo1の対立遺伝子を有するMIN6-Foxo1-flox/flox細胞株を樹立し、この細胞株に、アデノウイルスでCre発現させ、FOXO1遺伝子を欠損させたMIN6-Foxo1-KO細胞を作製した。MIN6 Foxo1-flox/flox cellsとMIN6-Foxo1-KO細胞を用いて、β細胞でFoxo1を欠損の効果を検討した。Foxo1欠損により、高グルコース濃度でβ細胞のインスリン分泌は増加し、細胞増殖およびアポトーシスは減少した。小林らは、近年、β細胞特異的Foxo1ノックアウトマウスは、正常または高脂肪高グルコース食を与えて検討し、明らかなβ細胞機能異常を示さないことを報告した。我々の検討でもFoxo1欠損細胞とFoxo1発現β細胞間の細胞増殖またはインスリン分泌能の違いが少ないこと一致している。対照的に、小林らは、耐糖能異常が異常であるdb/dbマウスと比較して、β細胞特異的Foxo1ノックアウトのdb/db糖尿病マウスにおいて重度であることを示した。Foxo1欠損はdb/dbマウスにおける成熟インスリン顆粒を減少させることが示された。それらはまた、β細胞特異的ノックアウトdb/dbマウスの膵島におけるPdx1の発現が低下すると報告した。我々のβ細胞株のDNAマイクロアレイ分析では、Foxo1欠損ではPdx1の発現を変化させず、これはRT-PCRによっても確認された。これらの結果は、Foxo1がPdx1発現を調節していることを示す他の報告とは異なる。私たちの結果からは少なくともPdx1がFoxo1の直接のターゲットではないことを示唆している。

FOXO因子は、核と細胞質間を往復し、そのリン酸化の変化からFOXOの活動結果を制御すると考えられている。これまでの検討では、Foxo1強制発現又は機能喪失型変異体を発現した細胞間においてDNAマイクロアレイのβ細胞の遺伝子発現パターンを比較することにより、のFoxo1ターゲット候補遺伝子を同定した。しかし、これらの検討は、basal Foxo1発現による影響がマスクされる可能性がある。本研究で確立されたFoxo1欠損膵β細胞株は、膵β細胞でFoxo1の標的遺伝子を同定するための理想的なツールだと考えられる。caFoxo1を発現するMIN6-Foxo1-KO細胞とEGFP発現細胞との間でのDNAマイクロアレイ分析による遺伝子発現プロファイルによる比較によ

り、FOXO1によって調節される遺伝子を同定した。興味深いことに、これらの遺伝子の多くは、β細胞機能または糖尿病感受性に関与しているものがあつた。caFOXO1によってdownregulateされた遺伝子の中では、ID1、HK1、BNIP3、LDHA、Slc16a3、C2cd4bとTFF3ならびに、NR4A1、EGR2、FOSBとJUNBなどの初期応答遺伝子を含まれていた。これらの遺伝子は、β細胞機能のFOXO1が介在する調節に関与している可能性がある。ID遺伝子は、リプレッサー型塩基性HLH転写因子をコードする。Id1は、膵島において発現され、グルコースや他のインスリン分泌刺激因子IIは、単離膵島やβ細胞株におけるIdの発現を増加させる。MIN6細胞では、Id1をのsiRNAによる阻害は、パルミチン酸処理した後にインスリン分泌を促進し、β細胞におけるパルミチン酸による遺伝子発現変化を阻止する。また、caFOXO1により、HK1、LDHA、Slc16a3が抑制されたことは興味深い。HK1はβ細胞においてグルコキナーゼの主要なアイソザイムであり、ヘキソキナーゼをコードしている。MIN6細胞におけるHK1の過剰発現は、低グルコース濃度においてインスリン分泌を増大することが示されている。また、これまでの検討で、LDHAによってコードされる乳酸脱水素酵素(LDH)はβ細胞で低レベルで発現しており、モノカルボン酸(乳酸/ピルビン酸塩)トランスポーターであるMCT1とMCT4(膵臓β細胞では、それぞれSlc16a1とSlc16a3によりコードされている。石原らが行った過剰発現の研究で、低MCTおよび低LDHレベルであることは、グルコース感受性インスリン分泌に必須であることがわかっている。したがって、FOXO1は、これらの遺伝子の望ましくない発現を抑制に関与している可能性がある。我々の研究でcaFOXO1によって制御された遺伝子、Cartpt、Phlda3、Calb1、MBL2、RAMP1、RAMP3などは、Foxo1を介したβ細胞機能調節に関与している可能性がある。これらの遺伝子はそれぞれβ細胞機能に関与していると報告されている。

マイクロアレイの結果、Nr4a1がFoxo1により抑制されることがわかった。Nr4a1はNur77をコードする遺伝子である。Nur77は脂質など、β細胞傷害を感知する蛋白として知られている。このことから、Foxo1はNur77の抑制を介して細胞傷害に対して抑制的に作用している可能性がある。またFoxo1はFosを抑制している。Fos遺伝子はc-Fosをコードしており、Fosはアポトーシスを引き起こすことが知られている。このことから、Foxo1のアポトーシス抑制効果はc-Fos抑制を介する可能性がある。

これらの結果から、Foxo1はβ細胞の機能維持に重要な役割を果たしていることがわかった。2型糖尿病では膵β細胞の機能低下が日本人ではその病因の中心であることが言われており、Foxo1制御遺伝子の解析は新たな糖尿病治療創薬の開発に貢献

するものと考えている。

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)

Miyazaki S, Minamida R, Furuyama T, Tashiro F, Yamato E, Inagaki S, Miyazaki J. Analysis of Foxo1-regulated genes using Foxo1-deficient pancreatic cells. Genes Cells 17: 758-67, 2012.

〔学会発表〕(計 1 件)

宮崎早月、田代文、倭英司、宮崎純一
Foxo1 欠損膵ベータ細胞株の解析
第 56 回日本糖尿病学会、2014 年 5 月 16 日、熊本

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倭 英司 (YAMATO, Eiji)
武庫川女子大学短期大学部・
食生活学科・教授
研究者番号：20273667

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし