

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460489

研究課題名(和文) 時計遺伝子DBP/E4BP4を介した膵細胞による糖代謝制御機構

研究課題名(英文) glucose metabolism in pancreatic beta-cell via circadian clock genes DBP and E4BP4

研究代表者

太田 康晴 (OHTA, Yasuharu)

山口大学・医学部・准教授(寄附講座等)

研究者番号：60448280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：重度の糖尿病をきたすWolfram症候群は、WFS1遺伝子の変異により発症する。我々は、WFS1欠損マウスの膵細胞において時計遺伝子ネットワークの出力部分の転写因子に異常がある(DBP活性の低下)ことを見出した。DBP活性が膵細胞特異的に抑制されるような遺伝子改変マウスは顕著なインスリン分泌不全を伴う耐糖能障害を呈していた。正常な膵細胞は、摂食が始まる時間に備えてインスリンが速やかに分泌されるような準備状態を作るが、DBP活性が抑制されている膵細胞はこのような準備が出来ないことが示唆された。つまり膵細胞における体内時計の異常はインスリン分泌不全さらには糖尿病を引き起こす可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：In *Wfs1*^{-/-} *Ay/a* islets, *Dbp* expression decreased and *E4bp4* expression increased, leading to reduced *DBP* transcriptional activity. Transgenic mice expressing *E4BP4* under the control of the mouse insulin gene promoter (MIP), in which *E4BP4* in β -cells is expected to compete with *DBP* for D-box, displayed remarkable glucose intolerance with severely impaired insulin secretion. Basal ATP/ADP ratios in MIP-*E4BP4* islets were elevated without the circadian oscillations observed in wild-type islets. Neither elevation of the ATP/ADP ratio nor an intracellular Ca^{2+} response was observed after glucose stimulation. RNA expressions of genes involved in insulin secretion gradually increase in wild-type islets early in the feeding period. In MIP-*E4BP4* islets, however, these increases were not observed. Molecular clock output *DBP* transcriptional activity, susceptible to ER stress, plays pivotal roles in β -cell priming for insulin release by regulating β -cell metabolism and gene expressions.

研究分野：糖尿病学

キーワード：体内時計 時計遺伝子 インスリン分泌 2型糖尿病

1. 研究開始当初の背景

生体リズムは生物の基本的形質であり、その根幹である時計遺伝子の発現リズムの障害は老化に伴う糖尿病、高血圧、癌など様々な疾患の発症・進展に与与する。

体内時計と摂食には密接な関係があり、「体内時計と摂食」の関係の破綻が、肥満や糖尿病の要因になりうるようになってきた。多くの研究が、シフトワークや睡眠障害は肥満や糖尿病のリスクファクターになることを示している (Pan A, et al. PLoS Med 8: e1001141, 2011)。また、マウスを用いたシフトワークモデルの研究でも、シフトワークが肥満を加速することが示されている。つまり、体内時計の周期に合わないような明暗環境や摂食行動は、結果的に肥満・糖尿病の発症・進展につながると考えられる。

生体の概日リズムの本体は時計遺伝子の振動である。脳(視床下部)の視交叉上核に概日リズムの中核が存在し、光刺激の情報を受けて視交叉上核のリズムが微調整され、それに同調するように膵細胞などの各組織に存在する体内時計が制御される。

一方、肝臓や脂肪細胞のようなエネルギー代謝に関わる臓器では、時計遺伝子の発現の振幅は視交叉上核よりむしろ大きい。興味深いことに、それらの臓器では視交叉上核からのシグナルに加えて、摂食の周期に大きな影響を受けることがわかってきた。通常、夜間摂食するマウスに強制的に昼間摂食させると、視交叉上核での時計遺伝子発現は変化しないが、肝臓ではそれらの発現の位相が大きくシフトして逆転してしまう (Damicola F, et al. Genes Dev 14: 2950-61, 2000)。摂食が末梢臓器での時計遺伝子の発現リズムを変えてしまうという観察は、体内時計と摂食及びエネルギー代謝調節との関わりをさらに強く示唆する。

2. 研究の目的

糖代謝の中核をなす膵細胞に焦点を当て、膵細胞による代謝調節における時計遺伝子の役割を、出力系の時計遺伝子の遺伝子改変マウスを用いて明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

膵細胞特異的 E4BP4 過剰発現マウス

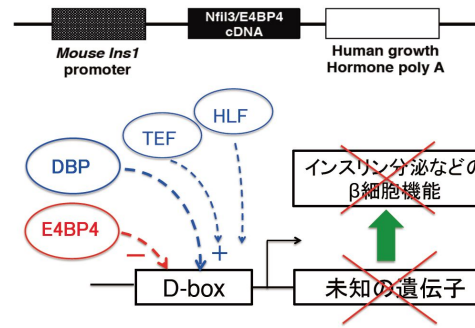


図1. MIP-E4BP4の作製

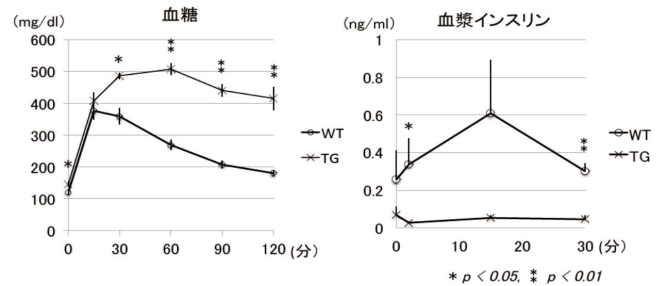


図2. MIP-E4BP4 TGマウスの腹腔内ブドウ糖負荷試験(1g/kg)

(MIP-E4BP4 TG マウス)を既に作製し(図1)

、耐糖能の表現系を明らかにする。このマウスは顕著なインスリン分泌不全を伴った耐糖能障害を呈することを明らかにしつつあるため(図2)、さらに Static incubation 法による単離ラ氏島のインスリン分泌の解析や膵灌流実験により、MIP-E4BP4 TG マウスの細胞機能を動的に解析し、E4BP4 の恒常的な過剰発現が膵細胞機能不全とりわけインスリン分泌不全を引き起こすという知見を確立していく。さらに、単離ラ氏島を用いたマイクロアレイ、プロテオーム解析、RNA シーケンスとともに ChIP-シーケンスを行い、MIP-E4BP4 TG マウスのインスリン分泌不全のメカニズムと膵細胞における E4BP4 の直接的なターゲット明らかにしていく。ターゲットの候補分子の中で興味深いものについては新たな遺伝子改変マウスの作製を検討する。

4. 研究成果

重度の糖尿病をきたす Wolfram 症候群は、WFS1 という遺伝子の変異により発症する。我々は WFS1 欠損マウスの膵細胞には、時計遺伝子ネットワークの出力に相当する転写因子に異常 (DBP の発現低下、E4BP4 の発現増加)があることを見出した。D-box 配列に作用する DBP、E4BP4 は時計遺伝子の出力系の1経路であり、DBP は転写活性化因子、

E4BP4 は転写抑制因子として、お互いに対し reciprocal にはたらく。DBP の転写活性が膵細胞特異的にかつ恒常的に抑制されているような遺伝子改変マウス (MIP-E4BP4 マウス) を作製したところ、このマウスは顕著なインスリン分泌不全を伴う耐糖能障害を呈していた。MIP-E4BP4 マウスのインスリン分泌不全のメカニズムとして、膵細胞のグルコース代謝障害、そしてインスリン分泌に関連する遺伝子の転写の障害という2つの機序を考えた。高グルコース刺激前後で、野生型マウスの膵ラ氏島では ATP/ADP 比が2倍に増加するのに対し、MIP-E4BP4 マウスの膵ラ氏島では、全くこの比が増加しなかった。さらにグルコース刺激前(ベール)の ATP/ADP 比を観察したところ、野生型マウスでは Zeitgeber Time (ZT)12 を最小値とした概日リズムが存在していた。一方、MIP-E4BP4 マウスでは、このリズムが消失し、ほとんどの時間帯で野生型マウスの ATP/ADP 比よりも高値であることが観察された。つまり、野生型マウスの膵細胞は、摂食時間の前にベールの ATP/ADP 比を下げしておくことによって、摂食した時の速やかなインスリン分泌を可能にしているが、MIP-E4BP4 マウスの膵細胞はこのような準備ができていないために速やかなインスリン分泌が出来なくなっていると考えられた。また、MIP-E4BP4 マウスの膵ラ氏島では、野生型で認められるようなインスリン分泌に関する遺伝子の ZT12~16 にかけての発現増加が不十分であることが観察された。以上の結果より、D-box に対するシグナルが恒常的に抑制されている状態では、膵細胞の代謝、そしてインスリン分泌に必要な遺伝子の転写に異常が起こり、インスリン分泌不全をきたすことが観察された。

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2件)

Ohta Y, Taguchi A, Matsumura T, Nakabayashi H, Akiyama M, Yamamoto K, Fujimoto R, Suetomi R, Yanai A, Shinoda K, Tanizawa Y. Clock Gene Dysregulation Induced by Chronic ER Stress Disrupts β -cell Function. Ebiomedicine18: 146-156.2017doi:10.1016/j.ebiom.201

7.03.040. 査読あり.

Matsunaga K, Tanabe K, Inoue H, Okuya S, Ohta Y, Akiyama M, Taguchi A, Kora Y, Okayama N, Yamada Y, Wada Y, Amemiya S, Sugihara S, Nakao Y, Oka Y, Tanizawa Y. Wolfram syndrome in the Japanese population; molecular analysis of WFS1 gene and characterization of clinical features. PloS One 9(9): e106906. 2014 doi: 10.1371/journal.pone. 査読あり.

[学会発表](計23件)

太田康晴、田口昭彦、松村卓郎、中林容子、秋山 優、末富史佐、谷澤幸生 DBP シグナルによるインスリン分泌調節機構の解明 第59回糖尿病学会年次学術集会2016年5月21日国立京都国際会館(京都府京都市)

Ohta Y, Taguchi A, Matsumura T, Nakabayashi H, Akiyama M, Suetomi R, Yanai A, Shinoda K, Tanizawa Y. Clock Gene Dysregulation Induced by Chronic ER Stress Disrupts β -cell Function. The Islet Study Group meeting 2016 Garmisch-Partenkirchen (Germany)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等:
山口大学ホームページ
(<http://www.yamaguchi-u.ac.jp/weeklynews/2017/6060.html>)
日本経済新聞
(<http://www.nikkei.com/article/DGXLZ016098610Y7A500C1LC0000/>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 康晴 (OHTA, Yasuharu)
山口大学・医学部・准教授
研究者番号：60448280

(2) 研究分担者

秋山 優 (AKIYAMA, Masaru)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90717547

田口 昭彦 (TADUCHI, Akihiko)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20634744

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし