

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860695

研究課題名(和文) 転写因子Rfx6のGIP産生K細胞における機能の解析

研究課題名(英文) Functional analysis of transcription factor Rfx6 in GIP-producing K-cell

研究代表者

山根 俊介 (YAMANE, Shunsuke)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90582156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：Rfx6がRfx3と共役してK細胞におけるGIP発現制御に関与しているという仮説を検証するため、STC-1細胞を用いて、Rfx6とRfx3の発現抑制および過剰発現に伴うGIP遺伝子発現の変化を検討した。Rfx6の発現抑制によってGIP発現は有意に低下したが、Rfx3の抑制ではGIP発現に変化を認めず、さらにRfx6とRfx3共抑制によってもRfx6単独抑制におけるGIP発現と比較して有意な差を認めなかった。またRfx6過剰発現によるGIP遺伝子発現は増加したが、Rfx6とRfx3の共過剰発現によるGIP発現はRfx6単独過剰発現時と比較して同程度であった。

研究成果の概要(英文)：To investigate the hypothesis that Rfx6 and Rfx3 cooperate with each other and are involved in the regulation of GIP expression in K-cell, we evaluated the effect of knockdown and overexpression of Rfx6 and Rfx3 on GIP gene expression using STC-1 cell line. GIP mRNA expression levels were significantly decreased in Rfx6- knockdown STC-1 cells as we have previously reported. However, Rfx3 knockdown had no effect on GIP gene expression. In addition, simultaneous knockdown of Rfx6 and Rfx3 in STC-1 cells resulted in no change in GIP gene expression compared to single knockdown of Rfx6. Increased GIP expression levels were observed in Rfx6-overexpressing STC-1 cells and GIP expression levels in Rfx6/Rfx3- overexpressing cells were similar to those in Rfx6-overexpressing STC-1 cells.

研究分野：代謝学

キーワード：インクレチン 肥満

1. 研究開始当初の背景

Gastric inhibitory polypeptide (GIP)は、腸管内分泌 K 細胞から分泌されるペプチドホルモンであり、インスリン分泌促進を介した血糖値降下作用のみならず、脂肪摂取時に分泌が亢進し、肥満の形成に重要であることが示されている。しかし腸上皮細胞の中で K 細胞は極めて希少であり、単離が困難であったため GIP 合成・分泌の機構はまだまだ不明な点が多い。これまでに申請者の所属研究室は、K 細胞を可視化した GIP-GFP ノックイン (GIP-GFP KI^{gfp+/+}) マウスを作製し、K 細胞に転写因子 Regulatory factor X (Rfx) 6 が高度に発現していること、高脂肪食摂取下肥満状態での GIP 分泌増加に K 細胞内 Rfx6 発現上昇が関与することを報告した。

2. 研究の目的

GIP 遺伝子転写制御機構の解明を目指しており、GIP 制御による抗肥満作用を有する糖尿病・肥満の新たな治療法の開発につなげたい。本研究では GIP 遺伝子発現に関与する Rfx6 の転写共役因子群の同定および高脂肪食摂取による GIP 分泌亢進機構のさらなる解明を目的とする。

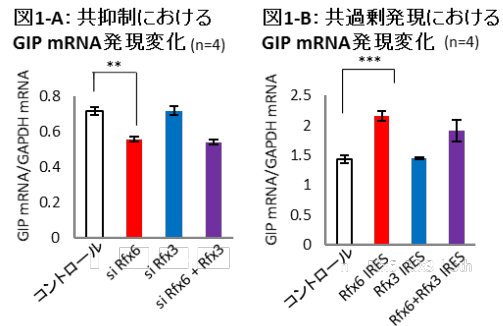
3. 研究の方法

K 細胞において Rfx6 が、同じ Rfx family である Rfx3 と共役して GIP 遺伝子発現制御に関与する可能性を検討するため、K 細胞モデルであるマウス腸管内分泌腫瘍株 STC-1 を用いて、Rfx6 と Rfx3 の small interfering RNA (siRNA) による発現抑制、または expression plasmid による過剰発現を行い、GIP 遺伝子発現の変化を評価した。また Rfx6 の新規転写共役因子の検索・同定を行うための予備実験として、Rfx6 に FLAG-tag を結合した Rfx6-FLAG plasmid を用いて Rfx6 過剰発現 STC-1 を作製した。さらに高脂肪食摂取時の GIP 分泌亢進機構の解明を進めるため、7 週齢の GIP-GFP KI^{gfp+/+} マウスに短期間 (5 日間)の高脂肪食 (60%脂肪: HFD) または通常食 (10%脂肪 CFD) 負荷を行った後、経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT) または経口脂質負荷試験を行い、血糖値、インスリン分泌、GIP 分泌を測定した。

4. 研究成果

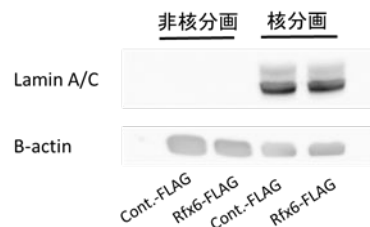
Rfx6 と Rfx3 の siRNA による抑制にともなう遺伝子発現の変化を測定した。Rfx6 の抑制によって GIP 遺伝子発現は有意に低下したが、Rfx3 の抑制では GIP 遺伝子発現に変化を認めず、さらに Rfx6 と Rfx3 共抑制によっても Rfx6 単独での GIP 遺伝子発現抑制と比較して変化を認めなかった (図 1-A)。次に IRES ベクターを用いて Rfx6 と Rfx3 の共過剰発現による GIP 遺伝子発現の変化を測定した。Rfx6 過剰発現による GIP 遺伝子発現亢進は再確認されたが、Rfx6 と Rfx3 の共過剰発現によっても GIP 遺伝子発現は Rfx6 単

独過剰発現時と比較して同程度であった (図 1-B)。以上の結果から、STC-1 において Rfx6 と Rfx3 の GIP 遺伝子発現への共役は示されなかった。



そこで、Rfx6 の新規転写共役因子の検索・同定を行うために、Rfx6-FLAG plasmid を用いて Rfx6 過剰発現 STC-1 を作製した。作製した細胞を回収し、Dignam 法によって細胞核分画の粗精製を行った。ウェスタンブロッティングによって粗精製産物が核分画と非核分画に分かれていることを確認した (図 2)。今後は、細胞核分画を用いて抗 FLAG ピーズによりアフィニティークロマトグラフィー精製を行い、精製産物を LC/MS による解析を行う予定である。

図2: Rfx6過剰発現STC-1の細胞分画精製



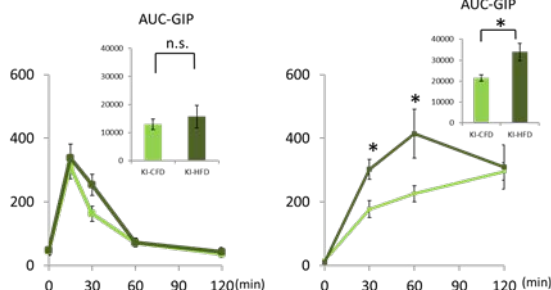
次に高脂肪食摂取による GIP 分泌亢進機構のさらなる解明のため、短期の高脂肪食負荷による非肥満状態における GIP 分泌を評価した。7 週齢の GIP-GFP KI^{gfp+/+} マウスに 5 日間の高脂肪食負荷を行ったところ、通常食と高脂肪食負荷群で有意な体重差を認めなかった。経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT)、経口脂質負荷試験を行い血中 GIP 濃度を測定したところ、経口ブドウ糖負荷試験において、通常食負荷群に比較して高脂肪食負荷群で負荷後の血糖値とインスリン値の有意な上昇を認めたが、GIP 値は差を認めなかった (図 3-A)。一方で、経口脂質負荷試験では、通常食負荷群に比較して高脂肪食負荷群で負荷後の GIP 分泌の有意な高値を認めた (図 3-B)。以上から、短期間の高脂肪食負荷による非肥満状態においては、糖刺激による GIP 分泌は変化していないが、脂質刺激による GIP 分泌は亢進することを明らかにした。今後は、RNA シークエンスにより短期高脂肪食負荷非肥満状態の K 細胞における遺伝子

発現プロファイルを評価する予定である。

図3: GIP-GFPヘテロマウスGIP分泌

■ GIP-GFP $KI^{fl/fl}$, CFD ■ GIP-GFP $KI^{fl/fl}$, HFD * $P < 0.05$, n.s. = no significance

図3-A: 経口ブドウ糖負荷試験 図3-B: 経口脂質負荷試験



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8件)

Yamane S, Harada N, Inagaki N. Mechanisms of fat-induced gastric inhibitory polypeptide/glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion from K cells. *J Diabetes Investig.* 2016;7 Suppl 1:20-6.

Yamane S, Inagaki N. Control of intestinal stem cell fate: A novel approach to treating diabetes. *J Diabetes Investig.* 2016 ;7 :166-8.

Joo E, Muraoka A, Hamasaki A, Harada N, Yamane S, Kondo Y, Suzuki K, Nasteska D, Shibue K, Harada T, Iwasaki K, Tsuji H, Shide K, Inagaki N. Enteral supplementation with glutamine, fiber, and oligosaccharide modulates incretin and glucagon-like peptide-2 secretion. *J Diabetes Investig.* 2015;6:302-8.

Shibue K, Yamane S, Harada N, Hamasaki A, Suzuki K, Joo E, Iwasaki K, Nasteska D, Harada T, Hayashi Y, Adachi Y, Owada Y, Takayanagi R, Inagaki N. Fatty acid-binding protein 5 regulates diet-induced obesity via GIP secretion from enteroendocrine K cells in response to fat ingestion. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015;308:E583-91.

Yabe D, Kuroe A, Watanabe K, Iwasaki M, Hamasaki A, Hamamoto Y, Harada N, Yamane S, Lee S, Murotani K, Deacon CF, Holst JJ, Hirano T, Inagaki N, Kurose T, Seino Y. Early phase glucagon and insulin secretory abnormalities, but not incretin secretion, are similarly responsible for hyperglycemia after ingestion of nutrients. *J Diabetes Complications.*

2015;29:413-21.

Iwasaki K, Harada N, Sasaki K, Yamane S, Iida K, Suzuki K, Hamasaki A, Nasteska D, Shibue K, Joo E, Harada T, Hashimoto T, Asakawa Y, Hirasawa A, Inagaki N. Free fatty acid receptor GPR120 is highly expressed in enteroendocrine K cells of the upper small intestine and has a critical role in GIP secretion after fat ingestion. *Endocrinology.* 2015; 156: 837-46.

Yamane S, Inagaki N. Long-term effect of dipeptidyl peptidase-4 inhibition on β -cell mass in an advanced-aged diet-induced obesity mouse model. *J Diabetes Investig.* 2014 23;5:142-3.

Nasteska D, Harada N, Suzuki K, Yamane S, Hamasaki A, Joo E, Iwasaki K, Shibue K, Harada T, Inagaki N. Chronic reduction of GIP secretion alleviates obesity and insulin resistance under high-fat diet conditions. *Diabetes.* 2014;63:2332-43.

[学会発表](計15件)

Nobuya Inagaki, Shunsuke Yamane, Norio Harada. The mechanisms of fat-induced GIP secretion from K-cells. *Incretin 2015 (Plenary presentation).* Jul.30. 2015. Vancouver, Canada.

Takanari Harada, Kanako Iwasaki, Norio Harada, Kazuki Sasaki, Shunsuke Yamane, Keiko Iida, Kazuyo Suzuki, Akihiro Hamasaki, Daniela Nasteska, Kimitaka Shibue, Erina Joo, Toshihiro Hashimoto, Yoshinori, Asakawa, Akira Hirasawa, Nobuya Inagaki. Free fatty acid receptor GPR120 is highly expressed in enteroendocrine K-cells of upper small intestine and has a critical role in GIP secretion after fat ingestion. *Incretin 2015.* Jul.30. 2015. Vancouver, Canada.

Kimitaka Shibue, Shunsuke Yamane, Norio Harada, Akihiro Hamasaki, Kazuyo Suzuki, Erina Joo, Kanako Iwasaki, Daniela Nasteska, Takanari Harada, Yoshitaka Hayashi, Yasuhiro Adachi, Yuji Owada, Ryoichi Takayanagi, Nobuya Inagaki. Fatty acid-binding protein 5 regulates diet-induced obesity via GIP secretion from enteroendocrine K-cells in response to fat ingestion. *Incretin 2015.* Jul.30. 2015. Vancouver, Canada.

Erina Joo, Norio Harada, Shunsuke Yamane, Toru Fukushima, Daisuke Taura, Kanako Iwasaki, Akiko Sankoda, Yuki Murata, Kimitaka Shibue, Kazuyo Suzuki, Takanari Harada, Satoko Kuwahara, Yuta Fujiwara, Nobuya Inagaki. Inhibition of GIP receptor signaling in adipose tissue reduces insulin resistance and improves hepatic steatosis in high fat diet-induced obesity. Incretin 2015. Jul.30. 2015. Vancouver, Canada.

Kimitaka Shibue, Shunsuke Yamane, Norio Harada, Akihiro Hamasaki, Kazuyo Suzuki, Erina Joo, Kanako Iwasaki, Daniela Nasteska, Takanari Harada, Yoshitaka Hayashi, Yasuhiro Adachi, Yuji Owada, Ryoichi Takayanagi, Nobuya Inagaki. Fatty acid-binding protein 5 regulates diet-induced obesity via GIP secretion from enteroendocrine K cells in response to fat ingestion. The American Diabetes Association's 75th Scientific Sessions. Jun.8.2015. Boston, MA.

渋江公尊 山根俊介 原田範雄 濱崎暁洋 鈴木和代 城尾恵理奈 岩崎可南子 ダニエラナスカ 原田貴成 安達泰弘 大和田祐二 高柳涼一 稲垣暢也. 脂肪酸結合タンパク質5 (FABP5) は胆汁の作用を介したK細胞における脂肪誘導性GIP分泌の制御に関与する. 第58回日本糖尿病学会年次学術集会 (YIA受賞). 2015年5月21日, 下関市, 山口.

岩崎可南子 原田範雄 佐々木香月 山根俊介 飯田桂子 濱崎暁洋 鈴木和代 城尾恵理奈 ナステスカダニエラ 渋江公尊 原田貴成 平澤明 稲垣暢也. 脂肪酸受容体GPR120は上部小腸K細胞に高発現し脂肪摂取後のGIP分泌に深く関与する. 第58回日本糖尿病学会年次学術集会 (YIA審査口演). 2015年5月21日, 下関市, 山口.

渋江公尊 山根俊介 原田範雄 濱崎暁洋 鈴木和代 城尾恵理奈 岩崎可南子 ダニエラナスカ 原田貴成 安達泰弘、大和田祐二 高柳涼一 稲垣暢也. 脂肪酸結合タンパク質5 (FABP5) はK細胞における脂肪誘導性GIP分泌の制御に関与する. 第26回分子糖尿病学シンポジウム. 2014年12月6日 高知市文化プラザ. 高知.

Kanako Iwasaki, Norio Harada, Kazuki Sasaki, Shunsuke Yamane, Keiko Iida, Kazuyo Suzuki, Akihiro Hamasaki, Erina Joo, Daniela Nasteska, Kimitaka Shibue, Takanari Harada, Hirasawa, Nobuya Inagaki.

Free fatty acid receptor GPR120 is highly expressed in enteroendocrine K cells of upper small intestine and has a critical role in GIP secretion after fat ingestion. 50th EASD Annual Meeting, Sep 18 2014. Wien, Austria.

Kimitaka Shibue, Shunsuke Yamane, Norio Harada, Akihiro Hamasaki, Erina Joo, Kanako Iwasaki, Daniela Nasteska, Takanari Harada, Yasuhiro Adachi, Yuji Owada, Ryoichi Takayanagi, Nobuya Inagaki. FABP5 is an essential modulator of fatty acid-induced GIP secretion in enteroendocrine K cells. 50th EASD Annual Meeting, Sep 18 2014. Wien, Austria.

Erina Joo, Norio Harada, Toru Fukushima, Akihiro Hamasaki, Shunsuke Yamane, Kanako Iwasaki, Daniela Nasteska, Kimitaka Shibue, Takanari Harada, Kazuyo Suzuki, Nobuya Inagaki. Inhibition of GIP receptor signalling in adipose tissue reduces insulin resistance in high fat diet-induced obesity. 50th EASD Annual Meeting, Sep 18 2014. Wien, Austria.

原田貴成 原田範雄 城尾恵理奈 福島徹 岩崎可南子 濱崎暁洋 山根俊介 Daniela Nasteska 渋江公尊 鈴木和代 稲垣暢也. 脂肪組織におけるGIPシグナルが高脂肪食接種下の肥満やインスリン抵抗性に及ぼす影響. 第57回日本糖尿病学会年次学術集会. 2014年5月24日. 大阪国際会議場. 大阪.

岩崎可南子 原田範雄 佐々木香月 鈴木和代 山根俊介 濱崎暁洋 城尾恵理奈 Daniela Nasteska 渋江公尊 原田貴成 稲垣暢也. GIP-GFPノックインマウスを用いたGIP分泌K細胞の局在と遺伝子発現の検討. 第57回日本糖尿病学会年次学術集会. 2014年5月24日. 大阪国際会議場. 大阪.

原田範雄 岩崎可南子 佐々木香月 山根俊介 飯田桂子 濱崎暁洋 鈴木和代 城尾恵理奈 ナステスカダニエラ 渋江公尊 原田貴成 平澤明 稲垣暢也. 脂肪酸受容体GPR120は上部小腸K細胞に高発現し脂肪摂取後のGIP分泌に深く関与する. 第29回日本糖尿病・肥満動物学会. 2014年2月14日. 芝蘭会館. 京都.

渋江公尊 山根俊介 原田範雄 濱崎暁洋 鈴木和代 城尾恵理奈 岩崎可南子 ダニエラナスカ 原田貴成 安達泰弘、大和田祐二 高柳涼一 稲垣暢也. 脂肪酸結合タンパク質5 (FABP5) はK細胞における脂肪誘導性GIP分泌の制御に関与する. 第29回日本糖尿病・肥満動物学会

(YIA 受賞). 2014 年 2 月 13 日. 芝蘭会館. 京都.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山根俊介 (YAMANE, Shunsuke)

京都大学・医学(系)研究科(研究院) 助教

研究者番号: 90582156

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし