

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893008

研究課題名(和文) 新たな組織特異的遺伝子改変マウスの樹立による膵細胞におけるNrf2の機能解明

研究課題名(英文) The role of Nrf2 in pancreatic beta-cells; a study of new pancreatic beta-cell specific Nrf2 activation model mice

研究代表者

柳下 陽子 (Yoko, Yagishita)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・産学官連携研究員

研究者番号：50733838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子Nrf2は、酸化ストレス応答性の生体防御因子である。ラットインスリンプロモータ(RIP)によるCre発現マウスは、Cre-loxpシステムによる細胞遺伝子改変に用いられるが、実験系の問題点から細胞解析が困難となる局面があった。本研究では、マウスIns1遺伝子を含む大腸菌人工染色体(BAC)によるCre発現を利用した新規膵細胞Nrf2活性化マウスを作出し、膵細胞におけるNrf2の機能解明を目指した。本マウスは優れた膵細胞組織特異的な遺伝子改変を示し、ストレプトゾトシン投与による膵細胞障害に対してNrf2が強い抑制作用を示すことが初めて明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：A transcription factor Nrf2 plays critical roles in the response to oxidative and electrophilic stresses. To clarify the role of Nrf2 in pancreatic β -cells, we generated new pancreatic β -cell-specific Nrf2 activation model mice. Rat insulin promoter (RIP) has been utilized to generate Cre recombinase expressing transgenic mice for Cre-loxP-mediated conditional knockout mice in pancreatic β -cells; however, several lines of RIP-Cre mice were reported to display ectopic expression of Cre recombinase. We newly established Nrf2 activation model mice by using Cre expressing transgenic mice mediated by bacterial artificial chromosome (BAC) including mouse Ins1 gene. This new established mouse line displayed pancreatic β -cell-specific expression of Cre recombinase, and successfully demonstrated that Nrf2 protects pancreatic β -cells against streptozotocin-induced cell damages.

研究分野：生化学

キーワード：Nrf2 膵細胞

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は社会的に大きな関心を集める疾患であり、膵β細胞障害は2型糖尿病発症の重要な因子である。膵β細胞は他臓器と比較して抗酸化酵素の発現が少ないことから、酸化ストレスに対して脆弱であると考えられている。

転写因子 Nrf2 は酸化ストレスや親電子性物質に対する生来防御遺伝子群の発現誘導の鍵因子であり、申請者はこれまで誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) を過剰発現した糖尿病モデルマウス (iNOS トランスジェニックマウス) を用いて、Nrf2 が膵β細胞障害に対して強力な保護作用を発揮することを明らかにしてきた。しかし、食生活の欧米化に伴い増加した肥満を再現したモデルにおいては、実験系の問題点から、膵β細胞における Nrf2 の役割を詳細に解明することはできていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子改変工学に基づいたマウスモデル解析から、肥満誘導性糖尿病に伴う膵β細胞障害に対し、Nrf2 が果たす役割の解明を目指す。

Cre-loxp システムを用いた条件付膵β細胞遺伝子改変マウスの作出には、従来はラットインスリンプロモータ (RIP) による Cre マウスが用いられてきた。しかし、本マウスは視床下部での異所性発現を伴うことが知られており、膵β細胞以外の臓器における非特異的な遺伝子改変の影響を排除することが困難であった。また、膵β細胞における遺伝子組換え効率についても、改善の余地があった。

本研究目的、すなわち『肥満誘導性糖尿病に伴う膵β細胞障害における Nrf2 の役割の解明』を達成するためには、これら実験系の問題点を克服する必要がある。

そこで第一に、膵β細胞組織特異性と遺伝子組み替え効率の改善を図った新規膵β細胞 Cre マウスを樹立し、当マウスを利用した膵β細胞特異的 *Keap1* 遺伝子欠失マウスを作出することを目的とする。

そして第二に、新規膵β細胞特異的 *Keap1* 遺伝子欠失マウスに肥満誘導性糖尿病を導入し、病態解析を行うことで、膵β細胞における Nrf2 の機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 膵β細胞組織特異性と遺伝子組み替え効率の改善を図る技術基盤として、視床下部での異所性発現が認められないことが明らかとなっているマウス *Ins1* 遺伝子 (*mIns1*) を利用し、さらに人口大腸菌染色体 (BAC) を活用した *Ins1-Cre* トランスジェニック (Tg) マウスを樹立する。さらに、このマウスを利用して、膵β細胞 *Keap1* 遺伝子欠失マウスを作出する。

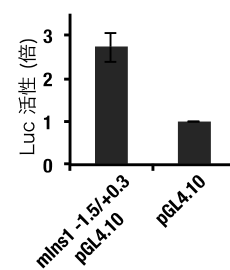
(2) 本マウスに高脂肪食を負荷して、食事依存的な肥満を誘導し、全身代謝評価および膵β細胞の病理学的および機能解析を行い、膵β細胞における Nrf2 の役割を解明する。

4. 研究成果

(1) *mIns1-Cre* の構築作製

予備解析として、*mIns1* 遺伝子 5' 上流領域 1.8 kb および 3' 領域下流 1.2 kb を Luc 遺伝子に結合させたコンストラクトを作製した (*mIns1* -1.5/+0.3)。ラットインスリンノーマ細胞株である RINm5F 細胞を用いたレポーターアッセイを行った結果、コントロールと比較して約 2.5 倍の活性を認め (図 1)、*in vitro* のレベルで上記の制御領域の転写活性を確認することができた。

図 1 *mIns1* -1.5/+0.3 ルシフェラーゼ活性試験



初年度の研究実施過程で、本研究で作製を目指し

ていたマウス BAC トランスジーンを用いた *mIns1-Cre-Tg* マウスを導入することができたことから (Hasegawa *et al.*, *Exp Anim.* 2014)、当初の研究計画を変更し、当マウスを利用した膵β細胞特異的 *Keap1* 遺伝子欠失マウスを早期に作出し、様々な糖尿病モデルを導入した病態解析を中心に研究を展開する事とした。

(2) *mIns1-Cre-Keap1* 欠失マウス作出

Nrf2 の抑制制御因子である *Keap1* を欠失させると、Nrf2 の転写活性が増強する。そこで、新規 *mIns1-Cre* マウスと *Keap1^{flx/flx}* マウスを交配し、膵β細胞特異的な *Keap1* 遺伝子欠失 Nrf2 活性化マウスを作出した。

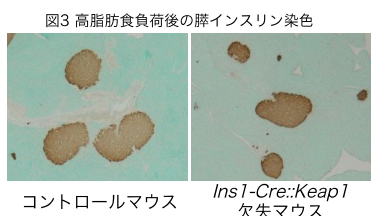
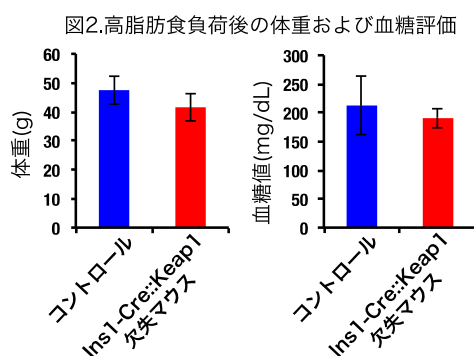
従来より膵β細胞特異的な Cre マウスとして利用されてきた *RIP-Cre* マウスは、視床下部における Cre 発現により、異所性の遺伝子組換えが生じることが報告されている。

一方、*mIns1-Cre-Keap1* 欠失マウスは、視床下部での *Keap1* 遺伝子の組換えが生じないことを確認した。さらに、*mIns1-Cre-Keap1* 欠失マウスは、*RIP-Cre* による *Keap1* 欠失マウスと比較して、膵β細胞での標的遺伝子の組換え効率が非常に高いことが明らかとなった。さらに *RIP-Cre* マウスは、マウスの系統によっては、Cre 単独の発現により代謝変化を生じることが報告されている。そこで、*Ins1-Cre* マウスと野生型マウスを比較した基礎代謝データを集積した。その結果、導入した *Ins1-Cre* マウスは、糖代謝異常やインスリン抵抗性悪化などの代謝変化を生じないことが確認できた。

(3) *mIns1-Cre-Keap1* 欠失マウス病態解析：

食事誘導性肥満モデル

mInsl1-Cre-Keap1 欠失マウスおよび対照マウスに8週間高脂肪食を与えた。いずれのマウスにおいても、顕著な体重増加と軽度な血糖値上昇が確認でき、食事誘導性の肥満を誘導することができた。高脂肪食負荷後の *mInsl1-Cre-Keap1* 欠失マウスは、対照マウスと比較して、血糖値・体重に優位な差は認めなかった(図2)。次に、膵臓のインスリン染色を行い、病理学的な評価を行ったところ、*mInsl1-Cre-Keap1* 欠失マウスと対照マウスとの間に顕著な違いは認められなかった(図3)。さらにインスリン・グルカゴン二重染色を行ったが、両陽性細胞の存在比に違いは認められなかった。



(4) *mInsl1-Cre-Keap1* 欠失マウス病態解析：ストレプトゾトシン投与モデル

上記解析から、高脂肪食を負荷するような条件においては、膵β細胞における Nrf2 の機能を詳細に解析することが困難であった。そこで、ストレプトゾトシン (STZ) 投与による糖尿病誘導モデルを新たに導入し、病態解析を行った。その結果、対照マウスは STZ 投与後、顕著な血糖値上昇と体重低下を認め、重篤な糖尿病を発症した。一方、*mInsl1-Cre-Keap1* 欠失マウスは STZ 投与後の血糖値上昇、体重低下が抑制され、糖尿病の発症がほぼ完全に抑制された。膵臓の病理学的解析を実施したところ、*mInsl1-Cre-Keap1* 欠失マウスは、対照マウスと比較して STZ による高度な膵島障害が抑制されていることが明らかとなった。

(5) *mInsl1-Cre-Trsp* 欠失マウス作出：内因性膵β細胞酸化ストレスモデル

上記解析で導入した食事誘導性肥満および STZ 投与モデルに加えて、膵β細胞における内因性の酸化ストレスをより詳細に観察する目的で、*mInsl1-Cre* によりセレン含有タン

パク質を欠失したマウスの作出を試みた。セレン含有タンパク質は、生体の抗酸化応答に重要な貢献を示し、同タンパク質群の合成に必須なセレノシステイン tRNA (*Trsp*) の欠失は重篤な酸化ストレス障害を引き起こす。そこで、*mInsl1-Cre* マウスと *Trsp^{flx/flx}* マウスを交配し、膵β細胞特異的な *Trsp* 遺伝子欠失マウスを作出した。

まず *mInsl1-Cre-Trsp* 欠失マウスの酸化ストレスレベルを評価した。抗 8OHdG 抗体を用いた病理学的な評価を行った結果、*mInsl1-Cre-Trsp* 欠失マウスは、対照マウスと比較して膵島内の 8OHdG 陽性細胞数が増加しており、酸化ストレスの有意な上昇が確認された。さらに膵切片のインスリン・グルカゴン二重染色を行ったところ、*mInsl1-Cre-Trsp* 欠失マウスの膵島では、インスリン陽性細胞の低下とグルカゴン陽性細胞の顕著な増加が認められた。

本研究では糖尿病モデルを導入し、*Ins1-Cre* による膵β細胞 *Keap1* 遺伝子欠失マウスの病態を評価した。その結果、特に STZ 投与による膵β細胞障害に対して、Nrf2 が強い抑制作用を示すことが明らかとなった。また当初の研究計画では予定していなかったが、新規 *Ins1-Cre* マウスを活用し、*Keap1-Nrf2* 系と並び生体の抗酸化応答に重要な役割を果たす *Trsp* 遺伝子欠失マウスの作製および解析を実施した。その結果、膵β細胞における酸化ストレスレベルの上昇が確認され、膵島内のインスリン陽性細胞が減少し、グルカゴン陽性細胞が増加することをマウス個体レベルで明らかとした。

従来膵β細胞遺伝子改変系を用いた解析では、組織特異性と遺伝子組換え効率という2つの実験系の問題点から、膵β細胞における詳細な解析が困難となる局面があった。一方、新規 *mInsl1-Cre* マウスは、視床下部での異所性発現が認められず、高い組織特性を示し、さらに優れた遺伝子組換え効率を示す優れた新規 Cre マウスである。本研究では、新規 *mInsl1-Cre* マウスを基盤とした実験系を導入したことにより、これまで不明であった膵β細胞における Nrf2 の機能を明らかにすることができた。さらに膵β細胞 *Trsp* 欠失マウスの解析など、*mInsl1-Cre* マウスのさらなる活用範囲拡大の可能性が示された。

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)

Urano A, Yagishita Y, Katsuoka F, Kitajima Y, Nunomiya A, Nagatomi R, Pi J, Biswal S and Yamamoto M. Nrf2-mediated regulation of skeletal muscle glycogen

metabolism. *Mol Cell Biol*, 2016, *in press*.
(査読あり)
DOI: pii: MCB.01095-15.
Uruno A*, Yagishita Y* (*Equal contributions to 1st author) and Yamamoto M. The Keap1-Nrf2 system and diabetes mellitus. *Arch Biochem Biophys*, 566, 76-84, 2015. (査読あり)
DOI: 10.1016/j.abb.2014.12.012.

[学会発表](計8件)

柳下陽子、福富俊明、宇留野晃、山本雅之、「Keap1-Nrf2 システムによる *Trsp* 欠失マウス膵β細胞および視床下部の酸化ストレス防御機構」第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会、2015年12月1日-4日、神戸ポートアイランド(神戸市)

宇留野晃、柳下陽子、山本雅之、「骨格筋における Nrf2 のグリコーゲン代謝制御機構」第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会、2015年12月1日-4日、神戸ポートアイランド(神戸市)

Yagishita Y, Uruno A, Katsuoka F, Kensler TW, Yamamoto M. Nrf2 regulates glucose metabolism-related genes. 27th Annual UPCI Scientific Retreat, June 18-19, 2015, Pittsburgh, USA

Yagishita Y, Uruno A, Katsuoka F, Funayama R, Nakayama K, Yamamoto M. Nrf2 regulates glucose metabolism-related genes. The Keap1/Nrf2 Pathway in Health and Disease, January 6-8, 2015, Cambridge, UK

Uruno A, Yagishita Y, Yamamoto Y. Nrf2 regulates glycol metabolism in skeletal muscle. The Keap1/Nrf2 Pathway in Health and Disease, January 6-8, 2015, Cambridge, UK

柳下陽子、宇留野晃、福富俊明、菅原明、山本雅之、「Nrf2 による酸化ストレス糖尿病モデルマウスの膵β細胞保護」第87回日本生化学会大会、2014年10月15日-18日、国立京都国際会館(若手優秀発表賞受賞)(京都市)

宇留野晃、古澤祐樹、柳下陽子、山本雅之、「Nrf2 による糖尿病の発症抑制作用」第87回日本生化学会大会、2014年10月15日-18日、国立京都国際会館(京都市)

宇留野晃、古澤裕樹、柳下陽子、福富俊明、山本雅之:「Keap1-Nrf2 システムは糖尿病発症を抑制する」第80回日本生化学会東北支部例会、2014年5月10日、アキタパークホテル(秋田市)

[図書](計1件)

Yagishita Y, Uruno A and Yamamoto M.

Elsevier, NRF2-mediated gene regulations and glucose homeostasis. *Molecular Nutrition and Diabetes*, 1st Edition, 331-348, 2015. Elsevier Science B.V., Amsterdam, Netherlands.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳下 陽子 (YAGISHITA Yoko)

東北大学・大学院医学系研究科・産学官連携
研究員

研究者番号: 50733838

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

宇留野 晃 (URUNO Akira)

東北大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 90396474

山本 雅之 (YAMAMOTO Masayuki)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 50166823

(4) 研究協力者

長沼 絵里子 (NAGANUMA Eriko)

東北大学・大学院医学系研究科

伊達 文子 (DATE Fumiko)

東北大学・大学院医学系研究科