

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19390246

研究課題名（和文） 膵β細胞の分化と新生における FoxO1 の役割

研究課題名（英文） The roles of FoxO1 in pancreatic β cell differentiation and neogenesis

研究代表者

北村 忠弘 (KITAMURA TADAHIRO)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：20447262

研究成果の概要：本研究課題においては、転写因子 FoxO1 が膵細胞の分化や膵細胞型の決定に果たす役割を vivo で明らかにする為に、膵特異的 FoxO1 欠損マウス (KO) と膵特異的 FoxO1 トランスジェニックマウス (TG) を作成し、解析を行った。耐糖能は KO で優位に改善、逆に TG では悪化し、一部のマウスは顕性の糖尿病を発症した。重要なことに、KO ではインスリン陽性の膵管細胞と小さなサイズのラ氏島の増加が認められ、β細胞の新生が促進されていると考えられた。一方、TG では明らかなβ細胞の減少とともに、腺房細胞の著減、膵管の増加とラ氏島内血管の増加が認められた。これらの結果から、FoxO1 が膵細胞の分化、新生のみならず、その機能にも重要であることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2008年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

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・細胞、転写因子

1. 研究開始当初の背景

インスリンの絶対的、あるいは相対的な不足によって発症する糖尿病にとって、インスリンを分泌する組織である膵ラ氏島の移植は究極の治療法である。近年の技術開発により、膵ラ氏島移植は安全に、そして効率的に行われる様になってきた。しかし、最大の問題点は、対象となる糖尿病患者数に比べ、膵ラ氏島供給者（ドナー）の数が圧倒的に不足している点である。この問題を解決すべく、胚性幹細胞や成体の幹細胞を用いて、インス

リン産生細胞（β細胞）を作成する試みが、世界的に行われているが、未だ成功には至っていない。最大の問題点は、膵臓の発生段階における、β細胞の基本的な分化メカニズムが、未だ十分に理解されていない点である。さらに、成体の膵臓において、β細胞は新生しているのかどうか、そして、もし新生しているのなら、そのプロジェニターはどこに存在するのか、という問題が未解決であるという点もある。研究代表者はこれまでに、転写因子 FoxO1 が膵β細胞の増殖を調節すること

を報告している (Kitamura et al., J Clin Invest 2002)。さらに、マウスの胎生期の膵発生過程における FoxO1 の発現パターンが、Pdx1 と酷似していることを確認した。一方、Notch シグナルは膵臓の発生や膵細胞の分化に重要であるが、研究代表者は FoxO1 が Notch シグナル下流の転写因子、Rbp-jk と直接結合することで、Notch シグナルと協調して Hes1 の転写を調節することを報告した (Kitamura et al., J Clin Invest 2007)。これらの学術的背景と研究代表者のこれまでの研究成果より、FoxO1 が膵細胞の分化や膵細胞型の決定に重要な役割をする可能性が強く示唆される。一方、議論のあるところではあるが、複数の状況証拠から、成体においては、膵管細胞は膵内分泌細胞のプロジェニターと考えられている。研究代表者はマウスから膵管細胞を単離培養する方法を独自に開発している。

2. 研究の目的

上記の学術的背景と研究代表者のこれまでの研究成果を踏まえて、本研究においては、まず FoxO1 が実際に膵細胞の分化や膵細胞型の決定に何らかの役割を果たしているかを *in vivo* で明らかにする。膵臓特異的 FoxO1 欠損マウスと膵臓特異的 FoxO1 トランスジェニックマウスの両方を作成し、全身の表現型の解析と膵臓の形態学的解析を行う。次に、これらのマウスに高脂肪食を与える、あるいは db/db マウスと交配した際に、耐糖能に変化が生じるかを検討する。また、研究代表者が既に確立している手法を用いて、マウスから膵管細胞を単離培養し、アデノウイルス発現系を用いて、FoxO1 の恒常的活性型、あるいは優位抑制型変異体を発現させ、膵管細胞が膵内分泌細胞に分化移行し得るかを検討する。さらに、FoxO1 以外の転写因子の遺伝子導入や、 β 細胞の分化や増殖を促進するとされている種々の生理活性物質の併用も検討する。本研究の特色は、これまで全く知られていない FoxO1 の膵細胞分化における役割を、*in vivo* で検討する点であり、本研究の成果は、膵 β 細胞の分化メカニズムの解明に大きく貢献する可能性がある。また、 β 細胞のプロジェニターと考えられている膵管細胞からインスリン産生細胞 (β 細胞) を作成する方法として、FoxO1 の導入を検討することにより、 β 細胞再生の新しい手法の開発にも貢献する可能性がある。

3. 研究の方法

[1] FoxO1 の膵特異的欠損マウスの解析

FoxO1 の全身の欠損マウスは胎生早期 (E9.5) に大血管の形成不全により死亡する (Hosaka et al., PNAS 2004)。その為、膵機能の解析はもとより、胎生膵の形態学

的解析すら困難であった。そこで本研究においては、膵臓特異的 FoxO1 欠損マウスを作成する目的で、FoxO1^{lox/lox} マウスと Pdx1-Cre トランスジェニックマウスとの交配を行う。Pdx1-Cre トランスジェニックマウスは米ハーバード大学の Douglas Melton 博士から供与して頂いている。Pdx1 は基本的には全ての膵細胞のプロジェニターで発現しており、結果として、Cre 酵素は全膵細胞に発現される。作成した膵特異的 FoxO1 欠損マウスの解析は以下の手順で行う。

(1) まず、Pdx1-Cre の臓器特異性を確認する為に、Pdx1-Cre マウスと eGFP-Rosa マウス (Jackson Lab から購入) を交配し、各臓器での GFP の発現を組織学的に調査する。

(2) 次に、膵臓における FoxO1 の欠損効率を定量 RT-PCR や ウェスタンブロットを用いて評価する。(3) 最終的にマウスの表現型を、各種代謝パラメーター (体重、血糖値、血清インスリン値、等) の測定、膵臓の形態学的調査 (膵臓やラ氏島のサイズ、ラ氏島の構築、 β 細胞量、等)、必要であれば、負荷テスト (グルコース耐性テスト、インスリン耐性テスト、等) を施行して検討する。

[2] FoxO1 の膵特異的トランスジェニックマウスの解析

FoxO1 の膵特異的欠損マウスの解析が loss-of-function の研究方法であるのに対し、逆に、gain-of-function の研究として、FoxO1 の膵特異的トランスジェニックマウスを作成する。具体的には、米ハーバード大学の Douglas Melton 博士より供与して頂いたマウス Pdx1 プロモーター領域の 5' - 端に、恒常的活性型の FoxO1 全長を β グロビンのイントロンとポリ A に挟まれた形で挿入し、トランスジーンのコストラクトとする。トランスジェニックマウスの作成、維持は群馬大学大学院医学系研究科付属動物実験施設との共同研究とする。作成されたマウスの解析は、基本的には、先述の FoxO1 の膵特異的欠損マウスの解析と同様に行う。つまり、まずトランスジーンが発現量と発現部位の特異性を組織免疫染色やウェスタンブロットで検討し、その後、各種代謝パラメーターの測定や膵臓の形態学的調査、そして必要があれば、負荷テストも順次行っていく。

[3] FoxO1 の遺伝子学的操作により、培養マウス膵管細胞からインスリン産生細胞を作成する試み

研究代表者は、従来の方法 (Arkle et al., Q J Exp Physiol 1986) とは全く異なる、新しい膵管細胞の単離培養法を既に確立している。重要なことに、この方法で得られた膵管細胞には、Pdx1 と FoxO1 が共に発現している。組織学的解析から、本来成体マウスの膵管上皮細胞には、非常に稀にしか Pdx1 と FoxO1 は発現しておらず、Pdx1/FoxO1 陽性膵管細胞が膵内分泌細胞のプロジェニターではないかと考えられている (Kitamura et al., J Clin Invest 2002)。本研究では、培養膵管細胞に FoxO1 の恒常的活性型や優位抑制型の変異体をアデノウイルス発現系により、あるいは FoxO1 特異的 SiRNA をトランスフェクション法により、発現させることで、膵管細胞の形態や性質に変化が生じるかを検討する。具体的には、RT-PCR を用いて各種ホルモン (インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン等) や膵酵素 (アミラーゼ、エラスターゼ、トリプシン等)、インスリン遺伝子に対する転写因子 (NeuroD、MafA)、その他の膵細胞分化関連転写因子 (Nkx2.2、Pax4、Pax6、Neurogenin3 等) の発現が膵管細胞に誘導されるかを検討する。

研究計画 [1] と [2] に関しては、さらに詳しく FoxO1 の膵細胞分化や膵細胞機能における役割を検討する目的で、これらのマウスに高脂肪食を与え、膵・細胞に負荷をかけた際の表現型や・細胞の形態にコントロールとの違いが見られるかを検討する。また、糖尿病モデルマウスである db/db マウスとの掛け合わせを行い、耐糖能や血糖値に変化が生じるかを検討する。研究計画 [3] に関しては、もし培養膵管細胞にインスリン遺伝子の発現を誘導することに成功すれば、さらにこの研究を推進させる為に、これらの細胞を糖尿病モデルマウスの腎皮膜下に移植して、in vivo での血糖降下作用を判定し、臨床応用を目指して解析を進める

4. 研究成果

[1] 膵特異的 FoxO1 欠損マウス

①FoxO1^{lox/lox}マウスとPdx1-Creトランスジェニックマウスを掛け合わせて作成した FoxO1^{lox/lox}:Pdx1-Creマウスの膵臓を採取し、定量RT-PCRを用いて、膵臓において特異的に FoxO1 遺伝子がノックアウトされていることを確認し、膵特異的FoxO1 欠損マウスの作成に成功した。さらに、膵臓以外の臓器では FoxO1 の発現量に変化が無いことも確認した。②次に、これらのマウスの体重、血糖値、血清インスリン値を測定したが、コントロールマウスとの間に有為な差は認められなかった。③また、これらのマウスの膵臓の組織学的解析を行った所、膵臓、及びラ氏島のサイズやラ氏島の構築に有為な差は認められな

かった。しかしながら、興味深いことに、膵特異的FoxO1 欠損マウスの膵臓においては、インスリン陽性の膵管細胞の数が増加しており、さらに小さなラ氏島やインスリン陽性細胞からなる細胞集塊の数も増加していた。④膵特異的FoxO1 欠損マウスに、グルコース耐性テスト (GTT) を行った所、コントロールマウスに比べて、軽度の耐糖能改善が認められた。さらに、膵特異的FoxO1 欠損マウスに高脂肪食を8週間与えた後、グルコース耐性テスト (GTT) を行った所、コントロールマウスに比べて、明らかな耐糖能の改善が認められた。また、より明らかなインスリン陽性膵管細胞数の増加が確認された。しかしながら、糖尿病モデルであるdb/dbマウスと交配させたところ、膵特異的FoxO1 欠損マウスでは明らかな耐糖能の悪化が確認された。現在、その原因につき、検討中である。

[2] 膵特異的 FoxO1 トランスジェニックマウス

Pdx1 プロモーターを用いて膵臓に特異的に恒常的活性型の FoxO1 (FLAG-FoxO1-ADA) を発現するマウスを作成し、その膵臓組織において、FLAG-FoxO1-ADA の発現を FLAG 抗体を用いた組織免疫学的手法により確認した。興味深いことに、これらのマウスではラ氏島構築の異常と、明らかな・細胞数の減少、相対的な・細胞の増加が認められた。グルコース耐性テスト (GTT) により、これらのマウスは耐糖能の異常が認められ、一部のマウスは顕性の糖尿病を発症していた。また、膵特異的 FoxO1 トランスジェニックマウスでは、著明な外分泌腺房細胞の減少と、膵管構造の増加、ラ氏島内微小血管の増加が確認された。次に、これらのマウスに高脂肪食を8週間与えた所、多くのマウスが糖尿病を発症し、GTTにおいても耐糖能の明らかな増悪が認められた。これらの結果から、FoxO1 が・細胞の分化、新生に重要な役割を果たす可能性が vivo の系で証明され、この成果は・細胞の分化メカニズムの解明に大きく貢献すると考えられる。

[3] FoxO1 の遺伝子学的操作により、培養マウス膵管細胞からインスリン産生細胞を作成する試み

転写因子 FoxO1 が膵管細胞から・細胞への分化を誘導し得るかを検討する為、従来から知られている膵分化関連転写因子 (Pdx1, Ngn3, MafA) との組み合わせにより、アデノウイルス発現系を用いて膵管細胞への導入を試みた。まず、培養膵管細胞に Pdx1、Ngn3、MafAに加えて恒常的活性型の FoxO1 を発現させることで、インスリン遺伝子の転写調節因子の1つである NeuroD の発現が誘導されたが、残念なことにインスリン遺伝子の発現誘

導には至らなかった。次に、これまでに・細胞の分化や増殖を促進すると報告されている生理活性物質であるアクチビンAとベータセルリン (BTC) の影響を検討したが、3つの異なるクローンにおいて、アクチビンAとBTCの併用は濃度依存性にNeuroDの発現を増加させたが、やはりインスリン遺伝子の発現誘導は認められなかった。さらに、特異的siRNAを用いたFoxO1遺伝子のノックダウンや優位抑制型FoxO1変異体の強制発現も試みたが、やはり膵管細胞にインスリン遺伝子の発現は誘導できなかった。

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4件)

1. Morita, S., Kojima, I., Horii, T., Kimura, M., Kitamura, T., (他5名、5番目). Dicer is required for maintaining adult pancreas. **PLoS ONE** 4巻、e4212、2009、査読有
2. Perilhou, A., Turrel-Cuzin, C., Kharroubi, I., Henique, C., Fauveau, V., Kitamura, T. (他4名、6番目) The transcription factor COUP-TFII is negatively regulated by insulin and glucose via Foxo1 and ChREBP controlled pathways. **Mol. Cell. Biol.** 28:巻、6568-6579、2008、査読有
3. Kobayashi, M., Ohnishi, H., Okazawa, H., Murata, Y., Kitamura, T. (他3名、7番目) Expression of SHPS-1 in pancreatic beta cells and its role in promotion of insulin secretion and protection against diabetes. **Endocrinology** 149巻、5662-5669、2008、査読有
4. Kitamura, T., Kitamura, Y., Funahashi, Y., Shawber, C.L. (他5名、1番目) A Foxo/Notch pathway controls myogenic differentiation and fiber type specification. **J. Clin. Invest.** 117:巻、2477-2485、2007、査読有

[学会発表] (計6件)

1. Tadahiro Kitamura, Yukari Kitamura (他1名、1番目) FoxO1 plays important roles in pancreatic cell differentiation and cell type specification. 68th American Diabetes Association Scientific Sessions、2008.6.6、San Francisco, USA
2. 北村忠弘、膝・細胞の分化、新生におけるFoxO1の意義、第51回日本糖尿病学会、2008.5.23、東京
3. 北村忠弘、北村ゆかり、膵細胞の分化、新

生におけるFoxO1の意義、第81回日本内分泌学会、2008.5.18、青森

4. Tadahiro Kitamura, Yukari Kitamura (他5名、1番目) Transcription factor FoxO1 controls skeletal muscle fiber type composition via interaction with Notch signaling. 67th American Diabetes Association Scientific Sessions、2007.6.25、Chicago, USA
5. 北村忠弘、膝・細胞の分化と新生における転写因子FoxO1の役割、第80回日本内分泌学会、2007.6.15、東京
6. 北村忠弘、視床下部FoxO1によるレプチンのエネルギー調節、第50回日本糖尿病学会、2007.5.24、仙台

[その他]

ホームページ等

<http://www.imcr.gunma-u.ac.jp/lab/metsi/g/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 忠弘 (KITAMURA TADAIRO)
群馬大学・生体調節研究所・教授
研究者番号：20447262

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：