

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790887

研究課題名（和文）膵β細胞におけるTRHの作用解析

研究課題名（英文）Effect of Thyrotropin-releasing hormone on gene expression in the islet of Langerhans of the pancreas

研究代表者

渋沢 信行 (SHIBUSAWA NOBUYUKI)

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：90396622

研究成果の概要（和文）：甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン（TRH）遺伝子欠損マウス（TRHKO）では耐糖能障害が観察され、膵ランゲルハンス氏島からのインスリン分泌の低下も認められた。膵臓β細胞におけるTRHによるインスリン分泌に対する作用の詳細は不明であったためTRHKO膵臓より単離したラ氏島を利用しマイクロアレイ解析を行い、有効な発現を示す7827遺伝子が検出された。

研究成果の概要（英文）：Thyrotropin-releasing hormone (TRH) is ubiquitously distributed throughout the brain and other tissues including pancreas. We have reported that the TRH-deficient mice (TRH^{-/-}) showed characteristic tertiary hypothyroidism and also hyperglycemia, which was accompanied by impaired insulin secretion in response to glucose. To elucidate the molecular mechanism of TRH effect on insulin secretion, we conducted a microarray study with endocrine islets of mice pancreas. In the microarray analysis, 7827 genes with proper expression levels were detected in islets isolated from both TRH^{-/-} and wild type mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：内分泌学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：糖尿病、マイクロアレイ、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

1) 甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (thyrotropin-releasing hormone; TRH) は、視床下部の主に室傍核より分泌され、下垂体門脈系を介し下垂体前葉の下垂体甲状腺刺激ホルモン (thyroid-stimulating hormone; TSH) 産生細胞に作用し、TSHの合

成分を刺激する。分泌されたTSHは甲状腺を刺激し、甲状腺ホルモンが末梢組織において作用する。我々の研究グループにおいて、確立されたTRH遺伝子欠損マウス (TRHノックアウトマウス) の研究により (Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 94:10862-7)、

TRHノックアウトマウスは中枢性（三次性）甲状腺機能低下症の病態を表すこと、TRHは胎生期のTSH産生細胞の発生、分化には必要でなく、生後のTSH産生細胞の維持に必須であること、下垂体TSH遺伝子発現を転写レベルにおいて調節していることなどが明らかとなっている。（Mol Endocrinol. 2000 14:137-46）一方、TRHは中枢神経系以外の消化管、膵臓、生殖器などに広く分布し、神経伝達物質あるいは神経修飾物質として働いていると考えられてきたが、その機能の詳細については不明であった。TRHノックアウトマウスの研究の中で、非常にユニークで画期的な発見の一つがTRHノックアウトマウスにおける耐糖能障害である。TRHノックアウトマウスでは空腹時ならびにブドウ糖負荷後の血糖値が軽度上昇していた。さらに膵臓ランゲルハンス島のインキュベーション法による測定で、TRHノックアウトマウスからのランゲルハンス島からのインスリン分泌の低下も認められた。（Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 94:10862-7）TRHは膵臓ではランゲルハンス島のβ細胞においてインスリンと同一分泌顆粒内に存在する事が知られている。膵臓ではTRHは胎生期に最も高い濃度を示し、生後は減少する。（Leduque P, et al. J Clin Invest. 1986 78:1028-34）またin vitroでは、TRH投与はランゲルハンス島からのインスリン分泌を促すことも報告されていた。（Kulkarni RN, et al. Endocrinology. 1995 136:5155-64）ランゲルハンス島にはTRH受容体サブタイプ1が発現している事も確認しており、分泌されたTRHはパラクリンの作用を示すことが予想された。（Life Sci. 2000 66:1119-25）

2. 研究の目的

これまで膵臓β細胞におけるTRHのインス

リン分泌に対する機序の詳細は不明であった。そこで今回、TRHノックアウトマウス膵臓より単離したランゲルハンス島を利用しマイクロアレイ解析を行い、TRH欠損による遺伝子発現への影響を明らかにし、インスリン分泌に関与するシグナル伝達におけるTRHの作用機序を解析する事とした。TRHが存在しない事による耐糖能異常を呈する、より生理的条件下での解析はTRHノックアウトマウスを利用した実験系によってのみしか成し得ないと考えられる。この研究により膵臓β細胞からのインスリン分泌低下の新たな原因や機構を明らかにしたいと考えた。

3. 研究の方法

TRHノックアウトマウス膵臓より単離したランゲルハンス島を利用しマイクロアレイ解析を行い、TRH欠損による遺伝子発現への影響を明らかにし、インスリン分泌に関与するシグナル伝達におけるTRHの作用機序を解析する。

特に、野生型マウス、TRHノックアウトマウス、及びTRHノックアウトマウスに野生型とほぼ同程度の甲状腺ホルモンレベルを維持したマウスの3群の動物を準備する。これにより、遺伝子発現の比較を行った場合、甲状腺機能低下症に伴う変化を除外したTRH欠損そのものによる作用、影響を見ることができ。さらにコラゲナーゼ法による膵臓ランゲルハンス島の単離によって、膵臓外分泌系からの影響を最小限にし、より効率のよい解析をすすめる。

同系統8週齢の野生型マウス、TRHノックアウトマウスを適切な匹数(N>=5)用意し、コラゲナーゼ法により膵臓ランゲルハンス島の単離を行う。単離ランゲルハンス島よりtotal RNAを抽出し、クオリティ検査の後、

マイクロアレイ解析を行う。結果により、TRH 欠損による遺伝子発現の異常、また甲状腺機能低下による遺伝子発現へ影響を解析する。特に重要と考えられる遺伝子、あるいは遺伝子群に関して、再びそれぞれのマウス膵臓での発現について、定量的 Real-time PCR による mRNA 発現量、Western blot 解析などで蛋白発現の確認を行う。膵臓β細胞でインスリン分泌における TRH の作用に関わるいくつかの候補遺伝子、あるいはその蛋白について、さらに詳細な解析を行う。膵β細胞由来の株化細胞を利用して候補蛋白の TRH 刺激後のシグナル伝達系における変化や発現を mRNA 量の測定、プロモーター解析、Western blot 解析などで分析する。

4. 研究成果

(1) マイクロアレイ解析の結果、有効な発現を示す 11619 プローブ、7827 遺伝子が検出された。そのうち野生型マウスと比較して TRH ノックアウトマウスから単離したラ氏島では 179 遺伝子が 2 倍以上の発現低下、155 遺伝子が 2 倍以上の発現増加を示した。遺伝子機能の分類においては核内蛋白、蛋白結合、膜蛋白、DNA 結合蛋白など多岐にわたり、多くの遺伝子が検出された。特にこれらの遺伝子の中から、既存の報告よりインスリン分泌や膵β細胞機能に関わる遺伝子を選別した結果、我々は fibroblast growth factor 21 (FGF21) に注目した。FGF21 は、生体において糖、脂質などのエネルギー代謝の重要な調節因子として働いており、膵臓β細胞機能に作用することも報告されている。定量的 Real-time PCR による再検では TRH ノックアウトマウスから単離したラ氏島における FGF21 mRNA レベルは、野生型マウスのラ氏島での mRNA 発現レベルの約 40~60% に低下していた。これは TRH ノックアウトマウスに甲状腺ホルモンを補充した場合も同様だった。したがっ

て、FGF21 の mRNA 発現低下は甲状腺機能低下症の影響ではなく、TRH 欠損そのものによる影響であると考えられた。

その他にマイクロアレイ解析の結果より、野生型マウスと比較して TRH ノックアウトマウスのラ氏島での発現に差のある、TCF7L2、FABP4、CPT1α などの膵β細胞機能や糖尿病に関わる候補遺伝子について Real-time PCR により mRNA 定量を行ったが、有意な差は認められなかった。引き続きこれらの遺伝子およびその他の候補遺伝子について発現量の確認を行っていく予定である。

(2) β細胞の株化細胞である βHC9 細胞、βTC6 細胞などを用い、TRH 刺激下における FGF21 mRNA 発現量を Real-time PCR により測定したところ TRH により発現増加が確認された。そこで TRH による FGF21 遺伝子発現のメカニズムを解明するため、FGF21 プロモーターをクローニングし Luciferase 発現レポータープラスミドに導入しプロモーター活性を測定した。ヒト FGF21 プロモーター(-684~+7)pGL3 Luciferase レポータープラスミドを用い TRH 受容体を発現させた CHO 細胞 (HTR4 細胞) に transfection させ、レポーターアッセイを行った。TRH を medium 中に加え、濃度依存性、時間依存性の反応性をみたところ、HTR4 細胞では $TRH10^{-8}M$ および 24 時間で最大の転写活性化を認めた。TRH は転写レベルで FGF21 の発現を調節していると考えられた。

また、MAP キナーゼ阻害薬である PD98059、PKC 阻害薬である Staurosporine、Ca channel 阻害薬である nimodipine をそれぞれ、TRH 添加後に加え FGF21 プロモーター活性を測定すると、PD98059 を加えた場合のみ、TRH によるプロモーター転写活性が阻害された。したがって TRH による FGF21 プロモーター活性化には MAP キナーゼを介するシグナル伝達系が

関与していると考えられた。

さらにプロモーターの欠失変異コンストラクトを作製し、TRH の活性責任部位の決定を試みた。5' 側を-684、-528、-407、-277 と欠失させていくと、-277~+7 のプロモーターにおいて TRH による活性が消失していた。さらにこの間の-377、-322~+7 のプロモーターを作製した結果、TRH による活性をみると-322~-277 間に TRH の応答領域が存在することが示唆された。-684~+7 プロモーターのこの領域の 45bp を欠失させたレポーターにおいてやはり TRH による活性は消失していた。したがってこの部位が TRH 応答領域であると判明した。このプロモーター領域の DNA ラベリングプローブを利用し、 β TC6 細胞より抽出した核蛋白と反応させた Electro mobility shift assay (EMSA) を行うと DNA-蛋白の結合を示す特異的なバンドが検出された。何らかの核内蛋白質がこの TRH 応答領域に結合し TRH 刺激による遺伝子活性化を仲介している事が示唆された。現在この蛋白質の同定に向けての実験を行っている。

TRH ノックアウトマウスの研究から、生体での膵臓 β 細胞の正常な機能維持に TRH は重要であり、その作用機構の 1 つとして FGF21 が関与していると考えられた。TRH は膵ラ氏島において遺伝子転写レベルで FGF21 発現調節を行っていることも今回の研究において明らかとなった。

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)

[学会発表] (計 6 件)

① 渋沢信行 他、TRH による膵ランゲルハンス島の遺伝子発現調節機構、第 53 回日本甲状腺学会学術集会、平成 22 年 11 月 22 日、長崎ブリックホール (長崎県)

② ガライ ジェニファー、渋沢 信行、他、TRH affects gene expression in the islet of Langerhans of the pancreas、第 31 回日本肥満学会、平成 22 年 10 月 2 日、前橋テルサ、前橋元気プラザ 21 (群馬県)

③ 渋沢信行 他、TRH の膵臓 β 細胞に対する作用解析、第 53 回日本糖尿病学会年次学術総会、平成 22 年 5 月 29 日、ホテルグランヴィア岡山、他 (岡山県)

④ 渋沢信行 他、Effect of Thyrotropin-releasing hormone on gene expression in the islet of Langerhans of the pancreas: microarray hybridization analysis of TRH-deficient mouse、14th International Congress of Endocrinology (ICE2010)、平成 22 年 3 月 30 日、京都国際会議場 (京都府)

⑤ garay jennifer、渋沢 信行、他、Thyrotropin-releasing hormone affects gene expression in the islet of Langerhans of the pancreas、14th International Congress of Endocrinology (ICE2010)、平成 22 年 3 月 27 日、京都国際会議場 (京都府)

⑥ 渋沢 信行 他、Effect of Thyrotropin-releasing hormone (TRH) on gene expression in the islet of Langerhans of the pancreas.、9th Asia and Oceania Thyroid Association Congress (AOTA)、平成 21 年 11 月 2 日、名古屋国際会議場 (愛知県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渋沢 信行 (SHIBUSAWA NOBUYUKI)

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：90396622