

平成 21 年 5 月 17 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19591067
 研究課題名（和文） 膵β細胞機能を制御する転写因子 PDX1 の上流シグナルの In Vivo
 における解析

研究課題名（英文） Molecular mechanism controlling PDX1 expression in vivo

研究代表者

藤谷与士夫 (FUJITANI YOSHIO)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：30433783

研究成果の概要：我々は、膵発生とβ細胞機能を制御する遺伝子 PDX1 の発現調節機構を明らかにすべく、先行研究において、PDX1 遺伝子 5' 上流に種をこえて保存されたエンハンサー領域 (AreaI-II-III) を同定した。本研究では、この領域の膵内分泌細胞分化における意義を明らかにするため、この領域を膵分泌前駆細胞のみにおいて欠損するマウスを作製し、その解析をすすめた。この領域は内分泌前駆細胞からβ細胞分化に必要であることが現在、明らかになりつつある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：転写因子，糖尿病，膵β細胞

1. 研究開始当初の背景

最近のヒトを対象とした研究において、インスリン抵抗性の長期にわたる持続や老化とともに、膵β細胞の機能および量が低下すること、それに伴い糖尿病が顕在化し、これを放置するとβ細胞量低下は不可逆的に進行することが報告されている。PDX1 (Pancreas duodenal homeobox gene-1) は膵の発生、β細胞の分化・増殖に必須の役割を演ずるのみならず、成熟膵β細胞の機能発現においても

重要な役割をはたす。マウスの2型糖尿病モデルにおいては、糖尿病の進展の過程にさいして、膵島における PDX1 の発現が低下してゆくことが知られている。したがって、β細胞の機能を維持し、糖尿病を発症あるいは進行させないためには、膵β細胞における PDX1 の発現を高く維持することが重要であると考えられる。

研究代表者らは、PDX1 の発現調節機構を明らかにすべく、PDX1 遺伝子の 5' 調節領域の解析を行なった。

これまでにマウスの PDX1 の転写開始部位より 5' 上流-2.5kb の領域に、種をこえて高度に保存されたエンハンサー様領域 (AreaI-II-III) が同定され、この領域が PDX1 の β 細胞特異的遺伝子発現を担うことが、おもに reporter 解析を用いて示唆されてきた。研究代表者は、このエンハンサー領域の生理的役割を明らかにする目的で、この調節領域を胎生の最初から欠損する変異マウスを作製し、解析を行なった。AreaI-II-III をホモに欠損するマウス (PDX1^{-I-II-III/-} · ^{-I-II-III}) の膵臓は腹側膵臓は発生せず、背側膵臓も低形成を示した。出生時の膵臓は、外分泌細胞、導管の分化は認めるものの、 β 細胞数は著しく減少し、分化した膵島は認められなかった。以上の結果から、このエンハンサー領域 (AreaI-II-III) は胎生期の膵臓において、PDX1 の発現調節において中心的役割を演じ、正常な膵発生・ β 細胞分化において必須であることが明らかとなった。(Fujitani et al. Gene Dev. 2006;20:253-266.)

2. 研究の目的

本研究では、以上の結果をさらに発展させ、①成熟 β 細胞における PDX1 の生理的な発現調節機構の解明とその制御による治療への可能性を探索する目的で、PDX1 遺伝子のプロモーター活性を in vivo において非侵襲的かつ簡便にレポートするマウスモデルの開発を行なうとともに、②これまでに研究代表者らが同定したエンハンサー領域 (AreaI-II-III) の膵の特定の細胞系譜における役割をマウス発生工学を用いた遺伝子改変法により明らかにすることとした。内分泌前駆細胞から β 細胞に分化する局面での重要性を、(研究計画当初は、RIP-CreER を用いて adult β 細胞において AreaI-II-III を inducible に delete する予定であった。しかしながら、tamoxifen による Cre の活性化の効率の問題等実験の実現可能性を考慮し、以下に示すように Ngn3-Cre を用いて、内分泌前駆細胞特異的にエンハンサーを delete する実験へと変更した。)

3. 研究の方法

①PDX1 の転写活性を in vivo において簡便にレポートするマウスモデルの開発: PDX1 遺伝子の生理的な発現調節を反映することが示されている、-4.6kb PDX1 promoter fragment を用いて、その制御下に分泌型の Alkaline phosphatase (SEAP) を発現する transgenic mouse (PDX1-SEAP) を作製した。この SEAP は免疫組織染色を用いて、その発現様式を in situ にて確認できることに加えて、血液中の Alkaline phosphatase 活性を測定することに

より、その発現量を定量化可能にするということを目指したものである。

②PDX1 のエンハンサー領域が、内分泌前駆細胞から β 細胞への分化誘導過程において果たす役割に焦点を絞り、解析を行なうこととした。この目的のために、すべての膵内分泌前駆細胞において一過性に発現する遺伝子、Ngn3 のプロモーター制御下に Cre recombinase を発現する transgene, Ngn3-Cre (Schonhoff SE et al. Dev Biol. 2004;270:443-454.) を有するマウスを入手した。また、PDX1 遺伝子の AreaI-II-III を loxP 配列にて挟んだ conditional allele を有する PDX1^{Fllox123} と、PDX1 null の二種類のマウスを準備した。これらを交配して、Ngn3-Cre;PDX1^{Fllox123/-} マウス (膵内分泌前駆細胞において AreaI-II-III を欠損するマウス) を作製し、その表現型を解析した。

4. 研究成果

①PDX1 の転写活性を in vivo において簡便にレポートするマウスモデルの開発: まず、PDX1-SEAP transgene が膵 β 細胞特異的に発現することを in vitro の細胞培養系を用いて確認した。次に作製した PDX1-SEAP transgenic mouse の 2 line において、膵島特異的に Alkaline phosphatase が発現していることを Alkaline phosphatase 染色により確認することができた (図 1)。

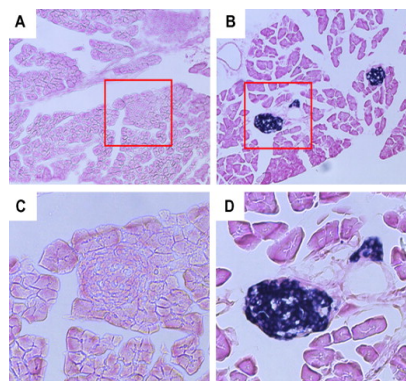


図 1

これらの transgenic line はその発現様式から、内因性の PDX1 発現を反映した line であると考えられた。また、その ALP 活性は、期待されたとおり、血液サンプルからも簡便なアッセイにより検出可能であることが示された。

②膵前駆細胞から β 細胞分化誘導における AreaI-II-III の役割: まず、Ngn3-Cre マウスと Rosa26R マウスを交配させて、Cre の発現が本来の Ngn3 の生理的な発現様式のコントロー

ル下に制御されていることを確認した。
次に、Ngn3-Creマウスとpdx1^{flox123}マウスおよびPDX1+/-マウスを交配することにより、Ngn3-Cre;pdx1^{flox123/-}マウスを得た。

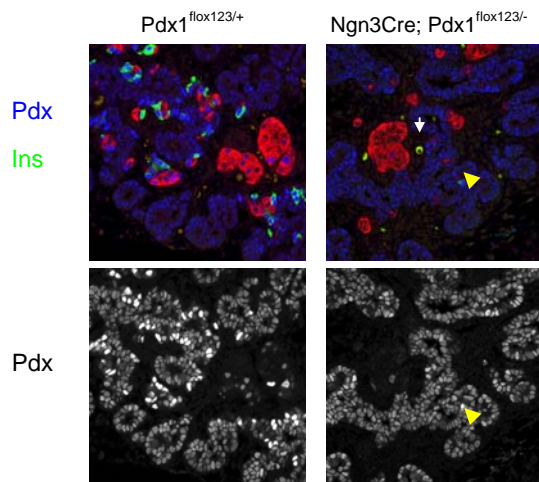


図 2

胎生15.5日においては、図2に示すようにコントロールマウスにおいて、PDX1強陽性を示す細胞が認められるが(図2下段)、Ngn3-Cre;pdx1^{flox123/-}マウスにおいてはそのような細胞が著減していた。

新生児期において変異マウスを免疫染色にて解析したところ、Ngn3-Cre;pdx1^{flox123/-}マウスは膵島の大きさが減少していた。また膵島を構成する細胞におけるβ細胞数が占める割合は著減しており、非β細胞(glucagon, PP産生細胞)の割合が増加していた。以上の結果から、AreaI-II-IIIを介した、Ngn3の一過性発現に引き続くPDX1発現亢進は、膵内分泌前駆細胞からのβ細胞へのcommitmentにきわめて重要な役割を果たすことがin vivoにおいて示された。(以上、未発表データ

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)

①Inada A, Nienaber C, Katsuta H, Fujitani Y, Levine J, Morita R, Sharma A, Bonner-Weir S. Carbonic anhydrase II-positive pancreatic cells are progenitors for both endocrine and exocrine pancreas after birth. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105:19915-19919.

②Nakayama S, Arakawa M, Uchida T, Ogihara T, Kanno R, Ikeda F, Azuma K, Hirose T, Kawamori R, Fujitani Y, Watada H.

。)

[研究の意義と今後の展望]

①PDX1の転写活性をin vivoにおいて簡便にレポートするマウスモデルの開発：われわれは、主に培養細胞系において明らかにされてきたPDX1の発現調節の分子機構が、はたしてIn Vivoにおいてもあてはまるのかどうか、またIn vitro studyでは明らかにしえない発現調節の機構を解析する目的でエンハンサー欠損マウス作製等のIn Vivo研究をこれまで展開してきた。しかしながら、そのような遺伝子改変動物を用いても、遺伝子発現の調節を非侵襲的かつリアルタイムに検出することは一般的に困難を伴う。今回はそのような実験系開発の第一歩として、PDX1プロモーター活性を非侵襲的にレポートするIn Vivoアッセイ系を開発した。今後、このin vivo reporter assay系をもちいて、β細胞機能に影響をあたえる薬剤のスクリーニングに応用できるかどうかを検証してゆきたい。

②これまで、遺伝子エンハンサーの機能解析はレポーター解析や、Chip assayなどに拠って通常行なわれてきており、本研究のように、エンハンサーの生理的役割に迫った研究は少ない。加えて、今回の変異マウスは、AreaI-II-IIIのflox alleleを作製しているため、さまざまなCre lineを用いることにより、膵発生各局面におけるエンハンサーの役割を明らかにしてゆくことが今後可能である。PDX1活性化にいたる上流シグナルを明らかにすることにより、β細胞機能を制御する薬剤の開発にも繋がる可能性があるだろう。

Dose-dependent requirement of patched homologue 1 in mouse pancreatic beta cell mass. Diabetologia. 2008;51:1883-1892.

③Ogihara T, Fujitani Y, Uchida T, Kanno R, Choi JB, Hirose T, Kawamori R, Watada H. Combined expression of transcription factors induces AR42J-B13 cells to differentiate into insulin-producing cells. Endocr J. 2008;55:691-698.

④Burlison JS, Long Q, Fujitani Y, Wright CV, Magnuson MA. Pdx-1 and Ptf1a concurrently determine fate specification of pancreatic multipotent progenitor cells. Dev Biol. 2008;316:74-86.

⑤Yamamoto K, Miyatsuka T, Tanaka A, Toyoda S, Kato K, Shiraiwa T, Fujitani Y,

Yamasaki Y, Hori M, Matsuhisa M, Matsuoka TA, Kaneto H. Tissue-specific deletion of c-Jun in the pancreas has limited effects on pancreas formation. *BiochemBiophys Res Commun.* 2007; 363:908-914.

⑥ Shiraiwa T, Kaneto H, Miyatsuka T, Kato K, Yamamoto K, Kawashima A, Kajimoto Y, Matsuoka TA, Matsuhisa M, Yamasaki Y, Fujitani Y. Establishment of a non-invasive mouse reporter model for monitoring in vivo pdx-1 promoter activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 361:739-744

⑦ Kaneto H, Miyatsuka T, Fujitani Y, Noguchi H, Song KH, Yoon KH, Matsuoka TA. Role of PDX-1 and MafA as a potential therapeutic target for diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;77 Suppl 1:S127-137.

⑧ Wiebe PO, Kormish JD, Roper VT, Fujitani Y, Alston NI, Zaret KS, Wright CV, Stein RW, Gannon M. Ptf1a binds to and activates area III, a highly conserved region of the Pdx1 promoter that mediates early pancreas-wide Pdx1 expression. *Mol Cell Biol.* 2007;27:4093-4104.

[学会発表] (計 3 件)

① Fujitani Y: Regulation of pancreatic islet cell fate by transcription factors and GI hormones, The 5th Catholic International Stem Cell Symposium, 2007.06.01, Seoul

② 稲田明理, 藤谷与士夫, 勝田 仁, Susan Bonner-Weir 「膵上皮細胞からのβ細胞の分化」第19回分子糖尿病学シンポジウム、2007年12月8日、神戸

③ Nakayama S, Watada H, Fujitani Y, Igarashi Y, Iwashita N, Ikeda F, Kanno R, Uchida T, Ogihara T, Motoyama J and Kawamori R. Effect of Hedgehog Signal Intensity on pancreas Morphogenesis. American Diabetes Association's 67th Scientific sessions. 2007.06.22-26. Chicago

[図書] (計 2 件)

① 藤谷与士夫、日本臨床、新時代の糖尿病学 (1) 一病因・診断・治療研究の進歩—「膵β細胞の発生・分化機構」、2008年、総8ページ

② 藤谷与士夫、科学評論社、特集 膵β細胞発生分化にかかわる転写因子の発現調節と機能「膵および膵外におけるPtf1aの発現調節と機能」、2008年、総8ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤谷与士夫 (YOSHIO FUJITANI)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：30433783

(2) 研究分担者

綿田裕孝 (HIROTAKA WATADA)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：60343480

(3) 連携研究者

なし