

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591055

研究課題名（和文） TCF7L2 遺伝子の膵発生と糖尿病発症における役割についての研究

研究課題名（英文） The roles of TCF7L2 gene in the development of pancreas and pathogenesis of diabetes

研究代表者

會田 薫 (AIDA KAORU)

山梨大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50184015

研究成果の概要（和文）：

Wnt シグナル系は動物の発生に非常に重要な役割をはたしている。TCF7L2 遺伝子産物は転写因子であり、その系に属している。最近では糖尿病の原因遺伝子の1つともされている。我々は膵特異的に $\beta$ -catenin を欠失させ TCF7L2 遺伝子が機能しないマウスを作製した。しかし予想に反して、このマウスは耐糖能に異常はなく、膵の形態にも異常はなかった。現在、TCF7L2 遺伝子の活性型を強発現したマウスを作製し検討を続けている。

研究成果の概要（英文）：

Wnt signaling cascade has a crucial role in development of many tissues. The TCF7L2 gene product is a transcription factor involved in the cascade, and is reported to be related to the pathogenesis of type 2 diabetes. We have constructed a pancreas-specific knock-out mouse of  $\beta$ -catenin, an upstream gene of TCF7L2. Unexpectedly, those mice had normal glucose tolerance and normal pancreatic architecture. We are analyzing active TCF7L2-overexpressing mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
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：糖尿病、膵発生、再生医療、TCF7L2 遺伝子、 $\beta$ -catenin

## 1. 研究開始当初の背景

Wnt シグナル系は、動物の発生過程にお

いては、体軸の形成、組織・器官の形成に至るまで、およそWnt シグナルが関与し

ない形態形成は見当たらないほど重要な役割をはたしている。

Wntシグナル系を構成するのは、ligandであるWnt、その受容体（Frizzled, LRP）、 $\beta$ -catenin、TCF family転写因子である。Wntが受容体に結合すると $\beta$ -cateninが細胞内に蓄積し、核内に移行、TCF family転写因子と結合することにより、転写を活性化する。Wntが存在しない場合は、 $\beta$ -cateninはリン酸化をうけ、分解されることにより転写の活性化は起きない。

成体においては、細胞増殖・制御に深く関与し、Wntシグナル系に異常をきたして恒常的活性化が起こると癌化が起こることが示されている。しかし、膵内分泌系の分化・発生にどのように関与しているかについてはほとんど報告がない。TCF7L2遺伝子産物（転写因子TCF4）そのものの役割については全く研究がなされていない。

一方、糖尿病の原因遺伝子を探索するために行われたgenome wide screeningにおいて、TCF7L2遺伝子の1塩基変異と糖尿病との関係が報告された。しかし、この変異はTCF7L2遺伝子のイントロンにあり、この変異と糖尿病発症との因果関係は明らかではない。

従って、TCF7L2遺伝子と糖尿病との関係を明らかにするためには、TCF7L2遺伝子の発現を調節した場合の直接的な膵の発生・機能を検討することが必要である。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究ではTCF7L2 (TCF4)の膵内分泌細胞の分化発生および機能、糖尿病発症における役割について発生工学的手法を用いて検討する。

(1) $\beta$ -catenin の膵特異的欠損マウスを作製

し、Wnt シグナル系を遮断する。

(2) TCF7L2 の dominant negative form を過剰発現する transgenic mouse を作製し、Wnt シグナル系を遮断する。

(3)  $\beta$ -catenin を恒常的に活性化させた transgenic mouse を作製し、Wnt シグナルが常に活性化した状態にする。

このように、3つの方法により Wnt シグナル系を操作することによって、膵内分泌形の発生、機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) TCF7L2 遺伝子の機能を解析するために、その機能を変異させるような遺伝子組み換え操作をしたマウスを作製する。

① PDX-1 promoter により膵特異的に cre recombinase を発現する PDX-1 cre mouse を入手する。

②  $\beta$ -catenin の exon 2-6 を loxP で挟んだ targeted mutant, Ctnnb1/tm2kem/KnwJ を入手する。

③  $\beta$ -catenin の constitutively active form である S33- $\beta$ -catenin cDNA を pCAG-CAT-oligo vector に組み込み、transgenic mouse を作製する。

④ TCF7L2 の dominant negative form である  $\Delta$ N-TCF4 cDNA を pCAG-CAT-oligo vector に組み込み、transgenic mouse を作製する。

(2) PDX-1 cre mouse と②③④のマウスと掛け合わせるにより、それぞれ、膵特異的 $\beta$ -catenin 欠損マウス、恒常的に Wnt シグナル系が活性化したマウス、恒常的に Wnt シグナル系が抑制されたマウスを作製する。

(3) それぞれのマウスの、成長、血糖値、耐糖能について検討する。さらに、胎児から成体までの膵の形態を検討する。

(4) 以上により、TCF7L2 遺伝子の膵発生、 $\beta$ 細胞機能へ果たす役割、糖尿病発症との関係

を明らかにする。

#### 4. 研究成果

我々は $\beta$ -catenin の exon 2-6 を loxP で挟んだ targeted mutant を PDX-1 cre と掛け合わせるにより、膵特異的に $\beta$ -catenin を欠失させた。このマウスは、約10ヶ月までの観察では、外見上、野生型と見分けがつかず、成長も正常であった。また、測定した血糖値も正常であり、10ヶ月齢マウスに糖負荷試験を行ったが、異常は見られなかった。さらに、膵の形態を免疫染色にて観察したが、膵島の形態、 $\beta$ 細胞面積など、野生型と差は見られなかった。PDX-1 遺伝子は胎生の早期に発現するため、 $\beta$ -catenin の欠失は胎生早期から見られる。そこで次に、 $\beta$ -catenin の欠失が胎生中期となるように insulin promoter cre を用いて遺伝子改変を行う準備をしていたが、マウスが継代不能となってしまった。現在は人工授精にて回復し、掛け合わせを行っている。

一方、2つの transgenic mouse の系を作製した。1つは、TCF7L2 遺伝子の dominant negative 型を過剰発現させるマウスである。もう1つは恒常的活性化型 $\beta$ -catenin を発現するマウスである。これらマウスを PDX-1 promoter や insulin promoter により cre recombinase が産生されるマウスと掛け合わせるにより、膵特異的、あるいは $\beta$ 細胞特異的に dominant negative 型 TCF7L2 遺伝子産物や恒常的活性化型 $\beta$ -catenin を発現させることができる。

現在これらマウスを作製し、膵内分泌異能を検討している最中である。

#### 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 18 件)

① Kaoru Aida, Yoriko Nishida, Shoichiro Tanaka, Taro Maruyama, Akira Shimada, Takuya Awata, Masako Suzuki, Hiroki Shimura, Soichi Takizawa, Masashi Ichijo, Daiichiro Akiyama, Fumihiko Furuya, Akio Kawaguchi, Masahiro Kaneshige, Jun Itakura, Hideki Fujii, Toyoshi Endo, Tetsuro Kobayashi. RIG-I- and MDA5-initiated innate immunity linked with adaptive immunity accelerates b-cell death in fulminant type 1 diabetes. Diabetes 60:884 2011, 査読有り

② 會田薫 西田頼子, 田中昌一郎, 丸山太郎, 島田朗, 小林哲郎:「II 感染症と1型糖尿病 劇症1型糖尿病とウイルス感染」、劇症1型糖尿病とウイルス感染。Diabetes Frontier 21:307-313, 2010, 査読なし

③ 會田薫, 小林哲郎:「緩徐進行1型糖尿病 (SPIDDM) および2型糖尿病患者における CXCL10 とインスリン抵抗性に関する検討」 Therapeutic Research 31(6):45-49, 2010 査読なし

④ 會田薫, 小林哲郎:「山梨地域糖尿病療養指導士の歩み」肥満と糖尿病 5・6 Vol. 8 No. 3 p437-439 2009. 5. 10 査読なし

⑤ Shoichiro Tanaka, Yoriko Nishida, Kaoru Aida, Taro maruyama, Akira Shimada, Masako Suzuki, Hiroki Shimura, Soichi Takizawa, Masashi Takahashi, Daiichiro Akiyama, Sayaka Arai-Yamashita, Fumihiko Furuya, Akio Kawaguchi, Masahiro Kaneshige, Ryohei Katoh, Toyoshi Endo, and

Tetsuro Kobayashi: Enterovirus Infection, CXC Chemokine Ligand 10 (CXCL10), and CXCR3 Circuit -A Mechanism of Accelerated Beta-Cell Failure in Fulminant Type 1 Diabetes-. Diabetes 58:2285-2291, 2009, 査読有り

⑥ Tetsuro Kobayashi, Shoichiro Tanaka, Kaoru Aida, Soichi Takizawa, Hiroki Shimura, Toyoshi Endo. Diabetes associated with autoimmune pancreatitis: new insights into the mechanism of beta-cell dysfunction. Expert Review of Endocrinology & Metabolism. 4:591-602, 2009, 査読有り

⑦ 小林哲郎, 田中昌一郎, 会田薫:「緩徐進行1型糖尿病(SPIDDM)の最近の知見」. 糖尿病 第52巻 第8号 2009/8/30, 査読あり

⑧ 会田薫, 土屋和子, 田中治幸, 新藤英夫, 黒沢理恵, 保坂嘉之, 祢津光廣, 井上正晴, 岩瀬英一, 小林哲郎:「山梨地区における糖尿病性神経障害に対するアルドース還元酵素阻害薬エパルレスタットの3年間長期投与による臨床効果—投与中止後の臨床経過も含めて—」. Diabetes Frontier 19(4):522-527 2008/8、査読あり

[学会発表] (計 17 件)

① Tetsuro Kobayashi, Kaoru Aida, Shoichiro Tanaka, Pathological changes in the pancreas of fulminant type 1 diabetes and slowly progressive insulin dependent (type 1) diabetes. The 11<sup>th</sup> International Congress of the Immunology of Diabetes Society. 2010/10/31-11/3, Korea

② Sayaka Yamashita, Kaoru Aida, et al. Expression of salivary type amylase in human pancreatic beta cell and its induction by pro-inflammatory cytokines in MIN6 beta cells. 46<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes. 2010/9/20-24, Stockholm

③ 会田薫 他、シンポジウム: 1型糖尿病の新しい展開。1型糖尿病の膵病変: 劇症1型糖尿病と緩徐進行1型糖尿病の対比から。第53回日本糖尿病学会年次学術集会、2010/5/27、岡山

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

会田 薫 (AIDA KAORU)  
山梨大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 50184015

### (2) 研究分担者

小林 哲郎 (KOBAYASHI TETSURO)  
山梨大学・医学工学総合研究部・教授  
研究者番号: 30113442

### (3) 連携研究者

なし