

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 23 日現在

機関番号：32653  
研究種目：基盤研究（C）  
研究期間：2008～2010  
課題番号：20591637  
研究課題名（和文） 膵細胞および脂肪前駆細胞の分化・機能調節に関わる転写因子の検討  
研究課題名（英文） Reserch of large maf transcription factors on pancreatic cell and preadipocyte differentiation  
研究代表者  
土谷 まり子 (TSUCHIYA MARIKO)  
東京女子医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：00266826

## 研究成果の概要（和文）：

3T3-L1 細胞において mafA mRNA を siRNA で抑制すると、細胞内に脂肪滴の蓄積が認められ、mafA が脂肪細胞の分化・代謝に影響することが示された。脳代謝についても mafA mRNA を siRNA で抑制する in vivo の系では、脳内のいろいろなホルモン、生理活性物質の著明な増減がみられた。転写因子 maf がさまざまな臓器での情報伝達・機能調節に関わることが示された。

## 研究成果の概要（英文）：

Suppression of mafA mRNA with siRNA prevents adipose cell differentiation in 3T3-L1 cells, which suggests a possible role of the transcription factor mafA in regulation of adipocyte function and differentiation. MafA is a key molecule in glucose and energy balance in the central nervous system and peripheral organs, and mafA is likely involved in the regulation of hormonal systems related to glucose metabolism.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科

キーワード：転写因子、インスリン、maf、siRNA、マイクロアレイ、膵細胞

1. 研究開始当初の背景  
膵内分泌細胞の分化 lineage における転写因子の profile の検討が行われており、4つの

転写因子で細胞の初期化がおこるように、遺伝子の発現をきめる転写因子の組み合わせで、分化の方向性や生体の反応性が決まる。

分化の様式は発生のときに獲得した記憶で、これが生体の危機や再生時に発動されると考えられるので、発生時の転写カスケードと対比しながら、インスリンの発現調節をする転写因子である mafA を追跡することにより、代謝にリンクする転写因子のネットワーク、クロストークを検討していく。細胞間のクロストークあるいは臓器間のネットワークを制御する転写因子の検討は必ずや治療のターゲットポイントやマーカーとなるはずで、臨床に有用な情報である。膵・細胞のような最終分化内分泌細胞に至る経路は必ずしも一つではなく様々な可能性、あるいは修飾因子が想定され、細胞の可塑性はインスリン分泌細胞のソースとして多くの可能性を与え、治療の多様性を提供する。

## 2. 研究の目的

内分泌細胞、外分泌細胞、脂肪細胞などの膵臓および関連臓器を構成する各細胞の分化、増殖、再生に関わる遺伝子プロファイルを明らかにし、それぞれ糖尿病（生活習慣病）、発癌、炎症などの治療に有用な細胞 support 療法の基礎から臨床への応用を行う translational research を目標としている。具体的な検討項目として、1) 膵細胞に主体を置いた細胞分化、再生に関わる分子生物学的検討を背景として、可塑性の期待できる細胞ソースに脂肪前駆細胞も加えて細胞 support 療法の可能性を検討する。2) maf 発現の操作による膵および膵外組織（脂肪、肝、脳など）の発現遺伝子 profile の検討。3) 生体の分化再生機構に則った自家細胞での再生医療の可能性などを検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) siRNA による large maf (mafA, mafB, c-maf) mRNA の抑制系の *in vivo*, *in vitro*

における変化を検討した。

(2) 代謝の profile は microarray (Affymetrix) により検討。

(3) 免疫組織染色によりタンパクの発現を検討した。

(方法の詳細は発表論文に記載)

## 4. 研究成果

### (1) 膵

mafA siRNA *in vivo* の膵における結果から adipocytokine の変化とリンクがみられ、細胞間のクロストークが示唆された。膵内分泌細胞の分化に関わる転写因子は、脂肪細胞の代謝、分化に関わることが示された (Int. J. Mol. Med. 2009)。生体でも膵内の脂肪細胞あるいは膵周囲の脂肪組織とのクロストークのひとつのパターンと考えられる。

### (2) 脳

脳の代謝の特性として、ブドウ糖の利用は最重要の経路であり、インスリンの転写因子である mafA の関与は必須である。mafA siRNA による抑制系の Microarray による profile では著明な変化が起こった (Int. J. Biomed. Sci. 2011)。転写因子による臓器間のネットワークが示される。

### (3) 腎

mafB c-maf siRNA による microarray の腎での解析では、mafB, c-maf とも共通の profile が見られることが確認され、転写調節の redundancy が示唆される。Large maf family としての共通構造、認識構造は、シグナルに対して、強調あるいは、拮抗して生体の反応性を制御する機構が示唆される。

さらに膵腎共通の発現タンパクをキイファクターとして検討をすすめている。

### (4) 肝

mafA siRNA *in vivo* では、inslin-like growth factor binding protein-1, thyroid hormone responsive spot 14, fatty acid

synthase, adiponectin など downregulated され、heat shock protein 68, Onecut1/HNF-6, Sc125a30/KMCP1 など up-regulated されていて、mafA の脂質代謝や細胞分化、adipocytokine などに関わる調節が示唆された。

膵・細胞の分化の最終第階で起こる mafB to mafA の転写のスイッチングが、色々な局面で起こり、代謝の機能調節を担っていると考え、liver の mafB siRNA では糖新生に関わる profile を予想して、mafB siRNA を試みていたが *in vivo* ではうまくいっていない。mafB の抑制シグナルが入るとそれに反応していろいろな代償機構が働くようであり、代謝だけでなく、免疫、肝再生など肝臓での作用の多様性を推測する。mafB siRNA の腎臓での profile からは、酸化ストレス防御に関わる一端が推測されるが、これが肝臓での作用にも当てはまるかは検討中である。

(5) AsPC-1, BxPC3 pancreatic cancer cell line

mafB siRNA により、*in vitro* では mafB mRNA の発現の変化に伴い、E-cadherin、 $\beta$ -catenin、GSK3 $\beta$  の発現に変化がみられることがわかり、これにつながる signal cascade として、WNT cascade がリンクしている可能性が示される。

#### 研究成果のまとめと課題

このように転写因子が、細胞間のクロストーク、臓器間のネットワーク、シグナルカスケードにかかわり、制御を及ぼしていることが観察され、その機構は lareg maf 間、その他の因子や機構と関わり、発生時の転写因子の profile との類似性があることも示された。*in vivo* siRNA の確立で、臓器内、臓器間の転写 profile の検討については、実際の生体に近い反応を示唆するもので、定量性の精度

に不足があるものの一定の成果があったと考える。研究成果に示すような形で、まとめることができた。しかし今後の展開としては、新しい方法や技術が必要である。

たとえば、mRNA の定量は realtime PCR で行っているが、定量性には偏りがある。シグナルカスケードの総和、重なりとして、生体の反応の方向性がきまり、増殖、再生、癌化のターニングポイントになりうるので、経時的な profile の定量的な確認方法が必要であり、転写のネットワークが解析できる精度の定量的方法が求められる。また、転写の profile は、個々の細胞で異なり、その差を追跡できる方法が必要で、経時的に、細胞一つ一つの変化が追跡できるようなマーカーと、それを経時的に可視化できる方法や、あるいは物理的なセンサーによる定量化で細胞移動などの動的な変化を計測できるような設定が必要と考えられる。

膵の転写因子の検討は、糖尿病、膵癌の予防、治療を変える情報を提供してきた。高インスリン血症、インスリン抵抗性に関わる転写因子ネットワークの調節は、膵細胞の機能の温存と、適切な膵細胞再生促進を模索できるようになり、糖尿病の治療だけでなく、より早期の予防が図られるようになった。高インスリン血症の状態ですでに転写因子の協調的なネットワークが働いており、インスリンの転写はグルカゴンや脂肪代謝、あるいは脳のインスリン代謝に関わり、さらに（低血糖時の）肝臓での糖新生、グルカゴンの転写に関わる知見は、臓器相関を前提にした治療の方向性を与えることができた。同様に、膵炎、膵癌の発症、治療にもインパクトを与え、癌に対する糖尿病治療薬の適応、糖尿病、糖代謝異常の発癌リスクについても示唆的な所見を提示し、当初目的とした細胞サポート療法的一端を担うことができた。今後も前述

の技術的な課題をクリアしながら、より臨床に有用な情報を発展させることを目指す。

#### 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)

- ① Mariko Tsuchiya, Ken Tsuchiya, Kazuki Yasuda, Mikiko Fujita, Akira Takinishi, Maiko Furukawa, Kosaku Nitta and Atsushi Maeda MafA is a key molecule in glucose and energy balance in the central nervous system and peripheral organs. Int. J. Biomed. Sci. 7(1):19-26, 2011
- ② Mariko Tsuchiya, Atsushi Maeda, Ayume Suzuki, Kazuki Yasuda, Takumi Yoshida, Kosaku Nitta and Ken Tsuchiya Suppression of MafA mRNA with siRNA prevents adipose cell differentiation in 3T3-L1 cells Int. J. Mol. Med. 23:725-732, 2009

[学会発表] (計5件)

- ① Mariko Tsuchiya, Ken Tsuchiya, Kosaku Nitta, Atsushi Maeda Transcription factor mafB and a functional link to E-cadherin expression in b cell differentiation. 71st scientific sessions of American Diabetes Association 24-28/06/2011, San Diego, CA
- ② Mariko Tsuchiya, Atsushi Maeda, Kosaku Nitta, Ken Tsuchiya Transcription factor mafB is implicated in regulation of expression of lipocalin2 and EMT-related genes as well as genes composing of developing pancreas. 70<sup>th</sup>

scientific session of American Diabetic Association 25-29/06/2010, Orland, FL

- ③ Mariko Tsuchiya, Ken Tsuchiya, Kazuki Yasuda, Ayume Suzuki, Atsushi Maeda MafA is a key molecule in glucose and energy balance in the central nervous system as in the peripheral organs. 69<sup>th</sup> scientific sessions of American Diabetic Association 5-9/06/2009, New Orleans, LA
- ④ Mariko Tsuchiya, Ayume Suzuki, Akiko Hayashi, Junko Tanaka, Ken Tsuchiya Atsushi Maeda Functional role of transcription factor of mafB in vivo assessed by siRNA technique and microarray analysis. 29-02/09-10/2009, Viena
- ⑤ Mariko Tsuchiya, Atsushi Maeda, Kazuki Yasuda, Ken Tsuchiya Suppression of mafA mRNA attenuates morphology and functions of adipocyte differentiation by 3T3-L1 cells. 68<sup>th</sup> scientific sessions of American Diabetic Association 6-10/06/2008, San Francisco, CA

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

土谷 まり子 (TSUCHIYA MARIKO)  
東京女子医科大学・医学部・准教授  
研究者番号 : 00266826

##### (2) 連携研究者

土谷 健 (TSUCHIYA KEN)  
東京女子医科大学・医学部・准教授  
研究者番号 : 00246472