

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790861

研究課題名（和文）膵細胞分化における FoxO1 の役割の解明と、膵β細胞再生の試み

研究課題名（英文）Overexpression of FoxO1 in Hypothalamus and Pancreas Causes Obesity and Glucose Intolerance

研究代表者

Hye Jin Kim (HYE JIN KIM)

群馬大学・生体調節研究所・研究員

研究者番号：40466686

研究成果の概要（和文）：

2型糖尿病は末梢臓器におけるインスリン抵抗性に膵β細胞障害が合わさって発症する。しかしながら、中枢性（視床下部）のエネルギー制御破綻も肥満のみならず、2型糖尿病の病態とも深く関わっている。我々は以前に視床下部と膵臓における転写因子 FoxO1 の異常が肥満と糖尿病の原因となることを報告してきたが、これらは視床下部と膵臓を別々に解析したものであった。そこで今回我々は、Rosa26-loxP-stop-loxP-FoxO1-3A マウスと Pdx1-Cre マウスを交配させることで、視床下部と膵臓で同時に恒常的活性型の FoxO1 (FoxO1-3A) を発現するノックインマウス (HTP-FoxO1-3A) を作成し、解析を行った。これらのマウスでは、視床下部と膵臓でのみ FoxO1-3A の発現が認められた。HTP-FoxO1-3A は摂食量の増加と基礎代謝の低下から、コントロール群に比べて有意に体重が増加した。活動量には有意な差は認められなかった。視床下部の AgRP 発現量は増加しており、摂食量増加の原因と考えられた。また、褐色脂肪、及び白色脂肪組織での UCP1 遺伝子群と PGC1α の発現量が減少しており、基礎代謝低下の原因と考えられた。一方、インスリン耐性試験にてインスリン抵抗性が認められ、さらに糖負荷試験において耐糖能が低下していた。単離ラ氏島におけるインスリン含量、並びにβ細胞における Pdx1、MafA、NeuroD の発現量は低下していたが、β細胞の総量は増加していた。また、Ki67 陽性β細胞の増加と p21 や p27 の発現量の減少が認められ、インスリン抵抗性に対する代償性のβ細胞増殖と考えられた。以上より、FoxO1 は視床下部においては摂食量と末梢のエネルギー代謝を制御しており、膵臓においてはβ細胞の機能に重要と考えられた。HTP-FoxO1-3A は肥満とβ細胞障害を伴ったメタボリック症候群の良いモデル動物である。

研究成果の概要（英文）：

Recent studies have revealed that insulin signaling in pancreatic b cells and hypothalamus are critical for the maintenance of nutrient and energy homeostasis, the failure of which are hallmark of metabolic syndrome. We previously reported that forkhead transcription factor FoxO1, a downstream effector of insulin signaling, plays important roles in b cells and hypothalamus. However, in those studies we investigated the roles of FoxO1 independently in either pancreas or hypothalamus. Therefore, to determine combined implications of FoxO1 in hypothalamus and pancreas in the development of metabolic syndrome, we generated constitutively active (CA) FoxO1 knock-in mice (KI), in which CA-FoxO1 is expressed in both hypothalamus and pancreas. Here we show that KI mice develop obesity and glucose intolerance due to increased food intake, decreased energy expenditure and impaired insulin secretion. We also show that KI mice have increased hypothalamic AgRP and Npy expressions and decreased UCP1 and PGC1α expressions in adipose tissues and skeletal muscle. Impaired insulin secretion is associated with decreased expressions of Pdx1, MafA and NeuroD in islets, although b cell mass is paradoxically increased in KI mice. Taken together, we propose that uncontrolled FoxO1 activation in hypothalamus and pancreas could account for the development of metabolic syndrome.

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	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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、肥満、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ようになってきた。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、未だ成功していない。その最大の理由は、膵臓の発生過程におけるβ細胞の基本的な分化メカニズムを、未だ私たちが十分に理解していないからである。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。現在までに明らかにされた膵細胞の分化や膵細胞型の決定に重要なメカニズムとして、1) Pdx1 や Nkx2.2、Pax4 といった膵細胞分化に関連する転写因子群による転写調節 (Jonsson et al., Nature 1994) と、2) Notch シグナルを介した調節 (Hald et al., Dev Biol 2003, Fujikura et al., Cell Metab 2005)、の2点がある。一方、私達は FoxO1 が Pdx1 プロモーター活性を調節していること (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、Nkx2.2、Pax4 と酷似していることを見いだした。また、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 シグナルとクロストークすることを報告している (Kitamura et al. J Clin Invest 2007)。以上の如く、私達の研究室のこれまでの研究成果から、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。例えば、稀ではあるが、膵管細胞の中に、インスリンや Pdx1 を発現している細胞が含まれている。あるいは、ラットやマウスに部分膵切除や膵管結紮を行うと、新生してくる膵管様構造の中にインスリンを発現する細胞が多数含まれている (Bonner-Weir et al., Diabetes 1993, Walker et al., Pancreas 1992)。私達の研究室では、既にマウスから膵管細胞を単離培養する方法を開発している。すなわち、マウスから膵管細胞の集落を回収し、それを上皮細胞のマーカーであるサイトケラチンを指標にして、膵管上皮細胞だけを選択的に培養していき、最終的には、限界希釈法を用いて、幾つかの膵管細胞のクローンを得た。興味深いことに、これらのクローンのうち、いくつかのクローンでは上皮系マーカーのサイトケラチンと間葉系マーカーのビメンチンの両方が陽性であった。従って、これらのクローンでは上皮間葉系変換が行われている可能性がある。一般的に、既に分化した細胞（上皮細胞）から性質の異なる他の分化した細胞（内分泌細胞）に移行する際には、一旦、より未分化な状態（間葉系細胞）に移行すると考えられており、上皮間葉系変換の所見は、今回確立した培養膵管細胞がインスリン産生細胞に再分化しうる可能性を示している。また、重要なことに、これらの培養膵管細胞では Pdx1 と FoxO1 が共に発現していた。

2. 研究の目的

上記の学術的背景と私達の研究室のこれまでの研究成果を踏まえて、本研究課題においては、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 vivo の系で検証する。具体的には、

胎生早期に全ての膵細胞のプロジェニターで発現している Pdx1 のプロモーターと Cre-loxP システムを用いて、全膵細胞に恒常的活性型の FoxO1 を発現するノックインマウスを作成し、各種代謝パラメーターの解析と膵臓の形態学的解析を行う。

### 3. 研究の方法

本研究課題では、膵細胞に特異的に恒常的活性型 FoxO1 を発現するマウスを作成する予定で以下の計画を行った。恒常的活性型の FoxO1 としては Akt によりリン酸化される 3 カ所のアミノ酸 (T24, S253, S318) を全てアラニンに置換し、恒常的に核に局在する変異体 (FoxO1-3A) を用いる。さらに FoxO1-3A を内因性の FoxO1 と区別する為に、FoxO1-3A のアミノ酸末端に FLAG tag を付加しておく。FLAG-FoxO1-3A を loxP 配列にはさまれた PGK-Neo 遺伝子とともに ROSA26 genomic locus に挿入したノックインマウス (ROSA-3A マウス) は、慶応大学の中江淳博士から供与して頂いた。ROSA-3A マウスを、ハーバード大学の Melton 博士より供与して頂いた Pdx1-Cre マウスと交配することにより、全ての膵細胞で恒常的に FoxO1-3A を発現するマウスが作成できる。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、FoxO1-3A は全膵細胞において発現する予定であった。作成したマウスの維持、管理は群馬大学大学院医学系研究科付属動物実験施設にて行った。また、作成したマウスの解析は以下の手順で行った。(1) まず、膵臓における FoxO1-3A の発現を FLAG 抗体を用いたウエスタンブロットや組織免疫染色により確認する。同時に膵臓以外の臓器では FoxO1-3A の発現がないことを確認しておく。

(2) 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、及び、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) を施行して検討する。(3) さらに、各種負荷テスト (グルコース耐性テスト、インスリン耐性テスト、単離ラ氏島における糖刺激インスリン分泌反応テスト (GSIS) 等) を施行する。(4) また、単離したラ氏島を用いて、定量 RT-PCR を行い、各種膵ホルモンや、膵酵素、または膵関連転写因子の発現レベルを解析する。

### 4. 研究成果

**(1) FoxO1 ノックインマウスは膵臓と視床下部に特異的に恒常的活性型 FoxO1 を発現している**

本研究課題を開始した当初は Pdx1-cre マウスは膵臓に特異的に Cre 酵素を発現するとされていた。しかしながら、Pdx1-cre マウスと Rosa-3A マウスを交配して作成したノック

インマウスの各種臓器をウエスタンブロット法と組織免疫染色法にて確認した所、FoxO1-3A は膵臓のみならず、視床下部にも発現していることが明らかとなった。つまり、作成したマウスは膵臓、及び視床下部特異的 FoxO1 ノックインマウスであり、以後、両臓器における FoxO1 の機能を解明する目的でこれらのマウスの解析を行った。

**(2) FoxO1 ノックインマウスは摂食量の増加とエネルギー消費の低下により、体重が増加する**

ノックインマウスは 16 週齢以降、コントロール群に比し、有意に体重が増加した。オスマウスの精巣上体脂肪の重量も有意に増加した。摂食量を定量した所、ノックインマウスで有意に増加していた。さらに呼吸代謝モニターを用いた解析により、ノックインマウスでは酸素消費量の減少が認められた。活動量の解析では特に変化は認められず、体温にも有意な変化はなかった。さらに、摂食量の増加の原因を明らかにする為に視床下部における摂食関連神経ペプチドの発現レベルを定量 RT-PCR を用いて解析した所、ノックインマウスにおいて AgRP と Npy が有意に増加していた。Pomc は減少する傾向にあったが、有意差は認めなかった。また、同様の検討で褐色脂肪組織と白色脂肪組織における遺伝子発現を解析した所、ミトコンドリア関連遺伝子である PGC1α、UCP1、UCP2 の有意な低下が認められた。従って、ノックインマウスでは摂食量の増加と基礎代謝の減少から、体重が増加したと考えられた。

**(3) FoxO1 ノックインマウスはインスリン抵抗性とインスリン分泌の低下から耐糖能障害を示す**

ノックインマウスの随時血糖値はコントロール群と特に違いを認めなかったが、空腹時血糖は 24 週齢の高齢マウスにおいて有意にコントロール群より高値であった。糖負荷試験の結果はノックインマウスで耐糖能が低下していた。一方、インスリン耐性試験においては、ノックインマウスはインスリン抵抗性を示した。

**(4) FoxO1 ノックインマウスのラ氏島サイズ (β細胞量) は増加しているが、インスリン含量は低下しており、グルコースに対するインスリン分泌能も低下している**

ノックインマウスの膵臓の形態学的解析を組織免疫染色法を用いて行った所、インスリン陽性のラ氏島面積 (β細胞量) が有意に増加していることが確認された。しかしながら、含有 DNA 量で補正したインスリン含量についてはノックインマウスで有意に低下しており、グルコースを腹腔内に投与した際の血清インスリンレベルはノックインマウスで有意に低下していた。また、単離ラ氏島を用いたグルコース依存性インスリン分泌能

(GSIS) はノックインマウスで著明に低下しており、耐糖能の悪化の原因の一つと考えられた。一方、単離ラ氏島におけるインスリン遺伝子制御転写因子の発現レベルを調査した所、Pdx1、MafA、及び NeuroD の有意な低下を認めた。また、細胞周期抑制因子である p21waf1 と p27kip1 の発現レベルが有意に低下しており、ノックインマウスでβ細胞量が増加している原因と考えられた。

これらの結果から、視床下部と膵臓で活性型 FoxO1 を発現するノックインマウスでは摂食量の増加と末梢臓器におけるエネルギー消費の低下から肥満を呈し、その結果によるインスリン抵抗性、及び膵臓において活性型 FoxO1 を発現することによるインスリン分泌能の低下の両方から耐糖能の低下を示すと考えられた。従って、今回作製した FoxO1 ノックインマウスはヒトのメタボリック症候群の良いモデルマウスになると考えられた。今後、これらのマウスをさらに詳細に検討することでメタボリック症候群に対する効果的な新しい治療法、予防法の開発に繋がる可能性が示唆された。

#### 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1件)

1. Sasaki, T., Kim, H-J., Kobayashi, M., Kitamura, Y-I., Yokota-Hashimoto, H., Shiuchi, T., Minokoshi, Y. and Kitamura, T. Induction of Hypothalamic Sirt1 Leads to Cessation of Feeding via AgRP. **Endocrinology** 査読有、151: 2556-2566. 2010.

[学会発表] (計2件)

1. 金恵珍、佐々木努、小林雅樹、北村ゆかり、北村忠弘、視床下部、膵特異的 FoxO1 ノックインマウスの解析 第54回日本糖尿病学会、2011.5.19、札幌
2. 金恵珍、佐々木努、小林雅樹、北村ゆかり、北村忠弘、視床下部、膵臓特異的 FoxO1 ノックインマウスは肥満と耐糖能障害を示す 第31回日本肥満学会、2010.10.1、前橋テルサ (群馬県)

[その他]

ホームページ等

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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

Hye Jin Kim (HYE JIN KIM)

群馬大学・生体調節研究所・研究員

研究者番号：40466686