

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790862

研究課題名（和文）転写因子 FoxO1 の膵β細胞増殖と新生における役割

研究課題名（英文）The roles of transcription factor FoxO1 in pancreatic β cell proliferation and neogenesis

研究代表者

小林 雅樹 (KOBAYASHI MASAKI)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：80373041

研究成果の概要（和文）：本研究課題においては、転写因子 FoxO1 の膵臓における生理機能を *in vivo* で明らかにする為に、全膵臓、およびβ細胞特異的 FoxO1 ノックアウト (KO) マウスに高脂肪・高シヨ糖食負荷を与え、または db/db マウスと掛け合わせて解析を行った。生体膵臓における FoxO1 はβ細胞の新生を抑制的に制御している一方で、糖毒性条件下においてはβ細胞の機能維持に貢献しているという、機能の二面性をもつことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：In present study, we analyze the characters of pancreas-specific (P-FoxO1-KO) and β cell-specific FoxO1 knockout mice (β-FoxO1-KO) under two different conditions, high fat high sucrose diet and *db/db* background, to investigate the physiological roles of FoxO1 in the pancreas *in vivo*. We conclude that FoxO1 functions as a double-edged sword in the pancreas; FoxO1 essentially inhibits β cell neogenesis but is required for the maintenance of insulin secretion under metabolic stress

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、膵臓、生理学

1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病は末梢臓器におけるインスリン抵抗性に、β細胞の減少やインスリン分泌異常といったβ細胞の障害が伴って発症するが、これまでのところ、遺伝子改変動物を用いた研究によってβ細胞自身のインスリン

シグナリングがβ細胞の量や機能の制御に重要な役割を果たしていることが明らかにされており、2 型糖尿病における膵β細胞障害もまた、β細胞におけるインスリン抵抗性が原因であると考えられるようになってきた(Kulkarni RN et al. Cell 1999, Ueki et

al. Nat Genet 2006)。しかしながら、現在までに糖尿病に対する根本的な治療法は開発されていない。その最大の理由としては膵内分泌細胞の分化や発生、及び機能調節のメカニズムが未だ十分に理解されていないことが挙げられる。

FoxO1 はインスリンシグナリングの下流で、Akt によるリン酸化を介して転写活性が調節される転写因子であり、研究代表者の所属する研究室では、これまでに肝臓、膵臓、骨格筋、脂肪組織、視床下部といった種々の臓器における FoxO1 の役割を解明し、報告してきた (Nakae J et al. Nat Genet 2002, Kitamura T et al. J Clin Invest 2002, Kitamura YI et al. Cell Metab 2005, Kitamura T et al. Nat Med 2006, Kitamura T et al. J Clin Invest 2007)。特に、膵臓においては FoxO1 のヘテロ欠損マウスとインスリン受容体基質の一つである IRS2 欠損マウスを交配させた *in vivo* の実験系により、FoxO1 が β 細胞への分化、増殖、及び新生を抑制的に制御している可能性を明らかにするとともに、培養 β 細胞を用いた *in vitro* の実験系により、FoxO1 が Pdx1 の転写調節を介して β 細胞の増殖を抑制するメカニズムを提唱した (Kitamura T et al. J Clin Invest 2002)。

さらに β 細胞における FoxO1 の役割を *in vivo* で解明する為に、Pdx1 プロモーターを用いて膵特異的に恒常的活性型の FoxO1 (FoxO1-ADA) を発現するトランスジェニックマウス (Pdx1-ADA マウス) を作製したところ、Pdx1-ADA マウスでは膵臓の低形成、膵外分泌細胞の著明な減少、膵管様構造の増加、膵ラ氏島における内分泌細胞の異常構築、特に β 細胞数の減少と、相対的な α 細胞の数の増加が認められた。さらに増加した膵管には、グルカゴン陽性の細胞は多数認められたが、インスリン陽性の細胞は稀にしか認められなかった (Kitamura T et al. J Clin Invest 2002)。これらの結果は、FoxO1 が膵管細胞から β 細胞への分化、及び新生を抑制し、逆に α 細胞への分化、新生を促進している可能性を示唆する。

一方で、培養 β 細胞において FoxO1 は酸化ストレス条件下ではアセチル化を介した機構により β 細胞の機能維持に関与していることについても報告しており (Kitamura Y., Cell Metab, 2005)、FoxO1 は β 細胞の分化、増殖、及び新生を抑制している反面、糖毒性条件下では β 細胞の機能維持に貢献しているという、相反する機能も有する可能性が示唆される。

このような FoxO1 の多様な生理機能を *in vivo* でさらに詳しく解明するにあたり、FoxO1 の全身の KO マウスは胎生早期 (E9.5) に死亡することから、膵臓の機能はもとより、膵臓の形態学的解析さえも困難であった。そ

のため、*in vivo* の実験系による FoxO1 の loss of function の研究は遅れていた。

2. 研究の目的

本研究課題においては、FoxO1 の loss of function の研究として、Cre-loxP システムを用いて膵臓特異的な FoxO1 ノックアウトマウスを作製し、このマウスの表現型解析により、膵臓における FoxO1 機能を *in vivo* で解析する。FoxO1^{lox/lox} マウスに対し、Pdx1-Cre マウスを交配させると全膵臓の FoxO1KO マウスを作製できるが、Pdx1-Cre マウスの代わりに、Rip(rat insulin promoter)-Cre マウスを交配させることで、 β 細胞特異的 FoxO1KO マウスを作製することができる。これら全膵臓 FoxO1KO マウスと β 細胞特異的 FoxO1 KO マウスの表現型を比較することで、FoxO1 が機能する膵細胞の種類を明らかにする。

3. 研究の方法

[1] 膵特異的 FoxO1 KO マウスの作成と解析
FoxO1^{lox/lox} マウスに Pdx1-Cre TG マウス、もしくは Rip-Cre TG マウスを掛け合わせて、それぞれ全膵臓、もしくは β 細胞特異的 FoxO1KO マウスを作製する。

作製した FoxO1KO マウスの解析は以下のように行う。①マウスの表現型を、各種代謝パラメーター (体重、血糖値、血清インスリン値など) の測定、及び、膵臓の形態学的調査 (ラ氏島のサイズや数、インスリン陽性膵管細胞の数など) を施行して検討する。②次に、各種負荷テスト (糖負荷テスト、インスリン負荷テスト、単離ラ氏島における糖刺激インスリン分泌反応テスト等) を施行する。③また、単離ラ氏島を用いて定量的 RT-PCR を行い、各種ホルモンや、膵関連転写因子の発現レベルの変化を調査する。

[2] 膵特異的 FoxO1 KO マウスの高脂肪・高シヨ糖食負荷による影響の検討

通常、生後 4 週齢のマウスに高脂肪・高シヨ糖食 (F2HFHSD、オリエンタル酵母) を 2~3 ヶ月間与えると、糖負荷試験にて耐糖能の低下が認められる。本研究課題では、膵特異的 FoxO1 KO マウスを高脂肪・高シヨ糖食で飼育した後、マウスの解析を上記 [1] の①~③に準じて行う。

[3] 膵特異的 FoxO1 KO マウスと糖尿病モデルマウスとの掛け合わせの検討

糖尿病モデルマウスである db/db マウスと膵特異的 FoxO1 KO マウスと掛け合わせた際に、糖尿病の程度に変化が生じるかどうかを検討する。さらには、糖負荷試験や組織学的解析を上記 [1] の①~③に準じて行う。

4. 研究成果

[1] 膵特異的 FoxO1 KO マウス

FoxO1^{lox/lox} マウスに Pdx1-Cre TG マウス、もしくは Rip-Cre TG マウスを掛け合わせて、それぞれ全膵臓、もしくはβ細胞特異的 FoxO1KO マウスを作製した。これらのマウスの随時および空腹時血糖値、血漿インスリン値を測定したが、コントロールマウスとの間に有意な差は認められなかった。また、これらのマウスの膵臓の組織学的解析を行ったところ、膵臓およびラ氏島の構築には変化は見られず、ラ氏島のサイズや数に有意な差は認められなかった。全膵臓 FoxO1 KO マウスにおいては、インスリン陽性となる膵管細胞数がコントロールマウスに比べ増加する傾向があった。次にこれらのマウスに糖負荷テスト、インスリン負荷テストを行ったが、コントロールマウスとの間に有意な差は認められなかった。

[2] 膵特異的 FoxO1 KO マウスの高脂肪・高シヨ糖食負荷による影響

全膵臓、およびβ細胞特異的 FoxO1KO マウスに4週齢より3ヶ月間高脂肪・高シヨ糖食を与えたのちに解析を行った結果、随時および空腹時血糖値、血漿インスリン値にはコントロールマウスとの間に有意な差は認められなかった。しかし、全膵臓 FoxO1KO マウスへの糖負荷テストの結果、コントロールマウスに比べ有意な耐糖能の改善が認められた。全膵臓 FoxO1KO マウスの膵臓においては、ラ氏島とインスリン陽性の膵管細胞数に有意な増加が認められ、β細胞量も有意に増加していた。一方、β細胞特異的 FoxO1KO マウスにおいては耐糖能の改善は認められず、ラ氏島とインスリン陽性の膵管細胞数もコントロールマウスとの間に有意な差は認められなかった。次に単離ラ氏島における糖刺激インスリン分泌反応テストを行ったが、全膵臓、およびβ細胞特異的 FoxO1KO マウスともにコントロールマウスとの間に有意な差は認められなかった。これらの結果より、高脂肪・高シヨ糖食負荷時の全膵臓 FoxO1KO マウスにおける耐糖能改善は、非β細胞からのβ細胞新生亢進によるβ細胞量増加によるものである可能性が考えられ、生体膵において FoxO1 は特にβ細胞の新生を抑制的に調節していることが示唆された。

[3] 膵特異的 FoxO1 KO マウスと db/db マウスとの掛け合わせ

全膵臓、およびβ細胞特異的 FoxO1KO マウスを db/db マウスと交配させた結果、高脂

肪・高シヨ糖食負荷を与えたときと比較し、随時および空腹時血糖値、血漿インスリン値の著しい増加が見られたが、コントロール db/db マウスとの間には有意な差は認められなかった。次に、糖負荷テストを行ったところ、全膵臓、およびβ細胞特異的 FoxO1KO マウスともにコントロール db/db マウスと比較して耐糖能の有意な悪化が認められた。全膵臓 FoxO1KO マウスのラ氏島とインスリン陽性膵管細胞数はコントロール db/db マウスより多い傾向を示し、β細胞量は有意に増加していたのに対し、β細胞特異的 FoxO1KO マウスではコントロール db/db マウスとの間に有意な差は認められなかった。単離ラ氏島における糖刺激インスリン分泌反応テストを行った結果、全膵臓、およびβ細胞特異的 FoxO1KO マウスともに、コントロール db/db マウスに比べインスリン分泌能に有意な低下が認められ、電子顕微鏡での解析によりβ細胞における成熟インスリン分泌顆粒数の有意な低下が起きていることが認められた。高脂肪・高シヨ糖食負荷では FoxO1KO による単離ラ氏島にインスリン分泌機能低下は認められなかったことから、慢性的な高血糖による糖毒性条件下において FoxO1 はβ細胞の機能維持に貢献的な働きをしていることが示唆された。糖毒性条件下における FoxO1 のβ細胞機能維持のメカニズムを明らかにすべく、β細胞機能関連遺伝子についてリアルタイム PCR による発現解析を行っているが、現在までにコントロール db/db マウスとの有意な発現量の違いを示す遺伝子は明らかになっておらず、さらに解析を進めている。

これまでの研究において、全身性の FoxO1 欠損は胎生致死となるために FoxO1 の in vivo での loss of function の研究は困難であった。本研究課題はこれまで報告のない膵特異的 FoxO1KO マウスを用いた研究であり、生体膵における FoxO1 の機能について解析を行った。これまでに得られた結果より、生体膵における FoxO1 はβ細胞の新生を抑制的に制御している一方で、糖毒性条件下においてはβ細胞の機能維持に貢献していることから、糖尿病の発症に関しては抑制的にも促進的にも働きうるという、機能の二面性をもつことを in vivo の系において明らかにした。将来的には FoxO1 の遺伝子学的、あるいは薬理的な操作によるβ細胞再生療法、さらに糖毒性条件下におけるβ細胞の機能改善療法などの開発に発展すると考えられる。

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)

〔学会発表〕（計 1 件）

①Kobayashi, M., Kitamura, T. (他 7 名、1 番目) The roles of FoxO1 in pancreatic cell differentiation. The 1st JSH International Symposium in Akita. 2010. 7. 16. 秋田大学（秋田市）

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 雅樹 (KOBAYASHI MASAKI)
群馬大学・生体調節研究所・助教
研究者番号：80373041