

## 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25年 5月31日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590295

研究課題名（和文） 膵臓におけるビタミンDの新規標的遺伝子の同定と発現調節分子機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanism of regulation of expression and identification of novel target gene of vitamin D in the pancreas

研究代表者

崔 美花 (Choi Mihwa)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：30571012

研究成果の概要（和文）：

私達は、Peptide YY (PYY)が膵臓におけるビタミンD新規標的遺伝子のあることを明らかにした。ビタミンD投与により、血清でのPYYレベル、膵臓におけるPYY mRNAとタンパク質レベルが増加したが、腸におけるPYYレベルは何の変化も示さなかった。ビタミンDによるPYY発現誘導が、VDRノックアウトマウスでは全く見られなかったことから、ビタミンDによるPYY発現誘導はVDR依存的であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We found that *Pyy* is a VDR target gene in the mouse pancreas. VDR activation increased mRNA and protein expression of PYY in the pancreatic islets of mice and pancreatic endocrine cell lines, but did not change intestinal PYY expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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：基礎医学・病態医科学

キーワード：分子病態学・膵臓学・ビタミンD・標的遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

慢性膵炎や膵臓癌は、日本国民の高齢化に伴いますます増加している。また、膵β細胞不全による糖尿病の増加は周知の事実である。ビタミンDはビタミンD受容体(VDR)の活性化を介して、カルシウム代謝、細胞の増殖・

分化、免疫・炎症など様々な生理作用の調節を行っている。これまで、ビタミンD作用の分子機構の研究は、VDRが発現している腎臓、骨、免疫系細胞などにおいて多くなされてきた。しかし、VDRは膵臓にも高発現しており、ビタミンDによる膵臓癌細胞に対する増殖

抑制効果、VDR 欠損マウスにおけるインスリン分泌不全を伴う耐糖能障害など、膵臓におけるビタミン D 作用の存在を示唆されているが、その生理学的意義と分子機構についてはほとんど明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、ビタミン D 及び胆汁酸受容体の研究を行っている崔美花と膵臓の  $\beta$  細胞の研究を専門とする石原寿光との共同研究により、膵臓におけるビタミン D の生理機能を解明することを目的として、膵臓 VDR 新規標的遺伝子の同定とその発現調節分子機構の解析を行う。

## 3. 研究の方法

### 1) 膵臓におけるビタミンDの新規標的遺伝子の同定

背景と目的で説明したように、膵臓におけるビタミンDの標的遺伝子についてはほとんど明らかになっていない。すでに候補となる遺伝子についての個別の解析から、膵臓におけるビタミンDの標的遺伝子を数種同定しているが、さらに、DNAマイクロアレイ等を用いた網羅的な方法で同定する。

### 2) ビタミンDのターゲットとなる細胞（内分泌細胞及び外分泌細胞）の解析

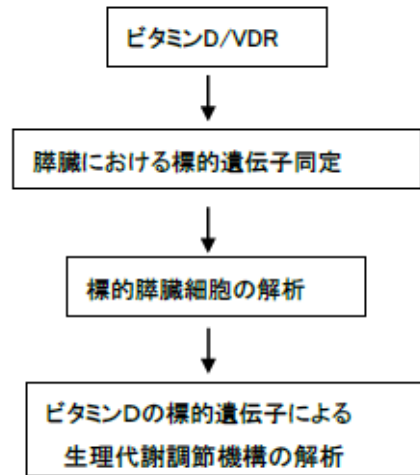
膵臓は内分泌系と外分泌系といった異なった作用をもつ組織である。また、内分泌系の膵島は、少なくとも4種類の内分泌細胞の集合体である。ビタミンDの標的遺伝子の発現及びそれらと関連する細胞機能を、外分泌細胞、内分泌細胞、さらに膵島の種々の細胞系を分離して解析する。

### 3) 膵臓疾患モデルマウスにおけるビタミンDの効果

慢性膵炎モデルマウスおよび  $\beta$  細胞障害に基づく糖尿病モデルマウスにおけるビタミンDの標的遺伝子発現及び生理機能に対する効果を評価する。

### 4) 新規標的遺伝子の生理学的機能の解析

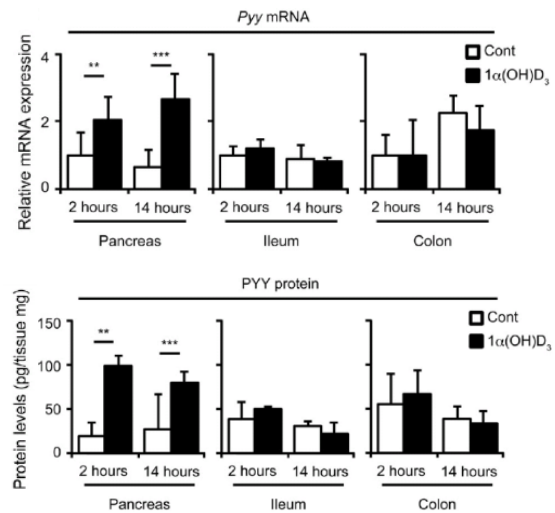
膵臓におけるビタミン D の新規標的遺伝子が生理学的にどのような役割をもつかを調べるために、ウイルス発現系などを利用した新規標的遺伝子の過剰発現系とノックダウン系を作成し、膵臓の外分泌及び内分泌機能を中心に表現型を解析し、さらにそれらに対するビタミン D の効果を解析する。



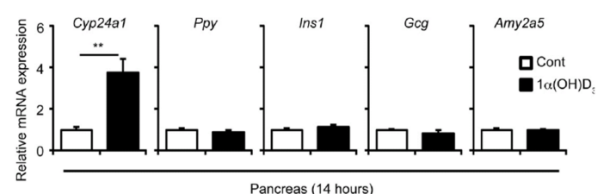
## 4. 研究成果

1) ビタミンD処理によってfood intakeと体重減少が起きる際に、膵臓と血清でのPYY (Peptide YY)レベルが増加した。

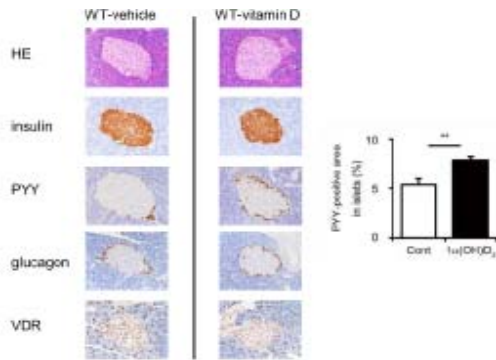
2) PYY がビタミン D/VDR の標的遺伝子であるかを確認するために、ビタミン D 処理 14 時間後の膵臓における PYY、インスリン、グルカゴン、PPY (pancreatic peptide Y)、アミラーゼなどの発現レベルを調べた。その結果、ビタミン D 処理によって膵臓特異的に PYY の mRNA、組織 Peptide content が増加した。



しかし、インスリン、アミラーゼ、グルカゴンの mRNA または peptide content は全く変化を受けなかった。

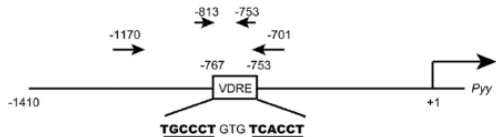


3) ビタミン D による PYY 発現上昇を組織染色法によって調べた結果、PYY はランゲルハンス島の淵に発現しており、ビタミン D により発現の増加が見られたことから、膵臓のランゲルハンス島がビタミン D とビタミン D 受容体による PYY 転写誘導調節の標的部位と考えられた。

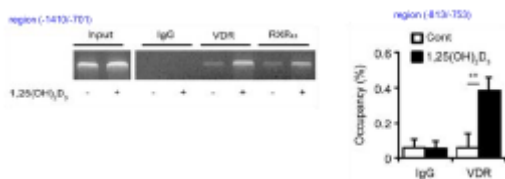


4) ビタミン D による PYY 発現誘導機構を調べるために、クロマチン免疫沈降法・レポーターアッセイ・EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) を利用し、マウス PYY プロモーター上におけるビタミン D 応答配列

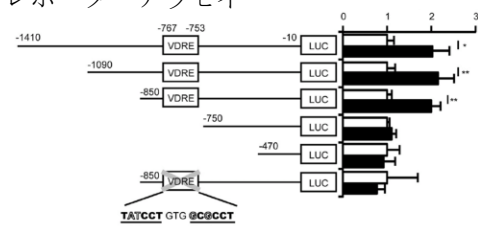
(Vitamin D Responsive element)の同定を行った。その結果、ビタミン D 処理により、VDR が PYY プロモーター上流の-767/-753 に位置する TGCCCT gtg TCACCT に結合し、PYY 転写誘導を行うことが明らかになった。



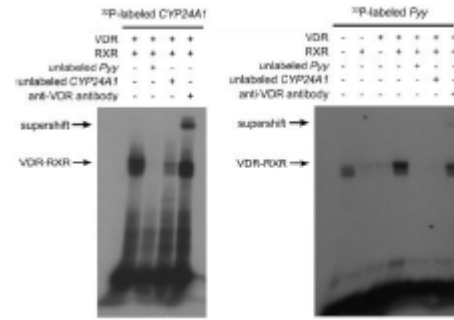
クロマチン免疫沈降法



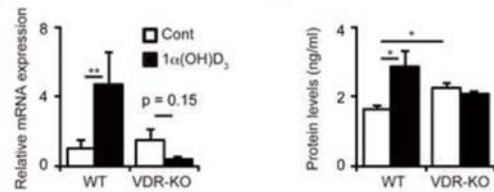
レポーターアッセイ



EMSA



5) ビタミン D による PYY 発現誘導が VDR 依存적であるか否かを調べるために、VDR ノックアウトマウスにビタミン D を投与し、PYY 発現有無を調べたが、全く変化が見られなかったため、ビタミン D による PYY 発現誘導は VDR 依存적であると考えられる。



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)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Choi Mihwa, Ozeki Jun, Hashizume Masami, Kato Shigeaki, Ishihara Hisamitsu, Makishima Makoto, Vitamin D Receptor Activation Induces Peptide YY Transcription in Pancreatic Islets, *Endocrinology*, 査読有、Vol. 153, No. 11, 2012, page 5188-5199.

[学会発表] (計 1 件)

- ① Choi Mihwa, Ozeki Jun, Kato Shigeaki, Ishihara Hisamitsu, Makishima Makoto, Identification of PYY as vitamin D target gene in the pancreas, *Keystone Symposia: Nuclear Receptors Matrix: Reloaded*, British Columbia, Apr 15-Apr 20, 2012

6. 研究組織

(1)研究代表者

崔美花 (Choi Mihwa)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：30571012

(2)研究分担者

石原寿光 (Ishihara Hisamitsu)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：60361086

(3)連携研究者

槇島誠 (Makishima Makoto)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：70346146