

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 5 月 14 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790883

研究課題名（和文）

甲状腺ホルモン受容体による糖尿病マウス遺伝子治療の試み

研究課題名（英文）

Gene therapy for diabetes using liganded-thyroid hormone receptor

研究代表者

古屋 文彦（FURUYA FUMIHIKO）

山梨大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90456450

研究成果の概要（和文）：

目的：甲状腺ホルモン受容体 α (TR α) 発現アデノウイルスベクター (AdTR α) を用い、膵腺房細胞でのインスリン産生能を誘導する。

方法：培養膵腺房細胞 (AR42J) に AdTR α を用いて TR α 遺伝子導入を行い、Neurogenin3 (NGN3) とインスリンの mRNA および蛋白の発現につき検討した。

結果：AdTR α の感染により、甲状腺ホルモン (T3) 依存性のインスリン mRNA の発現誘導が見られ、Activin-A 存在下でインスリン蛋白の増加も確認できた。また、T3 依存性の NGN3 の発現増加が AdTR α の感染により誘導され、NGN3siRNA はインスリン遺伝子発現を阻害した。

考察：NGN3 の発現誘導を介して、AdTR α は膵腺房細胞をインスリン産生細胞へ分化誘導する作用を有している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

One goal of diabetic regenerative medicine is to instructively convert mature pancreatic exocrine cells into insulin-producing cells. We recently reported that liganded thyroid hormone receptor α (TR α) plays a critical role in expansion of the β -cell mass during postnatal development.

AdTR α is a recombinant adenoviral vector that expresses human TR α 1 under the control of the cytomegalovirus promoter. To analyze whether TR α gene transfer induces reprogramming of pancreatic exocrine cells to insulin-producing cells, AdTR α were injected into the pancreas of immunodeficient mice. Rat pancreatic AR42J cells that possess exocrine and neuroendocrine properties were infected with AdTR α . The expression of transcription factors that are involved in the differentiation of pancreatic endocrine cells was then analyzed by quantitative RT-PCR, western blot or immunocytochemistry. To explore whether liganded-TR α -induced reprogramming of pancreatic exocrine cells is direct or indirect effect, AdTR α -infected AR42J cells were concomitantly transfected with siRNA of Ngn3 or MafA.

Small scattered clusters of insulin-producing cells, which also expressed lipase, were observed in AdTR α -infected mice. T3-treatment of AR42J cells that were infected with

AdTR α and pretreated with activin A increased the mRNA and protein expression levels of Ngn3 and MafA, compared to no T3-treatment. Overexpression of TR α together with T3-treatment also induced insulin expression in activin A-treated AR42J cells. The siRNA-induced inhibition of expression of Ngn3 or MafA significantly inhibited AdTR α -induced reprogramming of AR42J cells into insulin-producing cells.

Conclusions: These results suggested that combination of liganded-TR α and activin A leads to reprogramming pancreatic exocrine cells to insulin-producing cells *via* induction of Ngn3 and MafA. Our findings also support the hypothesis that liganded-TR α plays a critical role in β -cell regeneration during postnatal development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：内分泌学

1. 研究開始当初の背景

甲状腺ホルモン受容体 α (TR α)は甲状腺ホルモン(T3) (リガンド) 依存性に作用する転写因子で、中枢神経の発達や分化を誘導する作用を持つことが知られている。胎生期 (E12) のラット膵臓において、TR α mRNA が、成人ラットと比較して約 22 倍の高容量発現していること、ストレプトゾトシン投与により膵 β 細胞にアポトーシスを起こさせたマウス膵臓に対して TR α 発現アデノウイルスベクター (AdTR α) を用いて TR α 遺伝子導入を行うことで、インスリン陽性細胞が増加し、インスリン分泌能が改善することを、我々は報告してきた(JBC 2010)。これらの結果は TR α がインスリン分泌細胞の分化や形成を促す作用を有している可能性を示唆するものと考えられた

2. 研究の目的

膵外分泌細胞に対する TR α の作用を、膵腺房細胞由来の AR42J 細胞を用いて検討する。TR α の持つインスリン分泌能誘導のメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

30MOI AdTR α を AR42J 細胞に感染させ 12 時間後に 100nM T3 を添加し、更に 12 時間培養し、real time-PCR により、インスリン 2、Neurogenin 3(NGN3)の mRNA 発現レベルの解析を行った。2 nM Activin-A で前処置した AR42J 細胞に同様に TR α 遺伝子導入を行い、インスリン蛋白の発現を細胞免疫染色法を用いて検討した。AdTR α 感染後に siRNA を用い NGN3 の蛋白の発現を特異的

に阻害し、インスリン蛋白の発現量を検討した。

*in vivo*におけるTR α の作用を明らかにするため、膵 β 細胞を特異的に障害する作用があるストレプトゾトシン(STZ)を投与し作成した糖尿病モデルマウスに対し、AdTR α を膵臓に注入し、一旦障害された膵島の形態変化、糖尿病モデルマウスの血中のインスリン濃度および血糖値の変化、ブドウ糖負荷に伴うインスリン分泌能の変化につき検討した。

4. 研究成果

AdTR α を感染させたAR42J細胞ではT3添加によりインスリン2のmRNAは6.1倍増加したが、インスリン蛋白の有意な増加は見られなかった。Activin-A添加し24時間培養によって、細胞質内でインスリン蛋白の顕著な増加が見られた。TR α を介したT3のインスリン遺伝子発現の機序の解明のため、NGN3に注目した。AdTR α を感染させたAR42J細胞ではT3添加によりNGN3のmRNAは2.5倍に増加し、核、細胞質内でNGN3蛋白の発現の増加が見られた。siRNAによりNGN3蛋白の発現を阻害したAR42J細胞では、TR α を介したT3のインスリンmRNAの発現の誘導は見られなかった。

NGN3は膵内分泌細胞の分化に必要な転写因子の一つで、膵外分泌細胞をインスリン産生細胞へ形質転換することが報告されている。NGN3のmRNAおよび蛋白の発現誘導を介して、AdTR α はT3依存性に、膵腺房細胞をインスリン産生細胞へ分化誘導する可能性が示唆された。

AdTR α を感染させたRIN5F細胞では、添加したT3の容量依存性に細胞増殖が見られた。Flow cytometryを行ったところ、TR α を発現させたRIN5F細胞ではT3を添加した群では添加しなかった群と比較してG0/G1 \rightarrow G2/Mへの細胞

周期の進展が促進されていた。また、同条件下でT3を添加したAdTR α 感染RIN5F細胞ではcyclinD1の蛋白発現の増加とリン酸化Rb(活性型Rb)蛋白の増加が見られ、膵 β 細胞において、T3はTR α を介してcyclin/CDK/Rb/E2F経路の活性化し、細胞増殖を誘導していると考えられた。

STZを腹腔内に単回投与し膵 β 細胞を特異的に障害を起こさせたマウスでは、STZ投与14日後で β 細胞面積は著しく縮小し、血中インスリン濃度の低下と高血糖が見られる。こうして作成した糖尿病モデルマウスの膵臓に対し、AdTR α を膵管に注入した。AdTR α 投与群で14日以降経時的に、 β 細胞面積は有意に増加し、STZ投与後21、28日以降、血中インスリン濃度は有意に増加し、血糖値は低下していた。STZ投与後のマウスでは腹腔内にブドウ糖を負荷し、血糖値、血中インスリン濃度の測定を行った。AdTR α 投与群では、ブドウ糖負荷後、インスリン初期分泌の反応がみられ血糖値もAdTR α 非投与群と比較して有意に低下していた。*in vivo*においてもTR α を介し甲状腺ホルモンは膵 β 細胞の細胞増殖調節機構の活性化やインスリン発現細胞を誘導し得ることが明らかになった。

糖尿病に対する膵 β 細胞の再生医療を目指した遺伝子治療の研究領域では、膵 β 細胞をはじめとする種々の細胞に、PDX-1やISL-1といった転写因の遺伝子導入を行うことで、細胞増殖の誘導や、膵臓形成過程におけるCyclinD1など細胞周期調節因子の発現量の変化に対する検討が行われているが、細胞周期調節因子の遺伝子導入に伴う過剰発現が原因と考えられる奇形腫などの悪性腫瘍の発生など、解決すべき問題点は多い。今回、我々はリガンド依存性の転写因子である甲状腺ホルモン受容体(TR)に注目したが、TRのような核内ホルモン受容体による膵 β 細胞の細胞周期の調節、細

胞増殖、インスリン発現細胞への形質転換について検討されたことはこれまでになく、本研究は極めて独創的といえる。

今回、糖尿病モデルマウスに対して、ウイルスベクターを用いてTR遺伝子導入を行い、*in vivo*においてもTRを介し甲状腺ホルモンは、膵β細胞の細胞増殖調節機構の活性化やインスリン発現細胞の増殖を誘導し、更には血中インスリン濃度を増加させ、血糖値を改善させることが明らかになった。

本研究の成果をもとに、膵β細胞の分化、増殖過程に対するTRの作用が実験動物レベルで解明されることが期待される。TRを介した膵臓特異的転写因子、細胞周期制御因子の発現調節のメカニズムが明らかになり、糖尿病の新たな治療法の開発が期待される。

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 K. Aida, Y. Nishida, S. Tanaka, T. Maruyama, A. Shimada, T. Awata, M. Suzuki, H. Shimura, S. Takizawa, M. Ichijo, D. Akiyama, F. Furuya, A. Kawaguchi, M. Kaneshige, J. Itakura, H. Fujii, T. Endo, and T. Kobayashi. RIG-I- and MDA5-Initiated Innate Immunity Linked With Adaptive Immunity Accelerates β-Cell Death in Fulminant Type 1 Diabetes. *Diabetes* 60: 884-889, 2011, 査読有

[学会発表] (計 2 件)

① Ligand bound-thyroid hormone receptor contributes to reprogramming of pancreatic exocrine cells to insulin-producing cells *via* induction of Ngn3 and MafA

F. Furuya, K. Asami, H. Shimura, T. Endo, T. Kobayashi, ICE 2012, 2012. 5. 10

② Liganded-thyroid hormone receptor and activin convert pancreatic AR 42J cells into insulin-producing cells

F. Furuya, K. Asami, H. Shimura, T. Endo, T. Kobayashi, EASD 47th annual meeting Lisbon, 2011. 6. 22

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古屋 文彦 (FURUYA FUMIHIKO)
山梨大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90456450

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし