

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591351

研究課題名(和文) 転写因子 ARX の膵島および腸管内分泌細胞に於ける役割の解明

研究課題名(英文) Role of the transcription factor, ARX, on the pancreatic islets and intestinal endocrine cells

研究代表者

村田 善晴 (Murata, Yoshiharu)

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号：80174308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円、(間接経費) 1,170,000 円

研究成果の概要(和文)：転写因子 ARX は、膵島内分泌細胞の分化に決定的な作用を發揮していることが知られているが、詳細な作用機構は不明である。我々が作製したグルカゴン(Gcg)遺伝子ノックアウトマウス(GcgK0)の膵島では ARX の発現増加と細胞の過形成が認められた。そこで、本研究では GcgK0 と Arx 遺伝子改変マウスのダブルミュータントの表現型を解析することにより ARX の膵島内分泌細胞に及ぼす作用機構の解明を目指した。その結果、変異 Arx 導入により、GcgK0 で観察される細胞の過形成が有意に減弱することが示され、ARX が Gcg 作用欠損により生ずる細胞の過形成に必須の役割を演じていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：A transcription factor, aristaless-related homeobox (ARX), is known to play a pivotal role in the development of pancreatic islet cells. However, its precise mechanism remains to be clarified. We recently found that a marked hyperplasia was associated with increased expression of ARX in the pancreatic islet in mice deficient in glucagon gene-derived peptides. In this study, we sought to elucidate the role of ARX in the hyperplasia of alpha cells through analyses of two Arx mutant alleles that have different levels of impairment of their function. The increase in islet size and number of alpha-like cells were reduced in those mutant mice, indicating that the alpha cell hyperplasia induced by the inactivation of glucagon gene is reduced by introduction of an Arx mutation. In addition, the reduction was correlated with severity of disrupted ARX function, showing that the function of ARX is one of the key modifiers for the proliferation of pancreatic alpha cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内分泌学

キーワード：グルカゴン 膵島 細胞 転写因子 ARX 膵臓

1. 研究開始当初の背景と目的

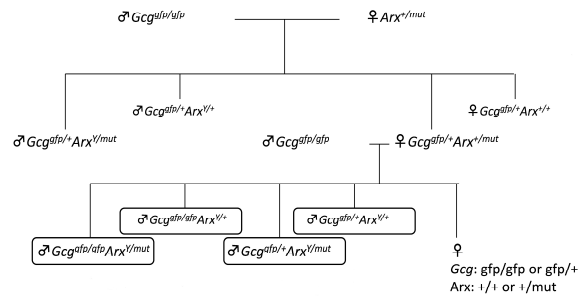
Arx 遺伝子 (the *Aristaless*-related homeobox gene) は、ホメオボックスを有する転写因子ファミリーに属し、哺乳類では X 染色体上に位置する。*Arx* は、主として中枢神経系に発現し、*Arx* 遺伝子変異は、伴性遺伝性精神発達遅滞や滑脳症などを引き起こす。一方、*Arx* は膵臓でも発現しており、膵島内分泌細胞の分化に決定的な影響を与えることが知られており、*Arx* 変異を有する症例では一過性の低血糖発作が報告されている。

我々は、これまで不明な点が多かったグルカゴンの生体内での作用を明らかにする目的でプログルカゴン遺伝子に GFP (Green Fluorescent Protein) を組み込むことで、グルカゴンを含むプログルカゴン遺伝子由来ペプチドがすべて欠損するグルカゴンノックアウトマウス (*Gcg*KO, あるいは *Gcg*^{gfp/gfp}) を作製した。興味あることに、*Gcg*KO の膵島では本来はグルカゴンを産生するはずの β -like 細胞の著明な過形成が観察され、*Arx* の発現が有意に増加していた。これまで ARX は β 細胞の分化に不可欠とされてきたことから、*Gcg*KO で観察される β -like 細胞の過形成に ARX の過剰発現が重要な役割を演じていることが想定された。そこで、本研究は以上の仮説を実証する目的で、ARX の機能が部分的に障害されている 2 種類の *Arx* ノックインマウスを入手し、これらを *Gcg*KO と交配することにより *Gcg* と *Arx* のダブルミュータントマウスを作製して、その表現型を解析することを計画した。

2. 研究方法

<動物実験> 理研バイオリソースセンターから寄贈を受けた 2 種類のノックインマウスの 1 つは、ヒトではミオクローム発作や知的障害をもたらす P355L:PL 変異のノックインマウス (*Arx*^{PL/Y}) であり、もう 1 つはウエスト症候群をもたらす変異 330ins(GCG7):G7 変異を組み込んだ *Arx*^{G7/Y} である。これらを図 1 に示した方法で交配し、*Gcg* と *Arx* のダブルミュータントマウスを作製した。得られた変異マウスの遺伝的背景を均一化するため、少なくとも 10 世代のモドシ交配を行い、実験に供した。すべてのマウスは、SPF (specific pathogen free) 環境下で飼育され、実験は米国 NIH (国立衛生研究所) が定める動物実験指針に則り実施された。

図 1: 交配実験計画



<膵形態学的の定量的解析> 摘出した膵は、重量測定後、4%パラホルムアルデヒドにより固定し、パラフィン包埋した。パラフィン切片は 6 μ m 厚とし、90 μ m 間隔の標本を HE 染色後形態学的解析に供した。膵島の数、面積など定量的解析は、ナノズーム 2.0 RS (浜松フォトリクス社製) を用いて行った。また、切片にある膵臓全体の面積は Image Pro Plus 6.1 (Media Cybernetics 社製) を用いて計測した。定量的 RT-PCR や免疫組織化学などは既報に従った。

3. 研究成果

(1) *Gcg*/*Arx* ダブルミュータントマウスの体重および血糖値

図 1 に示した交配により、メンデルの遺伝法則から予想された数の *Gcg* と *Arx* のダブルミュータントマウスが出生した。生後 2 週令における体重は、ゲノタイプ *Arx*^{G7/Y} を持つ個体が *Gcg* ゲノタイプの如何に関わらず、有意に減少していた。一方、*Arx*^{PL/Y} は体重には影響しなかった。同様に、*Arx*^{G7/Y} を持つ個体の血糖値はこれを持たない個体に比べ有意に低下していた。このことから、ARX-G7 導入による ARX の機能障害の程度は PL に比べ大きいと考えられたが、これは *Arx*^{G7/Y} を持つ個体の神経症状が *Arx*^{PL/Y} を持つ個体に比べ重症であるという報告に合致するものである。

(2) *Gcg*/*Arx* ダブルミュータントマウスに於ける膵島面積、膵島数、および膵全体サイズ HE 染色切片に於ける膵島数と膵島面積をナノズームを用いて定量的に解析した際の典型的な光学顕微鏡所見を図 2A に示し、その結果を図 2 B, C, D, E に示した。

図 2A: 膵切片の HE 染色像

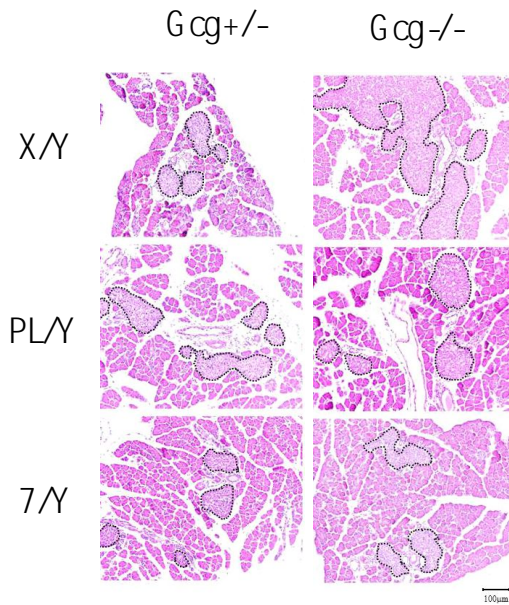


図 2B: 膵全体に占める膵島面積の割合 (2週令)

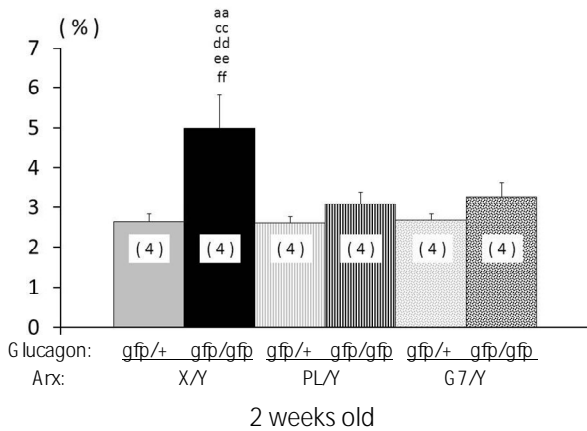


図 2C: 膵全体の膵島数 (2週令)

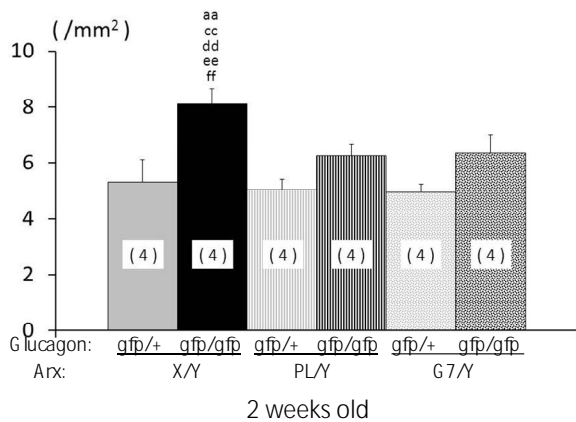


図 2D: 膵重量/個体重量 (2週令)

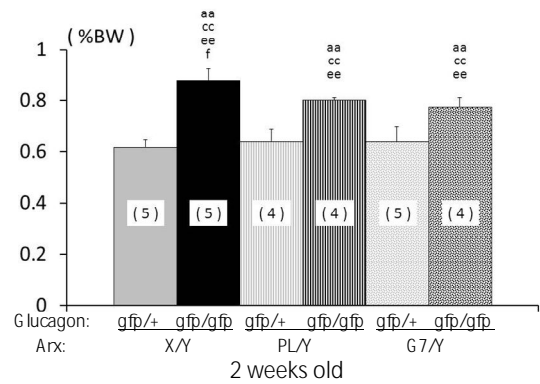
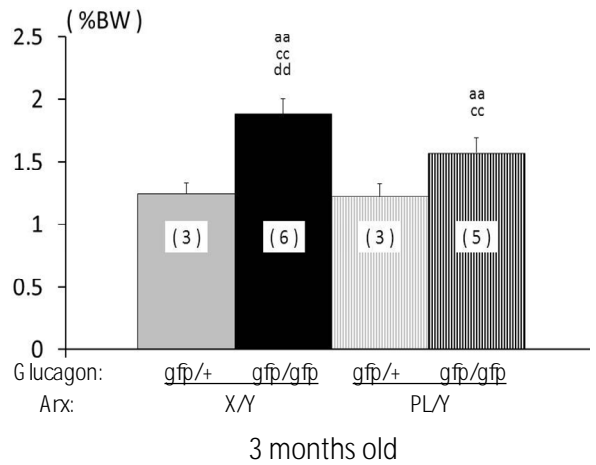


図 2E: 膵重量/個体重量 (3ヶ月令)



膵島の面積は *GcGKO* で約 2 倍と有意に増加していたが、2 種類の *Arx* 変異の導入により、いずれもコントロールである *Gcg^{gfp/+}* のレベルまで減少していた。同様に膵単位面積あたりの膵島の数も *GcGKO* で有意に増加し、2 種類の *Arx* 変異の導入により、いずれも *Gcg^{gfp/+}* のレベルまで減少していた。

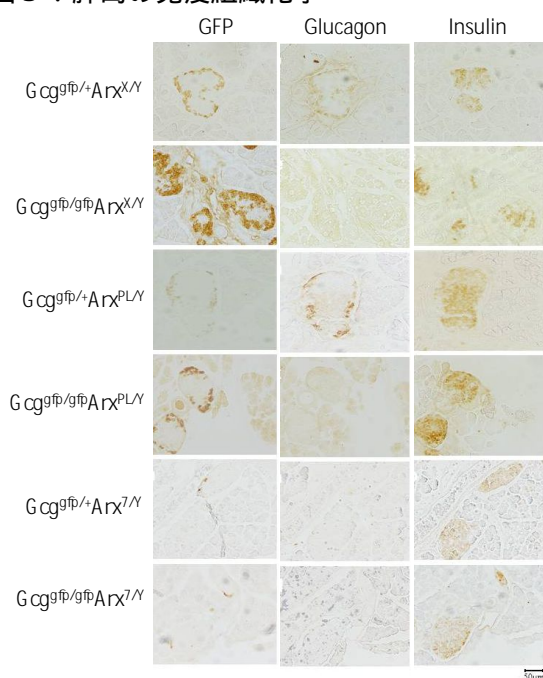
一方、膵重量は、*GcGKO* で有意に増加していたが、この増加は 2 種類の *Arx* 変異の導入の影響は受けなかった。3 ヶ月令のマウスでも膵重量は、*GcGKO* で有意に増加していたが、2 週令のマウスとは異なり *Arx^{PL}* の導入により有意に減少した。しかしながら、*Gcg^{gfp/+}* のレベルまで減少することはなく、*Gcg^{gfp/+}* に比し、有意に増加していた。なお、*Arx^{7/Y}* 導入マウスは体重減少と低血糖が出現するため、生後数週で死亡してしまうため、3 ヶ月令の解析には用いることが出来なかった。

(3) 膵の免疫組織科学的解析

変異 *Arx* 導入の膵島 および β -like 細胞と細胞の分布に及ぼす影響を検討するため、抗 GFP 抗体 (β -like 細胞染色)、抗グルカゴン抗体 (β 細胞染色) および抗インスリン抗体 (β 細胞染色) を用いた免疫組織化学による解析を行い、その結果を図 3 に示した。

本来グルカゴンを産生する β -like 細胞を示す抗 GFP 抗体の免疫染色は既報(Hayashi Y. et al. Mol Endocrinol, 2009)と同様、*GcgK0*(*Gcg^{g1p/g1p}*)において著明に増加し、その数も増加していることが示された。一方、この *GcgK0* に変異 *Arx* である *Arx^{PLY}* を導入すると (*Arx^{PLY}*) 免疫染色の程度、および陽性細胞の数が減少し、もう一つの *Arx* 変異である *Arx^{7Y}* の導入個体 (*Arx^{7Y}*) では陽性細胞はほとんど認められなかった。同様にグルカゴン免疫染色性も 2 つの *Arx* 変異導入により減弱したが、その減弱の程度は *Arx^{7Y}* 導入個体に於いてより著明であった。これに対し、抗インスリン抗体による免疫染色は *Gcg*, *Arx* いずれの遺伝子変異導入によっても変化することがなく、*Gcg* や *Arx* の変異は膵細胞の機能および数に影響を及ぼさないことが示された。

図 3 : 膵島の免疫組織化学



4. 考案と総括

GcgK0 やグルカゴン受容体ノックアウトマウスにおいて膵島細胞 (*GcgK0* においては β -like 細胞) の著明な過形成が認められたことから、グルカゴン作用の欠損が β 細胞の過形成をもたらすことは既に知られていたが、この過形成にどのような因子が関与するかに関しては不明な点が多かった。本研究は、*GcgK0* 膵において転写因子である *Arx* mRNA が過剰発現することに注目し、*GcgK0* と変異 *Arx* ノックインマウスのダブルミュータントを作製、これを用いてグルカゴン作用欠損による β 細胞過形成に及ぼす ARX の作用を検討した。その結果、膵島の面積のみならず、数も *GcgK0* 膵に於いて著明に増加しており、免疫組織化学の結果と合わせると、膵島面積と数の増加は、 β -like 細胞の過形成を反映したものであることが明らかとなった。一方、変異 *Arx* を導入したダブルミュータントマウスでは β -like 細胞過形成が有意に減弱し、この減弱の程度は ARX 機能に強い障害をもたらす *Arx^{7Y}* 変異導入個体においてより著明であった。以上の結果より、ARX はグルカゴン作用欠損に伴う β 細胞の過形成に必須な役割を演じていることが示された。

5. 主な論文発表等

(下線は研究代表者・分担者)

[論文] (計 5 件)

Sai Xu, Yoshitaka Hayashi, Yoshiko Takagishi, Mariko Itoh, Yoshiharu Murata: Aristaless-related homeobox plays a key role in hyperplasia of the pancreas islet β -like cells in mice deficient in proglucagon-derived peptides. PLoS ONE 8 (5) e64415, 2013

Ayako Fukami, Yusuke Seino, Nobuaki Ozaki, Michiyo Yamamoto, Chisato Sugiyama, Eriko Sakamoto-Miura, Tatsuhiro Himeno, Yoshiharu Murata, Yutaka Seino, Yutaka Oiso, Yoshitaka Hayashi: Ectopic expression of GIP in pancreatic β cells maintains enhanced insulin secretion in mice with complete absence of proglucagon

-derived peptides. Diabetes 62: 510-518, 2013

Chisato Sugiyama, Michiyo Yamamoto, Tomomi Kotani, Fumitaka Kikkawa, Yoshiharu Murata, Yoshihata Hayashi: Fertility and pregnancy-associated -cell proliferation in mice deficient in proglucagon-derived peptides. PLoS ONE 7:e4375, 2012

Duncan JH Basset, John G Logan, Alan Boyde, Moira Cheung, Holly Evans, Peter Crocher, Xia-yan Sun, Sai Xu, Yoshiharu Murata, Graham R Williams: Mice lacking the calcineurin inhibitor Rcan2 have an isolated defect of osteoblast function. Endocrinology 153:3537-3548, 2012

Chika Watanabe, Yusuke Seino, Hiroki Miyahira, Michiyo Yamamoto, Ayako Fukami, Nobuaki, Ozaki, Yoshiko Takagishi, Jun Sato, Tsutomu Fukuwatari, Katsumi Shibata, Yutaka Oiso, Yoshiharu Murata, Yoshitaka Hayashi: Remodeling of hepatic metabolism and hyperaminoacidemia in mice deficient in proglucagon-derived peptides. Diabetes 61: 78-84, 2012

[学会発表] (計2件)

Sai Xu, 林 良敬, 村田善晴: Blood glucose levels and islet -cell mass in mouse models carrying mutant Arx alleles. 第85回日本内分泌学会学術総会, 2012, (名古屋)

Yoshitaka Hayashi, Hiroyuki Tanaka, Noriko Sanzen, Kiyotoshi Sekiguchi, Yoshiharu Murata: Innervation and vascularization into islets of Langerhans in the presence or absence of proglucagon-derived peptides. 15th International/14th European Congress of Endocrinology 2012, (Florence, Italy)

[産業財産権]

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 善晴 (MURATA, Yoshiharu)
名古屋大学・環境医学研究所・教授
研究者番号: 80174308

(2) 研究分担者

林 良敬 (HAYASHI, Yoshitaka)
名古屋大学・環境医学研究所・准教授
研究者番号: 80420363

高岸 芳子 (TAKAGISHI, Yoshiko)
名古屋大学・環境医学研究所・助教
研究者番号: 50024659