

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月24日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659169

研究課題名（和文） 膵α細胞機能解析法の確立と、遺伝子改変動物を用いたα細胞障害メカニズムの解明

研究課題名（英文） Establishment of the alpha cell analytical methods and the clarification of the mechanism for alpha cell dysfunction

研究代表者

北村 忠弘 (KITAMURA TADAIRO)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：20447262

研究成果の概要（和文）：

2型糖尿病の病態とα細胞における ATF3、FoxO1 との関連を検討したが、発現レベルや細胞内局在に有意な差は認められなかった。次に、膵臓特異的 ATF3 欠損マウスを作製、解析したが、糖代謝に差はなく、血中グルカゴン、インスリン濃度、及びα細胞、β細胞の形態学的変化は認めなかった。さらに、α細胞特異的 FoxO1 ノックインマウスを作製した所、高グルカゴン血漿と血糖値の上昇、耐糖能の悪化を認めた。α細胞の FoxO1 は糖代謝調節に関与するが、ATF3 の関与は少ないと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We tried to elucidate the significance of ATF3 and FoxO1 in the development of type 2 diabetes. First, there was no difference in the expression levels and subcellular localization of ATF3 and FoxO1 in the alpha cells of type 2 diabetic model mice. We next generated the pancreas-specific ATF3 knockout mice and analyzed metabolic parameters and the pancreas morphology. However, we couldn't find any significant change in blood glucose levels, glucose tolerance, plasma glucagon and plasma insulin levels in these mice. Furthermore, alpha cell and beta cell mass were comparable between knockout mice and control mice. By contrast, alpha cell specific FoxO1 knockin mice showed significantly increased blood glucose levels and impaired glucose tolerance compared to the control mice, which was accompanied with increased plasma glucagon levels. Thus, FoxO1 in alpha cell is important for the regulation of glucose metabolism, but the contribution of ATF3 seems to be less important.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：代謝学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：糖尿病、FoxO1、ATF3、α細胞

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病の病態として、インスリン分泌の障害と共に、グルカゴン分泌抑制も障害されていることが知られている。しかしながら、そのメカニズムについては不明である。その背景には、動物を用いた α 細胞研究が困難であったことがある。例えば、マウスのラ氏島から α 細胞だけを分離、回収するのは困難である。一方、 α 細胞機能障害のメカニズムとして、申請者は ATF3 と FoxO1 に着目した。ATF3 はストレス応答タンパクであるが、予備検討において、膵臓においては α 細胞優位に発現していること、及びグルカゴンプロモーターを調節することを確認した。また、申請者はこれまでに FoxO1 が膵 β 細胞機能に重要な役割を果たしていることを報告してきたが (Kitamura et al JCI 2002, Kitamura et al Cell Metab 2005, Kitamura et al MCB 2009)、 α 細胞においてはグルカゴンの転写を調節していることを見出した。従って、2型糖尿病の病態と α 細胞における ATF3、FoxO1 との関連の解明、並びに α 細胞における ATF3 と FoxO1 の生理的役割を *in vivo* で解明することは有意義と考えられる。

2. 研究の目的

2型糖尿病の病態としては、インスリン分泌障害の他に、グルカゴン分泌の抑制障害も重要である。しかしながら、そのメカニズムは不明である。まず、これまで α 細胞研究を困難にしてきた問題点の解決を試みた。次に、申請者の予備検討により、 α 細胞機能との関連が示唆される ATF3、FoxO1 に着目して研究を行った。まず、各種糖尿病モデルマウスの α 細胞におけるこれらの分子の動態を解析し、 α 細胞特異的にこれらの分子を欠損するマウスを作成、解析した。

3. 研究の方法

- (1) 従来の方法でマウスから単離したラ氏島には α 細胞の他に、 β 細胞、 δ 細胞、PP細胞など多くの他のホルモンを分泌する細胞が含まれており、 α 細胞機能はこれらの細胞から分泌されるホルモン(インスリンやソマトスタチン)によっても制御されている。しかしながら、 α 細胞をこれら他の細胞から分離して回収するのは非常に困難であった。本研究課題では、Rosa26-eGFP マウスを Glucagon-cre マウスと交配し、 α 細胞でのみ GFP タンパクを発現するマウスを作製し、そのマウスから

単離したラ氏島を酵素処理により解離後、セルソーターを用いて GFP 標識された α 細胞のみを回収する方法の確立を試みた。

- (2) α 細胞における ATF3 と FoxO1 の動態を組織免疫染色を用いて解析した。また、糖尿病モデル動物のラ氏島における ATF3 と FoxO1 の変化を免疫組織染色と定量 RT-PCR で調査した。
- (3) 膵臓特異的 ATF3 欠損マウスを Pdx1-cre マウスと ATF3 flox マウスを交配することで作製し、血糖値、耐糖能、血中インスリン濃度、血中グルカゴン濃度、単離ラ氏島内のホルモン含量、組織学的変化(α 細胞と β 細胞量)を検討した。
- (4) α 細胞特異的 FoxO1 ノックインマウスを Glucagon-cre マウスと Rosa26-FoxO1 マウスを交配することで作製し、血糖値、耐糖能、インスリン感受性、血中グルカゴン濃度などを検討した。

4. 研究成果

- (1) Rosa26-eGFP マウスを Glucagon-cre マウスと交配したが、組織学的に検討した所、 α 細胞での GFP 発現が非常に弱く、セルソーターで回収できる程度になかった。従って、計画を変更し、Rosa26-eYFP マウスと Glucagon-cre マウスを交配する系に切り替えた。これらのマウスでは α 細胞で YFP が発現しており、組織学的には十分検出できたが、やはりセルソーターで回収できる程度ではなかった。現在、さらに強く蛍光標識できるマウスの系を確立中である。
- (2) 膵臓における ATF3 の発現パターンに関しては、意見が分かれていた。Hai らのグループでは ATF3 はラ氏島 β 細胞に発現していると報告し、実際に ATF3 欠損マウスではインスリン分泌能が向上することを報告している。一方、Steiner らのグループは ATF3 がラ氏島内では α 細胞に特異的に発現すると報告している。この違いがマウスの遺伝子背景の違いによるものか、使用した抗体の違いによるものかは不明であった。そこで我々は市販されている異なる3種類の抗体 (Santa-Cruz:C-19、Santa-Cruz:H-90、abcam:70005)

を用いて、膵臓における ATF3 の発現パターンを調べた。野生型マウスの膵臓切片において、これらの ATF3 抗体とインスリン、あるいはグルカゴン抗体との 2 重免疫染色を施行した所、C-19 抗体では ATF3 はグルカゴンと共染色したが、インスリンとは共染色しなかった。一方、H-90 抗体と abcam 抗体では ATF3 はインスリンとグルカゴンの両方と共染色した。また、C-19 抗体では ATF3 は細胞質優位に染色されており、H-90 と abcam 抗体では核に優位に発現が確認された。これらの結果から、ATF3 は染色に用いる抗体によって膵臓における発現パターンが異なって解釈される可能性が示唆された。一方、これらの抗体を用いて、高脂肪食飼育マウスと db/db マウスのラ氏島細胞における ATF3 と FoxO1 の発現レベルを、組織免疫染色を用いて検討したが、コントロールマウスと比べて有意な差は認められなかった。また、これらのマウスからラ氏島を単離し、定量 RT-PCR を用いて ATF3 と FoxO1 の mRNA 量を解析したが、やはり有意な差は認められなかった。

(3) 膵臓特異的 ATF3 欠損マウスを Pdx1-cre マウスと ATF3 flox マウスを交配することで作製した。ウエスタンブロット法と組織免疫染色法にて、ラ氏島における ATF3 の発現は 70% 減少していることを確認した。血糖値は空腹時、食後ともコントロールと比べて差がなく、糖負荷試験の結果、耐糖能にも変化を認めなかった。一方、血中インスリン濃度と血中グルカゴン濃度にも差を認めず、さらに単離ラ氏島内のインスリンとグルカゴン含量も正常であった。膵臓の組織学的形態 (α 細胞と β 細胞量も含めて) も異常を認めなかった。従って、既報と異なり、ATF3 の膵 β 細胞、 α 細胞における役割は少ないと考えられた。

(4) α 細胞特異的 FoxO1 ノックインマウスを Glucagon-cre マウスと Rosa26-FoxO1 マウスを交配することで作製した。これらのマウスの血糖値はコントロールに比べて有意に上昇しており、さらに糖負荷試験の結果、耐糖能が有意に悪化していることが明らかとなった。また、インスリン負荷試験ではインスリ

ン感受性の低下を示し、血中インスリン濃度と血中グルカゴン濃度が上昇していた。従って、 α 細胞の FoxO1 は恐らくグルカゴンの分泌を増加させることで血糖値を上昇させると考えられた。

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. Hypothalamic ATF3 is involved in regulating glucose and energy metabolism. Lee Y-S, Sasaki T, Kobayashi M, Kikuchi O, Kim H-J, Yokota-Hashimoto H, Shimpuku M, Susanti V-Y, Ido-Kitamura Y, Kimura K, Inoue H, Tanaka-Okamoto M, Ishizaki H, Miyoshi J, Ohya S, Tanaka Y, Kitajima S and Kitamura T. *Diabetologia*, 査読有 2013 in press.

[学会発表] (計 2 件)

1. 李容守 視床下部、膵臓特異的 ATF3 ノックアウトマウス 第 85 回日本内分泌学会 2012. 4. 20 名古屋国際会議場 (愛知県)
2. 李容守 視床下部、膵臓特異的 ATF3 ノックアウトマウスの解析 第 55 回日本糖尿病学会 2012. 5. 19 パシフィコ横浜 (神奈川県)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[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

北村 忠弘 (KITAMURA TADAHIRO)
群馬大学・生体調節研究所・教授
研究者番号：20447262

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし