

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 5月 15日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791013

研究課題名（和文） 転写因子 FoxO1 の膵α細胞における生理機能の解明

研究課題名（英文） The elucidation of physiological functions of transcription factor FoxO1 in pancreatic alpha cell

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α細胞における生理機能を明らかにする目的で、α細胞特異的恒常的活性型 FoxO1 ノックインマウス（α-FoxO1-KI マウス）を作製し、解析を行った。α-FoxO1-KI マウスはコントロールマウスに比べ自由摂食時の血漿グルカゴン濃度が有意に高く、高血糖を示した。膵α細胞における FoxO1 はグルカゴン分泌の促進的な制御を行っていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the physiological roles of FoxO1 in pancreatic alpha cell, we prepared and analyzed the character of alpha cell-specific constitutive active-FoxO1 knockin mice (alpha-FoxO1-KI). Alpha-FoxO1 KI mice showed significant increases in plasma glucagon and blood glucose levels under random fed condition. We conclude that FoxO1 promotes glucagon secretion from pancreatic alpha cell.

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	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：糖尿病

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、α細胞、グルカゴン、FoxO1

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。しかしながら、α細胞においては血糖上昇に対してグルカゴン分泌を抑制させる機能が低下することも知られている。グルカゴン過剰分泌は肝糖産生を亢進させるため、結果として高血糖が引き起こされる。このように、α細胞機能障害もまた2型糖尿病の進行に深く関わっていると考えられる。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いるが

(Kulkarni RN et al. Cell 1999, Ueki et al. Nat Genet 2006)、α細胞においても細胞機能調節にインスリンシグナリングが重要な役割を果たしていることが報告された (Kawamori D et al. Cell Metab 2009)。これらのことから、2型糖尿病における膵内分泌細胞の機能障害もまた、膵内分泌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。しかしながら、膵内分泌細胞の分化や増殖、及び機能調節のメカニズムは未だ十分には理解されておらず、さらなる研究の推進が求められている。

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、申請者の所属する研

研究室では、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 欠損マウスを交配した場合、FoxO1 のヘテロ欠損が IRS2 欠損マウスに認められる β 細胞障害と糖尿病の発症を抑制することを明らかにするとともに、FoxO1 が β 細胞の分化、増殖に最も重要な転写因子である 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)。さらに膵管細胞は膵内分泌細胞のプロジェクターであると考えられており、事実、稀にはあるがインスリン/Pdx1 陽性細胞が膵管で観察される。組織学的解析の結果、インスリン/Pdx1 陽性膵管細胞はすべて FoxO1 陽性であり (Kitamura T et al. J Clin Invest 2002)、膵特異的 FoxO1 ノックアウトマウスの膵管ではインスリン陽性膵管細胞数の増加が認められることを示した (Kitamura T et al. Mol Cell Biol 2009; Kobayashi et al. Am J Physiol Endocrinol Metab 2012)。これらの結果は FoxO1 が膵管細胞から 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示唆している。一方で、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、さらに 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. Mol Cell Biol 2009)。これらの結果より、FoxO1 が膵管細胞から β 細胞への分化、増殖、及び新生を抑制し、逆に α 細胞への分化、新生は促進するという、膵細胞の分化調節に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。さらに α TC 細胞を用いた *in vitro* の系においては、FoxO1 はプログルカゴン遺伝子のプロモーターに直接結合し、転写を促進することが報告されている (McKinnon et al. J Biol Chem 2006)。

これらの結果より、FoxO1 は α 細胞の分化やプログルカゴン遺伝子の転写を制御し、個体レベルでの糖恒常性調節に関与している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

転写因子 FoxO1 の α 細胞における生理的役割を明らかにするために、Gain of function の研究としては α 細胞特異的恒常活性型 FoxO1 ノックインマウスを、さらに Loss of function の研究としては α 細胞特異的 FoxO1 ノックアウトマウスを、Cre-loxP システムを利用して作製する。これらのマウスの表現型

を解析することで、 α 細胞における FoxO1 の生理的役割を明らかにする。その後、これらのマウスと ROSA26-eGFP マウスを交配させ、FoxO1 ノックアウト α 細胞、あるいは恒常活性型 FoxO1 発現 α 細胞において GFP を共発現するマウスを作製する。これらのマウスの単離ラ氏島からセルソーターを用いて GFP 標識した α 細胞を分離、回収し、 α 細胞における FoxO1 の機能を分子レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

(1) α 細胞特異的恒常活性型 FoxO1 ノックインマウス (α -FoxO1-KI マウス) の解析

α -FoxO1-KI マウスは Cre-loxP システムを用いて、恒常活性型 FoxO1 を loxP 配列に挟まれた PGK-Neo 遺伝子とともに ROSA 26 genomic locus に挿入したノックインマウス (ROSA26-FoxO1 3A マウス) と、グルカゴン-Cre トランスジェニック (TG) マウスを掛け合わせて作製する。恒常活性型 FoxO1 は Akt によるリン酸化を受ける 3 か所のアミノ酸 (T24, S253, S318) を全てアラニンに置換し、内因性の FoxO1 と区別するために FLAG tag を付加した変異体である FoxO1 3A を用いる。ROSA26-FoxO1 3A マウスは慶應義塾大学の中江淳博士より、グルカゴン-Cre TG マウスはジュネーブ大学の Pedro Herrera 教授より既に供与して頂いたものである。作製した α -FoxO1-KI マウスについて、表現型の解析を以下の手順で行う。(1) 各種代謝パラメーター (体重、摂食時および空腹時の血糖値、血漿中のグルカゴンおよびインスリン濃度、インスリン/グルカゴン比など) をマウスの成長を追って測定するとともに、膵臓の形態学的調査 (α 細胞量、 β 細胞量、ラ氏島のサイズや数、ラ氏島内の β 細胞と α 細胞の比率など) を施行する。(2) 次に、各種負荷テスト (グルコース負荷テスト、アルギニン負荷テスト、インスリン耐性テストなど) により、マウス個体の耐糖能やインスリン抵抗性などについての解析を行うとともに、グルカゴン・インスリン分泌反応の解析を行う。(3) 単離ラ氏島についてグルコースまたはアルギニンなどの刺激に対するグルカゴン・インスリンの分泌反応テストを施行するとともに、それぞれのホルモンや α 細胞機能関連遺伝子の発現の変化を調査する。

(2) 膵 α 細胞特異的 FoxO1 ノックアウトマウス (α -FoxO1-KO マウス) の解析

α -FoxO1-KO マウスは、ROSA26-FoxO1 3A マウスの代わりに、FoxO1 flox マウスをグルカゴン-Cre TG マウスと掛け合わせて作製する。FoxO1 flox マウスはハーバード大学の Roland Depinho 教授より、供与して頂いたものである。 α -FoxO1-KO マウスの解析も、先述の α -FoxO1-KI マウスと同様に行う。

(3) α 細胞特異的 FoxO1 遺伝子改変マウスの単離 α 細胞を用いた解析

作製した α 細胞特異的 FoxO1 遺伝子改変マウスに、Rosa26-eGFP マウス (Jackson Lab から購入済) を交配させて、FoxO1 ノックアウト細胞、あるいは FoxO1 3A 発現細胞において GFP を共発現するマウスを作製する。これらのマウスより臍ラ氏島を単離した後、GFP 標識された α 細胞をセルソーター (BD FACSAria II Cell Sorter、ベクトン・ディッキンソン社製) により分離、回収する。回収した α 細胞を用いて、ブドウ糖、アルギニン、インスリンなどの細胞刺激に対するグルカゴンの分泌反応を検討し、さらに α 細胞機能に関連した分子の発現レベルの変化を定量 RT-PCR やウェスタンブロットにより解析する。

4. 研究成果

(1) α -FoxO1 KI マウス

本研究課題を進めるにあたり、グルカゴン測定系の問題が浮き彫りになった。現行のグルカゴン測定系は感度が低く、1 検体あたり $100 \mu\text{l}$ もの血漿を必要とする。そのため、マウスに対しグルカゴンの分泌抑制をするような負荷を与えて解析を行うことが困難なだけでなく、同一個体について経時的なグルカゴン分泌の変化を測定することは不可能であった。さらに、現行のグルカゴン測定系は反応特異性も低く、血液中に存在するプログルカゴン関連ペプチドも検出してしまうため、反応特異性のより高いグルカゴン測定系の開発が求められている (Holst et al. Diabet Obest Metab 2011)。そのため、本研究課題においてはグルカゴンの解析が大幅に遅れている。

現在、マウスの血中グルカゴンの解析を行うのに必要な感度を有し、かつ反応特異性を恒常させた新しいグルカゴン測定系を開発しており、その精度についての検証を行っている。

α -FoxO1-KI マウスは正常に繁殖、成長し、コントロールマウスとの間に体重の差は認められていない。また、生後約 4 カ月において、オスの α -FoxO1-KI マウスの随時血糖値はコントロールマウスより有意に高い値を示した。一方で、空腹血糖値には差が見られなかったが、糖負荷試験を行った結果、 α -FoxO1-KI マウスのわずかながらも有意な耐糖能の低下が認められた。自由摂食時に血糖値の差が認められたことから、血漿グルカゴン濃度測定を行った結果、 α -FoxO1-KI マウスが有意に高い値を示していた。血漿インスリン濃度についても α -FoxO1-KI マウスが高値であったが、統計学的に有意ではなかった。 α -FoxO1-KI マウスの膵臓についての組織学

的解析を行った結果、形態的な異常や、 α 、 β 、両細胞量はともにコントロールマウスとの間に差はなかった。

さらに、生後 1 年以上経過した加齢したオスのマウスについても解析を行っているが、現在での予備的な解析の結果では、加齢により随時血糖値はコントロールマウスとの差がなくなった一方で、インスリン負荷試験において血糖値の回復が有意に早くなっていた。また、空腹時血糖値も有意な高値を示していた。

インスリン負荷試験における血糖値の有意な上昇は、予備的な解析中であるメスの α -FoxO1-KI マウスにおいても観察されている。

これまでに α -FoxO1-KI マウスにおいて得られた結果より、臍 α 細胞における FoxO1 はグルカゴンの分泌を促進的に制御していることが示唆される。

現在、 α -FoxO1-KI マウスの膵臓におけるグルカゴン分泌能について、さらに詳細な解析を行うため、高インスリン-低グルコースクランプ、および臍灌流法によるグルカゴン解析を検討している。

(2) α -FoxO1-KO マウス

α -FoxO1-KO マウスについても α -FoxO1-KI マウスと同様に正常に繁殖、成長し、コントロールマウスとの間に体重の差は認められていない。これまで α -FoxO1-KO マウスの解析の結果では、オスでは随時血糖値がコントロールマウスより低値となり、メスではインスリン負荷試験において血糖値の回復が有意に遅れることが認められた。これらの結果は、 α -FoxO1-KI マウスの結果と完全に逆になるものである。

現在、 α -FoxO1-KI マウスの膵臓におけるグルカゴン分泌能について、さらに詳細な解析を行うため、高インスリン-低グルコースクランプ、および臍灌流法によるグルカゴン解析を検討している。

(3) α 細胞特異的な FoxO1 遺伝子改変マウスからの α 細胞単離

セルソーターにより α 細胞を単離、回収する実験条件の検討の為、グルカゴン-Cre TG マウスと Rosa26-eGFP マウスを交配させ、得られたマウスの単離ラ氏島をトリプシン等の消化酵素や EDTA 処理等により消化し、セルソーターによる解析を行った。このマウスより得た単離ラ氏島においては、RT-PCR により GFP 遺伝子が発現していることは確認できたが、免疫染色およびウェスタンブロットでの GFP 発現については確認することができなかった。そこで、予定を変更し、Rosa26-eYFP マウス (Jackson Lab から購入) をグルカゴン-Cre TG マウスと交配させた。このマウスのラ氏島において約 7 割の α 細胞において YFP

が発現していることは免疫染色にて確認したが、蛍光顕微鏡下にて YFP 発現を確認することはできず、現在までに、セルソーターにおいて有効な GFP シグナルを α 細胞にて検出するに至っていない。その理由について、詳細は不明であるが、ROSA26 プロモーター下流にて蛍光タンパク質の発現量が α 細胞においては極めて低い可能性が考えられる。

そのため今後、 α 細胞特異的 FoxO1 遺伝子改変マウスとプログルカゴン遺伝子ヘテロ欠損マウス ($Gcg^{Gfp/+}$ マウス、Hayashi et al. Mol Endocrinol 2009) を組み合わせることを検討している。 $Gcg^{Gfp/+}$ マウスはプログルカゴン遺伝子を GFP に置換したことにより、プログルカゴン産生細胞(膵 α 細胞、小腸 L 細胞等)において GFP を発現するが、林良敬博士(名古屋大学 環境医学研究所)よりすでに供与して頂いているとともに、GFP の発現は蛍光顕微鏡下で直接観察できるほど強いことを申請者は確認している。現在、 $Gcg^{Gfp/+}$ マウスの単離ラ氏島より GFP シグナルを検出し、そのシグナルを指標に α 細胞を単離する実験条件の検討を行っている。

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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

①小林雅樹 菊池司 李容守 佐々木努 北村忠弘、マウス膵 α 細胞における転写因子 FoxO1 の生理機能、第 37 回日本比較内分泌学会、福井、2012 年 11 月

②小林雅樹 菊池司 李容守 北村忠弘、グルカゴン調節における転写因子 FoxO1 の生理機能、第 85 回日本内分泌学会学術集会、名古屋、2012 年 4 月

③小林雅樹、菊池司、橋本博美、北村忠弘、転写因子 FoxO1 のマウス膵臓における生理機能、第 36 回日本比較内分泌学会大会、東京、2011 年 11 月

④小林雅樹 Hey-Jin Kim 佐々木努 菊池司 天野剛介 北住知也 Yong-Soo Lee 橋本博美 北村ゆかり 北村忠弘、膵 α 細胞における FoxO1 の機能解析、第 84 回日本内分泌学会学術集会、神戸、2011 年 4 月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし