

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591328

研究課題名(和文) インスリン転写因子Mafaの新規標的遺伝子の解析と膵細胞再生への応用

研究課題名(英文) Analysis for new target gene of Mafa, and application for pancreatic beta-cell generation.

研究代表者

松岡 孝昭 (Matsuoka, Takaaki)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：10379258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子Mafaの直接的標的因子を見出し、同因子のGSISへの関与メカニズムを解析した。MIN6細胞とMafa抗体を用いてChIP assayを行い、deep sequencing解析によりMafaが結合しているDNA配列を網羅的に解析した。結果、インスリン分泌へ関与し得る因子を同定し得た。膵細胞新生を目指した検討ではMafaを他の膵細胞関連転写因子とともに組織特異的に発現誘導し得るトランスジェニックマウスを作製し、各転写因子を異所性に発現誘導した。結果、様々な非膵細胞からインスリン陽性細胞を誘導し得ることが示された。これら結果は膵細胞機能・新生におけるMafaの有用性を示している。

研究成果の概要(英文)：it is still unknown how Mafa is involved in insulin secretion. To examine its mechanism, we performed ChIP assay with Mafa antibody and MIN6 cells followed by deep sequencing of isolated fragmented DNA. As a result, we could isolate several genes as target of Mafa. At least, one of them is clearly important for generating ATP and glucose-induced insulin secretion in pancreatic β -cells. In another study, To explore the potential role of Mafa in reprogramming capacity in vivo, we generated transgenic mice conditionally expressing insulin transcription factors by the Cre/loxP system. Ectopic and combined expressions of those factors induced insulin producing cells from various non- β -cells in vivo. Interestingly, the difference of original cell make different efficiency for the reprogramming to insulin producing cells. These results demonstrated the critical role of Mafa for β -cell function and generation.

研究分野：糖尿病

キーワード：糖尿病 インスリン合成 インスリン転写因子

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病患者において、膵細胞機能障害の存在が高血糖を助長し、さらに膵細胞機能が増悪するといった悪循環が繰り返されることは临床上よく経験されている。この膵細胞機能障害の背景に、インスリン転写因子 Mafa の発現低下が関与していることを近年我々は報告している。実際にヒトの膵切片を用いた検討においても、インスリン分泌能の低下した患者においては、Mafa の発現低下が観察された。我々はまた、Mafa が胎生膵から成熟膵に至る如何なる時期においてもインスリン陽性細胞にのみその発現が認められ、多くのインスリン転写因子のなかでも、インスリン合成の中心的役割を果たしていることを報告してきた。さらに Mafa は、インスリン合成のみならずグルコース応答性インスリン分泌にも関与することが Mafa ノックアウトマウスの検討からも明らかとなっており、膵細胞機能において主要な役割を果たしているものと考えられる。しかしながら、Mafa がどのような機序によりインスリン分泌を低下させるのかは明らかではない。これまでに、Mafa の dominant negative form の過剰発現系を用いて、インスリン分泌に関与する幾つかの既知の因子の発現が低下するという報告がなされているが、Mafa 特異的 shRNA 発現マウスにより Mafa 発現を 20%未満までノックダウンした我々の系においては、これら既知の因子のなかでは GLUT2 の他に有意な発現変化はなく、Mafa は主に GLUT2 発現を介してインスリン分泌に関与している可能性と、未知の因子の発現を制御することによりインスリン分泌に関与している可能性を考えているが、いまだ明らかな標的遺伝子は同定されておらず、Mafa が如何にインスリン分泌へ関与しているかは明らかではない。

インスリン分泌の枯渇した糖尿病患者に対する根治療法の一つとして、膵細胞の補充療法が挙げられる。移植ドナー数が不足している現状において、非膵細胞からの膵細胞化へ向けた様々な試みがなされているが、いまだ膵細胞化のためのソースが確立されたとは言いがたく、未分化細胞のみならず、分化細胞も含め多くの候補細胞からの選択が求められている。膵細胞の主要な役割はインスリンの合成であるが、様々な転写因子がこれに関与している。なかでも前述した Mafa は特に強力なインスリン転写因子であり、我々は同因子のクローニングに成功した後、

Mafa が他のインスリン転写因子に比べて膵細胞への発現特異性が際立って高く、他の膵島細胞である α , δ , pp 細胞には発現を認められないこと、膵細胞の最終的な分化段階になり初めてその発現が認められること、膵細胞株に Mafa を stable に発現させるとインスリン発現が認められるようになるなどの報告をしてきた。これらは Mafa が膵細胞機能における key factor の一つであり、膵細胞の発生・再生を考える上でも重要な因子であることを示している。さらに、非膵細胞の膵細胞化に向けた試みとして、Mafa を他の膵細胞特異的転写因子、Pdx1、Beta2 などと同時に作用させることにより、マウスの肝臓や、ラット腸管上皮由来 IEC6 細胞及び膵外分泌由来 AR42J 細胞などに豊富なインスリン発現を誘導し得ることも報告している。しかしながら、実際に *in vivo* において非膵細胞からの膵細胞化を目指すにあたり、いずれの細胞・組織がこれに適しているのかは明らかではない。

2. 研究の目的

我々は、Mafa を手掛かりとした新たなインスリン分泌に関与する因子を探求することを一つの目的としている。未解明の部分の多いインスリン分泌の一端を明らかにできれば、将来の分子生物学的手法によるグルコース応答性インスリン分泌能を有する膵細胞の作製の一助となり得ると考えている。二つ目の目的は、将来の分子生物学的手法による膵細胞の作製に適した標的細胞を探求することである。これまでに得られた我々の結果を基礎として、非膵細胞から膵細胞への分化転換を目指しており、まずは *in vivo* における有望な候補細胞を探求することとした。本研究が将来の膵細胞再生医療に役立つ知見となり得ると考えている。

3. 研究の方法

A) Mafa の直接的標的遺伝子の網羅的解析

グルコース応答性インスリン分泌能を有する MIN6 細胞において sh-Mafa adenovirus を用いて Mafa を knock-down し、灌流実験を行った結果、グルコース応答性インスリン分泌に Mafa が関与していることが示された。そこで、Mafa の直接的標的因子を探求することによりグルコース応答性インスリン分泌関連因子を新規に同定することを目的として、MIN6 細胞と Mafa 抗体を用いて ChIP assay を行い、

得られたChIPサブゲノムの遺伝子配列を直接的に解読すべく、454 Sequencing 解析(Takara Bio)を行った。この解析のメリットは、一度の解析で大量に、そして直接的に DNA 断片を sequence するので、少数の DNA 断片まで網羅的に拾い読むことの出来る点である。454 Sequencing 解析により 100 bp 前後の配列が 65,000 リード程度得られた。得られたリード全てを BLAST サーチし、リードのゲム上での位置が coding sequence よりも上流であり、5000 bp 上流以内のものに絞って解析した。さらに Mafa の結合するコンセンサ配列(MARE)が、実際に沈降された DNA 断片の近傍に存在しているかを解析し、この条件に合致した候補遺伝子上の MARE を含む配列を subcloning することにより、100 種類程度の reporter gene plasmids を作製した。これらを用いて luciferase reporter analysis を施行したところ、Mafa により promoter activity が増大し、且つ、shMafa 発現 plasmid により減少したものが 7 種類認められた。次に、実際に shMafa 発現アノウイルスを用いて Mafa をノックアウトした系において、候補因子の発現の低下の有無を realtime RT-PCR により検討した結果、3 因子が有意に発現低下しており、Mafa により正に制御されている可能性が認められた。そこで、この 3 因子のノックアウトウイルスをそれぞれ作製し、MIN6 細胞の機能に及ぼす影響を検討した。

B) 膵β細胞への分化転換に向けた試み

今回申請している研究の2つ目の目的は *in vivo* における膵β細胞への分化転換に適した候補細胞を見出すことである。この目的のため、Mafa、Pdx1、NeuroD1/Beta2、Neurogenin3(Neurog3)など、膵β細胞の発生・分化およびインスリン発現において必須の転写因子を、Cre-loxP システムを用いた系により組織特異的に発現誘導し得るトランスジェニックマウス(CAG-CAT-Mafa, CAG-CAT-Pdx1, CAG-CAT-Beta2, CAG-CAT-Neurog3)を作製した。これらマウスと様々な非膵細胞特異的 Cre 発現マウスとを交配させることにより、上記転写因子を単独または組み合わせて外因性に発現誘導することにより、各非膵細胞の膵細胞への transdifferentiation の可能性を検討した。

4. 研究成果

A) Mafa の直接的標的遺伝子の網羅的解析

上記3因子のうち、2因子のノックアウトウイルスの作製に成功し、グルコース応答性インスリン分泌を灌流実験により評価したところ、1因子においてノックアウトによる有意なグルコース応答性インスリン分泌の低下が観察された。また、同因子が他組織に比較し膵β細胞に大量に存在していることは、膵β細胞株及び膵島由来RNAを用いて既に確認済である。さらに、これら因子の発現が、Mafaの低下している糖尿病マウスにおいて低下しており、膵細胞特異的Mafa過剰発現db/dbマウスでは発現が改善していることも認められ、Mafaの標的因子である傍証と考えられた。また、同因子をMIN6細胞においてノックアウトすると、ATP産生が低下することも確認しており、グルコース応答性インスリン分泌にはATP産生を介して関与していると考えられる。現在、同候補因子に注目し、*in vivo*での機能を詳細に解析すべく、conditional homo knock-out (flox) mouseを作製中である。hetero knock-out mouseでは、iPGTTでの負荷後血糖高値が認められ、負荷後インスリン値には有意差は認められなかったが、初期には軽度の低下の後、遷延性の高インスリンとなる傾向が認められた。homo knock-out mouseの産出が待たれる。

B) 膵β細胞への分化転換に向けた試み

Neurog3-Cre マウスを用いて、膵β細胞と最も発生学的に近縁にある膵内分泌細胞(α、δ、PP細胞)にMafa及びPdx1の発現を誘導し、その影響につき検討した。結果、胎生膵内分泌細胞へのMafaまたはPdx1単独の過剰発現では、Pdx1により10%未満程度の細胞にインスリンとグルカゴンの共発現を認めたが、その他各内分泌細胞に大きな影響を認めなかった。一方、MafaとPdx1を同時に発現誘導したところ、0.5日齢では多くのグルカゴン陽性細胞においてインスリンが共発現しており、PP陽性細胞においてもインスリンの共発現が認められた。さらに、6週齢においてはグルカゴン、PP陽性細胞がほぼ消失していた。これら結果からは、膵島細胞、なかでも細胞の細胞への可塑性が示唆されたが、分化転換の確認はできていない。そこで、Mafa、Pdx1発現細胞のtracingと、分化の進んだα細胞におけるこ

れら転写因子発現の影響を同時に検討すべく、glucagon-Cre マウスによる Mafa, Pdx1 の発現誘導を行った。Mafa または Pdx1 の単独過剰発現では成熟期に至るまで大きな変化を認めなかった。一方、Mafa 及び Pdx1 を同時に発現させた系においては、ROSA26R-LacZ マウスを用いた細胞の tracing の結果、多数の細胞がインスリン陽性細胞となり、それら細胞ではグルカゴン発現が消失していた。

次に、Ealstase-CreER または Sox9-CreER を用いて、 β 細胞誘導性に膵外分泌細胞または膵導管細胞への各種インスリン転写因子の異所性発現誘導を試みた。いずれの成熟組織においてもインスリン遺伝子発現を誘導し得ることを確認し得たが、外分泌細胞に比べ、Sox9 陽性細胞へインスリン転写因子を発現させた方が、インスリン陽性細胞化効率が高い結果が得られた。これら結果から、インスリン転写因子による膵細胞への transdifferentiation を目指す上では、元の細胞により膵細胞化効率に違いがでると考えられた。

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)

Matsuoka TA, Kaneto H, Kawashima S, Miyatsuka T, Tochino Y, Yoshikawa A, Imagawa A, Miyazaki JI, Gannon M, Stein R, Shimomura I. Preserving Mafa expression in diabetic islet β -cells improves glycemic control in vivo. *J. Biol. Chem.* 290(12):7647-57, 2015.

Miyatsuka T, Matsuoka TA, Sasaki S, Kubo F, Shimomura I, Watada H, German MS, Hara M. Chronological analysis with Fluorescent Timer reveals unique features of newly generated β cells. *Diabetes.* 63(10):3388-93, 2014.

Yamamoto, K., Matsuoka T., Kawashima, S., Takebe, S., Kubo, N., Miyatsuka, T., Kaneto, H., and Shimomura, I. A novel function of OneCut 1 as a negative regulator of MafA. *J. Biol. Chem.* 288, 21648-58, 2013

〔雑誌論文〕(計 7 件)

松岡孝昭

糖尿病ってどんな病気

糖尿病ケア ; Vol.10, No.4, 14-22, 2013

金藤秀明 松岡孝昭

Pancreatic lipotoxicity 細胞ストレスの視点から

月刊糖尿病 9, 12 - 17, 2013

松岡孝昭

膵 β 細胞障害と MafA 発現調節メカニズム

内分泌・糖尿病・代謝内科 Vol.39、No.2 167-172, 2014

下直樹 松岡孝昭

糖尿病患者フォロー中、予期しないコントロール悪化を認めた時の対策の実際

Medical Practice Vol.32, No.1, 92-96, 2015

松岡孝昭 安田哲行

糖尿病患者の胸部の不快感、ここがケン！(虚血性心疾患)

Expert Nurse Vol.31, No.1, 82-85, 2015

藤澤慶子 河盛段 松岡孝昭

糖尿病治療の経口薬 up to date, DPP-4

阻害薬

月刊糖尿病 Vol.7, No.2, 39-44, 2015

下直樹 松岡孝昭

肥満 2 型糖尿病の分子メカニズム
膵臓 β 細胞

The Lipid Vol.26、No.2, 39-44, 2015

〔学会発表〕(計 5 件)

第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会

第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会

第 25 回分子糖尿病学シンポジウム

第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会

第 26 回分子糖尿病学シンポジウム

〔図書〕(計 1 件)

佐々木周伍 松岡孝昭

BOT のエビデンス - ORIGIN 試験

最新インスリン療法 第 2 版 107-110, 2015.6 中山書店

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

松岡孝昭 (MATSUOKA TAKAAKI)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号：10379258

(2)研究分担者

宮塚健 (MIYATSUKA TAKESHI)
大阪大学・医学系研究科・特任講師
研究者番号：60622363

(3)研究分担者

金藤秀明 (KANETO HIDEAKI)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：80448034