

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790925

研究課題名(和文) 膵細胞におけるインスリンシグナルのエピジェネティクス制御に関する検討

研究課題名(英文) Analysis of the epigenetic regulation of insulin signaling molecules in pancreatic beta cells.

研究代表者

橋本 尚子 (Hashimoto, Naoko)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：40559845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：代表者らが作製した低出生体重仔モデルでは出生時の膵細胞量減少および出生後の急激な膵細胞量増加を呈するものの、24週齢では再び膵細胞量が減少することが明らかとなった。また膵細胞におけるインスリンシグナルを検討したところ、若齢期ではインスリンシグナルが亢進しているものの、24週齢の時点ではインスリンシグナルが低下していることがわかった。膵細胞量のCatch-up growthにインスリンシグナルが重要と考えられたため、マウスを用いて検討を行った。その結果、膵細胞特異的PDK1欠損マウスでは対照群と比較して有意に若齢期の膵細胞量増加が抑制されていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We generated a mouse model of low birth weight induced by starvation stress. Specifically, pregnant C57BL/6J mice were subject to a 70% dietary restriction from late pregnancy (10.5 dpc) until delivery. After that, pups of two groups (the mice of food restriction group: RG, and the mice of control group: CG) were fostered to female ICR mice. The body weight of RG offspring was significantly lower than that of CG offspring at birth. As RG mice exhibited a catch-up growth, the body weight of them became equivalent to that of CG mice about 7 days after birth, and thereafter exceeded that of CG mice. Pancreatic beta cell mass at birth was decreased by approximately 30% in RG offspring as compared to that in CG offspring. A high-fat diet significantly increased the pancreatic beta cell mass in RG mice as compared to that in CG mice at 12 weeks of age. However, RG mice fed on high-fat diets tended to exhibit a decrease in the pancreatic beta cell mass at approximately 20 weeks of age.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：代謝学

キーワード：2型糖尿病 インスリンシグナル エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病の発症において、インスリン抵抗性と並んで膵β細胞分泌不全の重要性が注目されている。近年膵β細胞機能は糖尿病発症初期から既に障害されていることが明らかとなってきた。インスリン分泌の障害とともに、膵β細胞量も2型糖尿病において減少していることは、多くの報告より確かなものとなってきたが、糖尿病発症のどのステージでどのようなメカニズムが関与して減少するのかについては、いまだ不明な点が多い。

これまでに代表者は一貫して、「膵β細胞におけるインスリンシグナルの役割」に関する研究を行ってきた。膵β細胞におけるインスリンシグナルの役割に関しては、種々の遺伝子欠損マウスの解析より、膵β細胞機能に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている (*Nat Genet.* 38: 589, 2006.)。つまり、インスリンシグナルが減弱することで、膵β細胞量や機能も低下する。しかし、インスリンシグナルが恒常的に活性化されることも、短期的には膵β細胞量を増加させるが、長期的にはネガティブ・フィードバック機構を介するなどで、膵β細胞量を減少させることが分かってきた (*Mol Cell Biol.* 28: 2971, 2008.)。このように、インスリンシグナルは膵β細胞機能の維持にとって重要であり、適度な調節が必要と考えられる。代表者は平成 22 年度科学研究費において「低出生体重後の膵β細胞量調節機構の解明」をテーマとして採択され、以下のことを明らかとしている。1) 代表者の研究室で「胎生期の飢餓ストレス」モデルとして構築した低出生体重マウスでは出生時に有意に膵β細胞量が減少している。2) 生後の低出生体重マウスは膵β細胞量の catch-up growth によって6週齢ほどで対照群に追いつき、その後一時的に対

照群よりも膵β細胞量が増大する。3) 24週齢においては低出生体重マウスにおいて再び膵β細胞量の減少が認められる。

4) 膵β細胞特異的 PDK1 ヘテロ欠損マウスの低出生体重マウスは6週齢において膵β細胞量が対照群と比して有意に減少している。5) 野生型低出生体重マウスの1週齢の膵島ではインスリンシグナルの亢進が認められる。

以上の結果から、野生型マウスに飢餓ストレスをかけると出生後に膵β細胞量の catch-up growth が認められるが、その分子メカニズムの一因は膵β細胞におけるインスリンシグナルの亢進によるものと考えられた。しかしながら、低出生体重マウスの膵β細胞では出生後に何故インスリンシグナルが亢進するのか、また高齢のマウスでは何故再び膵β細胞量が減少しているのかについては、現在もまだ明らかではない。

2. 研究の目的

代表者は、低出生体重マウスの膵β細胞におけるインスリンシグナルの変化が、エピジェネティクス制御によるものと考えている。胎生期の飢餓ストレスがエピジェネティクス制御に影響を及ぼすことは既に広く知られており、膵β細胞においても転写因子 Pdx1 のエピジェネティクス制御の変化によって高齢期になってから膵β細胞量が減少することが報告されている。しかしながら、インスリンシグナルがエピジェネティクス制御によって亢進・減弱していることを示した報告はない。飢餓ストレスが膵β細胞だけではなく肝臓や筋肉のインスリン抵抗性を惹起することも併せて考えると、インスリンシグナルにエピジェネティクス制御が関与している可能性は十分考えられる。

以上の点から、代表者は飢餓ストレスを負

荷したマウスおよび膵β細胞株を用いて、「膵β細胞におけるインスリンシグナルのエピジェネティクス制御に関する研究」を行うという考えに至った。

### 3. 研究の方法

マウス:妊娠 10.5 日の母親マウスを 2 群に分けた。片方は通常食を制限なく与え(CG)、一方は妊娠 10.5 日より 70%食餌量に制限した(RG)。両群共に出生後は ICR マウスを里親とし、生後 4 週にて離乳、30%脂肪分を含んだ高脂肪食を与えた。

免疫染色:それぞれの週齢にて膵臓を摘出し、ポアン液にて一晩固定した後パラフィン包埋を行った。ブロックを 4 μm 厚の切片にし、スライドガラス上でインスリン抗体およびグルカゴン抗体(ともに Dako)と反応させた後、Cy3 あるいは FITC 結合二次抗体(Jackson Immuno Research Laboratories)で染色した。

マイクロアレイ解析:10 週齢の CG 群および RG 群マウスの単離膵島から total RNA を抽出した。それらの total RNA を、約 39,000 のマウス転写産物に対する probe を含む Gene Chip Mouse Genome 430 2.0 array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)を用いて解析した。

統計学的解析: Unpaired-Student's-t-test による検定を行い、\*: $P < 0.05$ , \*\*: $P < 0.01$  とした。

### 4. 研究成果

これまでの結果から我々は、低出生体重マウスにおいては catch-up growth 期に膵β細胞量が増加することを明らかにした。すなわち胎生期の飢餓ストレスによって、生後の catch-up growth 期には体長だけではなく膵β細胞量も急激に増加するが、それはインスリンシグナルの亢進によるものであることが明らかとなった。しかしながら、どのような機序で低出生体重モデルマ

ウスの膵β細胞においてインスリンシグナルが亢進するかについては依然不明である。これまでに、飢餓の条件下では Drosophila においてインスリン受容体の発現が増加すること、また低出生体重モデルにおける膵β細胞量の減少にエピジェネティクス制御が重要な役割を果たしていること等が報告されていることから、我々は膵β細胞のインスリンシグナルにエピジェネティクス制御が関与しているという仮説を構築した。この仮説を実証すべく、マウス膵β細胞株 MIN6 細胞にヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 Trichostatin A (TSA)を負荷し、インスリンシグナル上流分子である IRS2 の発現変化について検討した。その結果、mRNA および蛋白発現解析によって IRS2 発現亢進が確認された。その際の IRS2 プロモーター領域におけるヒストン修飾を ChIP アッセイで検討したところ、コントロールと比してヒストンのアセチル化亢進が認められた。すなわち IRS2 プロモーター領域のヒストンアセチル化を亢進させることによって、IRS2 の発現が亢進することが明らかとなった。

飢餓ストレスを負荷した膵β細胞においては、IRS2 プロモーター領域におけるエピジェネティクス修飾が変化していると考えられたため、飢餓ストレスマウスの単離膵島を用いて Bisulfite sequence ならびに ChIP アッセイを行った。その結果、コントロールマウスと比較して飢餓ストレスマウス膵島の IRS2 プロモーター領域では、ヒストンアセチル化が低下していることが明らかとなった。また DNA メチル化に関しては両群間で差が認められなかったことから、飢餓ストレスマウスの膵β細胞におけるインスリンシグナル低下は、IRS2 プロモーター領域におけるヒストン修飾変化が重要な要素であることが示唆された。

## 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 2 件)

Yoshida Y, Fuchita M, Kimura-Koyanagi M, Kanno A, Matsuda T, Asahara S, Hashimoto N, Isagawa T, Ogawa W, Aburatani H, Noda T, Seino S, Kasuga M, Kido Y. Contribution of insulin signaling to the regulation of pancreatic beta-cell mass during the catch-up growth period in a low birth weight mouse model. ***Diabetology International***. 5:43-52, 2014. 査読有

Asahara S, Shibutani Y, Teruyama K, Inoue H, Kawada Y, Etoh H, Matsuda T, Kimura-Koyanagi M, Hashimoto N, Sakahara M, Fujimoto W, Takahashi H, Ueda S, Hosooka T, Satoh T, Inoue H, Matsumoto M, Aiba A, Kasuga M, Kido Y. Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1) regulates glucose-stimulated insulin secretion via modulation of F-actin. ***Diabetologia*** 56:1088-1097, 2013. 査読有

[学会発表](計 1 件)

Kawada Y, Asahara S, Sato A, Hashimoto N, Kido Y. Analysis of the epigenetic regulation of insulin signaling molecules in pancreatic beta cells. 第 35 回日本分子生物学会年会 2012.12.11-12.14 福岡

[その他]

ホームページ等

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/fhs-diabe>

tes/

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

橋本 尚子 (Hashimoto, Naoko)

神戸大学大学院医学研究科・医学研究員

研究者番号：40559845