

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670432

研究課題名(和文)膵細胞の内分泌細胞への分化能変換因子の網羅的探索

研究課題名(英文)Comprehensive screening of the differentially expressed genes in various conditions for factors involved in the development of endocrine pancreas.

研究代表者

武田 純 (Takeda, Jun)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40270855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：若年糖尿病MODYに関連する一連の転写因子の欠損では膵島の発生・分化が障害される。本研究では、同転写因子を制御するLRH-1やSHP欠失について解析すると共に、膵島トランスクリプトームのシース活用、多分化能を有するAR42J細胞を用いた分化誘導実験、発現変化遺伝子を用いた連関アルゴリズム等の解析を実施した。その結果、LRH-1および関連因子は単独では膵島分化を起動しないと考えられた。また、種々のキーワードを用いた機能ネットワーク形成により、11種類の関連候補分子を獲得することができた。これらは膵島機能の理解において重要であると共に、新規MODY遺伝子の有力候補にもなる。

研究成果の概要(英文)：Functional defects of MODY-related transcription factors are associated with both functional and morphological abnormalities in endocrine pancreas. In order to understand the pathogenesis, we examined functional properties of the related cofactors, using LRH-1 and SHP deficient mice. In addition, establishment of molecular inventory of differentially expressed genes located downstream of the pancreatic MODY network was also performed. Both LRH-1 and SHP deficient mice represented no glucose intolerance, suggesting that these factors alone could not initiate any remodeling of endocrine cells. However, LRH-1 (-/+) mice showed significantly increased body weight, suggesting that MODY transcription network might include various metabolic pathways. The comprehensive survey of differentially expressed genes in various conditions resulted in the identification of eleven candidate genes, the analysis of which could lead to the better understanding of acquirement of the tissue-specificity.

研究分野：医学・糖尿病代謝学

キーワード：インスリン分泌 遺伝性疾患 分子遺伝学 生活習慣 糖尿病 ランゲルハンス島 ゲノム トランスクリプトーム

## 1. 研究開始当初の背景

膵内分泌細胞は高度に分化した細胞群であり、終末分化とされていたが、膵島自身も複製することができることが示された。さらに、以前から膵外分泌細胞や導管から膵島新生が生じること知られる

iPS細胞は人口多能性幹細胞であり、4種類の遺伝子(Oct3, Sox2, Klf4, c-myc)を導入することによって多分化能を獲得する。これらの内、ラットとマウスのPOU-ホメオドメイン転写因子Oct3は胚細胞からクローニングされ、成熟した分化細胞では発現しないと考えられてきた。しかし驚く事に、申請者は、約20年前にげっ歯類とは独立して、ヒト膵島からOct3 cDNAをクローニングしていた(Nucleic Acids Res 1992)。発現レベルは高くないが、成熟したヒト膵島細胞においてもOct3は発現している。更に、インスリンノーマでは、Oct3のmRNA発現レベルは亢進することも報告した。

申請者は、家族性若年糖尿病(MODY)の新規原因遺伝子を探索する過程で、膵島特異的な転写因子であるPOU-ホメオドメイン分子に着目していた。後にMODY3,5の原因遺伝子と判明したHNF-1 $\beta$ は同ドメインを有する。MODY転写因子の欠失マウスでは、膵内分泌細胞の発生・分化の障害が認められる。一方、HNF-1 $\beta$ 異常を有する症例では、膵臓の形成不全が見られるので、これらの転写因子経路は発生と分化に関係すると推定される。

申請者は、転写標的の下流分子を網羅するために、世界初の膵島トランスクリプトームのデータベースを形成するに至った。興味深いことに、iPS遺伝子である他の3遺伝子も膵細胞で発現していることが判明した。従って、膵島は4遺伝子を発現しているが、iPS化せずに終末分化を維持している。

以上から申請者は、膵島細胞は分化・増殖の開始準備は完了した状態を維持しており、何らかの誘導条件が加わると再生や複製が起こると考えている。

## 2. 研究の目的

申請者は、高度分化の状態でも、種々の誘導因子が働けば細胞変換能が惹起される、という仮説を立てた。MODY転写因子など多くの転写因子はその過程で発現が誘導され、重要な働きを担う。同因子のコード遺伝子異常は新たな糖尿病遺伝子となる可能性があると共に、創薬対象にもなる。

本仮説を検証するための第一歩として、膵島トランスクリプトームのDNAシーズを活用し、膵内分泌細胞への変換因子あるいは関連因子の探索スクリーニングを試みる。

また、膵島の発生・分化に関連するMODY関連の転写因子やその周辺因子(Oct3関連分子など)に注目して、膵島特異的機能の獲得に関する解析を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 発生初期に発現する膵島遺伝子の集積ラット膵島EST (Expressed sequence tag) の標識cRNAプローブを用いて大規模in situ hybridization (ISH)を行うシステムを開発した。5,066個のESTクローンとラット膵切片を用いて検討し、膵島に特異的に発現する111遺伝子を既にプールした。これらのクローンを用いて胎生初期に発現する遺伝子群を同様にISH解析して網羅する。

## (2) 転写因子LRH-1の機能解析

LRH-1は発生初期において膵島でOct3と共に発現していると報告される。LRH-1はオープン受容体SHPと相互制御し、SHPはMODY転写ネットワークを負に制御している。そこで、これらの核内因子の周辺分子は重要な候補であるので、先ずLRH-1とSHPの欠失マウスを作成して表現型を解析する。LRH-1のホモ欠失は胎生致死であったので、本研究ではヘテロ欠失を解析する。一方、SHP欠失はホモ接合でも生存したので、ホモ接合マウスを使用する。

MODY転写因子の大半は肝臓でも発現しているので(一連のHNF転写因子)、解析が比較的容易である肝臓をモデルとして解析して、その成果を膵島解析に応用する戦略も同時に試みる。

## (3) ラット膵島と細胞株のトランスクリプトームの比較解析

ラット膵細胞株R1Nm5Fはインスリン分泌能を欠失し、発生初期の表現型を呈する。そこで、分化した正常膵島から調製した20,000個のESTとR1Nm5F細胞から調製した20,000個のESTの出現頻度を比較して、発生・分化に関連する候補分子を網羅する。

## (4) AR42J細胞を用いたMODY転写因子の選別スクリーニング

AR42J細胞は、デキサメサゾン負荷で内分泌細胞に、アクチビン/ベータセルリン負荷でHNF6, ngn3, Pax4の発現を介して内分泌能を獲得し、更にインスリン分泌細胞へと分化する。その過程で、一連のMODY転写因子の内発現が誘導される分子を選別する。共役因子であるSHPとLRH-1の発現レベルも検討する。

## 4. 研究成果

(1) LRH-1の欠失マウスを作成したが、ホモ欠失は胎生致死であったので、本研究ではヘテロ欠失動物を解析した。耐糖能は正常であり、インスリン分泌能にも異常は認めなかった。膵島組織にも異常を認めなかったため、膵島の発生・分化には他の共役因子の関与が必須であると考えられた。

しかし、興味深いことに成長と共に体重増加が認められ、特に高脂肪食でその傾向は顕著であった。脂質代謝、基礎代謝、食欲等においては異常を認めなかったため、その背景

は不明である。インスリン分泌経路において、体重に係る経路も重複することは大変興味深い結果であった。

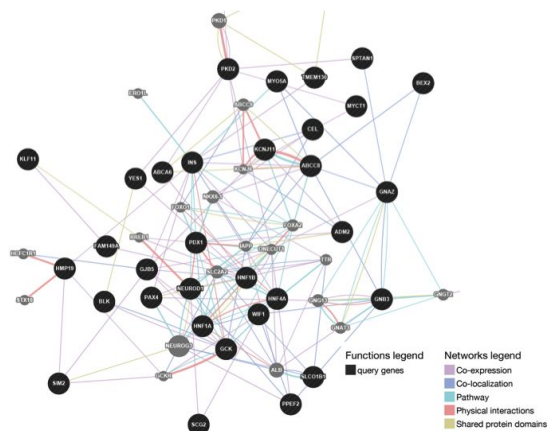
SHP 欠失動物はホモ欠失でも生存したので、同マウスを解析したが、同じく膵島組織の発達には異常を認めなかった。しかし、興味深いことに、ヒトで見られた出生時過体重の表現型や耐糖能異常は見られなかった。このことは、これらの代謝異常の成因には種差が存在することが示唆された。

(2) 外分泌腫瘍由来の AR42J 細胞をアクチビン/ベータセルリンで内分泌細胞に分化誘導したところ、膵島に特徴的な ngn3, PAX4 と共に、MODY 転写因子である HNF-4 (MODY1), -1 (MODY5), IPF1 (MODY4), Beta2/NeuroD (MODY6) が一緒に、あるいは続いて発現誘導された。HNF-1 (MODY3) については、関連性のある発現誘導は見られなかった。従って、これら選出された MODY 転写因子を中心にしてネットワーク解析を試みるのが効率的と考えられた。

(3) 解析シーズを得るために、ラット膵島 EST をプローブとして大規模 ISH を以前に実施した。その結果、発現が膵島特異的である 111 遺伝子が得られ、これらを後述の MODY 分子ネットワーク解析に投入した。胎生 15 日の胎児膵の ISH スクリーニング結果も採用した。

(4) 更に、インスリン分泌能を欠失した胎生期の性格を有する RINm5F と正常膵島の発現プロフィールを比較して 14 遺伝子を獲得し、同じく MODY 分子ネットワーク解析に投入した。

(5) 共発現、機能構造、分子連関、機能経路などに関する種々のアルゴリズムを駆使した結果 (GeneMANIA program; Pathway Commons, BioGrid, GEO, InterPro)、最終的に、11 遺伝子 (PKD2, TMEM130, SPTAM1, MYCT1, BEX2, GNAZ, ADM2, WIF1, GNB3, FAML149A, HMP19) が有力な近隣分子として獲得された (下図)。これらの分子は、内分泌能の獲得に際して誘導される分子群であるが、逆に、これらの発現増強による内分泌能への変換も求められるが、それは今後の研究課題である。



## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 14 件)

(英文原著)

Hattori T, [Iizuka K](#), [Horikawa Y](#), & [Takeda J](#).

LRH-1 heterozygous knock-out mice are prone to mild obesity.

Endocr. J. 61: 471-480, 2014. 査読有り

[Horikawa Y](#), Enya M, Fushimi N, & [Takeda J](#).

Screening of diabetes of youth for hepatocyte nuclear factor 1 mutations: clinical phenotype of HNF1 -related maturity-onset diabetes of the young and HNF1 -related maturity-onset diabetes of the young in Japanese.

Diabetic Med. 31: 721-727, 2014.

doi: 10.1111/dme.12416. 査読有り

Enya M, [Horikawa Y](#), [Iizuka K](#), & [Takeda J](#).

Association of genetic variants of the incretin-related genes with quantitative traits and occurrence of type 2 diabetes in Japanese.

Mol. Genet. Metab. Rep. 1: 350-361, 2014.

査読有り

Oba S, Szuki E, Yamamoto M, [Horikawa Y](#), Nagata C, & [Takeda J](#).

Active and passive exposure to tobacco smoke in relation to insulin sensitivity and pancreatic cell function in Japanese.

Diabetes Metab. 41: 160-167, 2014.

doi: 10.1016/j.diabet.2014.09.002. 査読有り

Daido H, [Horikawa Y](#), & [Takeda J](#).

The effects of pitavastatin on glucose metabolism in patients with type diabetes with hypercholesterolemia.

Diabetes Res. Clin. Prac. 106: 531-537, 2014.

doi: 10.1016/j.diabres.2014.09.048. 査読有り

[Iizuka K](#), Niwa H, Takahashi Y, & [Takeda J](#).

Liraglutide normalized glucose tolerance and the response of insulin to glucose in a non-obese patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus.

Diabetology Int. 5: 254-259, 2014. 査読有り

Nishimura H, [Iizuka K](#), & [Takeda J](#).

Protamine-containing insulin but not analog insulin and duration of insulin use are risk factors for the production of insulin auto antibodies in insulin-treated patients with diabetes mellitus. *Endocr. J.* 61: 635-640, 2014. 査読有り

飯塚勝美、武田純  
グルカゴン受容体とグルコースによる発現調節 - 転写因子 ChREBP を介した経路  
*生体の科学* 64: 406-407, 2014. 査読無し

Mune T, Suwa T, Morita H, Isomura Y, Takada N, Yamamoto Y, Hayashi M, Yamakita M, Sasaki A, Takeda N, Takeda J, White PC, & Kaku K. Longer HSD11B2 Ca-repeat in impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Endocr. J.* 60: 671-678, 2013. 査読有り

Iizuka K, Wu W, Horikawa Y, Saito M, & Takeda J.  
Feedback looping between ChREBP and PPAR in the regulation of lipid metabolism in brown adipose tissue. *Endocr. J.* 60: 1145-1153, 2013. 査読有り

Iizuka K, Wu W, Horikawa Y, & Takeda J.  
Role of glucose-6-phosphate and xylulose-5-phosphate in the regulation of glucose-stimulated gene expression in the pancreatic cell line, INS-1E. *Endocr. J.* 60: 473-482, 2013. 査読有り

Iizuka K, Tomita R, Horikawa Y, & Takeda J.  
Normalization of fasting hyperglycemia is beneficial for successful introduction of small amount of the GLP-1 analog liraglutide in obese patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetology Int.* 3: 61-64, 2013. 査読有り

Yoshida S, Yoshida M, Yamamoto M, & Takeda J.  
Optical screening of diabetes mellitus using non-invasive Fourier-transform spectroscopy technique for human lip. *J. Pharmaceut. Biomed.* 76: 169-176, 2013. 査読有り

Mune T, Morita H, Takeda N, Yamamoto Y, Isomura Y, Suwa T, Takeda J, White PC, & Kaku K.  
HSD11B2 CA-repeat and sodium balance. *Hypertens. Res.* 36: 614-619, 2013. 査読有り

[学会発表](計8件)

(国内学会)

平手祐子、橋本健一、塩谷真由美、堀川幸男、武田純  
HNF-1 の標的分子である DPP-4 と SGLT2 の阻害が有効であった MODY5 の 1 家系  
第 112 回内科学会総会、みやこメッセ、京都府、京都市、2015.

武田純  
インスリン分泌不全に関連する体質の分子遺伝学的研究  
第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会、海峡メッセ下関、山口県、下関市、2015.

服部泰輔、飯塚勝美、堀川幸男、武田純  
肥満合併症における LRH-1 の役割 - LRH-1 ヘテロノックアウトマウスを用いた検討  
第 87 回日本内分泌学会、福岡国際会議場、福岡県、福岡市、2014.

服部泰輔、飯塚勝美、堀川幸男、武田純  
高脂肪食負荷 LRH-1 ヘテロノックアウトマウスの行動学的解析  
第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、大阪国際会議場、大阪府、大阪市、2014.

塩谷真由美、堀川幸男、横山恵子、川田純子、土田宏美、廣田卓男、諏訪哲也、武田純  
BLM 遺伝子のエクソン 1 欠損と MODY の関係について  
第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、大阪国際会議場、大阪府、大阪市、2014.

飯塚勝美、土田宏美、ウ・ウデレフ、丹羽啓之、堀川幸男、武田純  
インスリン分泌不全状態におけるグルコース活性化転写因子 ChREBP の糖および脂質代謝に対する検討  
第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、大阪国際会議場、大阪府、大阪市、2014.  
0

ウ・ウデレフ、飯塚勝美、土田宏美、堀川幸男、武田純  
糖尿病モデルマウスにおける血中 osteonectin 濃度の検討  
第 87 回日本内分泌学会総会、福岡国際会議場、福岡県、福岡市、2014.

(海外学会)

Iizuka K, Wu W, Niwa H, Tsuchida H, Dokuko K, Horikawa Y, Takeda J.  
Deletion of ChREBP gene in mice did not improve intolerance in insulin-deficient state. 74<sup>th</sup> American Diabetes Association Annual Meeting, San Francisco, 米国、2014.

[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 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

武田 純 (TAKEDA JUN)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40270855

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者

堀川 幸男 (HORIKAWA YUKIO)

岐阜大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10323370

飯塚 勝美 (IIDUKA KATSUMI)

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40431712

### (4) 研究協力者 なし