

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860220

研究課題名(和文) 膵細胞の再生増殖におけるヒトREGファミリー遺伝子の役割の解明

研究課題名(英文) Roles of human REG family genes in pancreatic beta cell regeneration

研究代表者

山内 晶世 (YAMAUCHI, AKIYO)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：70361110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：増殖因子遺伝子群REGファミリーは、ヒトでは5つ存在し、膵細胞の再生・増殖にも関与すると考えられていたが、どの遺伝子が重要であるかは不明であった。本研究では、5つのREGファミリー遺伝子のうち、REG1遺伝子とREG1遺伝子が炎症条件下でJAK/STAT経路を介して発現することを明らかにした。発現誘導におけるプロモーターの一塩基多型(SNPs)の影響を調べた結果、REG1遺伝子の-563G/A、-10T/CおよびREG1遺伝子の-231G/A、-165A/Cについて、マイナーアレルで転写活性が有意に低下することを見出した。

研究成果の概要(英文)：REG family genes are considered to be involved in pancreatic cell regeneration. In human, 5 REG genes were isolated. However, which human REG gene is expressed in cells during inflammation is unclear. In this study, it was revealed that among 5 human REG genes, REG1 and REG1 were induced under an inflammatory condition through JAK/STAT pathway. The effects of the -563G/A and -10T/C polymorphisms in the REG1 promoter as well as the -231G/A and -165A/C polymorphisms in the REG1 promoter on the induction were examined. As a result, in cells transfected with the constructs containing the minor allele, the fold increases of promoter activity by inflammation were significantly reduced.

研究分野：医歯薬学

キーワード：再生増殖因子

1. 研究開始当初の背景

Reg (*Regenerating gene*) 遺伝子は、ラット膵β細胞が傷害を受けたときに発現し増殖因子として機能する遺伝子として発見された。ヒトには5種類の *REG* 遺伝子 (*REG Ia*, *REG Ib*, *REG III*, *HIP/PAP*, *REG IV*) が存在する。*REG Ia* タンパク質はマウスやラットの膵β細胞の増殖を促進することが報告されている。しかし、ヒト由来のグルコース応答性をもつインスリン産生細胞株が存在しなかったため、*REG Ia* 遺伝子をはじめ、*REG* ファミリー遺伝子のヒト膵β細胞における発現や機能は明らかではなかった。研究代表者は最近樹立されたヒト膵β細胞由来の培養細胞株 1.1B4 細胞において、5つの *REG* ファミリー遺伝子のうち、*REG Ia* 遺伝子の転写活性が特に高く、その転写活性は IL-6+グルココルチコイド刺激によって著しく増大することを見いだした。しかし、その転写誘導機構は明らかではなかった。また、他の *REG* ファミリー遺伝子の膵β細胞の再生・増殖における役割は不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、5つのヒト *REG* ファミリー遺伝子のうち、どれが膵β細胞の再生増殖に重要であるかを明らかにすることである。さらに、膵β細胞に発現して機能する *REG* 遺伝子について、発現機構、遺伝子多型と発現との関連の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) *REG* ファミリー遺伝子の発現が、細胞がどのような刺激を受けたときに、どんな機構で誘導されるかを、レポーターアッセイ、ゲルシフトアッセイ、クロマチン免疫沈降によって解析する。

(2) 膵β細胞の再生・増殖に関与すると考えられる *REG* 遺伝子について、遺伝子多型が発現に及ぼす影響を明らかにする。

4. 研究成果

(1) ヒト膵β細胞の培養細胞株 1.1B4 細胞において、*REG Ia* 遺伝子が炎症性サイトカインの IL-6 と抗炎症ホルモンのグルココルチコイド (デキサメサゾン, Dx) の同時刺激によって転写誘導される機構を解析した。レポーターアッセイとゲルシフトアッセイにより JAK/STAT 経路の関与が示唆されたので、クロマチン免疫沈降を行い、IL-6+Dx 刺激によって転写因子 STAT3 の *REG Ia* プロモーターへの結合が増加することを明らかにした。さらに、STAT3 に対する siRNA を 1.1B4 細胞に導入すると、IL-6+Dx による *REG Ia* 遺伝子の発現誘導が消失した。

また、IL-6+Dx 以外に *REG Ia* 遺伝子転写を誘導する物質を探索した。これまでに膵β細胞に傷害を与えることが報告されている

種々の炎症性サイトカインや酸化ストレス誘導物質などを検討したが、IL-6+Dx による転写増幅率に匹敵する転写誘導活性をもつものはなかった。

REG Ia 遺伝子以外の *REG* ファミリー遺伝子についても種々の炎症性サイトカインや酸化ストレスが転写活性に与える影響を検討した。その結果、IL-6+Dx によって *REG Ib*, *HIP/PAP* 遺伝子の転写活性が有意に増大したが、増幅率は *REG Ia* 遺伝子と比較して小さかった。IL-6+Dx 刺激によって、*REG Ib* 遺伝子では mRNA 量も有意に増加したが、*HIP/PAP* 遺伝子の mRNA 量は増加しなかった。

REG Ib 遺伝子プロモーターは *REG Ia* 遺伝子プロモーターと相同性が高く、IL-6+Dx に対する応答に必須な STAT 結合配列を同様に有している。レポーターアッセイにてこの配列を変異させると IL-6+Dx による転写誘導が消失した。また JAK 阻害剤によって転写誘導は有意に阻害された。さらに、STAT3 に対する siRNA によって IL-6+Dx による発現誘導が消失した。したがって、*REG Ia* 遺伝子と同様に、*REG Ib* 遺伝子は IL-6+Dx によって JAK/STAT3 経路を介して転写誘導されることが明らかとなった。*REG Ib* タンパク質は *REG Ia* タンパク質と非常に相同性が高いため、同様に増殖因子として機能すると考えられる。これまで、高い相同性のために、各々を区別した研究例が少なく、*REG Ib* 遺伝子の膵β細胞における役割についての知見はほとんどなかったが、本研究により、炎症条件下での膵β細胞の再生には、*REG Ia* 遺伝子の他に *REG Ib* 遺伝子も寄与している可能性が示された。

(2) 炎症条件下での *REG Ia* 遺伝子および *REG Ib* 遺伝子の発現誘導効率が低いと糖尿病の発症リスクが高まる可能性が考えられる。そこで、*REG Ia* プロモーターの一塩基多型 (SNPs) の影響を調べた結果、IL-6+Dx 刺激による転写活性の増幅率は、-563G/A, -10T/C については、マイナーアレルである -563A, -10C で、メジャーアレルと比較して 20%ほど低かった (図 1a)。一方、-1166G/C, -1087T/C, -537A/C についてはアレルによる差はなかった。また、*REG Ib* 遺伝子プロモーターの SNP (-231G/A と -165A/C) については、マイナーアレルである -231A, -165C で転写活性の増幅率は 15-20%ほど低かった (図 1b)。

IL-6+Dx による *REG Ia* 遺伝子および *REG Ib* 遺伝子誘導率のアレル間の差が約 20%と小さかったので、IL-6+Dx の濃度を変えてアレルによる転写誘導の差が顕著になるように条件を最適化することを試みたが、これ以上

差が増大する条件はなかった。

そこで SNP の影響は、クロマチン構造に関わっている可能性を考え、ルシフェラーゼ遺伝子を連結した *REG 1α* 遺伝子プロモーターをクロマチンに組み込んだ安定発現株を作製して IL-6+Dx による転写誘導の差を検討した。その結果、メジャーアレルをもつプロモーターを組み込んだ細胞では IL-6+Dx によって転写が誘導されるクローンと誘導されないクローンの両方が単離された。一方、マイナーアレルである -563A, -10C をもつプロモーターを組み込んだ細胞はどれも IL-6+Dx による転写誘導が見られなかった。この結果は、炎症条件下での *REG 1α* 遺伝子発現へのこれらの SNP の関与を強く示唆するものである。

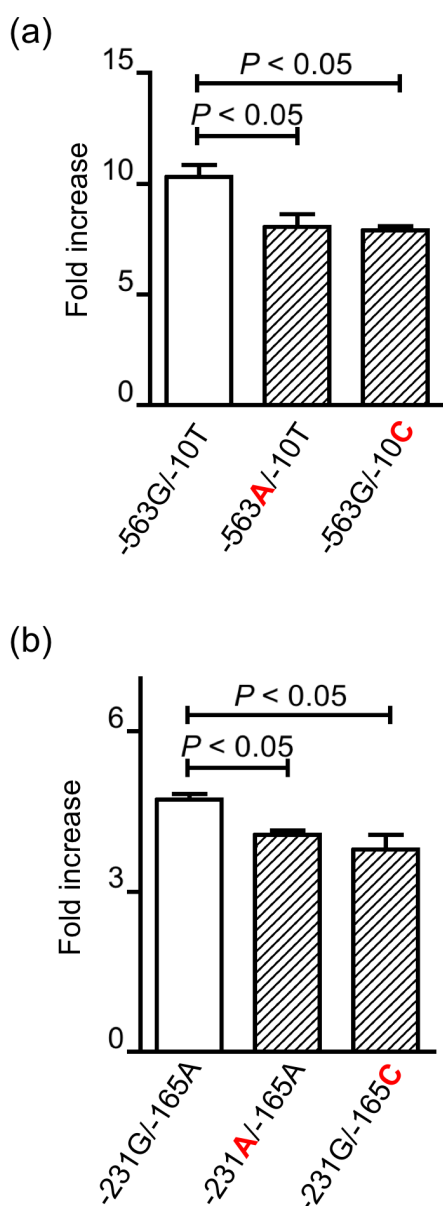


図1 IL-6+Dx による *REG* 遺伝子転写誘導における SNP の影響
(a) *REG 1α* 遺伝子, (b) *REG 1β* 遺伝子。

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 12 件)

Fujimura T, Fujimoto T, Itaya-Hironaka A, Miyaoka T, Yoshimoto K, Sakuramoto-Tsuchida S, Yamauchi A, Takeda M, Tsujinaka H, Tanaka Y, Takasawa S. Significance of interleukin-6/STAT pathway for the gene expression of *REG 1α*, a new autoantigen in Sjögren's syndrome patients, in salivary duct epithelial cells. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2016, in press, 査読有。

Yamauchi A, Itaya-Hironaka A, Sakuramoto-Tsuchida S, Takeda M, Yoshimoto K, Miyaoka T, Fujimura T, Tsujinaka H, Tsuchida C, Ota H, Takasawa S. Synergistic activations of *REG 1α* and *REG 1β* promoters by IL-6 and glucocorticoids through JAK/STAT pathway in human pancreatic β cells. *J. Diabetes Res.* **2015**, 173058. 2015, 査読有, doi: 10.1155/2015/173058.

Fujimura T, Fujimoto T, Itaya-Hironaka A, Miyaoka T, Yoshimoto K, Yamauchi A, Sakuramoto-Tsuchida S, Kondo S, Takeda M, Tsujinaka H, Azuma M, Tanaka Y, Takasawa S. Interleukin-6/STAT pathway is responsible for the induction of gene expression of *REG 1α*, a new auto-antigen in Sjögren's syndrome patients, in salivary duct epithelial cells. *Biochem. Biophys. Rep.* **2**, 69-74, 2015, 査読有, doi:10.1016/j.bbrep.2015.05.006.

Tsujinaka H, Itaya-Hironaka A, Yamauchi A, Sakuramoto-Tsuchida S, Ota H, Takeda M, Fujimura T, Takasawa S, Ogata N. Human retinal pigment epithelial cell proliferation by the combined stimulation of hydroquinone and advanced glycation end-products via up-regulation of *VEGF* gene. *Biochem. Biophys. Rep.* **2**, 123-131, 2015, 査読有, doi:10.1016/j.bbrep.2015.05.005.

Fujimoto T, Yoshimoto K, Fujimura T, Takeda M, Yamauchi A, Itaya-Hironaka A, Takasawa S. Regenerating gene protein as a novel autoantigen in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Antibodies* **4**, 409-425, 2015, 査読有, doi:10.3390/antib4040409.

Enami N, Itaya-Hironaka A, Yamauchi A, Sakuramoto-Tsuchida S, Takasawa S, Takahashi Y. The CD38 genotype (rs1800561(4693C > T): R140W) is associated with an increased risk of admission to the neonatal intensive care unit. *Early Human Dev.* **91(8)**, 467-470, 2015, 査読有, doi: 10.1016/j.earlhumdev.2015.05.002.

Murakami-Kawaguchi S, Takasawa S, Onogawa T, Nata K, Itaya-Hironaka A, Sakuramoto-Tsuchida S, Yamauchi A, Ota H, Takeda M, Kato M, Okamoto H. Expression of *Ins 1* and *Ins 2* genes in mouse fetal liver. *Cell*

Tissue Res. **355**, 303-314, 2014, 査読有, doi:10.1007/s00441-013-1741-4.

Ota H, Itaya-Hironaka A, Yamauchi A, Sakuramoto-Tsuchida S, Miyaoka T, Fujimura T, Tsujinaka H, Yoshimoto K, Nakagawara K-I, Tamaki S, Takasawa S, Kimura H. Pancreatic β cell proliferation by intermittent hypoxia via up-regulation of *Reg* family genes and *HGF* gene. *Life Sci.* **93**, 664-712. 2013, 査読有, doi:10.1016/j.lfs.2013.09.001.

Nakagawa K, Takasawa S, Nata K, Yamauchi A, Itaya-Hironaka A, Ota H, Yoshimoto K, Sakuramoto-Tsuchida S, Miyaoka T, Takeda M, Unno M, Okamoto H. Prevention of Reg I-induced β -cell apoptosis by IL-6/dexamethasone through activation of *HGF* gene regulation. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* **1833**, 2988-2995. 2013, 査読有, doi:10.1016/j.bbamer.

Masui T, Ota I, Itaya-Hironaka A, Takeda M, Kasai T, Yamauchi A, Sakuramoto-Tsuchida S, Mikami S, Yane K, Takasawa S, Hosoi H. Expression of *REG III* and prognosis in head and neck cancer. *Oncol. Rep.* **30**, 573-578, 2013, 査読有, doi: 10.3892/or.2013.2521.

Kyotani Y, Ota H, Itaya-Hironaka A, Yamauchi A, Sakuramoto-Tsuchida S, Zhao J, Ozawa K, Nagayama K, Ito S, Takasawa S, Kimura H, Uno M, Yoshizumi M. Intermittent hypoxia induces the proliferation of rat vascular smooth muscle cell with the increases in epidermal growth factor family and erbB2 receptor. *Exp. Cell Res.* **319**, 3042-3050, 2013, 査読有, doi: 10.1016/j.yexcr.2013.08.014.

Yoshimoto K, Fujimoto T, Itaya-Hironaka A, Miyaoka T, Sakuramoto-Tsuchida S, Yamauchi A, Takeda M, Kasai T, Nakagawara K, Nonomura A, Takasawa S. Involvement of autoimmunity to REG, a regeneration factor, in patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* **174**, 1-9, 2013, 査読有, doi: 10.1111/cei.12142.

〔学会発表〕(計 25 件)

(1) Ota H, Yamauchi M, Koyama N, Fujita Y, Itaya-Hironaka A, Yamauchi A, Sakuramoto-Tsuchida S, Shobatake R, Tomoda K, Yoshikawa M, Takasawa S, Kimura H. Up-regulation of selenoprotein P, and HIP/PAP in hepatocytes by cyclic intermittent hypoxia. American Thoracic Society International Conference 2016, May 13-18, 2016, San Francisco (USA).

(2) Tsujinaka H, Itaya-Hironaka A, Yamauchi A, Sakuramoto-Tsuchida S, Fujimura T, Shobatake R, Takasawa S, Ogata N. Human retinal pigment epithelial cell proliferation by the combined addition of hydroquinone and advanced glycation end-products via up-regulation of *VEGF* gene. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2016, May 1-5, 2016, Seattle

(USA).

(3) Yamauchi A, Itaya-Hironaka A, Sakuramoto-Tsuchida S, Takeda M, Yoshimoto K, Miyaoka T, Fujimura T, Tsujinaka H, Tsuchida C, Ota H, Takasawa S. Combined stimulation of IL-6 and dexamethasone activated human *REG I α* and *REG I β* gene transcription in human pancreatic β cells via the JAK/STAT signaling pathway. American Diabetes Association 75th Scientific Sessions. June 5-9, 2015, Boston (USA).

(4) Ota H, Yamauchi A, Itaya-Hironaka A, Sakuramoto-Tsuchida S, Takeda M, Yamauchi M, Koyama N, Fujita Y, Fujimura T, Tsujinaka H, Tomoda K, Yoshikawa M, Kimura H, Takasawa S. Cyclic intermittent hypoxia upregulated expression of Selenoprotein P, a diabetes-associated hepatokine. American Diabetes Association 75th Scientific Sessions. June 5-9, 2015, Boston (USA).

(5) Tsujinaka H, Itaya-Hironaka A, Yamauchi A, Sakuramoto-Tsuchida S, Shobatake R, Ota H, Fujimura T, Ogata N, Takasawa S. Advance glycation endproducts (AGE) cause age-related macular degeneration (AMD) via *VEGF* transcription. American Diabetes Association 75th Scientific Sessions. June 5-9, 2015, Boston (USA).

(6) 山内晶世, 広中安佐子, 土田澄代, 武田麻衣子, 吉本清巳, 宮岡朋子, 藤村貴則, 辻中大生, 土田親次, 太田浩世, 高沢伸, 舘 β 細胞におけるヒト *REG (Regenerating gene)* フアミリー遺伝子の炎症性刺激による発現誘導第 58 回日本糖尿病学会年次集会, 2015 年 5 月 21-24 日, 海峡メッセ下関他(下関市).

(7) Takasawa S, Itaya-Hironaka A, Yamauchi A, Sakuramoto-Tsuchida S, Ota H, Fujimura T, Tsujinaka H, Shobatake R, Tsuchida C. Nucleotide sequence responsible for translational control of proinsulin synthesis in beta cells by glucose. World Diabetes Congress 2015, Nov 30-Dec 4, 2015, Vancouver (Canada).

(8) Ota H, Itaya-Hironaka A, Yamauchi A, Sakuramoto-Tsuchida S, Fujimura T, Tsujinaka H, Tomoda K, Yoshikawa M, Kimura H, Takasawa S. Up-regulation of selenoprotein P, a diabetes-associated hepatokine, and HIP/PAP, a mitogenic factor for liver, in hepatocytes by intermittent hypoxia. 51st European Association for the Study of Diabetes, Sep 14-18, 2015, Stockholm (Sweden).

(9) Tsujinaka H, Itaya-Hironaka A, Yamauchi A, Sakuramoto-Tsuchida S, Ota H, Fujimura T, Shobatake R, Ogata N, Takasawa S. Hydroquinone-damaged human retinal pigment epithelial cell proliferation by advanced glycation end-products via up-regulation of *VEGF* gene. 51st European Association for the Study of Diabetes, Sep 14-18, 2015, Stockholm (Sweden).

(10) 山内晶世, 広中安佐子, 土田澄代, 武田麻衣子, 吉本清巳, 宮岡朋子, 藤村貴則, 辻

中大生，土田親次，太田浩世，高沢伸，赜細胞におけるヒト *REG (Regenerating gene)* 遺伝子ファミリーの発現誘導 第 37 回日本分子生物学会年会，2014 年 11 月 25-27 日，パシフィコ横浜（横浜市）。

(11) Takasawa S, Murakami-Kawaguchi S, Nata K, Itaya-Hironaka A, Sakuramoto-Tsuchida S, Yamauchi A, Ota H, Takeda M, Tsuchida C, Tsujinaka H, Fujimura T, Okamoto H. Expression of proinsulin genes in fetal liver. 50th European Association for the Study of Diabetes, Sep 15-19, 2014, Vienna (Austria).

(12) Takasawa S, Nakagawa K, Nata K, Yamauchi A, Itaya-Hironaka A, Ota H, Sakuramoto-Tsuchida S, Miyaoka T, Takeda M, Fujimura T, Tsujinaka H, Unno M, Okamoto H. Combined addition of interleukin-6 and dexamethasone prevented Reg protein-induced β cell apoptosis through activation of *HGF* gene transcription. American Diabetes Association 74th Scientific Sessions. June 13-17, 2014, San Francisco (USA).

(13) Fujimura T, Fujimoto T, Itaya-Hironaka A, Miyaoka T, Kondo S, Yoshimoto K, Sakuramoto-Tsuchida S, Yamauchi A, Tsujinaka H, Tanaka Y, Takasawa S. Interleukin-6/STAT pathway is responsible for the induction of REG $I\alpha$, a new auto-antigen in Sjögren's syndrome patients, in salivary duct epithelial cells. Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2014, June 11-14, 2014, Paris (France).

(14) Kyotani Y, Ota H, Itaya-Hironaka A, Yamauchi A, Sakuramoto-Tsuchida S, Zhao J, Nagayama K, Ozawa K, Takasawa S, Kimura H, Yoshizumi M. Sleep apnea syndrome as an emerging risk factor for type 2 diabetes and atherosclerosis: evidence and underlying mechanism. 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress, Sep 12-14, 2014, Kyoto (Japan).

(15) 山内晶世，広中安佐子，土田澄代，武田麻衣子，吉本清巳，宮岡朋子，藤村貴則，辻中大生，土田親次，太田浩世，高沢伸，赜細胞における JAK/STAT 経路を介したヒト *REG (Regenerating gene) I α* 遺伝子の転写誘導 第 86 回日本生化学会大会，2013 年 9 月 11-13 日，パシフィコ横浜（横浜市）

(16) Ota H, Itaya-Hironaka A, Yamauchi A, Sakuramoto-Tsuchida S, Takeda M, Fujimura T, Tsujinaka H, Tsuchida C, Tamaki S, Takasawa S, Kimura H. Dysfunction and proliferation of pancreatic beta cells by intermittent hypoxia. World Diabetes Congress 2013, Dec 2-6, 2013, Melbourne (Australia).

(17) Tsujinaka H, Itaya-Hironaka A, Yamauchi A, Sakuramoto-Tsuchida S, Ota H, Fujimura T, Nochioka K, Shimoyaya-Miyata K, Ogata, N, Takasawa S. Activation of cell proliferation and *VEGF* transcription by advanced glycation end-products in hydroquinone-treated human

retinal pigment epithelial cells. 49th European Association for the Study of Diabetes, Sep 23-27, 2013, Barcelona (Spain).

(18) Tsujinaka H, Itaya-Hironaka A, Yamauchi A, Sakuramoto-Tsuchida S, Ota H, Fujimura T, Nochioka K, Ogata, N, Takasawa S. Up-regulation of *VEGF* mRNA by Advanced glycation endproducts in hydroquinone-treated human retinal pigment epithelial cells. 73rd American Diabetes Association Scientific Sessions, June 21-25, 2013, Chicago (USA).

(19) Fujimura T, Fujimoto T, Itaya-Hironaka A, Miyaoka T, Yoshimoto K, Sakuramoto-Tsuchida S, Yamauchi A, Tsujinaka H, Tanaka Y, Takasawa S. Induction of REG $I\alpha$, a new auto-antigen in Sjögren's syndrome patients, in salivary duct epithelial cells by interleukin-6 and -11. Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2013, June 12-15, 2013, Madrid (Spain).

〔図書〕(計 1 件)

Takasawa S, Itaya-Hironaka A, Yamauchi A, Ota H, Takeda M, Sakuramoto-Tsuchida S, Fujimura T, Tsujinaka H. "Regulators of beta cell death and regeneration" in "Pancreatic Islet Biology", Hardikar, A.A. ed., Springer, Berlin, in press, 2016.

〔その他〕

<http://www.naramed-u.ac.jp/~bioch/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内晶世 (YAMAUCHI AKIYO)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：70361110

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：