

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460356

研究課題名(和文)膵内分泌細胞における大Maf群転写因子の機能解析

研究課題名(英文)Functional Analysis of large MAF Transcription Factors in Endocrine Pancreas

研究代表者

大石 久史(OISHI, Hisashi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30375513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、膵内分泌細胞における大Maf群転写因子の細胞における機能の類似点と相違点を明らかにした。MafA(-/-)マウスと細胞特異的MafB(-/-)マウス、MafA(-/-)MafB(+/-)マウスの3系統の比較を行なって、MafAは細胞の発生に関与しないものの機能的成熟に重要であること、逆にMafBは細胞の正常発生に重要であるものの、細胞特異的MafB(-/-)マウスは成獣において明らかな表現型を示さないことを明らかにした。

さらに治療応用を目的に、肝臓細胞に、他の細胞関連遺伝子とMafAまたはMafBを遺伝子導入したところ、MafAの方が様細胞誘導効率が優れていた。

研究成果の概要(英文)：In this study, the functional similarity and difference of large Maf transcription factors has been elucidated in endocrine pancreas. The phenotypic comparison among MafA(-/-),  $\beta$ -cell specific MafB(-/-), and MafA(-/-);MafB(+/-) mice revealed that: (1) MafA gene was important for the maturation of  $\beta$ -cell function but not for  $\beta$ -cell development, (2) conversely, MafB gene was important for the normal  $\beta$ -cell development, and  $\beta$ -cell specific MafB(-/-) mice in adult showed no obvious abnormality including fasting blood glucose levels and glucose stimulated insulin secretion.

In addition, in order to apply diabetic treatment of large Maf genes, MafA or MafB gene together with other  $\beta$ -cell related genes were transferred in to mouse liver. The result demonstrated MafA is capable to induce more effective  $\beta$ -like cell induction than MafB.

研究分野：実験動物学

キーワード：インスリン 大Maf転写因子 膵内分泌細胞 糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

大 *Maf* 転写因子群は、MAF 認識配列(MARE)に結合する b-ZIP 型転写因子である。ゲノムプロジェクトにより、マウスおよびヒトでは、*Mafa*、*Mafb*、*c-Maf*、*Nrl* の 4 遺伝子の存在が明らかとなり、膵内分泌細胞には *Mafa*、*Mafb* とごく僅かに *c-Maf* が発現する (Nishimura W, Dev Biol. 2006)。申請者らは、世界に先駆けて *Mafa* 遺伝子欠損マウスを作製し、生後 4-6 週からグルコース応答性インスリン分泌(GSIS)が低下し糖尿病を発症すること、またランゲルハンス島の構築異常を呈することを明らかにした。*Mafa* の下流で GSIS に関わる標的遺伝子として *Glut2* および *Gck* を明らかにしたものの、構築異常について、その原因および標的遺伝子の同定を行うことはできなかった。(Zhang C, Mol Cell Biol. 2005)。

一方で、*Mafb* 遺伝子は、胎生期、の両細胞に発現し、その遺伝子欠損マウスは両細胞の細胞数が減少する。生後の発現は、細胞では消失し、細胞のみに限局されるため、細胞マーカーとして広く用いられている (Artnner I et al, PNAS, 2006)。興味深いことに、*Mafa* 欠損マウスでは、本来発現のない

細胞に *Mafb* の発現が見られ(未発表)、インスリン需要が亢進する妊娠マウスでも同様に細胞に *Mafb* が発現することが報告されている (Pechhold S et al, Nat Biotechnol. 2009)。2 型糖尿病患者では、*Mafa* を含む細胞関連転写因子の機能不全が観察されており (Guo S et al, J Clin Invest. 2013)、恐らく、生体におけるインスリン需要の亢進にตอบสนองするために、代償的に細胞に *Mafb* が誘導され、インスリン転写及び分泌を活性化すると考えられる。一方で、最近発表された *Foxo1* 遺伝子欠損マウスが発症する重症糖尿病モデルでは、細胞の脱分化と細胞へのコンバージョンが起こっていること (Talchai et al, Cell. 2012)、さらにその機序の一部には、DNA メチル化の関与が考えられた (Dhawan S et al, Dev Cell. 2011)。本来 *Mafb* が細胞マーカーであることを考慮に入れると、細胞に異所性発現する *Mafb* は、減少したインスリン分泌を代償する一方で、細胞の脱分化および細胞への変換機序にも関与する可能性が示唆された。

実際、大 *Maf* 群転写因子を優性阻害(ドミナント・ネガティブ)する *Mafk* 遺伝子を細胞特異的に過剰発現させたマウスでは、ランゲルハンス島において細胞数の優位な増加が観察されており (Shimohata H, Biochem Biophys Res Commun. 2009)、この仮説を強く示唆する。

これまでの全身性 *Mafb* 遺伝子欠損マウスは、中枢性の呼吸不全で生直後に死亡するため、その意義を明らかにすることは困難であった (Moriguchi T et al, Mol Cell Biol. 2006)。したがって、細胞や細胞特異的 *Mafb* 遺

伝子欠損マウスを用いて、*in vivo* におけるこの仮説を検証することが、糖尿病のより正確な病態を理解し、治療応用するために、必要不可欠であると考えられた。

さらに、*Mafa* 遺伝子は、膵内分泌細胞を含む種々の細胞から細胞への直接変換(ダイレクト・コンバージョン)因子として報告されており、糖尿病に対する将来の細胞治療を考える上で、重要な遺伝子の一つであった (Zhou Q et al, Nature. 2008)。これまでに、*Pdx1*、*Neurod*、*Mafa* 発現アデノウイルスを作製して、マウス肝臓に遺伝子導入したところ、肝細胞からのインスリン遺伝子の発現と分泌が認められた (Katsumata et al, Plos One. 2013) が、*Mafb* 遺伝子が細胞分化により中心的な役割を担うことから、*Mafa* 遺伝子の代わりに *Mafb* 遺伝子導入の方が、より強力に様細胞誘導可能である可能性が示唆された。これまで、肝臓からの細胞誘導を、生体発光を用いて非侵襲的に繰り返し検出し、定量可能なスクリーニング系を構築しており、このスクリーニング系を用いて、簡便に、効果的な様細胞誘導能の比較が行なえるようになった。

## 2. 研究の目的

平成 26 年度からの 3 年間に、糖尿病のより詳細な病態の理解および治療に資する細胞再生への応用のために、次の 4 点を明らかにすることを目的とした。(1) *Mafa* 遺伝子欠損マウスに見られる構築異常が生じる時期を正確に明らかにし、その標的遺伝子を同定する。また、(2) 条件付き *Mafb* 遺伝子欠損マウスを様々な膵内分泌細胞特異的 Cre 発現マウスと交配することで、おのおのの細胞系譜における *Mafb* の機能を明らかにする。(3) *Mafa/Mafb* 二重欠損マウスを作製し、膵内分泌細胞における大 *Maf* 群転写因子の機能を明らかにする。最後に、(4) 大 *Maf* 転写因子群を含む細胞転写因子を *in vivo* でマウス肝臓に導入することで、グルコース応答性を有する機能的に成熟な細胞再生に挑戦する。

## 3. 研究の方法

(1) *Mafa* 遺伝子欠損マウスの解析  
*Mafa* 遺伝子欠損マウスが示すランゲルハンス島の構築異常に対して、出生 0 日、1 日、3 日、7 日、14 日、28 日と経時的にインスリン・グルカゴンの免疫染色を行なって、正確に異常を呈する時期を同定する。さらに、その時期より前の膵臓を採材して、細胞における BrdU の取り込み能、Ki67 陽性細胞数を計測して細胞増殖能と TUNEL 染色を行なって、細胞死の有無を検討する。そして、ランゲルハンス島における遺伝子発現を網羅的に解析して、構築異常に関わる *Mafa* の標的遺伝子の候補を同定する。

## (2) *Mafb* 遺伝子欠損マウスの解析

*Mafa* 遺伝子欠損マウスの解析と平行して、*Mafb* 遺伝子の機能解析を合わせて行って、膵内分泌細胞における大 *Maf* 転写因子群の機能を明らかにする。全身性の *Mafb* 遺伝子欠損マウスは、中枢神経系の呼吸中枢の異常を伴って、生後数時間で死亡するため、これまで成獣の膵内分泌細胞における機能解析は困難であった (Moriguchi T et al, Mol Cell Biol. 2006)。したがって、まず *Mafb* ヘテロマウス (+/-) の糖代謝に関わる表現型の有無を探索する。ただ、生後 *Mafb* 遺伝子の発現は細胞から消失するため、*Mafb* (+/-) マウスは異常を示さないと予想されるため、*Mafa*(-/-)*Mafb*(+/-) マウスを作製し、*Mafa*(-/-)マウスとの比較を行なう。

さらに、これまでに、*Mafb* 遺伝子が loxP 配列で挟まれた flox マウスを作製し、現在 flox/+マウスを得ている。順次、flox/flox マウスを作製し、膵内分泌細胞 (Ngn3-Cre)、

細胞 (Ins-Cre) 特異的に Cre 組み換え酵素を発現可能なマウスと交配を行う。全身性に *Mafb* 遺伝子を欠損するマウスの細胞は、胎生 18 日目において、ともに野生型の 40% 程度に減少することが報告されており、今回作製する細胞特異的 *Mafb* 欠損マウスでも、

細胞の減少が予想される。ただ、一般に細胞数の減少は、明らかな低血糖を引き起こさないため (Thorel F et al, Diabetes. 2011)、顕著なグルコース恒常性の異常は観察されないと考えられる。細胞の発生に必須な転写因子 *Arx* の発現解析を行って、*Arx* と *Mafb* の階層性を明らかにする。一方で、細胞特異的 *Mafb* 欠損マウスは、胎生 18 日目までに

細胞分化が阻害されるものの生後 *Mafa* による代償作用のために、生後数ヶ月までは、グルコース恒常性の異常を認めないと考えられる。研究期間後半では、*Mafa*・*Mafb* 二重欠損マウスを作製し、膵内分泌細胞における大 *Maf* 転写因子群の機能を明らかにする。

## (3) 細胞特異的 *Mafk* 遺伝子過剰発現マウスの解析

*Mafk* は、小 *Maf* 転写因子群であり、大 *Maf* 転写因子群と同様、MARE 配列に結合するものの転写活性ドメインを持たないために、一般に、転写を負に制御する。細胞内で *Mafk* を過剰発現した場合、大 MAF 転写因子群の MARE 配列への結合を競合阻害するために、大 MAF 群のドミナント・ネガティブ・フォームとして作用する。

2006 年、細胞特異的 *Mafk* 過剰発現マウスを作製し、GSIS 不全を示すことを明らかにした (Shimohata H et al, Biochem Biophys Res Commun. 2006)。今回、その分子メカニズムを明らかにするために、インスリン抗体、グルカゴン抗体を用いて、ランゲルハンス島のホルモン分泌細胞の免疫染色を行なう。同時に、膵臓またはランゲルハンス島のマイク

ロアレイ解析を行って、その *Mafk* の標的遺伝子の同定を行なう。

## (4) 肝臓細胞からのダイレクト・コンバージョンにおける大 *Maf* 遺伝子群の機能

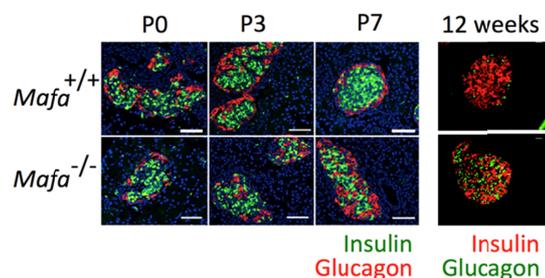
これまで *Pdx1*, *Neurod*, *Mafa* の 3 遺伝子は、肝臓細胞からインスリン分泌細胞を誘導可能な転写因子として報告されている (Kaneto H et al, J Biol Chem. 2005) が、*Mafa* と *Mafb* の比較はなされていない。これまでに確立した *in vivo* イメージングによるスクリーニング系を用いて、*Mafb* を含む種々の遺伝子の組み合わせを導入することによって、ストレプトゾトシン糖尿病に対する治療効果や、グルコース応答性の有無について検討を行なう。将来のヒト糖尿病に対する細胞治療の可能性について、基礎的知見を蓄積する。

## 4. 研究成果

### (1) *Mafa* 遺伝子欠損マウスの解析

*Mafa* 遺伝子欠損マウスの膵臓組織におけるインスリン、グルカゴンの免疫染色を行なって、ランゲルハンス島の構築異常の生じる時期を、生後 3-7 日であることを明らかにした。これまで、我々は、生後 4 週で異常を示すこと、またアメリカのグループが生後 2 週程度と報告していたが、それ以上に早いことを明らかにした (下図)。従来、生後 4 週程度まで細胞に *Mafb* が発現するため、*Mafa* 機能を代償するために、生後 2-4 週から構築異常を示すと考えられてきたが、*Mafb* の代償作用は軽微で、生後 1 週間以内に構築異常を来すことを明らかにした。

また *Mafa* 遺伝子欠損マウスのランゲルハンス島における遺伝子発現解析を行って、*Glut2*, *ZnT8*, *Granuphilin*, *Vdr*, *Pcsk1* 等、インスリン分泌に重要な機能を有する遺伝子群の発現低下に加え、*Prlr* や *Ccnd2* の発現低下を認め、細胞増殖の低下に関わる遺伝子群の発現低下を認めた。*Mafa* 遺伝子欠損マウスに観察される生後数日からの構築異常は、プロラクチンシグナル経路の異常に起因することが示唆された。

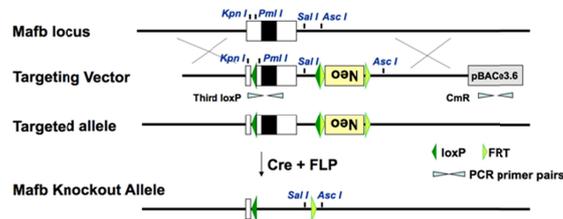


### (2) *Mafb* 遺伝子欠損マウスの解析

全身性 *Mafb* 遺伝子欠損マウスは、呼吸中枢の異常、腎足突起の形成不全等を伴って、生後数時間で死亡してしまう。*Mafb* 遺伝子ヘテロマウスは、明らかな糖代謝異常を示さなかったが、20 週齢で、*Mafa*(-/-)*Mafb*(+/-)

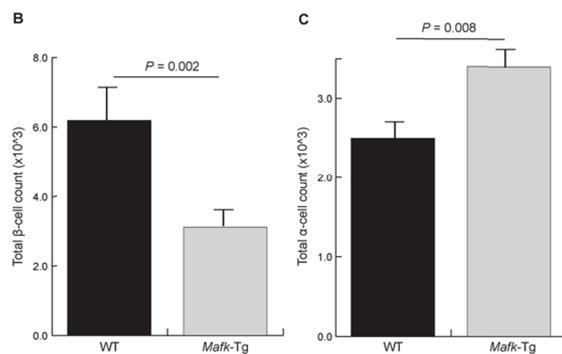
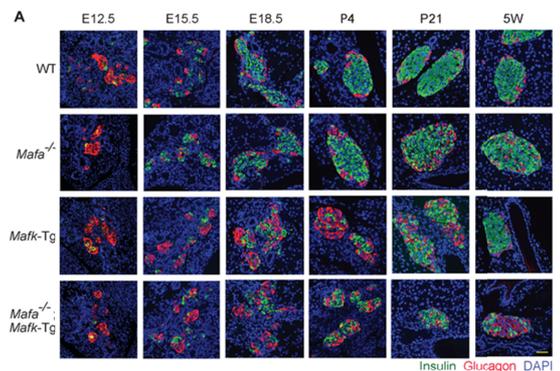
マウスは、*Mafa*(-/-)*Mafb*(+/+)マウスより絶食時高血糖を示した。その詳細な機序は明らかとなっていないが、*Mafa*(-/-)マウスや高血糖負荷時の細胞には、本来認められない*Mafb*が再発現する。この再発現は、*Mafa*機能の代償作用と考えられ、*Mafa*(-/-)*Mafb*(+/-)マウスでは、この代償作用が低減しているためと考えられる。

また flox *Mafb* マウスの作製に成功し(下図) Tie2-Cre マウスと交配して、血球特異的に *Mafb* を欠損させ、高脂肪食負荷を行なった所、*Mafb* 欠損マウスは、体重、体脂肪率が優位に増加し、血球、おそらくマクロファージに発現する *Mafb* が、脂肪組織において何らかの役割を有することを明らかにした(Tran MT et al, FEBS Open Bio 2016)。同様に、Ngn3-Cre マウス、Ins-Cre マウスと交配して、膵内分泌細胞、細胞特異的に *Mafb* を欠損させている。いずれも、一見正常に誕生し生後数週程度まで、外観上明らかな表現型を示さず成長することを明らかにした。現在、細胞機能に加え、グルカゴン分泌に関わる機能等に異常を認めないか探索を行なっている。



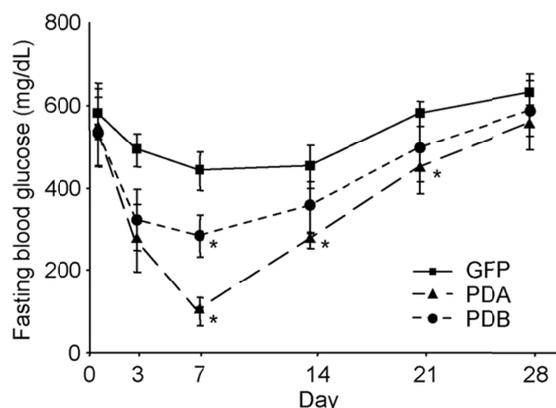
### (3) 細胞特異的 *Mafk* 遺伝子過剰発現マウスの解析

細胞特異的 *Mafk* 過剰発現マウスの詳細な表現型解析を行った。インスリン抗体、グルカゴン抗体を用いて、ランゲルハンス島のホルモン分泌細胞の免疫染色を行なった所、胎生 15.5 日では明らかな異常を示さず、18.5 日では細胞数の減少と細胞数の増加を認め、細胞が優位であった(下図)。その異常は生後 5 週程度までに、正常化することも明らかとなった。遺伝子発現解析を行った所、細胞機能や分化に関わる遺伝子の発現低下を認め、細胞分化に関わる *Pou3f4*, *Arx*, *Mafb* の発現亢進を認めた。また細胞の増殖亢進を認めたものの、細胞から細胞からの細胞変換を認めなかった。マイクロアレイ解析の結果、膵内分泌細胞分化に関わるいくつかの新規遺伝子候補を同定した。



### (4) 肝臓細胞からのダイレクト・コンバージョンにおける大 Maf 遺伝子群の機能

*Pdx1*, *Neurod*, *Mafa*, *Mafb* の発現アデノウイルスを作製し、*Pdx1*, *Neurod*, *Mafa* (PDA) の組み合わせと *Pdx1*, *Neurod*, *Mafb* (PDB) の組み合わせで尾静脈注射し、マウス肝臓に遺伝子導入した。肝臓におけるインスリン含有量、細胞関連遺伝子の発現を比較した所、いずれも PDA の方が、効率にインスリン発現を誘導可能なことを明らかにした。さらに、ストレプトゾトシン誘導糖尿病モデルに対して、PDA 遺伝子導入は、導入後 3 週間に渡り、血糖改善効果を示し、治療応用可能性があることが示唆された(下図)。



### 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 7 件)

bicistronic knock-in ins1-cre driver mice.

Hasegawa Y, Hoshino Y, Ibrahim AE, Kato K, Daitoku Y, Tanimoto Y, Ikeda Y, Oishi H, Takahashi S, Yoshiki A, Yagami K, Iseki H, Mizuno S, Sugiyama F.

Exp Anim. 2016;65(3):319-27.

doi: 10.1538/expanim.16-0016. 査読有り

-Cell-Specific Mafk Overexpression Impairs Pancreatic Endocrine Cell Development.

Abdellatif AM, Oishi H, Itagaki T, Jung Y, Shawki HH, Okita Y, Hasegawa Y, Suzuki H, El-Morsy SE, El-Sayed MA, Shoaib MB, Sugiyama F, Takahashi S.

PLoS One. 2016;11(2):e0150010.

doi: 10.1371/journal.pone.0150010. 査読有り

Role of large MAF transcription factors in the mouse endocrine pancreas.

Abdellatif AM, Ogata K, Kudo T, Xiafukaiti G, Chang YH, Katoh MC, El-Morsy SE, Oishi H, Takahashi S.

Exp Anim. 2015;64(3):305-12.

doi: 10.1538/expanim.15-0001. 査読有り

Generation and characterization of MafA-Kusabira Orange mice.

Nishimura W, Oishi H, Funahashi N, Fujiwara T, Takahashi S, Yasuda K.

Endocr J. 2015;62(1):37-51.

doi: 10.1507/endocrj.EJ14-0296. 査読有り

Generation of insulin-producing cells from the mouse liver using cell-related gene transfer including MafA and MafB.

Nagasaki H, Katsumata T, Oishi H, Tai PH, Sekiguchi Y, Koshida R, Jung Y, Kudo T, Takahashi S.

PLoS One. 2014;9(11):e113022.

doi: 10.1371/journal.pone.0113022. 査読有り

Generation and characterization of Ins1-cre-driver C57BL/6N for exclusive pancreatic beta cell-specific Cre-loxP recombination.

Hasegawa Y, Daitoku Y, Mizuno S, Tanimoto Y, Mizuno-Iijima S, Matsuo M, Kajiwara N, Ema M, Oishi H, Miwa Y, Mekada K, Yoshiki A, Takahashi S, Sugiyama F, Yagami K.

Exp Anim. 2014;63(2):183-91. 査読有り

MafA is required for postnatal proliferation of pancreatic  $\beta$ -cells.

Eto K, Nishimura W, Oishi H, Udagawa H, Kawaguchi M, Hiramoto M, Fujiwara T, Takahashi S, Yasuda K.

PLoS One. 2014;9(8):e104184.

doi: 10.1371/journal.pone.0104184. 査読有り

〔学会発表〕(計 3 件)

大石久史、逆井智貴、Jung Yunshin、周如意、三輪 佳宏、高橋 智

*in vivo* イメージングによる膵 細胞の可視化

第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会  
ビッグパレットふくしま(福島県・郡山市)  
平成 28 年 3 月 28 日-30 日

Hisashi Oishi

Large Maf transcription factors in endocrine pancreas and their role in diabetes

Gene-editing, transgenics and stem cells: Frontiers in medicine and molecular therapeutics

Trinity Biomedical Sciences Institute, Ireland (Dublin) September 8th, 2015

Hisashi Oishi, Tokio Katsumata, Yukari Sekiguchi, Pei-Han Tai, Satoru Takahashi  
Bioluminescence Imaging of beta-cells and Intrahepatic Insulin Gene Activity under Normal and Pathological Conditions.

28th International Mammalian Genome Conference

Bar Harbor Club, Bar Harbor (USA)

October 26-29, 2014

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/anatomy/embryology/>

[http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/animal.dir/animalweb/dcem/index\\_ncu.html](http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/animal.dir/animalweb/dcem/index_ncu.html)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

大石 久史 (OISHI, Hisashi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号 : 30375513

### (2)研究分担者

高橋 智 (TAKAHASHI, Satoru)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号 : 50271896