

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2014

課題番号：26893031

研究課題名(和文)膵細胞におけるSirt1の機能解析

研究課題名(英文)The roles of Sirt1 in the pancreas alpha cells

研究代表者

菊池 司(Kikuchi, Osamu)

群馬大学・生体調節研究所・研究員

研究者番号：40739009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文)：「膵細胞においてSirt1はFoxO1の活性化を介して膵細胞の分化・増殖・新生とプログルカゴン遺伝子の転写を正に調節する」という仮説の検証のため、膵細胞特異的Sirt1ノックアウトマウスの表現型解析を行った。

Sirt1遺伝子ノックアウトマウスではコントロールのマウスと比べてインスリン負荷後の低血糖からの回復が有意に障害され、グルカゴン分泌不全が示唆された。またin vitro解析では、Sirt1阻害薬がグルカゴン分泌を抑制し、活性化剤が促進することを確認した。いずれの解析結果も上記の仮説を支持するものであった。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that “Sirt1 up-regulates cell differentiation, proliferation and neogenesis, and proglucagon gene expression via activation of FoxO1 in  $\alpha$  cells”. To investigate this hypothesis, we analyzed phenotype of the  $\alpha$  cell-specific Sirt1 gene knockout (KO) mice.

The KO mice showed a significant suppression of recovery from insulin induced hypoglycemia compared with the control mice. This result suggests glucagon secretion was impaired in the KO mice. Moreover, we validated a Sirt1 inhibitor suppressed glucagon secretion and an activator enhanced it by in vitro analysis used  $\alpha$  cell line. Both results supported the hypothesis.

研究分野：糖尿病

キーワード：グルカゴン Sirt1

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病の発症の要因として膵細胞でのインスリン分泌不全および末梢臓器でのインスリン抵抗性に加えて、膵細胞におけるグルカゴン分泌異常が重要視されつつある。また、膵細胞特異的なインスリン受容体欠損マウスの解析から、細胞だけでなく細胞においてもインスリンシグナルが細胞機能の調節に重要な役割を担っていることも明らかとされている(1)。

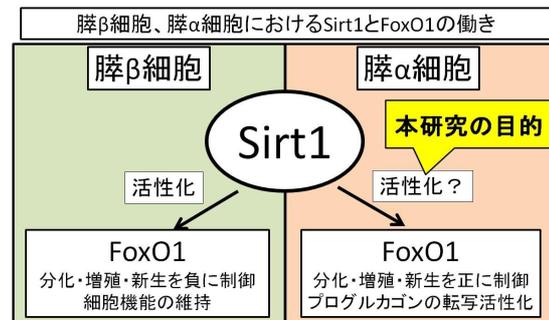
申請者の所属する研究室ではインスリンシグナル下流の転写因子である FoxO1 と、その FoxO1 を基質とする NAD<sup>+</sup>依存性の脱アセチル化酵素 Sirt1 に着目して研究を進めてきた。これまでに細胞で FoxO1 がその分化増殖を抑制的に制御し、一方でストレス条件下での細胞の機能維持にも寄与する事を明らかとした(2, 3)。また細胞において Sirt1 が、FoxO1 を脱アセチル化することで転写活性を亢進し、同時にユビキチン化も促進して蛋白安定を損なうことで、FoxO1 の機能を調節することを報告した(4)。別の研究グループからは、アデノウイルスを用いた細胞への Sirt1 の過剰発現によって、ストレプトゾトシン誘発性の細胞破壊が抑制されることも報告されている(5)。以上の報告から、Sirt1 は細胞において FoxO1 による分化・増殖・新生の抑制と細胞機能維持を正に制御していることが示唆される。

また申請者は膵臓特異的 FoxO1 過剰発現マウスを作製し、その表現型を解析した(3)。この過剰発現マウスでは細胞量の顕著な減少とそれに伴うインスリン分泌能の低下に加えて、細胞量の増加と血中グルカゴン濃度の増加が確認され、一部の個体で重度の糖尿病を発症した。別の研究グループからは、細胞の培養株を用いた検討で FoxO1 がプログルカゴンのプロモーター領域に結合して転写を促進することが報告されている(6)。これらの報告から細胞での機能とは対照

的に、細胞においては「FoxO1 は分化・増殖・新生とプログルカゴンの転写を促進する」ことが示唆される。一方、細胞での解析から細胞においても Sirt1 の FoxO1 を介した機能が予想されるが、細胞における Sirt1 の働きについては未だ報告が無い。

### 2. 研究の目的

膵臓内で Sirt1 の発現は細胞で最も顕著に確認されるが(7) 上述の通り細胞における Sirt1 の機能に関しては報告がまったく無い。一方で細胞において Sirt1 による調節を受ける FoxO1 の働きは申請者や他の研究グループの報告から一部が明らかとされている。そこで本研究ではまず第一に、細胞特異的 Sirt1 遺伝子改変マウスの表現型解析を通して、「Sirt1 は FoxO1 の活性化を介して細胞の分化・増殖・新生とプログルカゴン遺伝子転写を正に制御する」という仮説(下図)を検証する。



### 3. 研究の方法

#### (1) in vivo 解析

細胞特異的 Sirt1 ノックアウトマウスの表現型解析をすることで細胞における Sirt1 の生理的機能を検討した。遺伝子改変マウスは Glucagon-cre マウス(ジュネーブ大学、Herrela 教授よりの供与)と Sirt1-flox マウス(ハーバード大学、Alt 教授からの供与)の交配によって作製した。表現型解析には体重および血糖値の経時的測定と、8 週齢のマウスに対する糖負荷試験およびインスリン負荷試験を行った。

## (2) in vitro 解析

細胞株の一つ InR1G 細胞を用いて、Sirt1 阻害薬と活性化剤のグルカゴン分泌への効果を検証した。

## 4. 研究成果

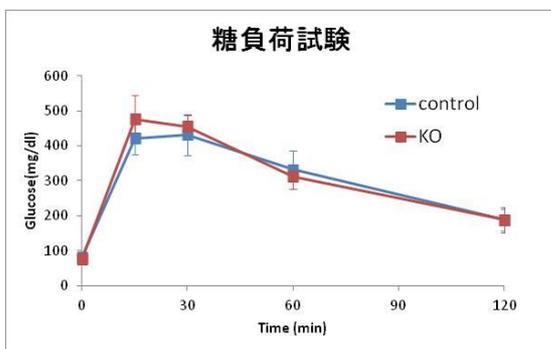
### (1) in vivo 解析

#### 体重および血糖値

Sirt1 KO マウスとコントロールマウスの間で体重に変化は見られなかった。また、随時及び空腹時の血糖値にも差は見られなかった。

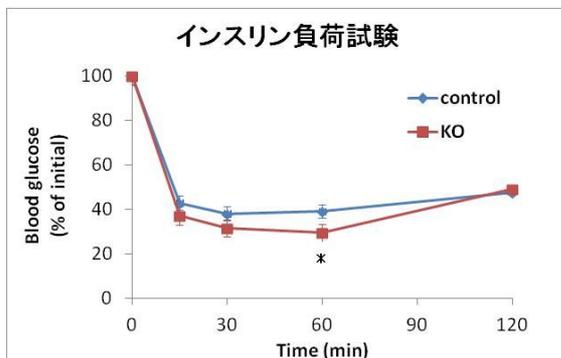
#### 糖負荷試験

糖負荷試験の結果も、Sirt1 KO マウスとコントロールマウスに差は認められなかった (下図)。



#### インスリン負荷試験

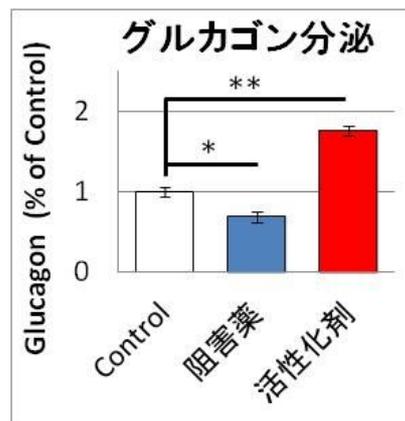
Sirt1 KO マウスではコントロールのマウスと比べてインスリン負荷後の血糖値の回復が有意に障害され (下図)、グルカゴン分泌不全が示唆された。



## (2) in vitro 解析

InR1G 細胞を用いた検討の結果、Sirt1 阻

害薬がグルカゴン分泌を抑制し、活性化剤が促進することが確認された (下図)。これは KO マウスでみられたグルカゴン分泌不全を示唆するデータとも合致している。



## (3) 総括

in vivo 解析と in vitro 解析のいずれの結果も、「Sirt1 は FoxO1 の活性化を介して 細胞の分化・増殖・新生とプログルカゴン遺伝子転写を正に制御する」という仮説を示唆するものであった。

### < 引用文献 >

- (1) Kawamori D et al. Cell Metab 2009 Apr;9(4):350-61
- (2) Kobayashi M et al. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2012 Mar;302(5):E603-13
- (3) Kikuchi O et al. PLoS ONE 2012 ;7(2): e32249
- (4) Kitamura T et al. Cell Metab 2005 Sep;2(3):153-63
- (5) Tang MM et al. Mol Ther. 2011 Jan;19(1):60-6
- (6) McKinnon et al. J Biol Chem 2006 Dec 22;281(51):39358-69
- (7) Moynihan et al. Cell Metab 2005 Aug;2(2):105-17

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

菊池 司 (Kikuchi, Osamu)

群馬大学・生体調節研究所・研究員

研究者番号：40739009