

課題番号 : 25指110
研究課題名 : 膵β細胞の量・機能を制御する新規メカニズムの解明
主任研究者名 : 西村 渉
分担研究者名 : 西村 渉

キーワード : 膵β細胞、糖尿病、転写因子、分化、インスリン
研究成果 : 膵β細胞障害における細胞分化状態の解析

インスリンプロモーターの活性化に重要な転写因子 MafA と、同じ Maf ファミリーの MafB は、成体の膵臓ではそれぞれβ細胞とα細胞に発現が限局している。発生過程では、膵β前駆細胞に MafB が発現し、インスリンの発現誘導に関与する。マウスならびにヒトの2型糖尿病のβ細胞では、MafA の発現は他の転写因子に先行して低下する事が知られている。しかし、β細胞における MafA の機能の詳細は不明である。そこで MafA KO マウスを解析した。MafA KO マウス膵臓は、生直後には正常であるが、生後にβ細胞におけるインスリンの発現が徐々に減弱/消失し、膵島内に膵ホルモン陰性の細胞が出現した。しかし、それらの細胞における内分泌細胞マーカーの発現は維持されていた。電顕では、β細胞にインスリン顆粒のない小胞 (empty granule) を多数認めた。細胞系譜追跡による解析では、MafA KO マウスの4週齢のβ細胞の多くでは、12週齢でインスリンの発現が減弱/消失し、またその一部にはグルカゴンを発現するものが存在した。7週齢の MafA KO マウス膵島の遺伝子発現解析では、β細胞機能に重要な分子や Dnmt1、3b の発現低下と共に、胎生期の分化過程で一過性に発現が増強する MafB などの転写因子の発現再増強が認められた。TUNEL アッセイでは、β細胞のアポトーシスは極めて稀であった。一方、MafA の発現が低下している糖尿病モデルマウスの膵島においても、細胞系譜追跡実験では同様の結果が認められ、また、インスリンなどβ細胞機能に重要な分子の発現低下と共に、グルカゴン、MafB、Ngn3 発現の増強が認められた。

高グルコース濃度で長期培養したβ細胞株INS-1細胞を解析した。このINS-1細胞では、インスリン、Pdx1のプロモーター活性の低下と、グルカゴン、MafBのプロモーター活性の増強が認められた。また、MafAとインスリンの発現低下、MafBなど分化過程のβ前駆細胞で認められる転写因子の発現再増強が認められた。この高グルコース濃度で長期培養したINS-1細胞における、MafBプロモーターのメチル化を解析したところ、転写開始点から-3,000bp上流までの8つのCpGアイランドのうちの1つの領域 (-2058~-1835) の、-1898から-1860の6つのCpGサイトと、-2058の1つのCpGサイトで脱メチル化を認めた。この6つのCpGサイトは、ヒト、マウス、ラット間で保存されていた。この領域の脱メチル化が、プロモーター活性に与える影響について、メチル化レポーターアッセイにより解析した。対照として解析したインスリン2、Glut2の各プロモーターでは、メチル化/非メチル化でプロモーター活性の差はほとんど認められなかったが、上記の領域のMafBプロモーターでは、非メチル化プロモーターの活性はメチル化プロモーターの約2倍であり、この領域の脱メチル化がプロモーター活性の増強に関与する事が明らかになった。

以上より、MafA は成熟β細胞の恒常性維持に重要であり、その発現低下がβ細胞の脱分化につながると考えられた。MafA の発現低下はβ細胞におけるインスリンの発現低下に直結し、MafA KO マウス膵島には、インスリンの発現が減弱/消失した“empty β-cell”が出現していた。遺伝子発現解析などの結果より、これらの細胞は、膵内分泌細胞の形質をある程度保っているものの、転写因子の発現パターンからは脱分化している事が示唆され、それには Dnmt の発現低下と、MafB のプロモーターの特定部位の脱メチル化が関与している可能性が示唆された。また、これら脱分化したβ細胞の状態を改善することが、機能改善につながる可能性が示唆された。

Subject No. : 25-110

Title : Elucidation of novel mechanism regulating mass and function of pancreatic β -cells

Researchers : Wataru Nishimura

Key word : pancreatic β -cells, diabetes, transcription factor, differentiation, insulin

Abstract :

(1) Analysis of β -cell dysfunction in diabetes

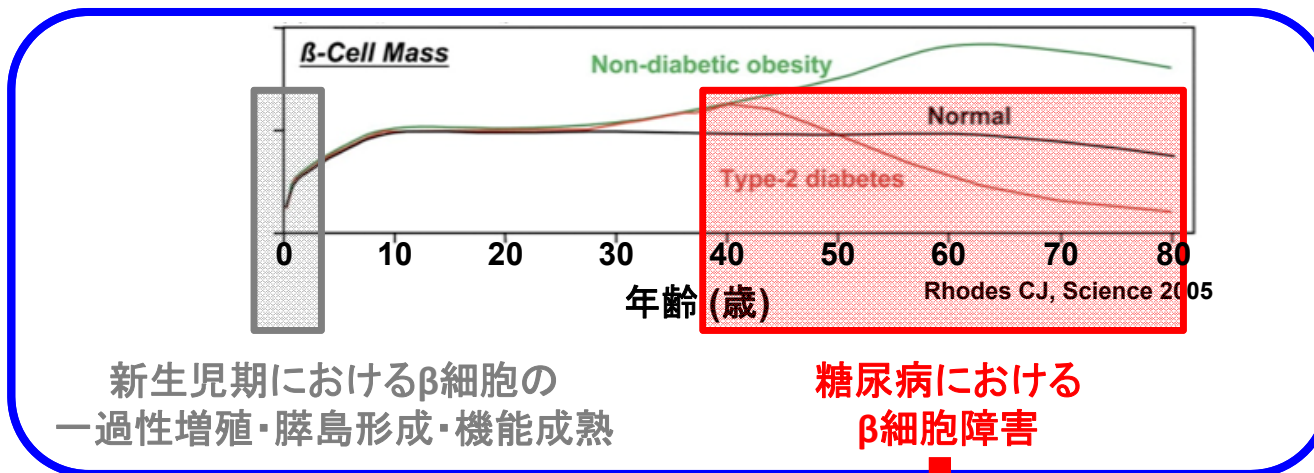
The plasticity of adult somatic cells allows their conversion to different cell types following extrinsic stimulation or the ectopic expression of transcription factors. However, the mechanisms involved in this process and its relevance to disease remain elusive. The proclivity of committed cells to de-differentiate is inversely correlated with their maturity, suggesting that maturation factors such as MafA, a mature pancreatic β -cell marker, may be involved in cell plasticity. Thus, lineage tracing analysis of β -cells were performed in MafA knockout (KO) mice and diabetes model mice, in which the expression of MafA was reduced in most β -cells. The loss of MafA causes a reduced β -cell/ α -cell ratio in pancreatic islets without elevation of blood glucose to diabetic levels. The conversion of β -cells to glucagon-expressing cells with reduced/lost expression of insulin was observed in MafA KO mice. These islets expressed factors that are normally transiently expressed in endocrine progenitors, such as MafB, but were still committed to endocrine cell lineage. The compromised β -cells in diabetes model mice underwent similar de-differentiation with expression of MafB. In β -cell lines with late-passage numbers and extremely low expression of MafA and insulin, the MafB promoter was partially demethylated, which allowed increased promoter activity and mRNA expression of MafB. These results suggested that the maturation factor MafA is critical for the homeostasis of mature β -cells, and regulates cell plasticity. The loss of MafA in β -cells leads to a deeper loss of cell identity, which is implicated in the pathology of diabetes.

(2) Mechanism regulating postnatal proliferation of β -cells

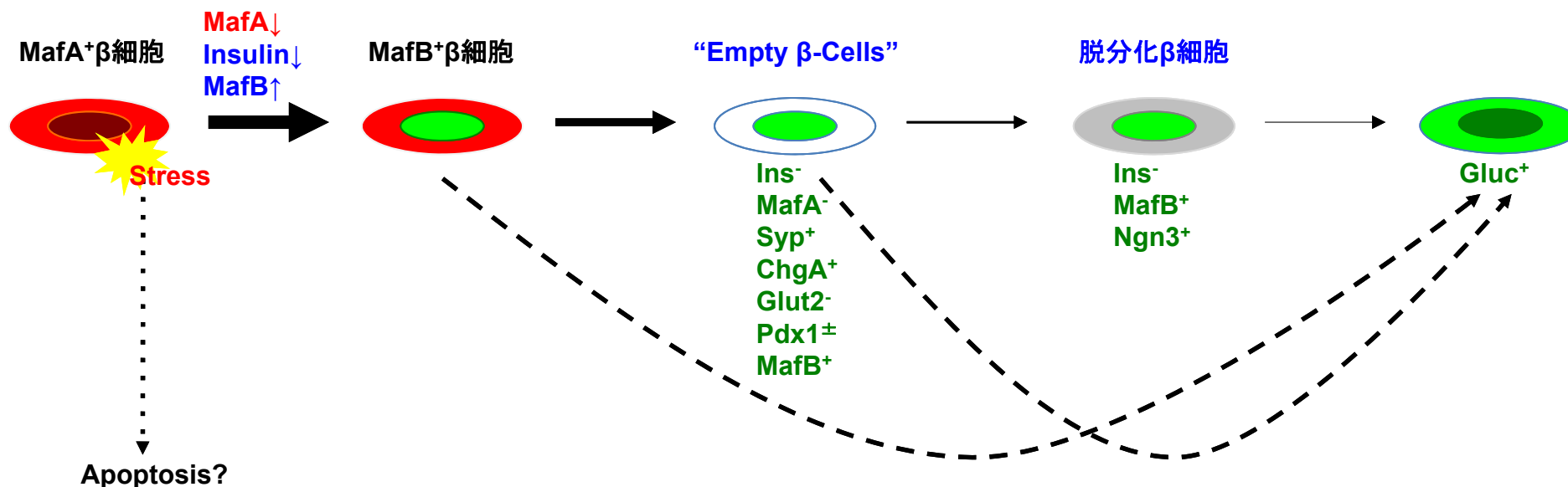
The postnatal proliferation and maturation of insulin-secreting pancreatic β -cells are critical for glucose metabolism and disease development in adults. Elucidation of the molecular mechanisms underlying these events will be beneficial to direct the differentiation of stem cells into functional β -cells. Maturation of β -cells is accompanied by increased expression of MafA, an insulin gene transcription factor. Transcriptome analysis of MafA KO islets revealed MafA is required for the expression of several molecules critical for β -cell function, including Glut2, ZnT8, Granuphilin, Vdr, Pcsk1 and Urocortin 3, as well as Prolactin receptor (Prlr) and its downstream target Cyclin D2 (Cnd2). Inhibition of MafA expression in mouse islets or β -cell lines resulted in reduced expression of Prlr and Cnd2, and MafA transactivated the Prlr promoter. Stimulation of β -cells by prolactin resulted in the phosphorylation and translocation of Stat5B and an increased nuclear pool of Cnd2 via Prlr and Jak2. Consistent with these results, the loss of MafA resulted in impaired proliferation of β -cells at 4 weeks of age. These results suggest that MafA regulates the postnatal proliferation of β -cells via prolactin signaling.

Researchers には、分担研究者を記載する。

(1) 糖尿病における膵β細胞障害メカニズムの解明

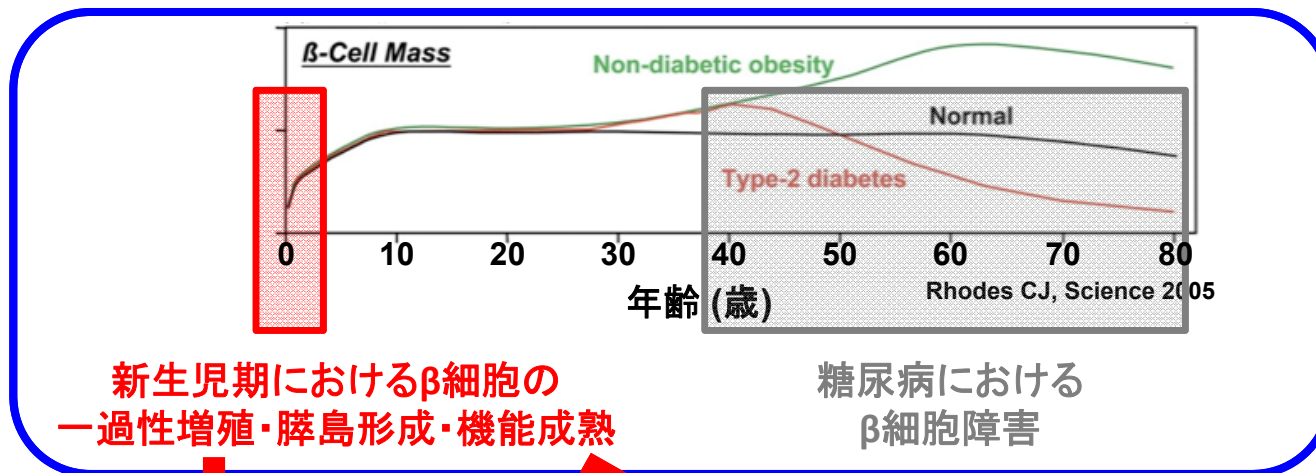


糖尿病における膵β細胞の運命の解析



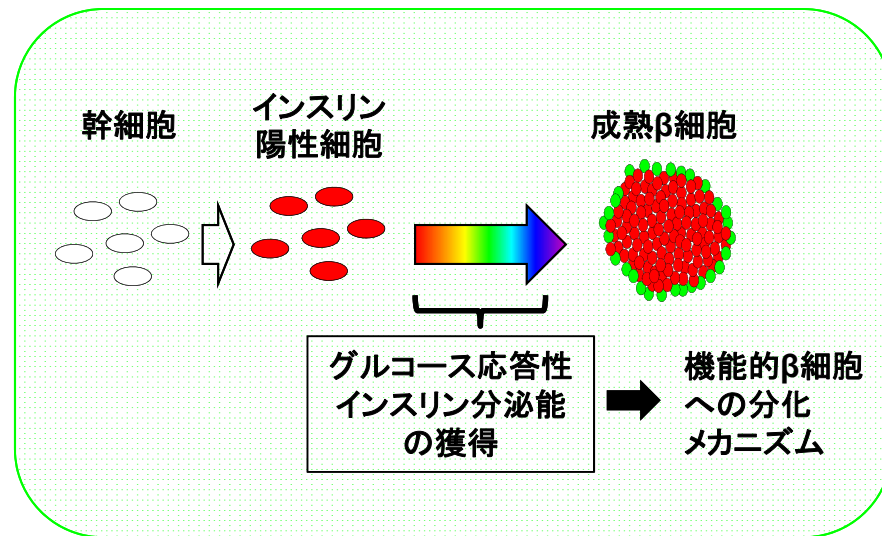
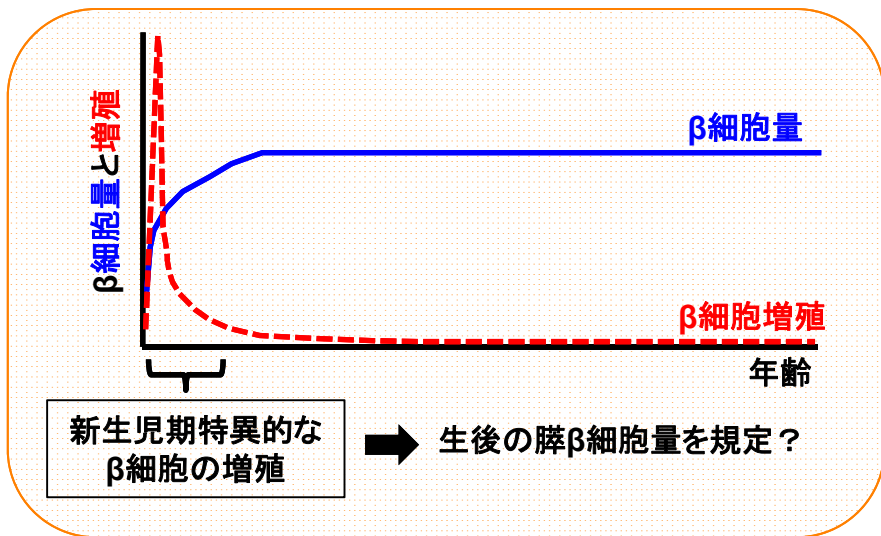
成熟β細胞の恒常性維持におけるMafAの重要性

(2) 膵β細胞の成熟化メカニズムの解明



新生仔期のβ細胞増殖
メカニズムの解明

機能的β細胞の
分化誘導・再生法の確立



課題番号 : 25指110

研究課題名 : 膵β細胞の量・機能を制御する新規メカニズムの解明

主任研究者名 : 西村 渉

分担研究者名 : 西村 渉

キーワード : 膵β細胞、糖尿病、転写因子、分化、インスリン

研究成果 : 膵β細胞増殖・機能成熟におけるプロラクチンシグナルの機能解析

(1) MafA のプロラクチンシグナルを介した生後のβ細胞増殖制御

転写因子 MafA の KO マウスでは、新生仔期に膵β/α細胞比が低下し、やがて耐糖能異常を発症する。転写因子 MafA の機能を解析するため、7週齢の MafA KO マウス膵島を用いて、野生型膵島を対照として網羅的遺伝子発現解析を施行し、qRT-PCR により結果を検証した。その結果 MafA KO マウス膵島では、プロラクチンレセプター (Prlr) とサイクリン D2 (Ccnd2) の有意な発現低下が認められた。また、膵β細胞株 MIN6 細胞において siRNA により MafA をノックダウンしたところ、Prlr の発現は有意に低下した。MafA KO マウス膵島では、Prlr と Ccnd2 の蛋白発現も有意に低下していた。ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイでは、MafA の共発現により、Prlr プロモーターは活性化された。Prlr プロモーターには、転写開始部位の近傍と-2000bp から-1700bp の間によく保存された MafA の結合配列が 6 カ所存在すると予測され、-117 から-107 までと、-2026 から-1713 までの MafA 結合配列を欠損した Prlr プロモーターでは、MafA の共発現による活性化が有意に低下した。

次に、プロラクチン (PRL) のβ細胞に対する作用を解析した。INS-1 細胞の PRL 刺激により、PRL シグナル下流の Stat5B のリン酸化の亢進および核移行が認められ、その下流の Ccnd2 の発現が増強した。一方、INS-1 細胞に Prlr の siRNA を導入後、あるいは Jak2 inhibitor を作用させた後、同様に細胞を PRL で刺激したところ、Stat5B のリン酸化ならびに核移行は減弱し、Ccnd2 の発現増強は有意に抑制された。Prlr ならびに Ccnd2 の global KO マウスでは、MafA KO マウスと同様に新生仔期に膵β細胞量が減少することが知られている。そこで BrdU の取り込みによるβ細胞増殖を解析したところ、4週齢の MafA KO マウス膵臓ではβ細胞の増殖が抑制されていた。以上より、MafA は膵β細胞において、PRL シグナルと Ccnd2 の発現制御を介して、生後の膵β細胞増殖をコントロールすると考えられた。以上の内容は、2014年6月17日付けで雑誌 PLoS One にアクセプトされた。

(2) β細胞特異的 Ccnd2、Prlr 過剰発現による MafA KO マウスの表現型のレスキュー

上記の研究結果により、新生児期の MafA KO マウス膵島においては Ccnd2 と Prlr の発現が低下しており、これが膵β細胞の増殖低下、あるいは耐糖能異常をもたらす可能性が示唆された。この結果を検証するため、MafA KO マウスのβ細胞特異的に Ccnd2 あるいは Prlr の発現を増強させ、上記の表現型が改善されるかを解析している。脳における発現を最小限度にしながら Ccnd2、Prlr のβ細胞特異的過剰発現を実現するため、Mouse insulin-1 promoter を含む BAC クローンをを用いて、BAC-Ins1-Ccnd2、BAC-Ins1-Prlr マウスを作成した。BAC-Ins1-Ccnd2 マウスは4ラインを、BAC-Ins1-Prlr マウスは7ラインを確立中である。BAC-Ins1-Ccnd2 マウスについては、F1 世代が得られた3ラインについて、C57BL/6J バックグラウンドの MafA KO マウスと交配し、BAC-Ins1-Ccnd2;MafA^{+/-} を作製した。現在、BAC-Ins1-Ccnd2;MafA^{-/-} マウスを作製している。このマウスを用いて、Ccnd2 の発現により、MafA^{-/-} マウスに認められる膵β細胞の増殖低下と耐糖能異常がどう変化しているかを解析し、生後のβ細胞増殖と機能成熟のメカニズムを明らかにしようとしている。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：25指110

研究課題名：膵β細胞の量・機能を制御する新規メカニズムの解明

主任研究者名：西村 渉

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
MafA is required for postnatal proliferation of pancreatic β -cells.	Koki Eto Wataru Nishimura Hisashi Oishi Haruhide Udagawa Miho Kawaguchi Masaki Hiramoto Toshiyoshi Fujiwara Satoru Takahashi Kazuki Yasuda	Plos One	In press	2014
Quantitative assessment of Pdx1 promoter activity in vivo using a secreted luciferase reporter system.	Wataru Nishimura Koki Eto Atsushi Miki Motohito Goto Miho Kawaguchi Takao Nanno Haruhide Udagawa Masaki Hiramoto Yukiko Shimizu Tadashi Okamura Toshiyoshi Fujiwara Yoshikazu Yasuda Kazuki Yasuda	Endocrinology	154巻11号	2013
Angiopoietin-like protein 4 (ANGPTL4) is induced by high glucose in retinal pigment epithelial cells and exhibits potent angiogenic activity on retinal endothelial cells.	Hiroataka Yokouchi Koki Eto Wataru Nishimura Norio Takeda Yasushi Kaburagi Shuichi Yamamoto Kazuki Yasuda	Acta Ophthalmol	91巻4号	2013
膵β細胞の成熟化機構.	西村 渉 衛藤弘城 安田和基	内分泌・糖尿病・代謝内科	36巻3号	2013

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
Generation and Characterization of Reporter Mice to Monitor Pdx1 and Mafa Promoter Activity.	Wataru Nishimura Nobuaki Funahashi Haruhide Udagawa Miho Kawaguchi Takao Nanno Hisashi Oishi Satoru Takahashi Kazuki Yasuda	16th International Congress of Endocrinology & the Endocrine Society's 96th Annual Meeting & Expo	シカゴ (米国)	2014年6月
転写因子MafAによる膵β細胞の分化可塑性制御.	西村 渉 川口美穂 宇田川陽秀 衛藤弘城 舟橋伸昭 南茂隆生 平本正樹 安田和基	第57回日本糖尿病学会年次学術集会	大阪	2014年5月

研究発表及び特許取得報告について

細胞系譜追跡実験による膵β細胞障害の時間経過の解析.	西村 渉 川口美徳 宇田川陽秀 衛藤弘城 舟橋伸昭 南茂隆生 平本正樹 安田和基	第51回日本臨床分子医学会学術集会	東京	2014年4月
MafA KOマウスβ細胞のlineage tracing study.	西村 渉 川口美徳 宇田川陽秀 南茂隆生 安田和基	第25回分子糖尿病学シンポジウム	大阪	2013年12月
分泌型ルシフェラーゼによる膵島の評価.	西村 渉 衛藤弘城 三木 厚 南茂隆生 川口美徳 宇田川陽秀 平本正樹 佐久間康成 安田是和 安田和基	第56回日本糖尿病学会年次学術集会	熊本	2013年5月
Assessment of pancreatic islets by Pdx1-Gaussia luciferase reporter system.	Wataru Nishimura Koki Eto Miho Kawaguchi Takao Nammo Haruhide Udagawa Masaki Hiramoto Kazuki Yasuda	Beta Cell Workshop 2013 Kyoto	京都	2013年4月
次世代シーケンサーを用いたゲノム、エピゲノム研究.	安田和基 西村 渉 南茂隆生	第57回日本糖尿病学会年次学術集会	大阪	2014年5月
膵島のゲノム網羅的解析による糖尿病発症機序の考察.	南茂隆生 宇田川陽秀 川口美徳 舟橋伸昭 上番増喬 平本正樹 西村 渉 安田和基	第57回日本糖尿病学会年次学術集会	大阪	2014年5月
脂肪細胞由来液成因子による新規インスリン分泌調節因子の発現誘導と膵β細胞機能変化.	宇田川陽秀 平本正樹 舟橋伸昭 川口美徳 南茂隆生 西村 渉 安田和基	第57回日本糖尿病学会年次学術集会	大阪	2014年5月
ゲノム網羅的解析を用いた、高脂肪食摂取による膵島の代償機序の解明.	南茂隆生 宇田川陽秀 川口美徳 衛藤弘城 上番増喬 平本正樹 西村 渉 安田和基	NGS現場の回第3回研究会	神戸	2013年9月
前駆・成熟脂肪細胞からの分泌因子が引き起こす膵β細胞機能変化.	宇田川陽秀 平本正樹 川口美徳 衛藤弘城 西村 渉 南茂隆生 安田和基	第56回日本糖尿病学会年次学術集会	熊本	2013年5月

研究発表及び特許取得報告について

マウス新生仔臍由来の長期継代可能な細胞の解析.	川口美徳 西村 渉 尾山和信 宇田川陽秀 衛藤弘城 南茂隆生 平本正樹 安田和基	第56回日本糖尿病学会年次学術集会	熊本	2013年5月
ニコチナミドはRNA結合タンパク質を介して膵β細胞における遺伝子発現制御に関与する.	平本正樹 西村 渉 川口美徳 宇田川陽秀 高橋枝里 加納圭子 鏑木康志 石橋奈緒子 衛藤弘城 上番増喬 南茂隆生 安田和基	第56回日本糖尿病学会年次学術集会	熊本	2013年5月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
Lineage Tracingによる膵β細胞障害の解析.	西村 渉	第5回北海道若手糖尿病研究会	札幌	2013年10月5日

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。
 ※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。