

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

### (1) 緒言：膵内分泌細胞の分化可塑性と糖尿病に対するその意義

近年、生体の様々な臓器において、細胞分化は可逆で動的な状態あることが、実験的に示されている。細胞の分化可塑性は、膵内分泌細胞で詳細に解析されてきている。細胞系譜追跡実験 (lineage tracing study) の結果、様々な状況において、膵臓の細胞から異なった系譜の細胞への分化転換が生じる事が明らかになっている。その際、膵内分泌細胞分化に重要な転写因子の発現が変動する。また、それら転写因子の強制発現により、膵臓の細胞に分化転換が生じる事も示されている。一方、ごく最近の研究により、糖尿病状態でのβ細胞の恒常性の破綻が、β細胞の脱分化と分化転換を引き起こす事が示されているが、その分子メカニズムは不明である。

膵内分泌細胞においてだけでなく、哺乳類の気管粘膜分泌細胞、Bリンパ球、そして核移植による初期化プロセスなどにおいても、細胞分化は成熟細胞の形質維持に関与する因子によって動的に制御されており、それら因子の発現低下による細胞の恒常性の破綻が、体細胞の脱分化を引き起こす事が、示されている。我々はこれまでに、インスリンの発現に重要な転写因子 v-Maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein A (MafA) が、成熟β細胞に発現し、また胎生期の膵内分泌細胞分化には関与しない事を明らかにしてきた。MafA と転写因子の Pdx1、Neurog3 を強制発現すると、膵外分泌細胞をインスリン陽性細胞に分化転換する。MafA は、ヒトの2型糖尿病のβ細胞障害において、他の因子に先行して発現が低下する。そこで本研究では、マウスにおける膵β細胞の恒常性維持と可塑性における MafA の機能を解析した。

### (2) 方法

MafA ノックアウト(KO)マウス、糖尿病モデルマウスとして db/db マウス、低容量ストレプトゾトシン (STZ) を投与したマウスのβ細胞につき、細胞系譜追跡実験を含む組織学的解析や、遺伝子発現解析などにより詳細に検討した。

### (3) 結果

#### 1. MafA は膵β細胞の恒常性維持に重要である

野生型マウス膵臓を対照として、免疫組織染色により MafA KO マウス膵臓を経時的に解析した。MafA KO マウス膵島は、生直後は正常であったが、4週齢頃より膵島内部にα細胞が出現し始め、8週齢ではインスリンの発現が低下するとともに、相対的にα細胞数が増加していた。10-12週齢では、様々なインスリン発現レベルの細胞が認められ、またインスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、膵ポリペプチドのいずれも発現しない細胞が出現した。このような膵島の形態学的変化にもかかわらず、MafA KO マウスでは、耐糖能異常を認めたものの、空腹時血糖が糖尿病レベルには達しなかった。MafA KO マウスの単離膵島は、ジチゾン染色性が障害され、インスリン含量が低下していた。MafA KO マウスの膵島には、TUNEL アッセイ陽性のβ細胞は、野生型と同様ほとんど認められなかった。12週齢において、MafA KO マウス膵島のほとんどの細胞は内分泌細胞マーカーの synaptophysin、chromogranin A 陽性であったが、インスリンの発現は減弱あるいは消失していた。電顕では、MafA KO マウス膵島細胞に多数のインスリン顆粒を持たない小胞を認めた。このようなインスリン陰性の『empty β細胞』とβ細胞/α細胞比の減少は、4週齢より12週齢まで高脂肪食を給餌した、MafA KO マウスと同様かそれ以上の血糖レベルを持つマウスの膵島には認められなかった。これら高脂肪食給餌マウスの膵島では、MafA の発現レベルに異常を認めなかった。以上より、MafA KO マウス膵島に認められる形態学的異常は、血糖値の上昇によるものではなく、MafA の発現低下によるものと考えられ、β細胞の恒常性維持における MafA の重要性が明らかになった。

## 2. MafA KO マウスの膵β細胞は脱分化している

MafA KO マウス膵島における synaptophysin 陽性インスリン陰性細胞、あるいは chromogranin A 陽性インスリン陰性細胞が膵β細胞由来かどうかを解析するため、インスリン陽性細胞の系譜追跡実験を施行した。RIPCreER;Rosa-YFP マウスでは、タモキシフェンの投与により Cre がインスリン陽性細胞特異的に発現し、YFP の発現が恒久的に誘導される。本研究では、90%以上のβ細胞に YFP の発現が認められた。MafAKO;RIPCreER;Rosa-YFP マウスと、対照として野生型の RIPCreER;Rosa-YFP マウスに、4週齢でタモキシフェンを投与し、12週齢で膵臓を解析した。MafAKO;RIPCreER;Rosa-YFP マウス膵臓では、β細胞において YFP の発現が明瞭に認められた。つまり4週齢においては、MafA の発現がなくても、インスリンプロモーターは作動することが明らかになった。これらの結果、胎生期と新生児期におけるインスリン陽性細胞の形成過程に、MafA は不要である事が明らかになった。

12週齢の MafAKO;RIPCreER;Rosa-YFP マウスは糖尿病を発症しなかったが、膵臓において多数のインスリン陰性 YFP 陽性細胞を認めた。また興味深い事に、MafAKO;RIPCreER;Rosa-YFP マウス膵臓では少数ではあるが、β細胞由来の YFP 陽性細胞に、グルカゴンの発現を認めた。定量的解析では、2.6% (n=991)のグルカゴン陽性細胞に YFP の発現を認めた一方、対照ではそのような細胞を認めなかった (n=361)。これらの結果は、MafA KO マウスのβ細胞では4週齢から12週齢の間に、大多数にインスリン発現の減弱あるいは消失を認め、そのうちのごく少数がグルカゴンを発現するという事を示唆する。4週齢から12週齢にかけて、MafA KO マウスのグルカゴン陽性細胞/膵島細胞比は高いままであったが、グルカゴン陽性細胞の増殖には促進を認めなかった。よって MafA KO 膵島におけるβ細胞/α細胞比の低下は、β細胞からα細胞への分化転換に加えて、β細胞増殖の低下(分担研究報告参照、Eto K et al, PLoS One. 2014) が関与していると考えられた。

MafA KO マウス膵島における遺伝子発現変動を、野生型を対照として解析した。MafA KO マウス膵島では、Ins1、Ins2、Slc2a2、Slc30a8、Psc1、Vdr、Sytl4、Ucn3、Maob など、β細胞機能に重要な遺伝子群の発現が低下していた。しかし、グルコース応答性インスリン分泌に重要な Gck、Kcnj11、Abcc8 の発現は低下していなかった。β細胞の形質維持に重要な転写因子 Pdx1、Neurod1、Pax6、Foxo1、Nkx6-1 の発現は、軽度低下していた。一方、ほとんどの組織で発現が認められるが、β細胞でのみ発現が抑制され、『β細胞特異的発現抑制遺伝子(“β-cell disallowed gene”)』とも呼ばれている遺伝子群の1つである Slc16A1 の発現が増強していた。また、胎生期膵臓の内分泌前駆細胞で一過性に発現が増強する転写因子 MafB、Pax4、Neurog3、Sox9 の発現が増強していた。これらの膵内内分泌細胞分化に関連した転写因子に加えて、Sox2、Nanog、Mycl の発現が増強していた。以上より、MafA の発現低下によるβ細胞の脱分化は、『β細胞特異的発現抑制遺伝子』をはじめとするいくつかの遺伝子群の発現増強と、β細胞機能に重要な分子群の発現低下を誘導し、それらがβ細胞の機能を低下させると推察された。また、MafA KO 膵島では、Dnmt1 と Dnmt3a の発現が低下し、Dnmt3l の発現が増強していた。Dnmt1、Dnmt3a の KO マウスでは、β細胞からα細胞への分化転換を認める事が報告されている。

## 3. 糖尿病モデルマウスの膵β細胞の脱分化

MafA の発現は、糖尿病モデルマウスのβ細胞で、Pdx1 など他の分子に先行して低下する。そこで RIPCreER;Rosa-YFP システムを利用して、db/db マウス、低容量 STZ マウスのβ細胞の運命を同様に解析した。これらのマウス膵島でも、β細胞/α細胞比が低下し、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、膵ポリペプチドのいずれも発現しない膵島細胞が存在していた。8週齢から12週齢までの db/db マウス膵β細胞の系譜追跡実験においても、MafA KO マウスと同様に、インスリンの発現が低下・消失したβ細胞が多数観察された。これらの膵島において、12週齢のα細胞の2.1% (n=1165)がβ細胞由来であったのに対し、対照群では0.6% (n=486)であった。低容量 STZ マウスにおいては、α細胞の2.8% (n=696)がβ細胞由来であったのに対し、対照群では0.2% (n=424)であった。MafA KO マウスに低容量 STZ を投与した群としない群では、β細胞系譜追跡実験の結果は同様であった事から、この現象における MafA の重要性が示唆された。

転写因子 MafB は、発生過程のβ前駆細胞に発現する。糖尿病モデルマウスにおけるβ細胞の脱分化をさらに解析するため、MafB<sup>GFP/+</sup>レポーターマウスを用いて膵島における MafB の発現を観察した。

対照群では、MafB-GFP の発現は  $\alpha$  細胞に局限していた。低容量 STZ マウスでは、MafB-GFP の発現は  $\beta$  細胞の 36.1% (n=1016)に見られたが、対照マウスの  $\beta$  細胞では 0.5%であった (n=1907)。db/db マウスでは、MafB-GFP の発現は  $\beta$  細胞の 39.6% (n=1522)に認められたが、対象マウスでは 1.5% (n=1158)であった。これらの結果は、MafB プロモーターが障害  $\beta$  細胞において活性化した事を示唆している。 $\beta$  細胞における MafB-GFP の発現は、4 週齢から 24 週齢まで高脂肪食を給餌したマウスでは認められなかった事から、 $\beta$  細胞における MafB プロモーターの活性化は、脱分化に関連している事が示唆された。

#### (4) 考察

本研究で我々は、膵  $\beta$  細胞の分化可塑性制御に対する転写因子 MafA の機能を解析した。その結果、MafA は成熟  $\beta$  細胞の形質維持に重要である事が明らかになった。MafA の発現消失により、膵  $\beta$  細胞は脱分化し、『 $\beta$  細胞特異的発現抑制遺伝子』の発現が増強した。MafA はヒト 2 型糖尿病患者の多くの  $\beta$  細胞で発現が低下する事から、上記の結果はヒトの糖尿病の病態メカニズムに直接関連する。

本研究で我々は、MafA KO マウス、db/db マウス、低容量 STZ マウスの  $\beta$  細胞で脱分化が起こっている事を、細胞系譜追跡実験などに基づいて、実験的に示した。 $\beta$  細胞の脱分化は、本研究の遂行中にもマウス膵臓において発表されており (Talchai et al, Cell. 2012; Wang et al, Cell Metab. 2014; Gao et al, Cell Metab. 2014)、注目されている  $\beta$  細胞障害メカニズムである。

近年の網羅的遺伝子発現解析の結果から、膵  $\beta$  細胞で特異的に発現が抑制されている遺伝子群が同定されている。これら遺伝子の発現抑制は、 $\beta$  細胞がグルコース刺激に対応して効率的に、適切な量のインスリンを分泌する事に貢献している。これらの遺伝子発現抑制は細胞分化度 (成熟度) 依存性で、新生児期の間に確立する。分化過程の、いわゆる「未熟な  $\beta$  細胞」は、これらの遺伝子群を発現している (Pullen et al, Diabetes Obes Metab. 2013; Thorrez et al, Genome Res. 2011)。Slc16A1 はこれら『 $\beta$  細胞特異的発現抑制遺伝子』の 1 つであるが、MafA KO マウス膵島で発現が増強していた。さらに MafB などの、胎生期膵臓の内分泌前駆細胞で一過性に発現が増強する転写因子の発現も、増強していた。MafB は高齢や多産後の  $\beta$  細胞特異的 FoxO1 KO マウスや Pdx1 KO マウスの膵島でも発現が増強しており、またゲノムワイドに DNA メチル化の変化を誘導する (Vicente-Dueñas et al, EMBO J. 2012)。よって MafB は、『 $\beta$  細胞特異的発現抑制遺伝子』の発現制御領域のエピゲノム変化を誘導する事により、それら分子の発現を増強させているのかもしれない。前述の Slc16A1 の  $\beta$  細胞における発現増強にも、エピゲノム変化が関与している事が報告されている。

脱分化したインスリン陰性  $\beta$  細胞を、高血糖の治療により再分化させる事で、 $\beta$  細胞機能が回復する事から、障害による  $\beta$  細胞脱分化はある段階までは可塑である事が示されている (Laybutt et al, Diabetologia. 2007; Wang et al, Cell Metab. 2014)。本研究により MafA は、障害  $\beta$  細胞の再分化の分子標的になり得る事が示された。また、障害  $\beta$  細胞における『 $\beta$  細胞特異的発現抑制遺伝子』群の発現を解析する事で、糖尿病における  $\beta$  細胞機能低下の新しいメカニズムが明らかになる可能性が見出された。

このような解析には、レポーターマウスが有用である。我々は、 $\beta$  細胞機能の解析に有用なレポーターマウスを作製してきた (Nishimura et al, Endocrinology. 2013、22 指 103 報告書参照)。また最近我々は、マウスの BAC を用いた MafA のレポーターマウスである MafA-Kusabira Orange、さらに MafA と MafB のダブルレポーターマウスである MafA-Kusabira Orange;MafB<sup>GFP/+</sup>マウスを作製し、これらのマウスから単離した膵島のライブモニタリングにより、MafA と MafB の発現の可視化に成功している

(Nishimura et al, Endocr J. Published on line, DOI: 10.1507/endocrj.)。今後は、これらの研究ツールとフローサイトメトリー、経時的なイメージングによる解析などにより、純粋  $\beta$  細胞集団の遺伝子発現をダイナミックに解析し、 $\beta$  細胞の脱分化メカニズムを分子レベルで効率的に解明して、糖尿病の病態解明と新規治療法の開発に貢献していく。

以上の研究結果の主要な部分は、Diabetologia (Published on line, DOI: 10.1007/s00125-014-3464-9) に発表した。

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) 緒言：新生児期のβ細胞増殖を研究する意義

新生児期、幼児期の器官発生や成熟過程は、その後の健康、特に生体代謝に重要である。膵β細胞は生後に激しく増殖し、生体から要求されるインスリン分泌能に見合った量を確保する。インスリン抵抗性の増大に対応したβ細胞の代償性増殖については、多くの研究結果が報告されているが、生後の膵β細胞増殖を制御するシグナルについては、よく分かっていない。この過程を解明する事は、生体におけるβ細胞量の制御メカニズムを明らかにするだけでなく、幹細胞より分化誘導されたインスリン陽性細胞の増殖能獲得にも貢献する可能性がある。

妊娠中の母体における膵β細胞増殖には、プロラクチンシグナルが関与している。一般的に、胎盤性ラクトゲンあるいはプロラクチンがプロラクチン受容体 (Prlr) に結合すると、下流の Janus kinase 2 (Jak2) と Signal transducer and activator of transcription 5B (Stat5B) をリン酸化する。リン酸化 Stat5B は核内に移行し、DNA 結合配列である GAS モチーフに結合し標的遺伝子の発現を誘導する。β細胞における Prlr/Jak2/Stat5B シグナルの下流として、Ins1、Ins2、Slc2a2、Gck、Tph1、Ccnd2、そして Prlr 自身が報告されている。また、Prlr ノックアウト (KO) マウスの解析からは、プロラクチンシグナルは生後のβ細胞増殖にも関与する可能性が示唆されている。

β細胞は、v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein A (MafA) の発現増強に伴って成熟化する。MafA はインスリンプロモーターの C1-A2 領域に結合し、インスリンの発現を制御する転写因子である。膵臓では、MafA は成熟β細胞にのみ発現する。MafA を転写因子 Pdx1、Neurog3 とともに膵外分泌細胞に発現させると、それらをインスリン陽性細胞に分化転換する。MafA は、糖尿病におけるβ細胞の機能障害早期に発現が低下する。MafA KO マウス膵島では、生直後には正常であるβ細胞/α細胞比が、新生児期に低下する事が知られている。そこで、本研究では生後のβ細胞増殖に対する MafA の機能を解析した。

### (2) 方法

7週齢の MafA KO マウス膵島における遺伝子発現を、野生型マウスを対照として網羅的に解析し、その結果得られた MafA の下流遺伝子の候補について、MafA KO マウスやβ細胞株などを用いて解析した。

### (3) 結果

#### 1. 膵β細胞において、MafA は Prlr の発現に関与する

7週齢の MafA KO マウス膵島において発現が低下している遺伝子として、Slc30a8、Vdr、Slc2a2、Pesk1、Cry11、Sytl4、Ucn3、Prlr、Ccnd2 などを同定した。次に、MafA の siRNA を導入したマウス膵β細胞株 MIN6 細胞における、これら分子ならびにβ細胞機能に重要な分子の発現を解析した。MafA の発現は、対照の 51.2±3.7% と低下していた ( $p<0.01$ )。この時、Prlr の発現は対照の 78.6±1.5% と、解析した分子の中で最も低下していた ( $p<0.05$ )。また、7週齢の MafA KO マウス膵島の qRT-PCR による解析では、Prlr の発現は野生型の 31.5±4.9% ( $p<0.01$ ) と低下していた。また、プロラクチンシグナルの下流の Ccnd2 の発現も 25.2±3.6% ( $p<0.01$ ) と低下していた。MafA KO マウス膵島では、Prlr と Ccnd2 の蛋白発現も、野生型膵島と比較してそれぞれ、24.8±15.9%、50.3±15.9% に低下していた ( $p=0.04$ 、0.05)。以上より、膵β細胞において MafA は、Prlr ならびに Ccnd2 の発現制御に関与している事が示唆された。Prlr KO マウスでは、新生児期にβ細胞量が減少する事が知られている。

#### 2. Prlr 発現制御領域に対する MafA の機能

In silico 解析では、マウス Prlr プロモーターの転写開始部位から-3000 bp 上流までに、MafA 結合部位が 6 か所同定され、これらはヒトならびにラットでも保存されていた。ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイでは、MafA はヒトおよびマウス Prlr プロモーターを活性化した（それぞれ  $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$ ）。MafA の各結合部位を欠損したマウス Prlr プロモーターを用いたレポーターアッセイでは、-217 から-207 まで ( $p < 0.01$ )、-2026 から-1409 まで ( $p < 0.01$ ) の領域が、MafA による Prlr プロモーターの活性化に重要である事が判明した。これらの結果、MafA は転写レベルで Prlr プロモーターの活性化を制御する事が明らかになった。

### 3. 膵β細胞においてプロラクチンシグナルは Ccnd2 の発現を制御する

膵β細胞において、MafA と Prlr が Ccnd2 の発現に関与するかを解析するため、ラット膵β細胞株 INS-1 細胞におけるプロラクチンシグナルを解析した。MafA の siRNA を導入した INS-1 細胞において、MafA の発現は対照群の  $41.5 \pm 5.8\%$  であった ( $p = 0.09$ )。この時、Prlr、Insulin1、Insulin2 の発現はそれぞれ  $84.8 \pm 7.0\%$ 、 $83.7 \pm 7.3\%$ 、 $68.5 \pm 8.4\%$  であった ( $p > 0.05$ )。Prlr の siRNA を導入した INS-1 細胞では、Prlr の発現は対照群の  $55.7 \pm 2.3\%$  であった ( $p = 0.05$ ) が、この時 MafA、Insulin1、Insulin2 の発現に変動は認められなかった。INS-1 細胞において、 $1 \mu\text{g/ml}$  のプロラクチン刺激による、プロラクチンシグナル下流の Stat5B のチロシンリン酸化ならびに細胞質から核内への移行は、Prlr や Jak2 依存性であった。これらのシステムを用いて、β細胞におけるプロラクチンシグナルの Ccnd2 の発現に対する機能を解析した。INS-1 細胞におけるプロラクチン刺激は、Stat5 のリン酸化とともに、核内の Ccnd2 の蛋白量を  $139.2 \pm 10.6\%$  に増加させた ( $p = 0.01$ )。また INS-1 細胞において、siRNA により Prlr の発現を対照群の  $15.3 \pm 0.5\%$  ( $p < 0.01$ ) に抑制した時、Ccnd2 の mRNA 発現は  $84.9 \pm 2.9\%$  ( $p = 0.01$ ) と低下した。以上より、膵β細胞株におけるプロラクチンシグナルは、Ccnd2 の発現を制御する事が明らかになった。

### 4. 4 週齢の MafA KO マウスでは、β細胞の増殖が抑制されている

MafA KO マウスの膵β細胞における Prlr と Ccnd2 の発現低下の、生後のβ細胞増殖に対する影響を解析した。BrdU 取り込み実験では、β細胞のうち BrdU 陽性であったのは、4 週齢の MafA KO マウスで  $0.35 \pm 0.0\%$  であったのに対し、野生型では  $1.57 \pm 0.48\%$  であった ( $p = 0.06$ )。よって、MafA の発現低下により、4 週齢のマウス膵臓におけるβ細胞の増殖が低下する事が明らかになった。以上より、MafA はプロラクチンシグナルの制御を通じて、生後のβ細胞増殖を制御する事が判明した。

### (4) 考察

本研究で我々は、MafA KO マウスより単離した膵島の網羅的遺伝子発現解析を施行した。その結果、MafA は膵β細胞において Prlr の発現に重要であり、プロラクチンシグナルが Ccnd2 の発現を制御し、そして MafA がプロラクチンシグナルを介して、生後のβ細胞増殖を制御する可能性を明らかにした。胎生期膵臓において、Prlr は胎生初期～中期には膵外分泌細胞や膵管に発現するが、その後、胎生後期から生後にかけて、膵島に局限していく (Freemark et al, Clin Invest. 1997)。この時期は、MafA がβ細胞に発現する時期と一致している (Nishimura et al, Dev Biol. 2006)。よってプロラクチンシグナルは、妊娠期の母体膵臓だけでなく、新生児期膵臓においても、β細胞増殖に重要であると考えられた。Ccnd2 発現に対する MafA の直接作用に関しては、β細胞株を用いた解析では困難であり、今後より詳細な解析が必要である。現在我々は、MafA KO マウスのβ細胞特異的に Ccnd2、Prlr を過剰発現するマウスを作製し、解析しようとしている。

生後のβ細胞におけるプロラクチンシグナルは、細胞増殖だけでなく、機能の成熟化にも重要である可能性がある。プロラクチンシグナルは、Slc2a2、Gck、Tph1、Foxm1、そして Prlr 自身の発現や、インスリン分泌・インスリン生合成に重要である事が報告されている (Weinhaus et al, J Endocrinol. 2007; Arumugam et al, Endocrinology. 2011; Nielsen et al, Endocrinology. 1982)。本研究により、プロラクチンシグナルの活性化や、プロゲステロンシグナルの抑制が、幹細胞から分化したインスリン陽性細胞の増殖や機能成熟を促進する可能性が見出された。

以上の研究結果の主要な部分は、PLoS One に発表した (Eto K et al., 2013)。

Subject No. : 25-110  
Title : Elucidation of novel mechanism regulating mass and function of pancreatic  $\beta$ -cells  
Researchers : Wataru Nishimura  
Key word : pancreatic  $\beta$ -cells, diabetes, transcription factor, differentiation, insulin  
Abstract :

### 1. Specific Aim

Dysfunction of pancreatic  $\beta$ -cells is directly involved in the pathology of diabetes. However, mechanism of reduced mass and impaired function of  $\beta$ -cells in diabetes is not fully understood. Thus, it is critical to elucidate mechanism regulating mass and function of adult  $\beta$ -cells.

Function and mass of insulin-expressing cells differentiated from endocrine progenitors in embryonic pancreas are immature at birth, but these cells actively proliferate and acquire mature function as  $\beta$ -cells during neonatal period. Molecular mechanism of these events is also not clear. Uncovering the mechanism regulating mass and function of  $\beta$ -cells in neonates would contribute to studies analyzing proliferation and maturation of immature insulin-expressing cells differentiated from stem cells.

Thus, the specific aims of this research project are below, to elucidate the molecular mechanism regulating mass and function of adult and neonatal  $\beta$ -cells.

1. Elucidation of novel mechanism of  $\beta$ -cell dysfunction in diabetes
2. Analysis of mechanism regulating proliferation of neonatal  $\beta$ -cells

### 2. Background

#### 1. Novel mechanism of $\beta$ -cell dysfunction

Recent studies using genetic engineered diabetes model mice with overexpression or repression of a particular molecule in  $\beta$ -cells show that compromised  $\beta$ -cells are not apoptotic, but there is large amount of  $\beta$ -cells with reduced / lost expression of insulin, which are dedifferentiated and/or transdifferentiated into  $\alpha$ -cells in various conditions (Talchai et al., Cell. 2012). Although molecular mechanism regulating fate of these compromised  $\beta$ -cells in adult mice is not clear, changes in the expression of transcription factors critical for differentiation of pancreatic endocrine cells are observed. Conversely, forced expression of these factors transdifferentiates pancreatic cells.

#### 2. Neonatal $\beta$ -cell proliferation

Regulation of  $\beta$ -cell replication during infancy plays a major role in  $\beta$ -cell mass in adult human (Meier et al., Diabetes. 2008), suggesting molecules and signals involved in neonatal proliferation of  $\beta$ -cells need to be elucidated. Prolactin signaling has been reported to be critical for cell proliferation, although it is not fully elucidated in  $\beta$ -cells. Neonatal  $\beta$ -cell mass is reduced in global knockout (KO) mice of prolactin receptor (Prlr) or cyclin D2 (Cnd2), a downstream target of Prlr. Conversely,  $\beta$ -cell-specific overexpression of placental lactogen, a ligand of Prlr, increases  $\beta$ -cell mass.

#### 3. Transcription factor MafA is critical for maturation of $\beta$ -cells

v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein A (MafA) is a transcription factor that binds to C1-A2 element of insulin promoter. MafA forms ternary complex with Pdx1 and NeuroD1 to activate

Researchers には、分担研究者を記載する。

insulin promoter and is critical for the insulin gene expression. MafA is expressed in mature  $\beta$ -cells, while MafB, another Maf family transcription factor, is expressed in immature insulin-expressing cells as well as mature  $\alpha$ -cells. MafB is essential for the expression of insulin in endocrine progenitor cells in the embryonic pancreas, while MafA is dispensable for embryonic development of pancreas. Maturation of  $\beta$ -cells accompanies increase in the expression of MafA in neonatal pancreas. Thus, MafA may be a key molecule for neonatal maturation and proliferation of  $\beta$ -cells. In adult, the expression of MafA in  $\beta$ -cells is sensitive to glucotoxicity and rapidly reduced in diabetes model mice. Pancreatic islets in MafA KO mice have reduced  $\beta$ -cell /  $\alpha$ -cell ratio, which is also observed in diabetes model mice such as db/db or mice that received low-dose streptozotocin (STZ).

### 3. Methods

#### 1. Novel mechanism of $\beta$ -cell dysfunction

The morphology of the islets in MafA KO mice was analyzed by immunohistochemistry and transmission electron microscopy (TEM), and gene expression in the MafA KO islets was examined by qRT-PCR. In addition, RIPCreER;ROSA-YFP mice were generated in the background of MafA KO mice, db/db mice and low-dose STZ mice, and the fate of  $\beta$ -cells in these mice was analyzed by the lineage tracing studies.

#### 2. Neonatal $\beta$ -cell proliferation

The transcriptome analyses of the islets of MafA KO neonates were performed. The results of these analyses were subsequently used for the elucidation of signaling pathway regulating  $\beta$ -cell proliferation and maturation.

### 4. Results:

#### 1. Novel mechanism of $\beta$ -cell dysfunction

In MafA KO islets, cells with reduced / lost expression of insulin increased over time with decreased  $\beta$ -cell /  $\alpha$ -cell ratio. These cells expressed chromogranin A or synaptophysin, the endocrine cell markers. TEM of MafA KO islets showed numerous  $\beta$ -cells with empty granules. The lineage tracing study of  $\beta$ -cells in MafA KO mice demonstrated many  $\beta$ -cells that have reduced / lost expression of insulin, minority of which expressed glucagon. qRT-PCR of MafA KO islets showed reduced expression of molecules critical for the function of  $\beta$ -cells such as insulin, Slc2a2, Slc30a8, Pcsk1, Vdr, Sytl4, Ucn3 and Maob. It also showed increased expression of genes that are specifically repressed in the conventional  $\beta$ -cells, such as Slc16A1 or that are transiently expressed in endocrine progenitor cells such as MafB, Neurog3, Pax4 or Sox9. Meanwhile, TUNEL assay of  $\beta$ -cells in MafA KO mice showed very few positive cells. Lineage tracing studies of other diabetes model mice such as db/db or low-dose STZ mice also showed  $\beta$ -cells with reduced / lost expression of insulin and with the expression of glucagon. These results suggest that MafA is important for the homeostasis of  $\beta$ -cells and regulates cell plasticity, and reduced expression of MafA in compromised  $\beta$ -cells of diabetes results in dedifferentiation of these cells. Our results also indicate that MafA can be a target for redifferentiation of compromised  $\beta$ -cells into the functional cells in diabetes.

To search small compounds to induce the expression of MafA, or to analyze gene expression of mature  $\beta$ -cells, MafA reporter mice were generated by the research project 22-103. In this project of 25-110, we generated double reporter mice MafA-KOr;MafB<sup>GFP/+</sup> for further analysis of dynamic change in the expression of MafA and MafB in compromised  $\beta$ -cells. The islets isolated from MafA-KOr;MafB<sup>GFP/+</sup> mice expressed KOR

(Kusabira Orange) in  $\beta$ -cells and GFP in  $\alpha$ -cells. After culturing of these islets for 3 days, majority of the islets exhibited MafA-KOr-dominant expression, while few islets were MafB-GFP-dominant. These transgenic mice enable to track dedifferentiation (MafA to MafB transition) over time.

## 2. Neonatal $\beta$ -cell proliferation

Transcriptome analyses revealed genes downregulated in MafA KO islets at 7 weeks of age, including Slc30a8, Vdr, Slc2a2, Pcsk1, Cry11, Sytl4, Ucn3, prolactin receptor (Prlr) and cyclin D2 (Ccnd2). The analysis of mouse  $\beta$ -cell line MIN6 cells with transfection of siRNA-MafA also showed reduced expression of Prlr. qRT-PCR analysis of MafA KO islets showed reduced expression of Prlr and Ccnd2. The protein expression of Prlr and Ccnd2 in MafA KO islets was also impaired. Thus, the role of prolactin signaling in neonatal  $\beta$ -cell proliferation and maturation was focused in this study.

Reporter assay using mouse and human Prlr promoters in HeLa cells revealed MafA can activate Prlr promoter via at least two MafA recognition elements (MARE). Prolactin stimulation of rat  $\beta$ -cell line INS-1 cells induced phosphorylation and translocation into the nucleus of Stat5B through Prlr and Jak2, which increased the expression of Ccnd2. In consistent with these results in vitro, BrdU incorporation assay revealed reduced proliferation of  $\beta$ -cells in MafA KO mice at 4 weeks of age. These results suggest importance of prolactin signaling for the proliferation of  $\beta$ -cells in neonatal as well as in pregnant mice.

## 5. Discussion

### 1. Novel mechanism of $\beta$ -cell dysfunction

Our results suggest that MafA is critical for the homeostasis of  $\beta$ -cells and loss of MafA induces dedifferentiated  $\beta$ -cells with reduced / lost expression of insulin. Our results demonstrate new mechanism of  $\beta$ -cell dysfunction, which is consistent with recently published articles during the course of this study, showing dedifferentiation of  $\beta$ -cells in diabetes (Talchai et al., Cell. 2012; Wang et al., Cell Metab. 2014; Gao et al., Cell Metab. 2014).

### 2. Neonatal $\beta$ -cell proliferation

In this study, we showed that MafA regulates  $\beta$ -cell proliferation through prolactin signaling. For more investigation of this aspect, we are now studying if  $\beta$ -cell specific expression of Prlr or Ccnd2 can rescue impaired proliferation of  $\beta$ -cell in MafA KO neonates. To this end, BAC-Ins1-Prlr mice and BAC-Ins1-Ccnd2 mice are being generated using BAC clone including mouse insulin1 promoter. Analysis of these mice may also show another role of prolactin signaling to induce functional maturation of  $\beta$ -cells.

The results described above were published in the following journals.

1. Nishimura W, et al. **Diabetologia**, published on line. DOI: 10.1007/s00125-014-3464-9.
2. Nishimura W, et al. **Endocr J**, published on line. DOI: 10.1507/endocrj.
3. Eto K, et al. **PLoS One**. 9: e104184, 2014.

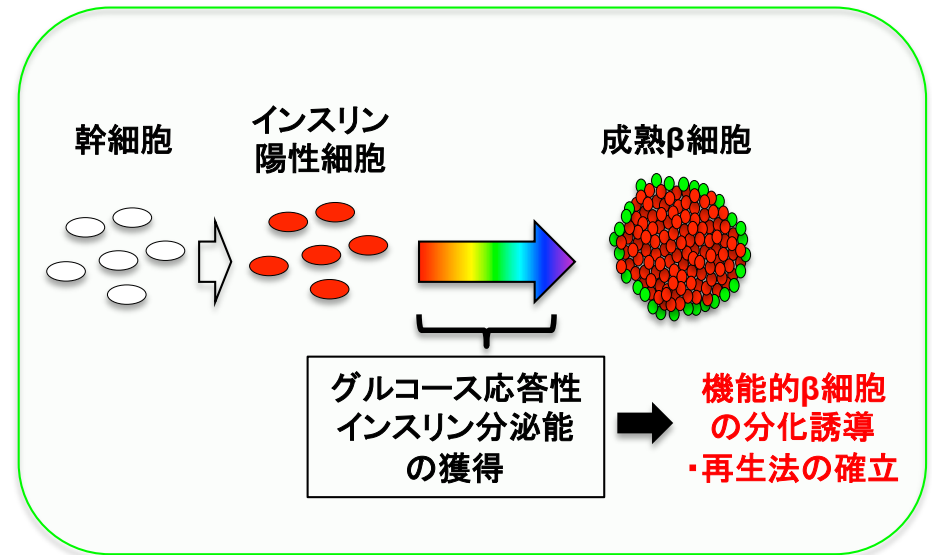
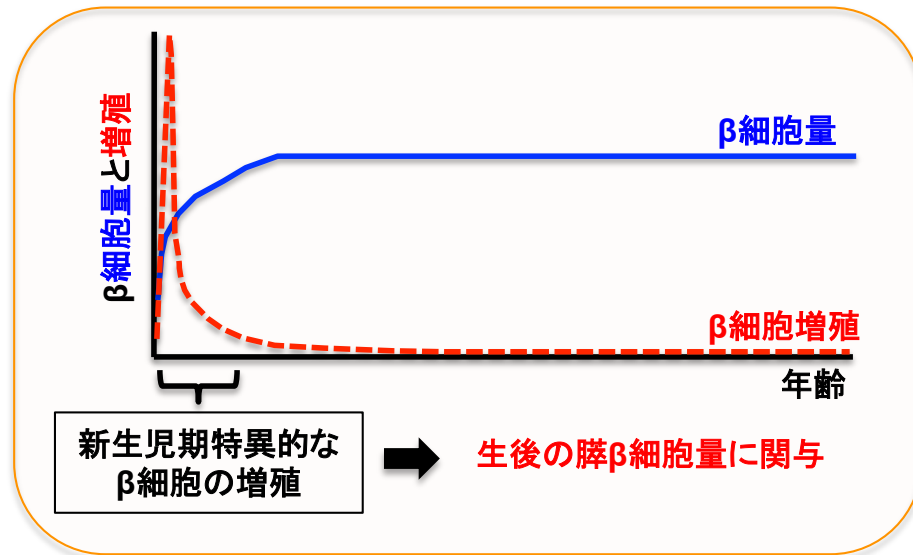


# 【研究報告書 25指110(西村班): 膵β細胞の量・機能を制御する新規メカニズムの解明①】

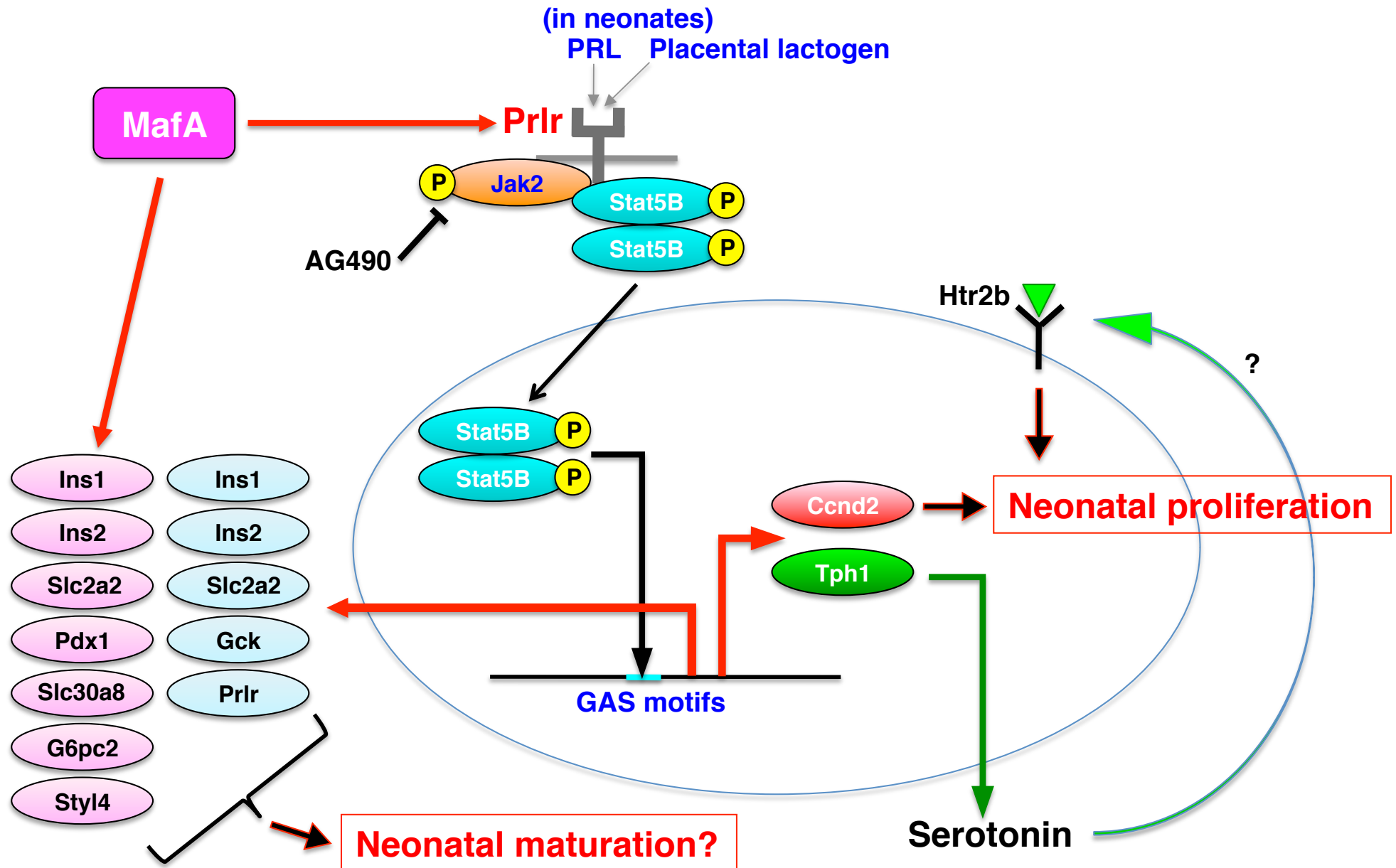
## 膵β細胞の成熟化メカニズムの解明

新生児期β細胞の  
増殖メカニズムの解明

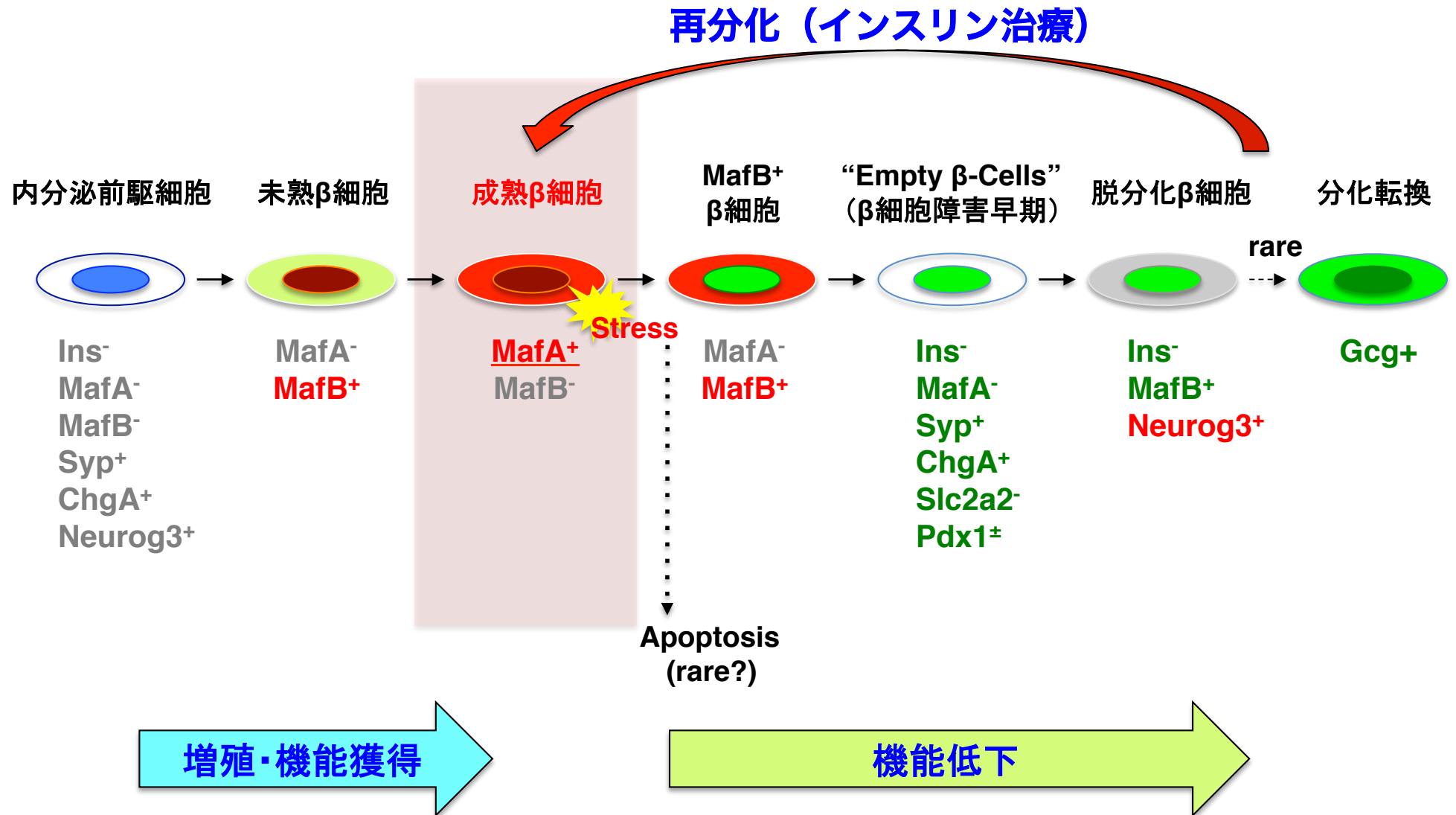
新生児期β細胞の  
機能成熟メカニズムの解明



# 生後のβ細胞増殖、機能成熟における転写因子MafAの機能



# 転写因子MafAによる膵β細胞の恒常性維持メカニズムの解明



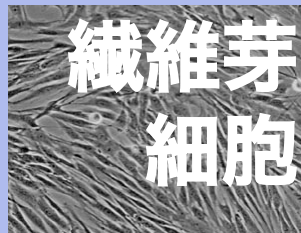
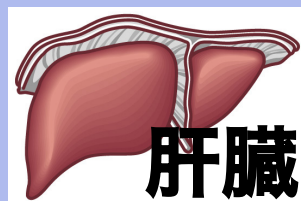
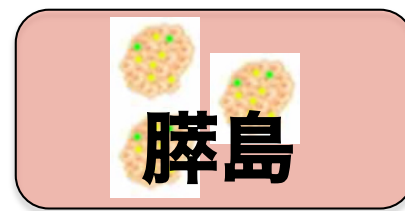
# Pdx1/MafA プロモーターを活性化する低分子化合物による膵β細胞の増殖、機能成熟促進



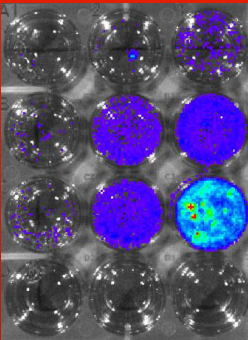
Pdx1-Gaussia Luciferase マウス



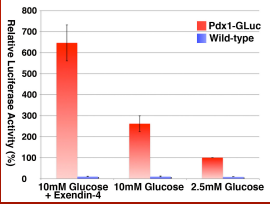
MafA-Kusabira Orange マウス



Small Molecule Screening



イメージング



レポーターアッセイ

Condition	Pdx1-GLuc (%)	Wild-type (%)
10mM Glucose + Exendin-4	~700	~10
10mM Glucose	~250	~10
2.5mM Glucose	~100	~10

膵β細胞の機能改善

Chemically Induced Reprogram

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 critical for maintenance of the mature beta cell phenotype in mice.	<u>Wataru Nishimura</u> Satoru Takahashi Kazuki Yasuda	Diabetologia	58巻3号	2015
Generation and characterization of MafA-Kusabira Orange mice.	<u>Wataru Nishimura</u> Hisashi Oishi Nobuaki Funahashi Toshiyoshi Fujiwara Satoru Takahashi Kazuki Yasuda	Endocrine Journal	62巻1号	2015
Paternal allelic mutation at the Kcnq1 locus reduces pancreatic $\beta$ cell mass via epigenetic modification of Cdkn1c.	Shun-ichiro Asahara Hiroaki Etoh Hiroyuki Inoue Kyoko Teruyama Yuki Shibutani Yuka Ihara Alberto Bartolome Naoko Hashimoto Tomokazu Matsuda Maki Koyanagi-Kimura Ayumi Kanno Yushi Hirota Tetsuya Hosooka Kazuaki Nagashima <u>Wataru Nishimura</u> Hiroshi Inoue Michihiro Matsumoto Michael J. Higgins Karl Pfeifer Kazuki Yasuda Nobuya Inagaki Susumu Seino Masato Kasuga Yoshiaki Kido	Proc Natl Acad Sci USA	In Press	2015
Allele comparative analysis of type 2 diabetes-associated SNPs identifies allele-specific DNA-binding proteins for the KCNQ1 locus.	Masaki Hiramoto Haruhide Udagawa Atsushi Watanabe Keisuke Miyazawa Naoko Ishibashi Miho Kawaguchi Takashi Uebanso <u>Wataru Nishimura</u> Takao Nammo Kazuki Yasuda	Int J Mol Med	36巻1号	2015

研究発表及び特許取得報告について

Comparison between the antiemetic effects of palonosetron and granisetron in breast cancer patients treated with anthracycline-based regimens.	Hideyuki Ohzawa Atsushi Miki Yasuo Hozumi Chieko Miyazaki Yuka Sagara Yumiko Tanaka Satomi Shiba Hiromi Joutoku Masako Sakuragi Megumi Takehara Yasunari Sakuma <u>Wataru Nishimura</u> Hirofumi Fujii Yoshikazu Yasuda	Oncol Lett.	9巻1号	2015
MafA is required for postnatal proliferation of pancreatic $\beta$ -cells.	Koki Eto <u>Wataru Nishimura</u> Hisashi Oishi Haruhide Udagawa Miho Kawaguchi Masaki Hiramoto Toshiyoshi Fujiwara Satoru Takahashi Kazuki Yasuda	PLoS ONE	9:e104184	2014
Quantitative assessment of Pdx1 promoter activity in vivo using a secreted luciferase reporter system.	<u>Wataru Nishimura</u> Koki Eto Atsushi Miki Motohito Goto Miho Kawaguchi Takao Nammo 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 <u>Wataru Nishimura</u> Norio Takeda Yasushi Kaburagi Shuichi Yamamoto Kazuki Yasuda	Acta Ophthalmol	91巻4号	2013
膵 $\beta$ 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
MafA is important for maintenance of the mature beta-cell phenotype.	<u>Wataru Nishimura</u> Miho Kawaguchi Haruhide Udagawa Nobuaki Funahashi Takao Nammo Kazuki Yasuda	9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress (MSDA)	京都	2014年9月
Generation and Characterization of Reporter Mice to Monitor Pdx1 and Mafa Promoter Activity.	<u>Wataru Nishimura</u> Nobuaki Funahashi Haruhide Udagawa Miho Kawaguchi Takao Nammo 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

研究発表及び特許取得報告について

転写因子MafAによる膵β細胞の分化可塑性制御.	西村 涉 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
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 涉 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 涉 川口美穂 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 涉 衛藤弘城 三木 厚 南茂隆生 川口美穂 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 涉 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 川口美穂 舟橋伸昭 上番増喬 平本正樹 西村 涉 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 川口美穂 南茂隆生 西村 涉 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 川口美穂 衛藤弘城 上番増喬 平本正樹 西村 涉 安田和基	NGS現場の回第3回 研究会	神戸	2013年9月

研究発表及び特許取得報告について

前駆・成熟脂肪細胞からの分泌因子が引き起こす $\beta$ 細胞機能変化.	宇田川陽秀 平本正樹 川口美穂 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
マウス新生仔膵由来の長期継代可能な細胞の解析.	川口美穂 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 $\beta$ 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 川口美穂 宇田川陽秀 高橋枝里 加納圭子 鈴木康志 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 $\beta$ 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。