

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590325

研究課題名(和文) 膵内分泌細胞分化における大Maf群転写因子の機能解析とその応用

研究課題名(英文) Functional analyses of large Maf transcription factors in the development of pancreatic endocrine cells and its application

研究代表者

大石 久史(OISHI, Hisashi)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：30375513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、(1)膵内分泌細胞特異的大Maf群転写因子欠損マウス(MafA/MafB二重欠損マウス)を得るために必要な、floxed MafB マウスの作製。(2)In vivo imagingを使った 細胞の可視化による新生細胞の定量的スクリーニング法の確立。(3)マウス肝組織からのインスリン産生細胞の誘導において、MafAとMafBの効果を比較し、MafAがより効率的に誘導可能であること の3つを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：It is an important research subject to understand the mechanisms of pancreatic beta-a-cell development and maturation for the achievement of regeneration therapy for diabetes. The project yielded these three results: (1) To analyze the function of large Maf transcription factors in pancreatic endocrine cells, we generated floxed MafB mice. (2) To monitor the newly induced beta-like cells in mouse liver, we established the in vivo imaging system capable to quantify the insulin gene activity (3) Dominant role of MafA in the beta-like cell conversion in comparison with MafB.

研究分野：内分泌学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：インシュリン 細胞 大Maf群転写因子 マウス

1. 研究開始当初の背景

In vivo におけるインスリン分泌細胞の再生にあたり、マウス肝組織に、Pdx-1, NeuroD, MafA の 3 遺伝子を導入することによって細胞様組織が誘導可能なことが報告されているが、そのインスリン産生は一過性かつ、発現量も不十分で、実用化に向けて改良すべき点が多い(Kaneto H et al, J Biol Chem. 2005)。ヒト糖尿病治療に応用可能なインスリン産生細胞の獲得に向けては、新生細胞が、(1)血糖値を下げることの出来る十分量かつ持続的なインスリンを産生し、かつ(2)血糖値の増減に生理的に反応して(3)インスリンのみを発現する、特徴を持つことが求められる (Borowiak M et al, Curr Opin Cell Biol. 2009)。我々は、以前より、細胞の分化決定における大 Maf 群転写因子の機能解析を行ってきたが、その研究の中で、MafA がインスリン陽性細胞に特異的に発現しており、インスリン転写や、Glut2 遺伝子等の発現を介して、細胞の成熟を促進的に作用することを明らかにした(Zhang C et al. Mol Cell Biol. 2005)。生後 4-6 週で、MafA 欠損マウスが、耐糖能異常を示すことと合わせ、MafA 遺伝子による細胞の成熟過程が、細胞の機能維持および全身の糖代謝調節に重要であることを示している。一方で、アメリカの Stain らの研究グループは、MafB が、MafA に先行して、膵臓に発現し、胎生期の細胞の分化に寄与することを明らかにした(Artner I et al, Diabetes. 2010)。このことは、大 Maf 群転写因子が、細胞のみならず、内分泌前駆細胞からの細胞の細胞分化に寄与することを示唆するが、我々の研究グループでも、胎生 18.5 日目における MafA/MafB の 2 重欠損マウスを解析したところ、インスリン・グルカゴン転写がほぼ消失することが明らかとなった。MafB 単独欠損マウスに認められる内分泌細胞の分化障害が比較的軽度であること (Artner I et al, Proc Natl Acad Sci USA. 2007)と合わせ、これらは、大 Maf 群転写因子が、内分泌前駆細胞からの細胞の細胞分化を協調的に促進することを強く示唆する。膵内分泌細胞は、共通の Ngn3 陽性前駆細胞から分化する (Gradwohl G et al, Proc Natl Acad Sci USA. 2000)ため、MafA と MafB の機能差を明らかにし、その前駆細胞の分化および細胞運命の決定機構を明らかにすることは、Borowiak らが提唱する課題を克服し、より効果的で生理的な細胞の獲得に応用可能であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大 Maf 群転写因子の内分

泌細胞発生における役割を明らかにし、それを肝組織における細胞再生に応用することである。MafB 欠損マウスは、呼吸中枢異常より、新生仔のうちに死亡するため、成獣における MafB の機能解析が困難である (Moriguchi T et al, Mol Cell Biol. 2006)。そこで、MafB 遺伝子の膵内分泌細胞特異的欠損マウスの作製を含め、MIP-Luc マウス (マウスインスリンプロモーター・ルシフェラーゼ・トランスジェニックマウス)を使った新生細胞のスクリーニングと共に、以下の研究課題を明らかにする。

(1)膵細胞特異的 MafB 欠損マウスの作製とその表現系解析。

(2)生物発光イメージングを用いて、In vivo での細胞の可視化を可能にして、肝臓からの新生様細胞の定量的スクリーニング法の確立。

(3)発光イメージングによる様細胞のスクリーニング法を用いて、MafA と MafB 遺伝子の効果を比較し、どちらの遺伝子が、効率的に様細胞を誘導可能か明らかにする。

3. 研究の方法

(1)条件付き MafB 遺伝子欠損マウスの作製とその表現系解析

MafB は、MafA に先行して胎生 12.5 日より発現が誘導され、胎生期には、インスリン陽性細胞に MafA と共に発現し、生後 2-3 週間まで細胞に発現し、以後細胞に発現が限局することが明らかとなっている (Nishimura W et al, Dev Biol, 2006)。我々の予備的実験で、胎生期の MafA/MafB 二重欠損マウスでは、インスリン、グルカゴン転写がほぼ消失することが確認されたが、MafB 欠損マウスは、生後 24 時間以内に死亡するため、成獣における解析が困難である (Moriguchi T et al, Mol Cell Biol. 2006)。そこで膵内分泌細胞特異的な MafB 欠損マウスを作製することにより、成獣における MafB 遺伝子の役割を明らかにすることを試みた。

(2) In vivo imaging による新生様細胞の可視化技術の確立

IVIS スペクトラムは、マウス、ラット等の小動物の生体内からの発光や蛍光を、非侵襲的に繰り返し観察可能なイメージングシステムである。本研究では、マウス・インスリンプロモーター・ルシフェラーゼ・マウス (MIP-Luc マウス)を用いて、膵細胞の可視化を行った。さらに、この可視化技術が、肝臓での新生様細胞の可視化と定量化に、応用可能か検討を行った。一方で、MIP-Luc

マウスは、非膵臓領域への発光の漏れ込みがみられるため、さらに細胞特異的に発光を観察するために、インスリン1遺伝子領域を含む人工染色体(BAC)のインスリン1遺伝子をルシフェラーゼに置換した Ins1-Luc-BAC マウスを作製し、これまでの MIP-Luc マウスと比較した。

(3) マウス肝組織からのより効率的で生理的な細胞の産生方法の開発

前述の可視化技術を用いて、肝臓からの様細胞誘導に対する MafA と MafB の効果を比較した。さらに、Pdx1、NeuroD、MafA の組み合わせ、Pdx1、NeuroD、MafB の組み合わせを、それぞれ遺伝子導入を行い、ストレプトゾトシン誘導糖尿病モデルに対する治療効果判定、また肝臓の還流実験を行って、グルコース応答性の有無を確認した。

4. 研究成果

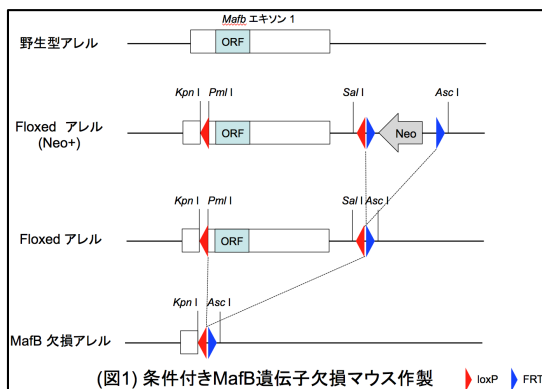
(1) 条件付き MafB 遺伝子欠損マウスの作製とその表現系解析

キメラマウスの作製。相同組み換えによって、Mafb 遺伝子領域を loxP 配列で挟んだ遺伝子改変 ES 細胞 (C57BL/6 マウス由来) を作製した。この ES 細胞を ICR マウスとアグリゲーションキメラマウスを作製し、仮親の子宮に移植した。

flox/+マウスの作製。得られたキメラマウスを野生型 C57BL/6 マウスと交配することで、生殖系列への移行を確認し、flox/+マウスの作製を行った。その後、Flpe マウスと交配し、ネオマイシン耐性遺伝子の排除を行った。

Cre 組換え酵素による flox Mafb アリルの切り出し。得られた flox/+マウスの floxed Mafb アリルが Cre 組換え酵素によって、有効に切り出されるか確認を行った。flox/+; Ayu1-Cre マウスを作製し、マウスゲノムを抽出、MafB 欠損アリルを特異的に認識可能なプライマーを用いた PCR を行って、Mafb 遺伝子が欠損するか判定を行った (図1)。

現在、細胞特異的 Cre 発現マウスと交配を行っている。また MafA 遺伝子欠損マウスとも交配することで、二重欠損マウスを作



製し、その表現系解析を行う。

(2) In vivo imaging による新生細胞の可視化技術の確立

IVIS スペクトラムは、マウス、ラット等の小動物の生体内からの発光や蛍光を、非侵襲的に繰り返し観察可能なイメージングシステムである。本研究では、マウス・インスリンプロモーター・ルシフェラーゼ・マウス (MIP-Luc マウス) を用いて、胎児期の膵細胞を可視化することに成功した。さらに、この可視化技術が、肝臓での新生細胞の可視化と定量化に、応用可能なことを明らかにした。一方で、MIP-Luc マウスは、非膵臓領域への発光の漏れ込みがみられるため、さらに細胞特異的に発光を観察するために、インスリン1遺伝子領域を含む人工染色体(BAC)のインスリン1遺伝子をルシフェラーゼに置換した Ins1-Luc-BAC マウスを作製し、これまでの MIP-Luc マウスと比較して、漏れ込みが認められないこと、さらに発光量が4倍程度増加することを明らかにした。

(3) マウス肝組織からのより効率的で生理的な細胞の産生方法の開発

Pdx1、NeuroD、MafA の組み合わせ (PDA) と、Pdx1、NeuroD、MafB の組み合わせ (PDB) を、それぞれ遺伝子導入を行って。前述の可視化技術を用いて、インスリン遺伝子誘導効率の比較を行った。生物発光は、PDA、PDB とともに遺伝子導入後、10-14 日間持続し、その発光ピークは導入後3日目であった。また、シグナル強度は PDA の方が、有意に増強されていた。一方で、ストレプトゾトシン誘導糖尿病モデルに対する治療効果判定を行った所、PDA は遺伝子導入後約4週間、PDB は約2週間の治療効果が認められた。さらに、PDA、PDB 遺伝子導入後の、肝臓の還流実験を行ったが、両群ともに、グルコース応答性は確認出来なかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Bioluminescence imaging of cells and intrahepatic insulin gene activity under normal and pathological conditions. Katsumata T, Oishi H, Sekiguchi Y, Nagasaki H, Daassi D, Tai PH, Ema M, Kudo T, Takahashi S. PLoS One. 2013;8(4):e60411. doi: 10.1371/journal.pone.0060411. 査読有

A bacterial artificial chromosome transgene with polymorphic Cd72

inhibits the development of glomerulonephritis and vasculitis in MRL-Fas^{lpr} lupus mice. Oishi H, Tsubaki T, Miyazaki T, Ono M, Nose M, Takahashi S. *J Immunol*. 2013 Mar 1;190(5):2129-37. doi: 10.4049/jimmunol.1202196 査読有り

Delayed cutaneous wound healing in Fam129b/Minerva-deficient mice. Oishi H, Itoh S, Matsumoto K, Ishitobi H, Suzuki R, Ema M, Kojima T, Uchida K, Kato M, Miyata T, Takahashi S. *J Biochem*. 2012 Dec;152(6):549-55. doi: 10.1093/jb/mvs100 査読有り

Noninvasive monitoring of β -cell mass and fetal β -cell genesis in mice using bioluminescence imaging. Sekiguchi Y, Owada J, Oishi H, Katsumata T, Ikeda K, Kudo T, Takahashi S. *Exp Anim*. 2012;61(4):445-51. 査読有り

Dampened ERK signaling in hematopoietic progenitor cells in rheumatoid arthritis. Colmegna I, Pryshchep S, Oishi H, Goronzy JJ, Weyand CM. *Clin Immunol*. 2012 Apr;143(1):73-82. doi: 10.1016/j.clim.2012.01.007 査読有り

The E3 ubiquitin ligase activity of Trip12 is essential for mouse embryogenesis. Kajiro M, Tsuchiya M, Kawabe Y, Furumai R, Iwasaki N, Hayashi Y, Katano M, Nakajima Y, Goto N, Watanabe T, Murayama A, Oishi H, Ema M, Takahashi S, Kishimoto H, Yanagisawa J. *PLoS One*. 2011;6(10):e25871 doi: 10.1371/journal.pone.0025871 査読有り

〔学会発表〕(計9件)

大石 久史, 勝又 斗紀夫, Tai Peihan, Jung Yunshin, 関口 有佳里, 高橋 智, 生物発光イメージングを用いた膵細胞および肝内インスリン遺伝子発現の可視化 第119回日本解剖学会総会・全国学会大会、2014年3月29日、自治医科大学キャンパス、栃木県下野市

大石 久史, 勝又 斗紀夫, 関口 有佳里, Daassi D, 依馬 正次, 工藤 崇, 高橋 智, 生物発光イメージングを用いた膵細胞および肝内インスリン遺伝子発現の可視化 第60回日本実験動物学会総会、2013年5月15日、つくば国際会議場、

茨城県つくば市

大石 久史, 工藤 崇, 高橋 智, 膵内分泌細胞発生・分化における大Maf群転写因子の役割とその応用、第118回日本解剖学会総会・全国学会大会、2013年3月29日、サンポートホール高松・かがわ国際会議場、香川県高松市

Katsumata T, Oishi H, Sekiguchi Y, Nagasaki H, Daassi D, Ema M, Kudo T, Takahashi S. In vivo monitoring of pancreatic cell mass and intrahepatic insulin gene activity in ins1-luc BAC transgenic mice by bioluminescence imaging. 第35回日本分子生物学会、2012年12月13日、福岡国際会議場、福岡県福岡市

Nagasaki H, Oishi H, Katsumata T, Sekiguchi Y, Kudo T, Takahashi S. Bioluminescence monitoring of intrahepatic beta-like cells show distinct roles for transcription factors, MafA and MafB on the generation of insulin-producing/secreting cells in vivo. 第35回日本分子生物学会、2012年12月11日、福岡国際会議場、福岡県福岡市

Oishi H, Katsumata T, Sekiguchi Y, Nagasaki H, Ema M, Takahashi S. Bioluminescence imaging of novel BAC transgenic mice expressing luciferase reporter under the control of the insulin locus. 第72回米国糖尿病学会、2012年6月10日、フィラデルフィアコンベンションセンター、米国フィラデルフィア

Sekiguchi Y, Oishi H, Katsumata T, Kudo T, Takahashi S. In vivo monitoring of intrahepatic insulin gene activity by bioluminescence imaging. 第34回日本分子生物学会、2011年12月13日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

Katsumata T, Oishi H, Sekiguchi Y, Ema M, Kudo T, Takahashi S. Bioluminescence imaging of novel BAC transgenic mice expressing luciferase reporter gene under the control of the insulin locus. 第34回日本分子生物学会、2011年12月13日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

Oishi H, Ogata K, Kudo T, Takahashi S. Role of Large Maf transcription factors in pancreatic endocrine cell development.

3rd Beta Cell Workshop, 2011 年 10 月 25
日、LO-Skolen、デンマーク

〔その他〕

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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大石 久史 (OISHI, HISASHI)
筑波大学・医学医療系・准教授
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