

膵 α 細胞を制御する分子メカニズムの解明 ～将来の新しい糖尿病治療法の開発を目指して～

群馬大学生体調節研究所 代謝シグナル研究展開センター
北村 忠弘

1. はじめに

2型糖尿病では、膵 α 細胞におけるグルカゴン分泌抑制の障害が認められる¹⁾。即ち、通常、食後にグルカゴン分泌が低下するが、2型糖尿病では、この低下反応が障害されている。しかしながら、そのメカニズムについては不明である。本研究課題においては、グルカゴン遺伝子の転写を調節する可能性がある2つの転写因子、ATF3とFoxO1に着目して研究を行った。ATF3は酸化ストレスなどで急性に発現が誘導されるストレス応答タンパクであり、 β 細胞においてはアポトーシスを誘導することで、 β 細胞量を調節していることが報告されているが^{2, 3)}、 α 細胞におけるATF3の生理的役割についての報告は少ない⁴⁾。一方、FoxO1はインスリンシグナル下流で制御されており、申請者は種々のインスリン標的臓器においてFoxO1がインスリンの代謝作用に関わっていることを報告してきた⁵⁻⁸⁾。また、申請者は以前に β 細胞においてはFoxO1が高グルコースによる酸化ストレス依存性に核に移行し、機能することを報告している⁹⁾。最近、 α 細胞におけるインスリンシグナルがグルカゴン分泌調節に重要であること¹⁰⁾、さらに α 細胞においてFoxO1はグルカゴン遺伝子の転写を調節することが報告された¹¹⁾。そこで、本研究課題においては、 α 細胞におけるATF3とFoxO1の役割を、培養 α 細胞を用いたvitroの系で高グルコースと酸化ストレスの面から検討した。また、 α 細胞特異的な遺伝子改変動物を作製し、解析することで α 細胞におけるATF3とFoxO1の役割をvivoの系でも検証することを目的とした。本研究の成果を元に α 細胞機能が障害される分子メカニズムが明らかとなり、新しいタイプの2型糖尿病薬の開発につながることを期待している。

2. 方法と結果

(1) α TC細胞におけるグルコース濃度の変化とATF3強制発現による影響の検討

まず、膵 α 細胞の細胞株である α TC細胞を種々のグルコース濃度(0, 1, 5, 25mM)で培養後、グルカゴンのmRNAレベルとグルカゴンプロモーター活性を定量RT-PCR法とルシフェラーゼアッセイを用いて解析した所、低グルコース濃度によってグルカゴンのmRNAレベルとグルカゴンプロモーター活性が上昇することが明らかとなった。次に同様の条件でATF3の発現レベルを調査した所、ATF3も低グルコース濃度で増加していた。また、FLAG-tagを付加したATF3を α TC細胞にトランスフェクションし、グルコース濃度依存性に、核—細胞質への移行が起こるかを、FLAG抗体を用いた細胞免疫染色により検討したが、ATF3の有意な細胞内移行は認められなかった。さらに、アデノウイルス発現系を用いて、 α TC細胞にATF3を過剰発現させた際の、グルカゴン発現量とグルカゴンプロモーター活性を検討した。ATF3の発現量依存性にグルカゴンプロモーター活性は上昇したが、定量RT-PCR法を用いた解析ではグルカゴンmRNAの発現量は変化しなかった。

(2) 2型糖尿病モデル動物の α 細胞における ATF3 と FoxO1 の解析

膵臓における ATF3 の発現パターンに関しては、意見が分かれていた。Hai らのグループでは ATF3 はラ氏島 β 細胞に発現していると報告し、実際に ATF3 欠損マウスでは β 細胞のアポトーシスが減少し、インスリン分泌能が向上することを報告している (Zmuda EJ, *Diabetologia*, 1438, 2010)。一方で Steiner らのグループは ATF3 がラ氏島内では α 細胞に特異的に発現すると報告している (Wang J, *PNAS*, 12660, 2003)。この違いがマウスの遺伝子背景の違いによるものか、使用した抗体の違いによるものかは不明であった。そこで我々は市販されている異なる3種類の抗体 (Santa-Cruz:C-19, Santa-Cruz:H-90, abcam:70005) を用いて、膵臓における ATF3 の発現パターンを調べた。野生型マウスの膵臓切片において、これらの ATF3 抗体とインスリン、あるいはグルカゴン抗体との2重免疫染色を施行した所、C-19 抗体では ATF3 はグルカゴンと共染色したが、インスリンとは共染色しなかった。一方、H-90 抗体と abcam 抗体では ATF3 はインスリンとグルカゴンの両方と共染色した。また、C-19 抗体では ATF3 は細胞質優位に染色されており、H-90 と abcam 抗体では核に優位に発現が確認された。これらの結果から、ATF3 は染色に用いる抗体によって膵臓における発現パターンが異なって解釈される可能性が示唆された。一方、これらの抗体を用いて、高脂肪食飼育マウスと db/db マウスのラ氏島細胞における ATF3 と FoxO1 の発現レベルを、組織免疫染色を用いて検討したが、コントロールマウスと比べて有意な差は認められなかった。また、これらのマウスからラ氏島を単離し、定量 RT-PCR を用いて ATF3 と FoxO1 の mRNA 量を解析したが、やはり有意な差は認められなかった。

(3) α 細胞特異的 ATF3 ノックアウトマウスと FoxO1 ノックアウトマウスの作成と解析

α 細胞における ATF3 の生理的役割を vivo で明らかにする為に、Glucagon-Cre マウス (ジュネーブ大学の Herrera Edlund 教授より供与) と ATF3 flox マウス (東京医科歯科大学の北嶋教授より供与)、あるいは FoxO1 flox マウス (ハーバード大学の Roland Depinho 教授より供与) を交配し、 α 細胞特異的 ATF3 ノックアウトマウスと α 細胞特異的 FoxO1 ノックアウトマウスを作成した。これらのマウスの血糖値 (空腹時血糖と随時血糖共に) は正常範囲であった。次に、糖負荷テストを行った所、 α 細胞特異的 ATF3 ノックアウトマウスと α 細胞特異的 FoxO1 ノックアウトマウスの両方で耐糖能に変化はなかった。さらに、インスリン負荷テストを施行したが、やはり両方のノックアウトマウスでコントロールと比べて有意な差は認められなかった。しかしながら、今回解析したマウスの匹数が少ない為、現在、さらに α 細胞特異的 ATF3 ノックアウトマウスと FoxO1 ノックアウトマウスの匹数を増やして検討中である。また、これらのマウスの血清グルカゴン値と血清インスリン値、さらに膵臓の組織学的解析に関しても現在検討中である。

3. 考察

今回の培養細胞を用いた解析からは、 α 細胞における ATF3 の発現レベルはグルコース濃度で調節されていることが示されたが、ATF3 の細胞内局在に関しては明らかな影響は確認できなかった。また、ATF3 は α 細胞においてグルカゴン遺伝子の転写を直接調節する可能性が示唆された。これまで意見が分かれていた膵臓における ATF3 の発現パターンに関しては、使用する抗体によって染色性が異なることが明らかとなり、今後は異なる3種類の抗体を用いて解析結果を確認する必要があると思われた。また、高脂肪食飼育マウスや db/db マウスといった2型糖尿病モデルマウスの α 細胞において、ATF3 と FoxO1 の発現に明らかな差は認められず、糖尿病病態との関わりについては明らかにならなかった。一方、 α 細胞特異的 ATF3 ノックアウトマウスと FoxO1 ノックアウトマウスの解析の結果、血糖値 (空腹時血糖と随時血糖共に)、糖負荷テスト、インスリン耐性試験の全てにおいて有意な変化を認めておらず、in vivo における ATF3 と FoxO1 の α 細胞での生

理作用についても明らかにできなかった。ATF3 と FoxO1 は α 細胞においてグルカゴンの遺伝子転写調節を介して血糖値のコントロールに関与している可能性が示唆されるが、これまでのところは糖代謝調節との関係について不明のままである。今後、さらに α 細胞における ATF3 と FoxO1 の機能について検討を行っていく予定である。最後になりましたが、本研究課題に対して助成をして頂きました公益財団法人、アステラス病態代謝研究会に深謝致します。

4. 参考文献

1. Muller, W.A., Faloon, G.R., Aguilar-Parada, E., and Unger, R.H. Abnormal alpha-cell function in diabetes. Response to carbohydrate and protein ingestion. *N Engl J Med*, 283, 109-115 (1970).
2. Hartman, M.G., Lu, D., Kim, M.L., Kociba, G.J., Shukri, T., Buteau, J., Wang, X., Frankel, W.L., Guttridge, D., Prentki, M., et al. Role for activating transcription factor 3 in stress-induced beta-cell apoptosis. *Mol Cell Biol*, 24, 5721-5732 (2004).
3. Zmuda, E.J., Qi, L., Zhu, M.X., Mirmira, R.G., Montminy, M.R., and Hai, T. The roles of ATF3, an adaptive-response gene, in high-fat-diet-induced diabetes and pancreatic beta-cell dysfunction. *Mol Endocrinol*, 24, 1423-1433 (2010).
4. Wang, J., Cao, Y., and Steiner, D.F. Regulation of proglucagon transcription by activated transcription factor (ATF) 3 and a novel isoform, ATF3b, through the cAMP-response element/ATF site of the proglucagon gene promoter. *J Biol Chem*, 278, 32899-32904 (2003).
5. Kitamura, T., Nakae, J., Kitamura, Y., Kido, Y., Biggs, W.H., 3rd, Wright, C.V., White, M.F., Arden, K.C., and Accili, D. The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic beta cell growth. *J Clin Invest*, 110, 1839-1847 (2002).
6. Kitamura, T., Feng, Y., Kitamura, Y.I., Chua, S.C., Jr., Xu, A.W., Barsh, G.S., Rossetti, L., and Accili, D. Forkhead protein FoxO1 mediates Agrp-dependent effects of leptin on food intake. *Nat Med*, 12, 534-540 (2006).
7. Kitamura, T., Kitamura, Y.I., Funahashi, Y., Shawber, C.J., Castrillon, D.H., Kollipara, R., DePinho, R.A., Kitajewski, J., and Accili, D. A Foxo/Notch pathway controls myogenic differentiation and fiber type specification. *J Clin Invest*, 117, 2477-2485 (2007).
8. Kitamura, T., Kitamura, Y.I., Kobayashi, M., Kikuchi, O., Sasaki, T., Depinho, R.A., and Accili, D. Regulation of pancreatic juxtaductal endocrine cell formation by FoxO1. *Mol Cell Biol*, 29, 4417-4430 (2009).
9. Kitamura, Y.I., Kitamura, T., Kruse, J.P., Raum, J.C., Stein, R., Gu, W., and Accili, D. FoxO1 protects against pancreatic beta cell failure through NeuroD and MafA induction. *Cell Metab*, 2, 153-163 (2005).
10. Kawamori, D., Kurpad, A.J., Hu, J., Liew, C.W., Shih, J.L., Ford, E.L., Herrera, P.L., Polonsky, K.S., McGuinness, O.P., and Kulkarni, R.N. Insulin signaling in alpha cells modulates glucagon secretion in vivo. *Cell Metab*, 9, 350-361 (2009).
11. McKinnon, C.M., Ravier, M.A., and Rutter, G.A. FoxO1 is required for the regulation of proglucagon gene expression by insulin in pancreatic alphaTC1-9 cells. *J Biol Chem*, 281, 39358-39369 (2006).