

## Banyu Foundation Research Grant 2012—生活習慣病領域—

## 研究成果報告書(最終) &lt;概要&gt;

所 属	群馬大学生体他調節研究所 代謝シグナル解析分野
氏 名	小林雅樹
研究テーマ	膵α細胞における転写因子 FoxO1 の生理機能の解明

- ・ 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- ・ 概要の構成は自由とするが、研究目的、手法、成果など、一般の方にもわかりやすくすること。
- ・ 枚数は1ページにまとめること。(図表、写真などの添付を含む)

## &lt;目的&gt;

糖尿病における膵α細胞の機能障害のメカニズムを明らかにするため、本研究課題ではインスリンシグナリングの下流に位置する転写因子 FoxO1 の膵α細胞における生理機能を行った。

## &lt;研究手法&gt;

In vivo の解析では、膵α細胞特異的恒常的活性型 FoxO1 ノックインマウス( $\alpha$ -FoxO1-KI マウス)と、膵α細胞特異的 FoxO1 ノックアウトマウス( $\alpha$ -FoxO1 KO マウス)の作製と表現型解析を行った。血漿グルカゴンの測定は、グルカゴン N 末端抗体と C 末端抗体を用いた新規開発サンドイッチ ELISA(未発表)により行った。

In vitro の解析では、マウスプログルカゴン遺伝子プロモーターへの FoxO1 の結合についてクロマチン免疫沈降法による解析を行うとともに、恒常的活性型 FoxO1 のトランスフェクションによるプログルカゴン遺伝子の転写活性の変化をルシフェラーゼアッセイにより解析した。

## &lt;結果と考察&gt;

本研究課題において血漿中のグルカゴン測定を行うにあたり、現行のグルカゴンの測定系(競合法 RIA, Glucagon RIA kit, Millipore 製)は感度が低く、マウスを用いた In vivo での解析は困難であった。加えて競合法のグルカゴンイムノアッセイは反応特異性が低く、グルカゴン以外の分子を同時に検出してしまう問題があった。そのため申請者は従来の測定系に比べ、反応特異性が高く高感度のグルカゴンサンドイッチ ELISAを開発した。この新規開発測定系を用いて  $\alpha$ -FoxO1 KI マウス(約 16 週齢)の In vivo の解析を行ったところ、随時血糖値と血中グルカゴン濃度の有意な高値が認められた。この時期の膵臓においては、膵α細胞量にコントロールマウスとの差は認められなかった。これに対し、 $\alpha$ -FoxO1 KO マウスはメスにおいて、インスリン投与による低血糖からの回復が有意に遅かった。成体の膵α細胞におけ FoxO1 は、食事負荷や低血糖に伴うグルカゴン分泌を促進させる役割を果たしていると考えられる。さらに、 $\alpha$ -FoxO1 KI マウスは加齢(生後 1 年以上)により空腹時血糖値が有意に高くなり、このときの血中グルカゴン濃度も有意に高いものであった。さらに、インスリン負荷試験の結果では、 $\alpha$ -FoxO1 KI マウスの低血糖からの回復は有意に早いものであった。加齢個体においては、 $\alpha$ -FoxO1 KI マウスの膵α細胞量はコントロールマウスより有意に大きいものであった。FoxO1 は成体の膵α細胞量の調節にも関わっており、膵α細胞量が大きくなることで、空腹時の血中グルカゴン濃度の増加に伴い血糖値も高くなり、インスリン投与による低血糖からの回復も早くなったと考えられる。以上より、成体の膵α細胞における FoxO1 は、食事負荷や低血糖に伴うグルカゴン分泌を促進させる役割を果たしているとともに、膵α細胞量の調節に関わっていることが示唆される。

In vitro の解析では、 $\alpha$ T1.6 細胞を用いた、マウスプログルカゴンプロモーターの約 1.5kbp の領域のうち、転写開始点より上流約 1.1 キロの位置の領域にて、FoxO1 の特異的な結合をクロマチン免疫沈降により検出した。一方で、ルシフェラーゼアッセイの結果では、恒常的活性型 FoxO1 のトランスフェクションによるプログルカゴン遺伝子の転写活性の増加は認められなかった。FoxO1 によるプログルカゴン遺伝子の転写調節には他の共役因子が必要である可能性が考えられる。



2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。</li> <li>・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。</li> <li>・ 国内外を問わない。</li> <li>・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。</li> </ul>		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2013年10月25日	第38回日本比較内分泌学会大会、小林雅樹、菊池司、佐々木勉、北村忠弘、膵α細胞特異的 FoxO1 遺伝子改変マウスの表現型解析
2		
3		
4		
3. 投稿、発表予定		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	2014年 秋	雑誌未定、グルカゴン測定系の開発・評価についての論文投稿予定
2	2014年 11月	第39回日本比較内分泌学会
3	2015年 夏	雑誌未定、膵α細胞特異的 FoxO1 遺伝子改変マウスの表現型について論文投稿予定
4		