

機関番号：31201

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590312

研究課題名 (和文) インスリン産生膵β細胞の発生・分化、機能における糖転移酵素 EXTL3 の関与

研究課題名 (英文) Reduced β-cell proliferation and impaired glucose tolerance in pancreatic β-cell specific *Ext13* knockout mice.

研究代表者

那谷 耕司 (NATA KOJI)

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号：90202233

研究成果の概要 (和文) : EXTL3 はへパラン硫酸の生合成に関与する糖転移酵素である。本研究では膵β細胞特異的に EXTL3 を欠失したマウスを作製した。このマウスでは膵β細胞の増殖能が低下しており、ランゲルハンス島に特徴的なマントル・コア構造が認められなかった。またインスリン分泌が低下しており、耐糖能異常が認められた。以上の結果から、EXTL3 が合成するへパラン硫酸が、膵β細胞の増殖、インスリン分泌機能において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文) : EXTL3 functions as a glycosyltransferase involved in heparan sulfate proteoglycans biosynthesis. We generated pancreatic β-cell specific *Ext13* knockout (β*Ext13*KO) mice. In β*Ext13*KO mice at 2 - 8 weeks old, the β-cell proliferation activity was decreased and histological examination of pancreatic islets revealed an atypical organization. β*Ext13*KO mice at 8 weeks old showed glucose intolerance coupled to impaired insulin secretion upon glucose challenge. These data indicate that heparan sulfate plays important role(s) in β-cell proliferation and the mechanism of insulin secretion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生化学・糖尿病学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医学

キーワード：膵β細胞, 糖尿病, 糖鎖, へパラン硫酸, 糖転移酵素, EXTL3, ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

真核細胞に存在するタンパク質の 50%以上は糖鎖が付加されていると考えられ、多く

のタンパク質が糖鎖の付加により機能変化を来すことから、糖鎖生物学が重要視されてきた。近年、糖鎖の異常が癌、糖尿病、肝炎、

肺気腫、感染症、筋神経疾患など多くの病気の成因に関わることが明らかになり、糖鎖生物学研究の医学への貢献が期待されている。

EXTL3 は遺伝性多発性外骨腫の原因遺伝子である EXT のファミリーとして分離された、ヘパラン硫酸の生合成に関与する糖転移酵素である。EXTL3 は α 1,4-N-acetylglucosaminyltransferase I と II の両方の活性を有しており、ヘパラン硫酸の糖鎖骨格の開始と伸長の両方に関与する重要な酵素である。研究代表者らは膵 β 細胞における EXTL3 の役割について解析するために EXTL3 を全身で欠損したマウスを作製したが、EXTL3 全身欠損マウスは胎齢 7.5-8.5 日の原腸形成時期に死亡することから、膵 β 細胞の発生・分化、機能における EXTL3 の役割について解析することが不可能であった。

2. 研究の目的

本研究では、Cre-loxP システムを用いて膵 β 細胞特異的に EXTL3 遺伝子を欠失したマウスを作製し、膵 β 細胞の発生・分化、機能における EXTL3 の役割を明らかにするとともに、膵 β 細胞特異的 EXTL3 欠損マウスを糖尿病モデル動物として開発・利用する。

3. 研究の方法

- (1) 研究代表者が作製した EXTL3 遺伝子の一方の対立遺伝子に loxP 配列を有するヘテロ変異マウスと、膵 β 細胞特異的に Cre レコンビナーゼを発現するマウスを交配することにより、膵 β 細胞特異的に EXTL3 遺伝子を欠失したマウスを作製する。
- (2) 膵 β 細胞特異的 EXTL3 欠損マウスの膵ランゲルハンス島の形態を発生の時期を追って観察することにより、膵 β 細胞の発生・分化における EXTL3 の役割を解明する。
- (3) 膵 β 細胞特異的 EXTL3 欠損マウスの機能、増殖能を解析することにより、膵 β 細胞の機能維持における EXTL3 の役割を解明する。

4. 研究成果

- (1) 膵 β 細胞特異的に EXTL3 遺伝子を欠失したマウスの作製

膵 β 細胞特異的に Cre レコンビナーゼを発現するマウスと EXTL3 遺伝子の一方の対立遺伝子に loxP 配列を有するヘテロ変異マウスとを交配していくことにより、EXTL3 遺伝子内に loxP 配列が挿入された変異遺伝子をホモに持ち、膵 β 細胞で Cre レコンビナーゼを発現するマウスを得た。このマウスでは膵 β 細胞特異的に EXTL3 が欠失することになる。EXTL3 の欠失は単離膵 β 細胞の Southern blot, RT-PCR, Western blot 解析、膵 β 細胞の免疫組織染色により確認した。

膵 β 細胞特異的 EXTL3 欠損マウスの膵ランゲルハンス島を抗ヘパラン硫酸抗体と抗 Cre-recombinase 抗体により二重染色すると、抗 Cre-recombinase 抗体で染色される細胞は抗ヘパラン硫酸抗体で染色されなかった。また、Cre-recombinase (+)/ヘパラン硫酸 (-) の細胞は抗インスリン抗体で染色されたことから、EXTL3 が欠失した膵 β 細胞ではヘパラン硫酸が合成されていないことが確認された。

- (2) 膵 β 細胞特異的 EXTL3 欠損マウスの膵ランゲルハンス島の形態の解析

膵 β 細胞特異的 EXTL3 欠損マウスの膵ランゲルハンス島の形態を、ヘマトキシリン・エオジン染色、抗インスリン抗体を用いた免疫染色により胎児期から成獣になるまで時期を追って観察したところ、2-8 週齢の EXTL3 欠損マウスではランゲルハンス島あたりの β 細胞の比率が有意に減少しており、ランゲルハンス島に特徴的なマントル・コア構造も認められなかった。また 2 週齢の EXTL3 欠損マウスでは膵 β 細胞の増殖能がコントロールマウスの 29% に低下していた。

- (3) 膵 β 細胞特異的 EXTL3 欠損マウスの膵 β 細胞機能の解析

膵 β 細胞特異的 EXTL3 欠損マウスの血糖値、血中インスリン値を週齢を追って調べたところ、随時血糖値・インスリン値、空腹時血糖値・インスリン値ともにコントロールのマウスとは有意な差は認められなかった。

一方、8-9 週齢のマウスを用いて耐糖能試験を行ったところ、膵 β 細胞特異的 EXTL3 欠損マウスではインスリン抵抗性については異常が認められなかったが、インスリン分泌が低下しており、耐糖能異常が認められた。また膵 β 細胞特異的 EXTL3 欠損マウスから単離したランゲルハンス島では、グルコース刺激、KCl 刺激のどちらにおいても、インスリン分泌の低下が認められた。

以上の結果から、EXTL3 が出生後の β 細胞増殖に重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに EXTL3 が膵 β 細胞のインスリン分泌機能においても重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

これまでの β 細胞研究は蛋白質を対象に進められており、ヘパラン硫酸と β 細胞の増殖・機能の関連について着目した研究は皆無であった。また糖尿病の 90% 以上を占める 2 型糖尿病の遺伝的素因としては多因子遺伝が想定されているが、その原因遺伝子についてはほとんど解明されていない。本研究により、ランゲルハンス島の形成、膵 β 細胞の機能におけるヘパラン硫酸の重要性が初めて明らかにされた。このことはランゲルハンス島・膵 β 細胞におけるヘパ

ラン硫酸の異常が糖尿病の要因となり得ることを意味しており、糖尿病研究にへパラン硫酸の異常という新たな観点をもたらすとともに、へパラン硫酸の合成に関与する酵素が糖尿病の新しい原因遺伝子となる可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Uruno A, Noguchi N, Matsuda K, Nata K, Yoshikawa T, Chikamatsu Y, Kagechika H, Harigae H, Ito S, Okamoto H, Sugawara A. All-trans retinoic acid and a novel synthetic retinoid tamibarotene (Am80) differentially regulate CD38 expression in human leukemia HL-60 cells: possible involvement of protein kinase C- δ . *J Leukoc Biol*. 査読有, 2011, in press.
- ② Zheng HC, Sugawara A, Okamoto H, Takasawa S, Takahashi H, Masuda S, Takano Y. Expression profile of the REG gene family in colorectal carcinoma. *J Histochem Cytochem*. 査読有, vol. 59, 2011, pp.106-115.
- ③ Takasawa S, Kuroki M, Nata K, Noguchi N, Ikeda T, Yamauchi A, Ota H, Itaya-Hironaka A, Sakuramoto-Tsuchida S, Takahashi I, Yoshikawa T, Shimosegawa T, Okamoto H. A novel ryanodine receptor expressed in pancreatic islets by alternative splicing from type 2 ryanodine receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, Vol.397, 2010, pp.140-145.
- ④ Zhou L, Zhang R, Wang L, Shen S, Okamoto H, Sugawara A, Xia L, Wang X, Noguchi N, Yoshikawa T, Uruno A, Yao W, Yuan Y. Up-regulation of REG I α accelerates tumor progression in pancreatic cancer with diabetes. *Int J Cancer*. 査読有, vol.127, 2010, pp.1795-1803.
- ⑤ Takahashi I, Noguchi N, Nata K, Yamada S, Kaneiwa T, Mizumoto S, Ikeda T, Sugihara K, Asano M, Yoshikawa T, Yamauchi A, Shervani NJ, Uruno A, Kato I, Unno M, Sugahara K, Takasawa S, Okamoto H, Sugawara A. Important role of heparan sulfate in the morphogenesis, β -cell proliferation, and insulin secretion of mouse pancreatic islets. *Biochem Biophys*

Res Commun. 査読有, vol.383, 2009, pp.113-118.

- ⑥ Yamauchi A, Takahashi I, Takasawa S, Nata K, Noguchi N, Ikeda T, Yoshikawa T, Shervani NJ, Suzuki I, Uruno A, Unno M, Okamoto H, Sugawara A. Thiazolidinediones inhibit REG I α gene transcription in gastrointestinal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, vol.379, 2009, pp.743-748.
- ⑦ Noguchi N, Yoshikawa T, Ikeda T, Takahashi I, Shervani NJ, Uruno A, Yamauchi A, Nata K, Takasawa S, Okamoto H, Sugawara A. FKBP12.6 disruption impairs glucose-induced insulin secretion. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, vol.371, 2008, pp.735-740.

[学会発表] (計 30 件)

- ① Takahashi I, Ohashi K, Shervani NJ, Nata K. Contribution of heparan sulfate fine structure to Insulin secretion. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 平成 22 年 12 月 9 日, 神戸
- ② Shervani NJ, Takahashi I, Ohashi K, Noguchi N, Okamoto H, Takasawa S, Sugawara A, Nata K. 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会, 平成 22 年 5 月 29 日, 岡山
- ③ Kaneiwa T, Yamada S, Sugahara K, Takahashi I, Noguchi N, Nata K, Okamoto H, Sugawara A. Structural characterization of heparan sulfate in the Ext13 knockout mice and the pancreatic β -cell specific Ext13 knockout mice. 25th International Carbohydrate Symposium. August 2. 2010. Tokyo
- ④ Yoshikawa T, Takayanagi S, Noguchi N, Uruno A, Okamoto H, Sugawara A, Yanai K. Role of heparan sulfate in glucose-induced insulin secretion in MIN6 cells. American Diabetes Association 70th Scientific Sessions. June 2. 2010. Orlando
- ⑤ Yoshikawa T, Takayanagi S, Noguchi N, Zhang D, Ariyama Y, Uruno A, Okamoto H, Sugawara A, Yanai K. Role of heparan sulfate in glucose-induced insulin secretion in mouse pancreatic β -cell line MIN6 cells. 16th World Congress of Basic and

- Clinical Pharmacology. July 20. 2010. Copenhagen
- ⑥ Yoshikawa T, Ikeda T, Sakai K, Noguchi N, Takahashi I, Shervani NJ, Uruno A, Yamauchi A, Sakai E, Onogawa T, Okabe M, Ando T, Kinouchi M, Miura K, Unno M, Emura T, Fujiwara M, Takasawa S, Okamoto H, Sugawara A. Predominant role of REG I α among the REG gene family in the proliferation of human colorectal adenocarcinoma. American Association for Cancer Research 100th Annual Meeting 2009. April 22. 2009. Denver
- ⑦ Kaneiwa T, Yamada S, Sugahara K, Takahashi I, Noguchi N, Nata K, Okamoto H, Sugawara A. Structural characterization of heparan sulfate in conventional and conditional Extl3-deficient mice. Hokkaido University-Mahidol University Joint Symposium. May 12. 2009. Sapporo
- ⑧ Uruno A, Noguchi N, Nata K, Yoshikawa T, Takahashi I, Shervani NJ, Chikamatsu Y, Kagechika H, Harigae H, Ito S, Okamoto H, Sugawara A. All-trans retinoic acid and a novel synthetic retinoid tamibarotene (Am80) differentially regulate CD38 expression in human leukemia HL-60 cells: possible involvement of protein kinase C- δ . The Endocrine Society 91st Annual Meeting. June 10-13. 2009. Washington, DC
- ⑨ Shervani NJ, Noguchi N, Ikeda T, Takahashi I, Yoshikawa T, Uruno A, Nata K, Takasawa S, Okamoto H, Sugawara A. Autoantibodies to REG family proteins in Japanese diabetes patients. 45th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes. September 29 - October 2. 2009. Vienna
- ⑩ Shervani NJ, Nata K, Noguchi N, Takahashi I, Ikeda T, Yamauchi A, Yoshikawa T, Uruno A, Takasawa S, Okamoto H, Sugawara A. Autoimmunity against REG family antigens in Japanese diabetes patients. The 20th World Diabetes Congress. October 18-22. 2009. Montreal
- ⑪ Shervani NJ, Nata K, Noguchi N, Takahashi I, Ikeda T, Ohashi K, Yoshikawa T, Uruno A, Takasawa S, Okamoto H, Sugawara A. Sera from Japanese diabetes patients show autoimmunity to REG family antigens. 第 82 回日本生化学会大会, 平成 21 年 10 月 23 日, 神戸
- ⑫ 池田崇之, 野口直哉, 吉川雄朗, 宇留野晃, 那谷耕司, 高澤 伸, 岡本 宏, 米倉秀人, 菅原 明. 2 型リアノジン受容体遺伝子には GG-AG 配列で切断されるイントロンが存在する. 第 82 回日本生化学会大会, 平成 21 年 10 月 23 日, 神戸
- ⑬ Takahashi I, Nata K, Noguchi N, Ikeda T, Sugihara K, Asano M, Yoshikawa T, Yamauchi A, Shervani NJ, Uruno A, Unno M, Takasawa S, Okamoto H, Sugawara A. Reduced β -cell proliferation and impaired glucose tolerance in β -cell specific Extl3 knockout mice. 44th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes. September 7-11. 2008. Rome
- ⑭ Yoshikawa T, Noguchi N, Ikeda T, Takahashi I, Shervani NJ, Uruno A, Yamauchi A, Nata K, Takasawa S, Okamoto H, Sugawara A. Impaired glucose-induced insulin secretion in FK506-binding protein 12.6-deficient mice. The American Diabetes Association 68th Scientific Sessions. June 8. 2008. San Francisco
- ⑮ 金岩知之, 山田修平, 菅原一幸, 高橋 巖, 野口直哉, 那谷耕司, 岡本 宏, 菅原 明. Extl3 ノックアウトマウスにおけるヘパラン硫酸の分析. 日本薬学会第 129 年会, 平成 21 年 3 月 26 日, 京都
- ⑯ 高橋 巖, 那谷耕司, 野口直哉, 池田崇之, 吉川雄朗, 山内晶世, Nausheen J. Shervani, 宇留野晃, 杉原一司, 浅野雅秀, 海野倫明, 高澤 伸, 岡本 宏, 菅原 明. 膵 β 細胞特異的糖転移酵素 Extl3 欠損マウスは β 細胞増殖能低下と耐糖能異常を生じる. 第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会, 平成 20 年 5 月 24 日, 東京
- ⑰ 吉川雄朗, 野口直哉, 池田崇之, 高橋 巖, Nausheen J. Shervani, 宇留野晃, 山内晶世, 那谷耕司, 高澤 伸, 岡本 宏, 菅原 明. FK506 結合蛋白質 12.6 ノックアウトマウスにおけるグルコース刺激インスリン分泌の低下. 第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会, 平成 20 年 5 月 23 日, 東京
- ⑱ 高橋 巖, 野口直哉, 那谷耕司, 山田修平, 金岩知之, 水本秀二, 池田崇之, 杉原一司, 浅野雅秀, 吉川雄朗, Nausheen J. Shervani, 宇留野晃, 海野倫明, 菅原一幸, 高澤 伸, 岡本 宏, 菅原 明. ヘパラン硫酸はマウス膵ランゲルハンス島の形態形成や β 細胞増殖, インスリン分泌機能に重要な役割を果たしている

る。第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会，平成 20 年 12 月 9 日，神戸

- ⑬ 高橋 巖，野口直哉，那谷耕司，山田修平，金岩知之，水本秀二，池田崇之，杉原一司，浅野雅秀，吉川雄朗，Nausheen J. Shervani，宇留野 晃，海野倫明，菅原一幸，高澤 伸，岡本 宏，菅原 明。
マウス膵ランゲルハンス島の形態形成やβ細胞増殖，インスリン分泌機能におけるヘパラン硫酸の重要性。第 20 回分子糖尿病学シンポジウム，平成 20 年 12 月 13 日，東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

那谷 耕司 (NATA KOJI)
岩手医科大学・薬学部・教授
研究者番号：90202233

(2) 研究分担者

菅原 明 (SUGAWARA AKIRA)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90270834

(3) 連携研究者

()

研究者番号：