

脂肪毒性下における small Maf 因子の膵 β 細胞調節機構

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 2型糖尿病における病態の主因は、インスリン抵抗性と膵 β 細胞の機能低下と考えられる。耐糖能が正常な肥満者では、膵 β 細胞量が増加し、インスリン抵抗性をインスリン分泌を増加させることで代償するが、膵 β 細胞量が減少すると耐糖能異常が出現する。2型糖尿病患者における膵 β 細胞量の経時的減少の主因は、糖毒性と脂肪毒性である。遊離脂肪酸などは膵島機能を障害し、高濃度の脂肪酸暴露はインスリン遺伝子の発現を低下させる。

インスリン遺伝子プロモーターに存在する C1/RIPE3b 領域 (Maf Responsive Element : MARE) に結合する転写因子 MafA は、large Maf 群に属し、膵 β 細胞特異的に発現する。その発現は短時間のグルコース刺激では増加し、長時間のグルコース刺激や酸化ストレス下では減少する。脂肪酸 (パルミチン酸) 暴露は、MafA mRNA の発現減少によりインスリンの発現を減少させる。

Small Maf 群には、分子量約 18kDa の相同性の高い MafF, MafG, MafK があり、転写活性化ドメインを欠如する。Small Maf は全身の多くの組織で発現し、酸化ストレス下で発現が誘導され、プロモーター上の ARE/StreB/EpRE 配列に結合し抗酸化物質の発現を誘導するが、膵 β 細胞における small Maf の発現や機能についてはこれまで明らかにされていない。

本研究では、高脂肪食負荷マウスの単離膵島を用いて small Maf 発現量を検討した。次に、膵 β 細胞株を用いて脂肪刺激下における各 small Maf mRNA の発現をリアルタイム PCR 法により評価し、レポーターアッセイにより脂肪刺激下のインスリンの発現を検討した。

【材料と方法と結果】 まず、肥満や脂質代謝異常を伴う 2型糖尿病モデルマウスとして高脂肪食を負荷したマウスを用い、生体内における血糖値と遊離脂肪酸、中性脂肪が上昇した状態において、高脂肪食群の単離膵島内の small Maf 発現が増加していることをウエスタンブロット法にて確認した。また、膵 β 細胞に対する糖毒性の影響を直接評価する目的で膵 β 細胞株を用いグルコース濃度を変え small Maf の発現を確認したが変化は認めず、糖毒性により発現が変化する MafA とは異なり、small Maf の発現調節に糖毒性は関与しないことが示唆された。

高脂肪食群の膵島細胞における現象は、脂肪毒性により引き起こされると仮説を立て、飽和遊離脂肪酸であるパルミチン酸を膵 β 細胞株に添加する実験を行った。これまでの small Maf に関する報告では、酸化ストレス物質である過酸化水素や生体異物への暴露によって、small Maf の転写促進が認められているが、MafF, MafK と細胞外ストレスについての報告はほとんどなく不明な点が多かった。このため MafF, MafG, MafK それぞれの発現の違いを確認する目的で、特異的なプライマーを設定した。ここではパルミチン酸の膵 β 細胞への純粋な影響を見るためにグルコース濃度は生理的濃度である 5.5mM に固定した。MafF, MafK の発現は mRNA レベルで増加し、パルミチン酸刺激を除去することにより発現増加が抑制された。

脂肪刺激により small Maf の核内移行によってその転写活性が調節されるか否かを検討した。細胞質成分と核抽出物に分離しウエスタンブロット法により解析した結果、脂肪刺激による small Maf 蛋白の細胞内局在に変化はなく、恒常的に核内に存在し、その発現が誘導されることを確認した。

インスリン遺伝子プロモーター上に存在する MARE を介して転写調節が行われているかを解析した。MIN6 細胞にインスリン遺伝子プロモーター領域の MARE を含んだ野生型ルシフェラーゼベクターと、small Maf として Flag-MafK または Mock を強制発現させルシフェラーゼ活性を測定したところ、Flag-MafK の導入により 4 分の 1 程度までインスリン転写活性が低下した。さらに、small Maf の MARE への結合を確認する目的で、Flag-MafK または Mock を強制発現させ抗 Flag 抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行ったところ、Flag-MafK を導入したサンプルでは MARE を含んだインスリンプロモーター領域が増幅されバンドが検出されたが、Mock を導入したサンプルではバンドが検出されなかった。

次に、small Maf によるインスリン遺伝子転写活性に対する影響を検討するため、インスリン遺伝子プロモーター領域の MARE を含むルシフェラーゼベクターを用い実験を行った。インスリン遺伝子転写活性を上昇する因子の一つとして MafA が挙げられるが、MafA は脂肪毒性によって発現が低下することが報告されているため、インスリン遺伝子転写活性を上昇させる他の因子として、Large Maf 群の一つである c-Maf を使用した。c-Maf 導入により誘導されたインスリン転写活性がパルミチン酸刺激により抑制される機序として、small Maf の発現増加が考えられた。以上より、膵β細胞において脂肪刺激下では、small Maf の発現が転写を介して増加し、インスリン転写活性を低下することが示唆された。

【考察】 膵β細胞にはインスリン発現を増加させる因子として MafA が存在し、2 型糖尿病の病態である酸化ストレスや脂肪毒性下では、その発現や安定性の低下が確認されている。一方、転写活性ドメインを欠きインスリン転写活性を低下させる small Maf も膵β細胞内に発現していることが確認され、脂肪毒性存在下でその発現が増加することから、MARE を介して両者が競合し、ストレスなどの細胞外環境に応じてインスリンの発現やβ細胞機能を調節している可能性が想定された。

本研究により、2 型糖尿病でみられる脂肪毒性に伴うインスリン発現の低下には small Maf が関与していることが示唆された。今後、膵β細胞内の転写因子 MafA と small Maf の相互作用をより詳細に解明することにより、2 型糖尿病の発症と進展への新たな病因解析が可能になり、2 型糖尿病の新規治療への発展が期待される。

【結果】 高脂肪食負荷マウスの膵島細胞では small Maf が増加していた。

膵β細胞株では、グルコース濃度による small Maf の発現には変化を認めないが、脂肪刺激によって MafF、MafK の mRNA 発現は増加した。また small Maf の蛋白発現は増加した。Small Maf は脂肪刺激により、恒常的に核内に存在した。

脂肪刺激によって増加した small Maf は、インスリンプロモーター領域の MARE を介して、インスリン遺伝子転写活性を低下させた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 畠 山 鎮 次
副 査 教 授 筒 井 裕 之

学 位 論 文 題 名

脂肪毒性下における small Maf 因子の膵 β 細胞調節機構

2型糖尿病患者における膵 β 細胞量の経時的減少の主因は、糖毒性と脂肪毒性である。遊離脂肪酸などは膵島機能を障害し、高濃度の脂肪酸暴露はインスリン遺伝子の発現を低下させることが知られている。

インスリン遺伝子プロモーターに存在する Maf Responsive Element : MARE に結合する転写因子 MafA は、膵 β 細胞特異的に発現する。Small Maf 群には相同性の高い MafF、MafG、MafK があり、転写活性化ドメインを欠如する。Small Maf は全身の多くの組織で発現し、酸化ストレス下で発現が誘導され、プロモーター上の ARE などの配列に結合し抗酸化物質の発現を誘導するが、膵 β 細胞における small Maf の発現や機能についてはこれまで明らかにされていない。

生体内における血糖値と遊離脂肪酸、中性脂肪が上昇した状態において、高脂肪食群の単離膵島内の small Maf 発現が増加していることを確認した。また、small Maf の発現調節に糖毒性は関与しないことが示唆された。パルミチン酸刺激により MafF、MafK の発現は mRNA レベルで増加し、パルミチン酸刺激を除去することにより発現増加が抑制された。脂肪刺激により核内移行によってその転写活性が調節されるか否かを検討し、蛋白の細胞内局在に変化はなくその発現が誘導されることを確認した。

MIN6 細胞に MARE を含んだ野生型ルシフェラーゼベクターと、Flag-MafK を強制発現させルシフェラーゼ活性を測定したところ、インスリン転写活性が低下した。抗 Flag 抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行い、Flag-MafK を導入したサンプルでは MARE を含んだインスリンプロモーター領域が増幅されバンドが検出された。small Maf によるインスリン遺伝子転写活性に対する影響を検討するため、インスリン遺伝子プロモーター領域の MARE を含むルシフェラーゼベクターを用い実験を行った。c-Maf 導入により誘導されたインスリン転写活性がパルミチン酸刺激により抑制される機序として、small Maf の発現増加が考えられた。以上より、膵 β 細胞において脂肪刺激下では、small Maf の発現が転写を介して増加し、インスリン転写活性を低下することが示唆された。

small Maf は脂肪毒性存在下でその発現が増加することから、MARE を介して MafA と競合し、ストレスなどの細胞外環境に応じてインスリンの発現や β 細胞機能を調節している可能性が想定された。今後、MafA と small Maf の相互作用をより詳細に解明することにより、2型糖尿病の発症と進展への新たな病因解析が可能になり、2型糖尿病の新規治療への発展が期待される。

学位公開発表における質疑応答は、畠山鎮次教授から脂肪刺激による small Maf 発現増加までの機序について、また、リポーターアッセイを使いインスリン遺伝子転写活性を small Maf 発現増加によって抑制する実験において c-Maf を使用した理由と実験結果についての説明、脂肪毒性として遊離脂肪酸以外に TG やスフィンゴミエリンなどで同様の反応

が起こるか、その他の large Maf(例えば c-Maf)は MARE に対して拮抗作用があるのではないかという質問があった。

次いで筒井裕之教授から β 細胞内で機能的にインスリン分泌を抑制するということがどういう意味をもつのか、また、small Maf を増加させることは糖尿病の治療に使えると思うか、small Maf による抗酸化メカニズム、ストレス応答についての質問があった。

最後に小池隆夫教授からパルミチン酸は脂肪毒性と同じと考えてよいのか、また、small Maf は large Maf と競合することによって MARE を介してインスリン遺伝子転写活性を調節しているという概念でよいか、数的なものではなく質的に MARE に与える small Maf、MafA の影響を検討しているか、インスリン分泌増加やがては β 細胞量低下は MafA と small Maf の競合だけで説明が出来るか、2 型糖尿病治療に対する治療展望についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は、現在報告されている事と自身の実験結果を引用し、質問に対してまた、small Maf の β 細胞内の機能について回答した。

この論文は、脂肪毒性下における膵 β 細胞内の small Maf の機能を解析したことで高く評価され、今後の 2 型糖尿病の病因解析や治療への応用として期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。