

# 論文の内容の要旨

論文題目

Role of UCP-2 Up-Regulation and Triglyceride Accumulation in Insulin Secretion in a  $\beta$ -Cell Lipotoxicity Model Overexpressing SREBP-1c

(SREBP-1c 過剰発現による  $\beta$  細胞の脂肪毒性モデルでのインスリン分泌における UCP-2 とトリグリセライド蓄積の役割)

氏 名 山 下 篤 行

2 型糖尿病は遺伝的素因と環境因子が合わさって発症する多因子病である。環境因子としては年齢、運動不足、肥満などがある。近年、特に肥満と 2 型糖尿病とのかわりが注目を集めており、末梢組織への脂肪の蓄積が 2 型糖尿病の発症・進展に関係があると考えられるようになってきている。膵  $\beta$  細胞においてもトリグリセライドの蓄積はグルコース応答性インスリン分泌の障害（脂肪毒性；Lipotoxicity）に関係があると考えられている。しかしながら、脂肪毒性によるグルコース応答性インスリン分泌の障害のメカニズムは明らかになっていない。そこで、膵  $\beta$  細胞の脂肪毒性におけるグルコース応答性インスリン分泌障害のメカニズムを理解するため、脂肪合成の調節因

子である sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c)の恒常活性型を培養豚β細胞株の INS-1 細胞にアデノウイルスベクターを用いて発現させ、SREBP-1c 過剰発現による脂肪毒性モデルを作成して検討を行なった。

アデノウイルスの感染による SREBP-1c の過剰発現はウエスタンブロットにより確認された。また、過剰発現した SREBP-1c の転写活性については SRE 領域をルシフェラーレポーター遺伝子組込んだルシフェラーゼアッセイにより確認された。次に、脂肪酸合成に関わる ACL, ACC, FAS, ACS などの遺伝子の発現を定量的リアルタイム PCR により検討したところ、SREBP-1c の過剰発現細胞では、それぞれコントロールの 3.8 倍、1.9 倍、16.4 倍、7.5 倍の発現の増加が確認された。また細胞内のトリグリセライド含量も SREBP-1c を組込んだアデノウイルスの感染量に依存して増加し、MOI 10 では 60%の増加が確認された。さらに、グルコース応答性インスリン分泌も SREBP-1c 過剰発現細胞で MOI 依存的に低下し、10 MOI では 42%の減少が確認された。また、SREBP-1c の過剰発現によって uncoupling protein-2 (UCP-2)遺伝子の発現量が 2 倍に増加することも確認された。

UCP-2 はミトコンドリアで生産された ATP を消費し、熱エネルギーに変化する役割が想定されている遺伝子である。そのため UCP-2 の発現増強によって細胞内の ATP が消費され、これによって起こる細胞内 ATP/ADP 比の減少が豚β細胞の脂肪毒性におけるグルコース応答性インスリン分泌障害の一因ではないかと考えられた。そこで、UCP-2 に対する small interfering RNA (siRNA)を作成し、細胞に導入して、UCP-2 の発現を抑制させる実験を行った。その結果、siRNA の導入により SREBP-1c 過剰発現細胞で UCP-2 遺伝子の発現の抑制が確認された。このとき、細胞内 ATP/ADP 比も増加し、グルコース応答性インスリン分泌も部分的に回復した。しかしながら、細胞内の

TG 含量には変化が認められなかった。

次に細胞内の TG 含量を減少させることにより脂肪毒性を解除できなかと考え、AMP-activated protein kinase (AMPK) のアゴニストである 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside (AICAR)を INS-1 細胞に添加する実験を行った。AICAR は AMPK をリン酸化して活性化し、次にその AMPK が ACC をリン酸化して不活性化することが知られている。ACC の不活性化によりマロニル-CoA が増加し、脂肪酸酸化が阻害される。

AICAR の添加により、SREBP-1c 過剰発現細胞の 1 mM グルコースまたは 10 mM グルコース条件での脂肪酸の酸化はそれぞれ、1.7 倍、2.6 倍に増加した。また、AICAR の添加によって、SREBP-1c 過剰発現細胞における細胞内の TG 含量が 33%減少することが確かめられた。また、AICAR の添加によって、SREBP-1c 過剰発現細胞におけるグルコース応答性インスリン分泌が部分的に回復することも確認された。このとき、SREBP-1c 過剰発現細胞での AMPK のリン酸化および ACC のリン酸化は、それぞれ 1.5 倍、1.7 倍に増加していた。また AICAR の添加によって UCP-2 の発現には影響が見られず、細胞内 ATP/ADP 比も変化しなかった。

これらのことから SREBP-1c は膵β細胞の脂肪毒性の発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、UCP-2 遺伝子の発現抑制や AMPK の活性化は、脂肪毒性による膵β細胞の機能障害の回復させるための有効なターゲットとなりうることを示唆された。