

論文内容の要旨

論文題目 糖尿病の発症機序における小胞体ストレス誘導性
アポトーシスに関する研究

指導教員 大内尉義 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成15年4月入学

医学博士課程

生殖発達加齢医学専攻

山口 潔

【目的】

MAP3Kファミリーに属する Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) は、酸化ストレスやサイトカインなどの細胞内外からの刺激を感知し、MAPKカスケードを活性化して、増殖、分化、アポトーシスなどのさまざまな生理応答を引き起こすことが知られる分子である。近年、ASK1は小胞体ストレスによるアポトーシスの誘導においても重要な役割を担っていることが明らかにされたが、その病態生理学的な役割については不明な点が多い。糖尿病モデルマウスとして知られる Akita マウスは、Insulin2 遺伝子の Cys96 の点変異をもち、膵β細胞のアポトーシスによる著しいβ細胞の減少が特徴である。変異型 Insulin2 タ

[別紙 1]

ンパク質は細胞外へ分泌されずに小胞体内に蓄積していき、それが強い小胞体ストレスとなって膵β細胞のアポトーシスが誘導される。そこで、Akita マウスの糖尿病発症における ASK1 の関与について検討した。

【方法と結果】

Akita マウス ($Ins2^{C96Y/WT}$) と ASK1 ノックアウトマウス ($ASK1^{-/-}$) の交配実験を行い、 $Ins2^{C96Y/WT} ASK1^{-/-}$ マウスを作製した。雄の Akita マウスでは、5 週齢から血糖値が上昇し始め、7 週齢には 600 mg/dl 弱まで上昇する。 $Ins2^{C96Y/WT} ASK1^{-/-}$ マウスの血糖値は、対照とした同週齢の Akita マウスと比較して上昇が抑えられ、糖尿病の発症が 1 週間程度遅くなることがわかった。つまり、Akita マウスの糖尿病発症において ASK1 は必要であることが示唆された。

生後 4 週齢、6 週齢において膵インスリン量を比較したところ、Akita マウスで観察される膵インスリン量の減少が、 $Ins2^{C96Y/WT} ASK1^{-/-}$ マウスにおいて抑えられた。Akita マウスの膵組織においては生後 6 週より TUNEL 陽性細胞を認めるが、 $Ins2^{C96Y/WT} ASK1^{-/-}$ マウスでは陽性細胞数の減少を認めた。以上より、ASK1 をノックアウトすることで膵β細胞のアポトーシスが抑えられることが、糖尿病発症が遅れる原因の一つであることが示唆された。

一方、マウスインスリン分泌細胞株 MIN6 に、Akita マウスの糖尿病発症の原因遺伝子である変異型 *Insulin2* 遺伝子をアデノウイルス法により発現させたところ、ASK1、JNK、p38 の活性化ならびにアポトーシスの亢進が認められた。アポトーシスは、ヒストン - DNA 断片複合体量および Caspase-3 活性の測定において、p38 阻害剤である SB203580 により部分的に抑制された。JNK 阻害剤である

[別紙 1]

SP600125 ではアポトーシスは全く抑えられないことから、膵β細胞において、p38 の活性化がアポトーシスに必要であることが示唆された。

そこで p38 によるアポトーシスのメカニズムを検討するため、p38 によりリン酸化を受けることが知られており、またアポトーシス促進因子として知られる転写因子 CHOP の転写活性化能が、p38 の活性化の阻害により変化するかどうかについて解析した。CHOP の転写活性化能の変化は、CHOP により誘導されることが知られる Carbonic Anhydrase 6 , stress inducible form (CA6) の mRNA 量を定量的 RT-PCR 法で測定することにより検討した。変異型 Insulin2 を MIN6 細胞に発現させると CHOP の誘導とともに CA6 の誘導が認められるが、p38 阻害剤の投与により CHOP の誘導には変化はなく、CA6 の誘導のみが抑えられた。

MIN6 に小胞体ストレス誘導体として知られる Thapsigargin または Tunicamycin を投与したところ、 p38、JNK の活性化および CHOP の誘導が認められた。また、Tunicamycin の投与により誘導されるアポトーシスは、p38 阻害剤の投与により抑えられた。MIN6 に Thapsigargin または Tunicamycin を投与すると、変異型 Insulin2 を発現させた場合と同様に CHOP の誘導とともに CA6 の誘導が認められるが、変異型 Insulin2 を発現させた際と同様に、CA6 の誘導のみが p38 阻害剤の投与により抑えられた。また、CHOP により誘導されることが知られる tribbles-related protein 3 (TRB3) の mRNA 量を定量的 RT-PCR 法で測定すると、Tunicamycin を投与した場合に、CA6 と同様に誘導が認められたが、その誘導は p38 阻害剤を投与することにより抑えられた。また、ASK1KO マウス由来の線維芽細胞 (MEF) に Thapsigargin を投与したところ、野生型マウス由来

[別紙 1]

MEF と比較し、CA6 の誘導は低下した。以上より、p38 の活性化によりアポトーシスが誘導されるメカニズムにおいて、p38 の活性化による CHOP の転写活性化能の亢進が関与していることが示唆された。

【結論】

今回私は、以下の点を明らかにした。1. ASK1を欠損させたAkitaマウスでは糖尿病の発症が遅れたことより、部分的ではあるが、ASK1はAkitaマウスの糖尿病発症に必要である。2. 膵β細胞において、ASK1-p38経路は小胞体ストレス誘導性アポトーシスに必要である。3. p38の活性化は、小胞体ストレスにより発現が誘導されたCHOPをさらに活性化することで、アポトーシスの誘導に関与する可能性がある。

以上より、ASK1の活性化の制御は、糖尿病の新しい治療ターゲットとなる可能性が示唆される。