

〔論文の内容の要旨〕

論文題目 The Role of Free Fatty Acids, Endoplasmic Reticulum Stress, and
Transcription Factor KLF5 in pancreatic β cell dysfunction

和訳 遊離脂肪酸、小胞体ストレス、転写因子 KLF5 の膵 β 細胞の機能低下における役割

指導教員 永井 良三 教授

東京大学医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名： 江口 航生

現在、肥満・高血圧・脂質代謝異常・インスリン抵抗性を主な構成要素とするメタボリックシンドロームは全世界で急激に増加している。メタボリックシンドロームの病態生理を特徴付けるものとして、インスリン抵抗性が挙げられ、インスリン抵抗性の大きな原因の一つが血中遊離脂肪酸の増加であり、血中遊離脂肪酸濃度は 2 型糖尿病発症の独立した危険因子である。2 型糖尿病の発症と進行においては、インスリン抵抗性ととも膵 β 細胞の機能低下が進行する。膵 β 細胞の機能低下においても、血中遊離脂肪酸濃度の慢性的高値が原因の一つとなることが示され、インスリン合成の低下、グルコース反応性インスリン分泌の低下などからなる β cell lipotoxicity の概念が確立されている。しかし、遊離脂肪酸が膵 β 細胞の機能低下をもたらす分子生物学的メカニズムは明らかでない。

今回私は、遊離脂肪酸による β cell lipotoxicity において、小胞体ストレスのはたす役割を解析した。血中脂肪酸の主要成分であり、また飽和脂肪酸であるパルミチン酸は、膵 β 細胞においてインスリン含有量の低下、インスリン分泌の低下と同時に CHOP, spliced Xbp-1 などの小胞体ストレスマーカーを誘導し、小胞体ストレスを抑制する 4-phenyl butyric acid (PBA) や taurine-conjugated ursodeoxycholic acid (TUDCA) などの chemical chaperone を用いると、パルミチン酸による β 細胞の機能低下が抑制された。すなわち β cell lipotoxicity において小胞体ストレスが重要な役割を果たすことが示唆された。またこのとき、 β 細胞でのインスリンシグナルを解析すると、パルミチン酸刺激によりインスリン刺激による Akt のリン酸化は抑制され、これは、chemical chaperone により小胞

体ストレスを抑制することにより回復することが示された。近年小胞体ストレスはその effector 分子の一つである、IRE1 を介して JNK のリン酸化を起こし、これにより IRS1/2 の serine リン酸化を介してインスリン抵抗性を生じることが示されており、この機序が働いている可能性が示唆された。このため、JNK や IRS1(ser307)のリン酸化を調べると、パルミチン酸ストレスによりこれらのリン酸化が生じ、chemical chaperone により小胞体ストレスを抑制するとこれらのリン酸化が抑制されることが示された。膵 β 細胞特異的インスリンレセプターノックアウトマウスや、IRS-1 ノックアウトマウスが、インスリンの第 1 層分泌の低下やインスリン含有量の低下などの表現形を示すことが報告されており、また、2 型糖尿病患者では早期より第 1 相のインスリン分泌の低下が認められることが報告されている。以上のことより、小胞体ストレスはインスリンシグナルの抑制を介して β cell lipotoxicity に関与し、これは 2 型糖尿病の病態の一面を説明すると考えられた。

また、パルミチン酸が小胞体ストレスを誘発する仕組みについて検討を行った。toll-like receptor (TLR) 2/4 はパルミチン酸などの飽和脂肪酸をリガンドとして認識しシグナル伝達が生じ、またエイコサペンタエン酸を含む n-3 多価不飽和脂肪酸はこれを阻害する事が示されていることから、パルミチン酸による小胞体ストレスの誘導に TLR pathway が関与している可能性を検討した。siRNA を用いて TLR4 またはその adaptor protein である MyD88 をノックダウンすると、パルミチン酸による小胞体ストレスの誘導および、インスリン mRNA の低下が減弱することから、TLR 4 がパルミチン酸による小胞体ストレスの誘導および、 β cell lipotoxicity に関与している可能性が示唆された。

一方、これまでに我々は、転写因子 KLF5 のヘテロノックアウトマウスにおける高脂肪食モデルなどを用い、KLF5 の脂肪細胞分化における役割を報告したが、興味深い事に、同様のモデルにおいて、KLF5 ヘテロノックアウトマウスでは高脂肪食による膵 β 細胞の組織構造の障害が減弱しており、代謝ストレスによる膵 β 細胞の障害において KLF5 が役割を果たしていることが示唆された。このため、膵 β 細胞での KLF5 の働きを調べた。

まずマウスから単離した膵 β 細胞では KLF5 の発現が確認された。膵 β 細胞の cell line MIN6 にパルミチン酸による刺激をすると、小胞体ストレスの誘導と同時に KLF5 の発現増加と、インスリンの mRNA・蛋白の減少を伴った。ここで PBA または TUDCA により小胞体ストレスを抑制したところ、KLF5 の誘導が抑制され、同時にインスリン mRNA・蛋白の減少が回復した。逆に Thapsigargin または Tunicamycin による小胞体ストレスの誘導によっても KLF5 が誘導され、インスリン mRNA・蛋白の減少を認めた。MIN6 におけるインスリンプロモーターのレポーターアッセイでは、KLF5 によりインスリンのプロモーター活性が抑

制される事が示された。またパルミチン酸の刺激のもとに、siRNA による KLF5 のノックダウンを行うとインスリン mRNA の増加を認め、KLF5 のシグナルがインスリンの転写を抑えていることが示された。これらの結果より、KLF5 は代謝ストレスによる小胞体ストレスにより誘導され、膵 β 細胞の障害において重要な役割を果たしていることが示唆された。

さらに、これまでに高脂肪食負荷による第 1 相のインスリン分泌低下に対して、魚油を添加することにより第 1 相のインスリン分泌の回復が認められることが報告されていることから、魚油に含まれる n-3 多価不飽和脂肪酸の代表としてエイコサペンタエン酸をパルミチン酸刺激に追加したところ、小胞体ストレスの減弱と共に、インスリンシグナルの回復を認め、さらにインスリン含有量・インスリン分泌の回復を認めた。これより、今回明らかにした、飽和脂肪酸による小胞体ストレスを介した膵 β 細胞におけるインスリン抵抗性が、膵 β 細胞 lipotoxicity に対する治療の標的となることが示された。