

論文の内容の要旨

論文題目 転写因子 SOX6 の膵β細胞における機能に関する研究

氏名 井口晴久

糖尿病とは、インスリン作用が減弱して糖が細胞に取り込まれず、血液中の糖濃度（血糖値）が高くなる病気であり、発症メカニズムによって1型糖尿病と2型糖尿病の2つに大別される。1型糖尿病は日本人の糖尿病患者の5%程度であり、膵臓ランゲルハンス氏島（ラ氏島）に局在する膵β細胞（インスリン産生細胞）が自己免疫などの機序によって破壊され、インスリンがほとんど作られなくなるために起こる。一方、日本人の糖尿病患者の90%以上を占めるのは2型糖尿病である。2型糖尿病は遺伝的な要因に加えて、過食、運動不足、肥満などの生活習慣が原因で以下に述べるメカニズムで引き起こされると考えられている。まず、肝臓、骨格筋、脂肪等の臓器（インスリン感受性臓器）におけるインスリン感受性が低下することで、相対的なインスリン供給不足の状態に陥る。このような状態は、インスリン抵抗性と呼ばれている。このインスリン抵抗性状態を代償するために、膵β細胞はインスリン分泌量を増やしてインスリン不足を解消し、血糖値を正常に保とうとする。ところが、この状態が長く続くと膵β細胞は疲弊してしまい、ついにはインスリン分泌量が低下し、糖尿病の発症に至るのである。日本人は欧米人と比較して、膵β細胞のインスリン分泌能が元来低いため、インスリン抵抗性を代償するためのインスリン分泌量が不足しがちである。ゆえに、日本人の2型糖尿病の治療を考える上で、代償的なイ

ンスリン分泌増加メカニズムの解明は重要な課題と考えた。

インスリン分泌が増加した膵β細胞はインスリン分泌能が活性化されているだけでなく、増殖能を強化して細胞数を増加していると言われている。このように細胞の機能を変化させるには、遺伝子の発現パターンを多様に変動させる必要があると考え、膵β細胞に発現する転写因子の中に代償的インスリン分泌増加に関与する因子があると予想した。始めに、代償的インスリン分泌増加が起きている膵ラ氏島と通常の膵ラ氏島の遺伝子発現プロファイルと比較して、発現量が変化する転写因子の選抜を試みた。すなわち、高脂肪食負荷マウスと通常食マウスそれぞれから膵ラ氏島を摘出し、両者の遺伝子発現プロファイルを DNA マイクロアレイ法と QRT-PCR 法を組み合わせて比較解析した。高脂肪食負荷マウスはインスリン抵抗性が惹起され、通常食マウスに比べてインスリン分泌が増加するモデルマウスである。その結果、両者の発現量に2倍以上の差のある転写因子を17個見出した。次に、選抜した17個の転写因子がインスリン分泌を制御するか調べるために、MIN6細胞(マウス膵β細胞由来培養細胞)にレトロウイルスを用いて該転写因子を強制発現した。その結果、代償的インスリン分泌増加時に発現減少する転写因子である Sex-determining region Y-box containing gene 6 (SOX6) がインスリン分泌を負に調節することを見出した。

SOX6のインスリン分泌抑制メカニズムを解析するために、グルコース依存性インスリン分泌のキーステップである細胞内ATP合成及びインスリン含量に対するSOX6の影響を検討した。その結果、SOX6は細胞内ATP/ADP比を減少させると共に、細胞内インスリン含量も減少させることが明らかとなった。そこで、SOX6強制発現MIN6細胞とコントロールMIN6細胞においてATP合成に関与する遺伝子群及びインスリン遺伝子の発現量を比較したところ、酸化的リン酸化酵素群の一部と、インスリン遺伝子の発現量が、SOX6強制発現MIN6細胞において約50%減少していることが分かった。そこで、SOX6の転写抑制メカニズムをラットインスリン遺伝子のプロモーターを用いて解析したところ、MIN6細胞においてSOX6はインスリンプロモーター転写活性を抑制することが分かった。更に、非膵β細胞であるBHK21細胞においても、PDX1とE47を共発現することで活性化されたインスリンプロモーターがSOX6によって抑制された。次に、SOX6がPDX1かE47どちらの転写活性を阻害しているかを、mammalian two-hybridアッセイを用いて検討した結果、SOX6はGAL4融合PDX1の転写活性を抑制したのに対して、GAL4融合E47の転写活性には影響しなかった。そこで、以降はSOX6とPDX1に注目して更に解析を進めた。

SOX6とPDX1の間の相互作用をGSTプルダウンアッセイにより調べた結果、PDX1のN末

端が SOX6 の HMG 領域と結合することが分かった。更に、クロマチン免疫沈降法を用いることで、SOX6 と PDX1 が細胞内においても結合し、インスリンプロモーター上に共存していることを確認した。以上の結果から、SOX6 は転写因子 PDX1 と結合しその転写活性を抑制することによって、インスリンプロモーター活性を抑制していることが示された。

SOX6 のインスリン分泌抑制メカニズムの解析結果から、SOX6 が PDX1 のレプレッサーとして働くこと、酸化リン酸化酵素群の一部及びインスリン遺伝子の発現を抑制することで、細胞内 ATP/ADP 比、インスリン含量を減少させることが示された。

一方、代償的インスリン分泌増加のメカニズムにおいて、インスリン分泌能の増強に加えて、膵β細胞の細胞増殖活性の上昇も重要である。そこで、SOX6 の膵β細胞増殖に対する影響を検討した結果、SOX6 強制発現細胞の細胞増殖が著明に抑制されることが分かった。逆に、siRNA を用いて膵β細胞由来細胞である INS-1E 細胞の SOX6 の発現を抑制したところ、細胞増殖が促進された。そこで、筆者は SOX6 の膵β細胞増殖抑制メカニズムの解析に取り組んだ。

まず、SOX6 強制発現細胞の FACS 解析を行った結果、SOX6 は G1 期から S 期への移行を妨げていることが分かった。次に、SOX6 強制発現細胞とコントロール細胞において、G1 期から S 期への移行を制御する遺伝子群の発現変動を QRT-PCR 法を用いて検討した。その結果、SOX6 強制発現 NIH-3T3 細胞において、サイクリン D1、D2、D3、E1 の減少が認められた。特に、サイクリン D1 の発現抑制は顕著であり、70%以上抑制されることが分かった。これらサイクリン遺伝子群はβ-カテニンという転写活性化因子により転写制御されることが知られている。そこで、筆者は SOX6 とβ-カテニンの関係に着目して以降の解析を進めた。

サイクリン D1 プロモーター活性に対する SOX6 とβ-カテニンの影響を調べたところ、β-カテニンはサイクリン D1 プロモーター活性を増加させるが、SOX6 を共発現させると増加した活性が減少することが分かった。続いて、SOX6 とβ-カテニンのサイクリン D1 プロモーター上の結合様式をクロマチン免疫沈降法を用いて検証した結果、SOX6 はβ-カテニンを介してサイクリン D1 プロモーターに結合し、その転写活性を抑制していると考えられた。

更に、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) の阻害剤の一種であるスクリプタイドを培地中に添加することで、SOX6 強制発現により減少したサイクリン D1 プロモーター活性が回復することが分かった。このことから、SOX6 は HDAC をサイクリン D1 プロモーター上にリクルートすることでヒストンの脱アセチル化を引き起こし、その転写活性を抑制していることが示唆された。次に、SOX6 がどの HDAC 分子種をサイクリン D1 プロモーター上へリクルートするかをクロマチン免疫沈降法を用いて調べたところ、HDAC1 が SOX6 を強制発現することによりサイクリン

D1 プロモーターへリクルートされることが分かった。更に、 β -カテニン、SOX6、HDAC1 の 3 者が複合体を形成しているかを免疫沈降法を用いて検討した結果、SOX6 を橋渡し役とする β -カテニン/SOX6/HDAC1 の 3 者の複合体が細胞内で形成されていることが分かった。

SOX6 による膵 β 細胞増殖抑制メカニズムの解析結果から、SOX6 は β -カテニン転写複合体に HDAC1 をリクルートすることでその転写活性を阻害し、サイクリン D1 等の細胞周期を調節する遺伝子群の転写を抑制することが分かった。

本研究結果から、SOX6 は膵 β 細胞の細胞増殖とインスリン分泌の両方を抑制する機能を持った転写因子であること、インスリン分泌亢進状態の膵 β 細胞において発現が減少することが分かった。このことから、SOX6 がインスリン抵抗性を代償するためのインスリン分泌増加メカニズムの一端を担っている可能性が示唆された。インスリン感受性臓器へ十分にインスリンが供給されている糖代謝が正常な状態では、膵 β 細胞において SOX6 はブレーキ役として働きインスリン分泌量を適正に調節しているが、インスリン分泌を亢進させる必要が生じた場合は、膵 β 細胞は SOX6 の発現を抑制して、言わばブレーキを外すことでインスリン分泌、細胞増殖を活性化し、インスリン需要に応じていると考えられる。

日本人の糖尿病患者は、欧米人のような極度の肥満患者は少なく、軽度の肥満やインスリン抵抗性にインスリン分泌不足が重なっていることが多い。日本人の糖尿病治療には、軽度のインスリン抵抗性を代償するために十分なインスリン量を膵 β 細胞に分泌させることは、効果的な手段であると考えられる。本研究から、代償的インスリン分泌亢進の分子メカニズムの 1 つとして SOX6 発現減少による PDX1、 β -カテニンの活性化が示唆された。今後、PDX1、 β -カテニンを活性化する低分子化合物が得られれば、日本人に向けた 2 型糖尿病治療薬となる可能性があると考えられる。