

審査の結果の要旨

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%程度であるのに対して、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である。本研究では、インスリン分泌増加、膵β細胞の増殖に関与する因子として Sex-determining region Y-box containing gene 6 (SOX6) という転写因子を見出し、その作用メカニズム解析を行った。

第1部 転写因子 SOX6 と PDX1 によるインスリン分泌調節機構

SOX6 は高脂肪食負荷マウス、*ob/ob* マウス等の高インスリン血症モデルマウスの膵ラ氏島において、mRNA レベル及びタンパクレベルで発現減少することを示した。また、膵β細胞特異的遺伝子である Pancreatic-duodenal homeobox factor-1 (PDX1) との2重蛍光免疫染色の結果から、SOX6 は確かに膵ラ氏島のβ細胞に発現していることを確認した。更に、SOX6 を 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強制発現した結果、SOX6 強制発現細胞においてグルコース依存性インスリン分泌が抑制されることを見出した。

そこで、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を明らかとした。次に、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 I、II 遺伝子の発現量が、SOX6 強制発現 MIN6 細胞において約 50% 減少していることを示した。そこで、SOX6 の転写抑制メカニズムをラットインスリン II 遺伝子のプロモーターを用いて解析したところ、SOX6 は PDX1 という転写因子の転写活性を抑制することで、インスリン発現を抑制していることが分かった。また、GST プルダウンアッセイやクロマチン免疫沈降法により、SOX6 と PDX1 が直接結合し、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。この結果から、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することが示された。

以上の解析から、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。これらの結果、SOX6 がインスリン分泌を抑制すると考えられた。

第 2 部 転写因子 SOX6 と β -カテニンによる細胞増殖調節機構

次に、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、SOX6 強制発現細胞の細胞増殖が細胞周期のどの段階で止まっているかを調べるために 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示された。次に、SOX6 強制発現細胞とコントロール細胞の遺伝子発現変動を調べたところ、サイクリン D1、D2、D3、E1 の減少が認められた。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ので、以降は SOX6 と β -カテニンの関係を解析した。

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 が β -カテニンと結合しサイクリン D1 プロモーター上にリクルートされることをクロマチン免疫沈降法を用いて確認した。更に詳細に SOX6 の β -カテニン転写抑制メカニズムを解析するために、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用いた検討を行った。スクリプタイドを添加することで、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。また、免疫沈降法により HDAC ファミリーの 1 つである HDAC1 が β -カテニン、SOX6 と複合体を形成していることが分かった。

以上の解析結果から、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

ることが示された。

本研究結果は、SOX6が膵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を示したはじめての知見である。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。今後、SOX6の活性を調節することで、新たな糖尿病治療薬の開発が期待される。以上のことから本研究は博士（薬学）の学位に充分値するものと判定した。