

研究題目 膵β細胞糖毒性の原因となる転写調節因子群の同定

研究組織

研究代表者：松岡 孝昭（和歌山県立医科大学 内科学第一講座）

共同研究者：松久 宗英（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：下 直樹（大阪大学大学院医学系研究科 内分泌代謝内科学講座）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

2型糖尿病患者では、一旦高血糖状態となると膵β細胞機能が顕著に障害され、さらなる高血糖状態に陥る現象が観察される。この悪循環は膵β細胞“糖毒性”として広く認識されており、糖尿病進展予防のためにも、その分子メカニズムの解明は急務である。本研究の目的は、膵β細胞糖毒性に関与する主要分子を転写因子レベルで同定することである。

[1-2]研究の方法・経過

我々は、2型糖尿病(*db/db*)マウス膵島を用いた *in vivo* の系において microarray による網羅的解析 (33,779 probe) から、SGLT2 阻害剤での糖毒性解除により、有意に且つ2倍以上と鋭敏に発現量の変化(増大)する遺伝子群(糖毒性感受性遺伝子: 43 遺伝子)を同定している。これまでに糖毒性により遺伝子発現が抑制される遺伝子とされてきた *Mafa*、*Pdx1*、*Slc2a2*、*Slc30a8* 等なども糖毒性感受性遺伝子 43 因子に含まれており、GO term 上「グルコース応答性インスリン分泌」、「活性酸素」、および「細胞増殖」に関わる因子のいずれかに分類された。本結果からは特定の遺伝子が高血糖に対し脆弱であり、それら遺伝子が膵β細胞機能・増殖において重要な役割を果たすことが推測された。

現在、申請検討(A)として、これら糖毒性感受性遺伝子の膵β細胞における働きを解析している。その中の一つ、GWASにおいて2型糖尿病疾患感受性遺伝子として報告されている *Tmem163* に着目し研究を進めている。マウスにおける本因子の局在に関し、免疫染色および免疫電顕での解析において膵β細胞インスリン分泌顆粒膜への高度の限局が示唆された。続いて、本因子の膵β細胞機能における役割に関し、膵β細胞特異的 *Tmem163* ノックアウトマウス (*βTmKO*) の解析を実施した。OGTT において

血糖値は対照群に比べ有意な低値を、血漿インスリン値は有意な高値を示した。単離膵島のグルコース応答性インスリン分泌も対照群に比べ有意な高値を示した。また電顕での解析において、対照群に比べインスリン分泌顆粒の *dense core* の密度低下が確認された。膵β細胞の免疫染色では、対照群に比べ *βTmKO* ではプロインスリンの分布が核周囲から細胞質全体へと変化しており、ELISA 法による定量において対照群に比べ *βTmKO* では膵島プロインスリン含量が増加していることが明らかになった。これら結果からは、高血糖毒性による *Tmem163* の発現抑制が生じると、インスリン分泌顆粒が未成熟となり、糖尿病初期に認められるインスリン異常分泌(糖負荷後過剰分泌)状態に陥ることが示唆された。実際、2型糖尿病モデルマウスにおいてインスリン分泌過剰となっている糖尿病初期での膵島電顕像は、上記 *βTmKO* マウスの膵β細胞と酷似していた。*Tmem163* の発現抑制の病態への関与として、糖尿病初期に認められる反応性低血糖の一因である可能性を考えている。さらに、*Tmem163* 発現調節機構に迫るべく、オープンクロマチン領域解析 (Assay for Transposase-Accessible Chromatin Sequencing: ATAC-Seq) と TRANSFAC、ChIP データとを組み合わせて転写調節領域の解析を行ったところ、*MafA* や *Pdx1* といった既知の転写因子結合モチーフが観察されたが、reporter assay 上、これら cis-element への mutation 挿入によっても *Tmem163* の発現抑制は認められず、未知の転写因子の関与が考えられ、申請検討(B)の結果に期待することとなった。

別の糖毒性感受性遺伝子として、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV のサブユニットである *Cox6a2* の解析も実施している。*Cox6a2* 全身欠損マウスの心筋・骨格筋では *Complex4* の活性低下による reverse electron transfer の結果、細胞内活性酸素の増大と、これによるインスリン抵抗性改善

が報告されているが、膵β細胞機能への関与は不明である。膵β細胞における *Cox6a2* の役割と糖尿病状態での発現抑制の病態生理学的意義を検討すべく、膵β細胞株における *Cox6a2* ノックダウン実験を施行した。膵β細胞株においても *Cox6a2* 発現抑制により活性酸素種の産生増加を認めた。In vivo での *Cox6a2* 発現抑制の影響を検討するため、*Cox6a2* 全身ノックアウトマウスを作製した。高脂肪高シヨ糖食負荷では、対照マウスと比べて体重増加が軽度であり、インスリン感受性が良いにも関わらず、腹腔内ブドウ糖負荷試験において、糖負荷後血糖値は 90 分、120 分値、AUC で有意に高値であり、耐糖能の悪化を認めた。また、*Cox6a2* 遺伝子発現の調節機序を検討すべく、正常血糖マウス膵島 DNA の ATAC-seq により同定した 15kbp 上流のオープンクロマチン領域 (800bp) 内にある遺伝子発現調節領域を用いてレポーター解析を行い、MafA が *Cox6a2* 発現を直接制御することを示した (Nagai, Matsuoka et al. *BBRC* 2021)。さらに、糖尿病状態では膵島特異的に *Cox6a2* 発現が抑制されていることを確認しており、膵β細胞特異的 *Cox6a2* ノックアウトマウスの作出を終了し、現在通常食での糖尿病発症有無につき精査中である。

このように、糖毒性感受性遺伝子の発現調節領域を open chromatin 領域に注目して解析することにより、同遺伝子群の発現が高血糖により障害される機序が明らかとなる可能性があり、糖毒性感受性遺伝子群の上流解析は、糖尿病状態での膵β細胞機能障害の改善を目指す我々の目的のための極めて重要なアプローチとなると考えられ、検討(B)を開始している。

前述のように、*db/db* マウスに対し、高血糖のままの対照群と糖毒性軽減群との間での膵島 microarray による遺伝子発現の変化を検討し糖毒性感受性遺伝子の抽出に成功している。しかしながら、正常血糖群の解析は未実施であり、非糖尿病正常血糖 (*db/m*) マウスの膵島 RNA 解析も予定している。これにより、糖尿病状態で発現低下または増大していた因子が、高血糖の軽減により非糖尿病状態へと回復しているのが評価可能であり、高血糖による病態形成に関与する可能性の高い遺伝子を抽出し得る。そこで始めに、より定量性が高く、データとしての汎用性も高い RNA-seq 解析により、正常血糖膵島・糖尿病膵島・糖毒性軽減膵島の 3 群 (各群 n=3) において膵島内遺伝子発現量を定量することを予定している。上記 3 群の膵島 RNA

を受託研究機関へ解析依頼したところ、*db/db* 膵島 RNA が不良との連絡があり、さらに SGLT2 阻害剤混餌が不足したため、混餌の再作製を終え、再度 *db/db* 膵島を単離している段階である。糖毒性感受性のある候補遺伝子の抽出後、*db/m* 正常血糖膵島を用いた ATAC-Seq 結果から糖毒性感受性遺伝子近傍数百 kbp 内にある open-chromatin 領域内にある転写因子結合モチーフを HOMER (data base + 検索 program) および ChIP-Atlas 解析により網羅的に抽出することを予定している。さらに、抽出した転写因子結合モチーフが、膵島特異的 open-chromatin 領域に比べ、糖毒性感受性遺伝子内にどれほど濃縮されているのか fold change を解析し、糖毒性軽減により増大する群と減少する群に分けた上で、糖毒性感受性遺伝子の発現を制御している転写因子を探索することを目指す。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

上述のように、これまでに検討(A)で得られた結果から、糖毒性感受性遺伝子には膵β細胞機能に直結しているものが多いことが確認された。これら遺伝子の発現調節因子として、共通の転写因子も認められており、検討(B)を実施することの意義が見出された。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

上記成果からも、検討(B)を進めて行く根拠が得られたと考えており、膵β細胞糖毒性の本質に迫る研究となると考える。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

Glucotoxicity-induced suppression of *Cox6a2* expression provokes β-cell dysfunction via augmented ROS production. Nagai Y, **Matsuoka TA** et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 556:134-141, 2021

[3-2] 学会発表

第 64 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2021 年 5 月 20 日~22 日、富山 (Web 開催))

・高血糖下 Tmem163 抑制による膵β細胞障害：下直樹、松岡孝昭

・活性酸素増大に関与する膵β細胞因子 *Cox6a2* の解析：永井 泰紀、松岡孝昭

【4】今後の課題等

課題 B につき、薬剤混餌と糖尿病マウスからの膵島単離条件の再考が課題。