

Title	Glycation-dependent, Reactive Oxygen Species-mediated Suppression of the Insulin Gene Promoter Activity in HIT Cells
Author(s)	松岡, 孝昭
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40744
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	まつおか たかあき 松岡孝昭
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 13718 号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	Glycation-dependent, Reactive Oxygen Species-mediated Suppression of the Insulin Gene Promoter Activity in HIT Cells. (HIT細胞においてグリケーション及び活性酸素依存性に認められるインスリン遺伝子転写活性の低下)
論文審査委員	(主査) 教授 堀 正二 (副査) 教授 松澤 佑次 教授 宮崎 純一

論文内容の要旨

【背景及び目的】

膵β細胞において、glucoseはインスリン分泌および生合成を促進する主要な因子であるが、反対に膵β細胞が長期間高血糖に曝されるとそれらはむしろ低下し、結果として膵β細胞の機能不全を招くことが知られている。こうした現象は概念的にglucose toxicityと呼ばれ、組織学的に多くは膵β細胞内インスリン顆粒の枯渇を伴っていることからインスリン生合成低下の関与が示唆されているが、その背景にある分子機構は明らかではない。glucose toxicityのメカニズムを解明することは、それを特異的ターゲットとする新しいNIDDM予防・治療法に道を開く可能性があり臨床的意義は大きい。

高血糖が引き起こす種々の細胞障害の中でも、蛋白glycationは眼(水晶体)などに加えて膵島でも高glucoseに伴い認められることから、膵β細胞glucose toxicityに関与する可能性がある。glycationに伴うMaillard反応においては、最終産物であるadvanced glycosylation end products (AGE)に至る過程で、reactive oxygen species (ROS)もまた産生される。そこで本研究では、特にインスリン遺伝子の転写調節異常に注目し、glycationによりもたらされる膵β細胞障害の分子機構を解析した。

【方法】

膵β細胞由来HIT細胞に強力な還元糖であるD-riboseを作用させglycationを誘導した培養細胞系において以下のような実験を行った。glycation,あるいはROSの関与の有無は、それぞれ、1 mM amino guanidine (AG), および10 mM N-acetylcysteine (NAC)を用いて検討した。

1. レポーター遺伝子解析

インスリン遺伝子プロモーター領域(-326~+30)をルシフェラーゼ構造遺伝子の5'上流に組み込んだレポーター遺伝子プラスミド(pA3InsLus)を作成した。また、コントロールとして、ヒトβ-actin遺伝子プロモーター領域(約4.3kb)を含むpHβLuc, およびRous sarcoma virusのlong terminal repeat (RSV-LTR)を含むpA3RSVLucを用いた。これらレポーター遺伝子プラスミドを、リポフェクション法により膵β細胞由来株HIT-T15細胞に遺伝子導入し、各濃度のD-ribose(0, 40, 60mM)存在下(一部は1 mM AGあるいは10 mM NACも含む)に72時間培養した後、細胞抽出物を得てルシフェラーゼアッセイを行った。結果は、蛋白補正した後、D-ribose非添加時の値

を100%として表した。

2. Northern blot 解析

上記と同様に、HIT-T15細胞を各濃度の D-ribose などの存在下にて5日間培養した。その後、total RNA を回収し、それぞれ10 μ gを用いて Northern blot 解析を行い各 mRNA 量の変化を検討した。

3. gel-mobility shift (ゲルシフト) 解析

転写因子の DNA 結合能への glycation の影響を検討すべく、上記のような各条件下で5日間培養した HIT-T15細胞から核蛋白を抽出しゲルシフト解析を行った。

【結果】

1. HIT-T15細胞におけるインスリン遺伝子プロモーター活性に及ぼす glycation の影響

β -actin 遺伝子のプロモーター活性は D-ribose により影響されなかったのに対し、インスリン遺伝子のプロモーター活性、40 mM あるいは60 mM D-ribose 存在下で、それぞれ、約48 \pm 19%および18 \pm 6%まで低下した。glycation を抑制する AG を共存させると、そうした低下は完全に (40 mM D-ribose の場合; 108 \pm 10%)、あるいは部分的に (60 mM D-ribose の場合; 67 \pm 18%) 回復した。同様に、活性酸素のキレート剤として働く NAC を用いた場合も、そうした D-ribose 依存性のプロモーター活性低下は完全に (40 mM D-ribose の場合; 104 \pm 10%)、あるいは部分的に (60 mM D-ribose の場合; 63 \pm 23%) 回復した。これらより、HIT-T15細胞において、D-ribose により誘導された glycation および活性酸素はインスリン遺伝子のプロモーター活性を抑制することが示された。

2. 細胞内インスリン mRNA 量および含量に及ぼす glycation の影響

上述のプロモーター活性の低下が、実際にインスリン遺伝子 mRNA 量の低下へと結びついているか否かを Northern blot 解析で検討した。その結果、プロモーター活性と同様に、インスリン mRNA 量は D-ribose の濃度依存性に低下し、やはり、1 mM AG、あるいは10 mM NAC 共存下では回復した。以上より、上記1で認めた glycation によるインスリン遺伝子プロモーターの活性抑制は、同細胞中のインスリン mRNA 量低下をもたらしていることが示された。さらに、 β 細胞内インスリン含量に関しても、40 mM D-ribose 存在下5日間培養により18%にまで低下することが確認された。

3. インスリン遺伝子転写因子 PDX-1に認めた glycation 依存性の DNA 結合能低下

上述のインスリン遺伝子プロモーター活性低下の背景を検索するため、長期高血糖下でその活性が低下することが知られているインスリン遺伝子転写因子 PDX-1の DNA 結合能の変化を検討した。ヒト・インスリン遺伝子 A3領域をプローブとしてゲルシフト解析を行ったところ、同領域に対する PDX-1の結合能は、40 mM または60 mM D-ribose の条件下で5日間培養した HIT-T15細胞では顕著に低下していた。また、そうした低下は、AG あるいは NAC により抑制され、glycation および活性酸素が PDX-1の DNA 結合能を低下させていることが示された。

4. D-ribose による影響の可逆性の検討

インスリン遺伝子転写活性に及ぼす D-ribose 作用の可逆性を検討するため、40 mM D-ribose にて HIT-T15細胞を5日間培養した後、D-ribose を除去し、その後2日および5日経過した時点で Northern blot 解析およびゲルシフト解析を行った。その結果、40 mM D-ribose により低下したインスリン mRNA は、D-ribose 除去後5日目においても僅かな回復を認めるのみであった。PDX-1の DNA 結合能に関しても同様であった。これらの結果は、D-ribose により惹起された glycation および活性酸素がもたらした HIT-T15細胞中の変化が (少なくとも短期的には) ほぼ不可逆であることを示唆した。

【総括】

glycation およびその結果生じる活性酸素により、インスリン遺伝子の転写活性が低下し、インスリン mRNA 量およびインスリン含量の減少が認められた。临床上、慢性高血糖に伴い認められるインスリン分泌障害の背景に、今回示されたような glycation による転写調節機構の障害が関与する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

インスリン非依存性糖尿病（NIDDM）患者において、持続する高血糖がグルコース応答性インスリン分泌を低下させることはよく知られており、“glucose toxicity”と呼ばれている。本研究は、長らく臨床概念に留まってきた“glucose toxicity”を新たに「転写因子病」として捉える極めてユニークなものであった。即ち、慢性高血糖に伴って増加する glycation や酸化ストレスが、インスリン遺伝子の転写を障害し、インスリン生合成低下をもたらすことを示した。さらに、その背景としてインスリン遺伝子に特異的な転写因子 PDX-1 の活性低下が関与する可能性を見出した。これらは、NIDDM 患者において認められる glucose toxicity の機序の少なくとも一部を説明するものと考えられ、酸化ストレスをターゲットとした将来の特異的な糖尿病治療法開発の有用性を示唆するもので臨床的に意義深い研究であったと考える。以上のような理由により、本研究は学位の授与に値するものと考えられる。