The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | Oxidative Stress Induces Nucleo-Cytoplasmic Translocation of Pancreatic Transcription Factor PDX-1 Through Activation of c-Jun NH2-terminal Kinase |
| Author(s) | 河盛, 段 |
| Citation | 大阪大学, 2004, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/45262 |
| 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。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

【23】

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 河盛　段（かわもり　だん） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博　士（医　学） |
| 学　位　記　番　号 | 第　１８４５１　号 |
| 学位授与年月日 | 平成 16 年 3 月 25 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第４条第１項該当<br>医学系研究科情報伝達医学専攻 |
| 学　位　論　文　名 | Oxidative Stress Induces Nucleo-Cytoplasmic Translocation of Pancreatic Transcription Factor PDX-1 Through Activation of c-Jun $NH_2$-terminal Kinase<br>**（酸化ストレスは、JNK 経路を介して膵β細胞特異的転写因子 PDX-1 の核外移行を誘導する）** |
| 論　文　審　査　委　員 | （主査）<br>教　授　堀　　正二<br>（副査）<br>教　授　荻原　俊男　　教　授　谷口　直之 |

## 論　文　内　容　の　要　旨

【背景及び目的】

コントロール不良の２型糖尿病における慢性高血糖下で、インスリン生合成や分泌といった膵β細胞機能が低下する現象は糖毒性（glucose toxicity）として広く認識されているが、その背景にある分子機構の詳細は明らかではない。一方で、高血糖持続時に誘導される酸化ストレスは膵β細胞においても惹起され糖毒性の本態としてβ細胞障害に深く関わることが示されてきた。実験的にβ細胞に誘導された酸化ストレスがインスリン生合成・分泌低下といった糖毒性におけるβ細胞機能低下と極めて類似する現象を誘導するのみならず、実際に２型糖尿病のモデル動物に対する抗酸化剤投与はβ細胞アポトーシス抑制やインスリン生合成・分泌回復による耐糖能改善をもたらす。これらの結果は、酸化ストレスが膵β細胞糖毒性において中心的役割を担っていることを示すものに他ならない。

一方、上述のようなインスリン生合成低下、分泌低下の分子背景として、インスリンやグルコキナーゼ等のβ細胞特異的遺伝子群に共通する転写因子として機能する PDX-1（Pancreatic duodenal homeobox-1）の活性低下が関与することが示唆されている。実際に、β細胞において誘導された酸化ストレスは PDX-1 の DNA 結合能低下をもたらし、その下流に位置するインスリンやグルコキナーゼ遺伝子の発現低下の原因となる。PDX-1 は核内外移行によりその活性が一部制御されうることが示唆されていることより、酸化ストレスによる PDX-1 機能低下の原因として細胞内局在変化が関与する可能性、併せてその背景にある分子メカニズムを検討した。

【方法及び結果】

1. 酸化ストレスは PDX-1 の細胞内局在変化を誘導する

膵β細胞由来 HIT-T15 細胞の各細胞分画を用いた Western-blotting にて、細胞全体 PDX-1 量は酸化ストレスに影響を受けない一方、核内 PDX-1 が酸化ストレスに応答して減少することが認められた。また PDX-1 に対する免疫組織染色にて、通常条件培養下で核内優位に局在した PDX-1 が酸化ストレス下では核外優位へと局在変化を呈し、この現象は抗酸化剤（N-acetyl L-cysteine）により抑制された。更に、GFP 標識 PDX-1 を遺伝子導入しその細胞内局在を観察したところ同様の結果を認め、これらより酸化ストレスが PDX-1 の細胞内局在変化を誘導することが示さ

れた。

2. PDX-1の酸化ストレス応答性細胞内局在変化はJNK経路を介する

酸化ストレスによるPDX-1の細胞内局在変化に対して、p38MAPKの阻害薬SB203580が何ら影響を及ぼさない一方、c-Jun amino-terminal kinase（JNK）のdominant negative formの過剰発現はPDX-1の核外優位の細胞内局在変化を抑制し、PDX-1の酸化ストレス応答性細胞内局在変化に関するJNKの関与が認められた。

3. PDX-1の核内移行シグナルは酸化ストレスに応答せず、酸化ストレス応答性核外移行シグナルを有する

PDX-1の核内移行シグナル（Nuclear Localization Signal；NLS）を含むポリペプチド断片、あるいは、NLSに変異を導入したPDX-1を用いた検討で、PDX-1のNLS機能は酸化ストレスにより影響されず、酸化ストレス応答性核外移行にNLSが関与しないことが示された。また、核外移行シグナル（Nuclear Export Signal；NES）の特異的阻害剤Leptomycin Bは酸化ストレス応答性PDX-1細胞内局在変化を阻害し、酸化ストレス応答性NESの存在が示唆された。実際にNESコンセンサス配列と相同性を有する配列をPDX-1に同定し、その部位に変異を導入すると酸化ストレスによる核外移行は消失したことより、同部位が実際に酸化ストレス応答性NESとして機能することを見いだした。

【総括】

以上の結果より、慢性高血糖下に誘導される膵β細胞糖毒性の分子機構の一端として、転写因子PDX-1の酸化ストレス応答性JNK依存性核外移行メカニズムが見出され、PDX-1機能の低下とそれに伴うインスリン生合成低下等のβ細胞機能障害に関わることが示唆された。また、PDX-1に酸化ストレス応答性NESを新たに見出し、さらにこのNESが酸化ストレス応答性にPDX-1の核外移行を促進すると考えられた。

このような分子機構の存在が示されたことで、今後、酸化ストレスやPDX-1、さらにはJNKを標的とした膵β細胞保護療法が、2型糖尿病進展阻止に向けた分子治療の新たなるターゲットとなり得ることが示された。

## 論文審査の結果の要旨

現在の日本において糖尿病患者は爆発的に増加の一途をたどり、この疾患に対する早急な対応に迫られているが、従来の治療は厳格な血糖コントロールによりその合併症進展を予防することに主眼が置かれていた。コントロール不良の糖尿病患者において膵β細胞糖毒性がしばしば認められ、その病態悪化において重要な役割を担っているが、その背景にある分子メカニズムは明らかにされていない。本研究において申請者は、糖毒性の分子メカニズムの一端として、インスリン遺伝子の重要な転写因子であるPDX-1の細胞内局在変化について検討を行った。遺伝子導入を行ったGFP標識PDX-1及び内因性PDX-1の検討から、酸化ストレスに応答してPDX-1が核外移行することを明らかにした。さらに、シグナル経路の解析にて、これに関与する経路としてJNKを同定した。また、酸化ストレス応答性核外移行メカニズム解析の結果、酸化ストレスは、PDX-1の核内移行シグナルには影響を及ぼさないが、核外移行を促進することを明らかにし、その機能部位を新規に同定した。この研究成果は糖毒性の発症メカニズム解明の糸口となり、従来の糖尿病治療法に加えて新たな治療ターゲットの開発に貢献すると考えられ、博士（医学）の学位授与に値する。