

Title	Marked increase of insulin gene transcription by suppression of the Rho/Rho-kinase pathway
Author(s)	中村, 裕美子
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47374
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 なか 中 むら 村 ゆみこ 裕美子

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 20900 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 19 年 3 月 23 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

医学系研究科情報伝達医学専攻

学 位 論 文 名 **Marked increase of insulin gene transcription by suppression of the Rho/Rho-kinase pathway**
(Rho/Rho-kinase 経路抑制によるインスリン遺伝子発現増加)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 堀 正二

(副査)

教 授 下村伊一郎 教 授 荻原 俊男

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

2型糖尿病の発症と進展には、インスリン抵抗性と膵β細胞機能不全が関与すると言われている。低分子量 G 蛋白により活性化されるセリン・スレオニン kinase の一つである Rho kinase はインスリン受容体基質である IRS-1 と結合し、インスリン抵抗性進展に関与することが近年報告され、インスリンシグナル伝達経路における Rho/Rho-kinase 経路の重要性が着目されている。膵β細胞における Rho/Rho-kinase 経路の役割は未だ知られておらず、これを本研究の目的とした。

[方法ならびに成績]

2型糖尿病モデルマウスである C57/BL/KsJ-db/db マウス (16 週齢) と正常血糖マウスである C57BL/6 (16 週齢) の膵臓において、RhoA 抗体を用いた免疫組織染色を行った。RhoA は膵島に発現を認め、2型糖尿病モデルマウスである C57/BL/KsJ-db/db マウスにおいては、正常血糖マウスである C57BL/6 と比較して、RhoA 発現の亢進を認めた。次に、膵β細胞での Rho 発現を検討するために、膵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 and duodenal homeobox factor-1) と RhoA の抗体を用いて二重免疫染色を行ったところ、PDX-1 と RhoA の co-localization を認め、RhoA は、PDX-1 陽性細胞において発現亢進を認めた。次に、膵β細胞での Rho/Rho-kinase 経路の機能的役割を明らかにするために、膵β細胞由来 HIT-T15 細胞を用い、Northern blot analysis にてインスリン mRNA における Rho-kinase 特異的阻害剤である Y27632 の影響を検討したところ、インスリン mRNA 量の著明な増加を認めた。また、HIT-T15 細胞を用いて、インスリンプロモーター活性における Y27632 の影響を検討したところ、やはりその活性の著明な増加を認めた。PDX-1、NeuroD はインスリン遺伝子の重要な転写因子であるが、そのインスリンエンハンサーエレメントである A3-box (PDX-1 binding site) と、E1-box (NeuroD binding site) はインスリン遺伝子発現に重要な役割をする。Y27632 によるインスリンプロモーター活性増加における A3-box、E1-box の関与を検討するために、A3-box、E1-box に変異を導入したインスリンプロモーターを用いたところ、WT インスリンプロモーターと同様に、プロモーター活性の増加を認め、Rho/Rho-kinase 経路抑制によるイ

インスリンプロモーター活性の増加は、A3-box、E1-box に依存しないと考えられた。また、PDX-1 と MafA はインスリン遺伝子の重要な転写因子として知られているが、糖尿病にみられる慢性高血糖状態において、インスリン発現の低下、その分泌低下に、PDX-1、MafA の発現低下やその機能低下が関与するとされており、Rho/Rho-kinase 経路抑制によるこれらの転写因子への影響を検討した。HIT-T15 細胞にて、Y27632 を投与しても、PDX-1、MafA の蛋白量の変化は認めず、また、PDX-1、MafA DNA binding activity も変化を認めなかった。このような結果から Rho/Rho-kinase 経路抑制によるインスリン遺伝子発現増加は、PDX-1、MafA、NeuroD などとは独立した分子機構に依存することが示唆された。

[総 括]

糖尿病マウスの膵β細胞において、Rho 発現は亢進しており、Rho/Rho-kinase、経路の抑制はインスリン遺伝子発現増加に関与することが考えられた。

論文審査の結果の要旨

2型糖尿病の発症と進展には、インスリン抵抗性と膵β細胞機能不全が関与するとされている。低分子量 G 蛋白により活性化されるセリン・スレオニン kinase の一つである Rho kinase はインスリン受容体基質である IRS-1 と結合し、インスリン抵抗性進展に関与することが近年報告され、インスリンシグナル伝達経路における Rho/Rho-kinase 経路の重要性が着目されている。膵β細胞における Rho/Rho-kinase 経路の役割は未だ知られていない。

RhoA 抗体を用いた免疫組織染色において、RhoA は膵β細胞に発現を認め、2型糖尿病モデルマウスの膵β細胞においてはコントロールマウスと比較し、RhoA 発現の亢進を認めた。Rho/Rho-kinase 経路の機能的役割を明らかにするために、膵β細胞由来 HIT-T15 細胞を用いてインスリン mRNA における Rho-kinase 特異的阻害剤である Y27632 の影響を検討したところ、インスリン mRNA 量の著明な増加を認めた。また、HIT-T15 細胞を用いてインスリンプロモーター活性における Y27632 の影響を検討したところ、やはりその活性の著明な増加を認めた。

本研究は、糖尿病マウスの膵β細胞において、Rho 発現は亢進しており、Rho/Rho-kinase 経路の抑制がインスリン遺伝子発現増加に関与することをはじめて示した点で、学位に値するものと認める。