

Title	Glucotoxicity-induced suppression of Cox6a2 expression provokes β -cell dysfunction via augmented ROS production
Author(s)	永井, 泰紀
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/87742
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

論文内容の要旨
Synopsis of Thesis

氏名 Name	永井 泰紀
論文題名 Title	Glucotoxicity-induced suppression of <i>Cox6a2</i> expression provokes β -cell dysfunction via augmented ROS production (糖毒性による <i>Cox6a2</i> 発現抑制は、酸化ストレスの増大を介して膵 β 細胞機能障害をもたらす)
論文内容の要旨	
<p>〔目的(Purpose)〕</p> <p>我々は、糖尿病状態において惹起される酸化ストレスがインスリン遺伝子の重要な転写因子であるPdx1、Mafaの発現や活性を低下させ、膵β細胞機能障害の一因となることを報告してきた。しかしながら、膵β細胞内酸化ストレス増加の分子機序はいまだ明らかではない。また、我々はこれまでに、糖尿病状態にあるマウスに対し糖毒性を軽減することにより、膵β細胞内において発現量が回復する遺伝子が存在することを示しており、その一つとしてミトコンドリア呼吸鎖複合体IVサブユニットである<i>Cox6a2</i>を同定している。<i>Cox6a2</i>欠損マウスの心筋および骨格筋では活性酸素が増大し、高脂肪・高シヨ糖食負荷時のインスリン抵抗性増大は対照マウスに比して改善することが報告されている。しかしながら膵β細胞機能への関与は不明である。そこで、本研究では、膵β細胞における<i>Cox6a2</i>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した。</p> <p>〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕</p> <p>野生型マウス組織における<i>Cox6a2</i>遺伝子発現は、心筋・骨格筋の他に膵島・肺・眼において高発現を示した。次に、肥満2型糖尿病モデルである<i>db/db</i>マウスを用いて、糖尿病状態における各組織の<i>Cox6a2</i>発現量変化を解析した。未治療<i>db/db</i>マウスでは正常対照<i>db/m</i>マウスに比べて、膵島における<i>Cox6a2</i>発現量は著明な低下を認め、SGLT2阻害剤であるempagliflozinを1週間投与し血糖値を改善させると、有意な発現量の改善を認めた。一方、<i>Cox6a2</i>の最も豊富に発現する心筋、骨格筋（ヒラメ筋）では大きな発現量の変化は認めなかった。</p> <p><i>Cox6a2</i>の機能解析のため、マウス膵β細胞株であるMIN6-CB4細胞におけるGFP発現アデノウイルスを用いたノックダウン実験を行った。flow cytometryにより単離したGFP陽性<i>Cox6a2</i>ノックダウンアデノウイルス感染細胞では88%の発現抑制を示し、これにより活性酸素種の産生増加を認めた。一方で、ATP、グルコース応答性インスリン分泌（GSIS）、およびPdx1、Mafa、insulinの遺伝子発現にも有意な変化はみられなかった。そこで、より長期の膵β細胞障害への影響を検討する必要があると考え、<i>Cox6a2</i>ノックアウトマウスを作製し、<i>in vivo</i>解析を行った。通常食では、対照マウスと比較して両群間に体重、耐糖能、グルコース応答性インスリン分泌、インスリン抵抗性の有意な差はみられなかったが、高脂肪高シヨ糖食負荷では、<i>Cox6a2</i>ノックアウトマウスにおい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、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。</p> <p>次に、<i>Cox6a2</i>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により同定した同遺伝子のcoding sequenceから15kbp上流にある800bpのオープンクロマチン領域（<i>Cox6a2</i>-βenh）を用いてレポーター解析を行った。転写因子結合モチーフ解析と既存のChIP-seqデータベースから、MafaとFoxa2が<i>Cox6a2</i>の転写制御に関与している可能性があると考えられ、<i>Cox6a2</i>-βenh reporter plasmid内、MafaおよびFoxa2の結合モチーフ配列に変異を導入し、これら転写因子の関与の有無を検討した。MIN6-CB4細胞において<i>Cox6a2</i>-βenhは著明な転写活性の増大を示し、Mafa結合モチーフへの変異導入により有意な転写活性の低下を認めた。一方、Foxa2結合モチーフへの変異導入では、転写活性の変化はみられなかった。また、非β細胞であるHEK293細胞において、Mafaを共発現させた場合に<i>Cox6a2</i>-βenhは活性化を示し、Mafa結合モチーフへの変異導入によりその活性は低下した。さらに、MIN6-CB4細胞においてMafaをノックダウンすると、<i>Cox6a2</i>発現の有意な低下を認めた。以上より、Mafaが<i>Cox6a2</i>発現を直接制御することが示唆された。</p> <p>〔総括(Conclusion)〕</p> <p>糖毒性下膵β細胞内では、Mafaにより発現制御を受ける<i>Cox6a2</i>の発現低下に起因した活性酸素種増大により、膵β細胞障害が生じる可能性が示された。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 永井 泰紀			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	下村 伸一郎 署名
	副 査	大阪大学教授	猪俣 善隆 署名
	副 査	大阪大学寄附講座教授	中村 啓彦 署名
論文審査の結果の要旨			
<p>膵β細胞が慢性的な高血糖に晒されると機能障害をきたすが、この現象は糖毒性として広く知られている。本研究では、膵島microarray解析上、2型糖尿病マウスの糖毒性軽減により発現量が増大することが示された<i>Cox6a2</i>遺伝子の、膵β細胞内での働きとその遺伝子発現調節につき検討が行われた。</p> <p>2型糖尿病マウスでは、膵島内<i>Cox6a2</i>遺伝子発現は著明に低下しており、糖毒性の軽減によりその発現量が改善することが確認された。<i>Cox6a2</i>はミトコンドリア呼吸鎖複合体IVのサブユニットであるが、膵β細胞株において<i>Cox6a2</i>をノックダウンすると活性酸素種の産生増加が認められた。<i>Cox6a2</i>全身ノックアウトマウスでは、高脂肪高シヨ糖食負荷条件下において、対照マウスと比べインスリン感受性が良いにも関わらず耐糖能の悪化を認め、膵β細胞機能障害が存在すると考えられた。膵島DNAのATAC-seqにより同定した<i>Cox6a2</i>遺伝子発現調節領域のオープンクロマチン部位を用いてレポーター遺伝子解析が施行され、膵β細胞特異的転写因子であり高血糖で発現が抑制されるMafaが<i>Cox6a2</i>遺伝子の転写を直接制御することが示された。</p> <p>以上より、糖毒性下膵β細胞内では、Mafaにより発現制御を受ける<i>Cox6a2</i>の遺伝子発現低下に起因した活性酸素種増大により、膵β細胞機能障害が生じる可能性が示され、学位に値するものと認める。</p>			