

## 論文の内容の要旨

論文題目 膵β細胞機能における小胞体ストレスの役割の検討  
— XBP-1 および関連分子の解析 —

氏 名 寺井 愛

### 【序文】

糖尿病におけるインスリン分泌低下のメカニズムの全貌は未だに明らかにはなっていない。剖検の結果より糖尿病では発症以前から膵β細胞量が進行性に減少していることが示されているが、膵β細胞量減少の要因の一つとして小胞体ストレスの関与が示唆されている。

XBP-1 (X-box binding protein 1) は小胞体ストレスセンサーである IRE1 により mRNA が splicing を受け活性型の spliced form XBP-1 となって核へ移行し、シャペロン分子や小胞体関連分解関連分子の誘導を介して Unfolded protein response (UPR) に関与する転写因子である。

膵β細胞は、常時インスリンを産生・分泌するという機能を有するため、膵β細胞には高度に発達した小胞体が必要であり、小胞体ストレス応答機構の異常により膵β細胞障害が引き起こされ糖尿病につながるということが明らかにされてきている。膵β細胞特異的 *Xbp1* 欠損マウスはインスリン分泌低下を伴う耐糖能異常を示すことが報告されているが、これまで XBP-1 を膵β細胞で過剰発現させた生体モデルの報告はない。

### 【目的】

本研究では、膵β細胞に spliced form XBP-1 (以下 XBP-1s) を過剰発現させたモデルを解析し、膵β細胞機能における小胞体ストレスの役割を検討した。

### 【結果】

**XBP-1s 過剰発現 MIN6 細胞ではインスリン遺伝子の発現とインスリン分泌量、インスリン含量の低下を認めた**

アデノウイルスを用いて XBP-1s を過剰発現させた MIN6 細胞を用いて実験を行った。

Western Blotting および qPCR で XBP-1s の過剰発現を確認し、下流のシャペロン因子である *Hspa5* (BiP)、*Dnajc3a* (p58IPK) の mRNA レベルでの発現も上昇を認めた。

マイクロアレイ解析では BiP、p58IPK、*Sdf2l1* の発現上昇のほか、膵β細胞の分化・機能維持に重要な転写因子である *Pdx1* と *MafA* および下流因子の *Nkx6.1*、*Slc2a2* (Glut2) の低下、開口分泌に関わる因子である *Snap25*、*Vamp2* の低下など、様々な経路の因子の発現に影響を認めた。*Pdx1* は XBP-1s 過剰発現 MIN6 細胞でコントロールと比べ約 0.3 倍と著明に低下していた。

マイクロアレイの結果をもとに qPCR でも解析を行ったところ、マイクロアレイでは低下を認

めなかったインスリン遺伝子 (*Ins1*, *Ins2*) の発現も有意に低下しており、その他 *p58IPK* や *Sdf2l1* の発現上昇や、*Pdx1*, *MafA*, *Nkx6.1*, *Glut2* の低下、*Snap25*, *Vamp2* の低下を qPCR でも認めた。

グルコース応答性のインスリン分泌の検討では、XBP-1s 過剰発現 MIN6 細胞は 1well あたりのインスリン分泌量およびインスリン含量が低下していた。インスリン分泌量をインスリン含量で補正したインスリン分泌率はコントロール細胞と比べて有意差を認めなかった。

### 膵 β 細胞特異的 XBP-1s 過剰発現マウスはインスリン分泌低下を伴う耐糖能異常を認めた

ラットインスリンプロモーターの下流に *Xbp1s* をつなぐコンストラクトにより膵 β 細胞特異的 XBP-1s 過剰発現マウス (以下 Rip-Xbp1s Tg マウス) を作製し、良好に繁殖し得た 3Line (Line138、Line293、Line316) の解析を行った。

Rip-Xbp1s Tg マウスはコントロールマウスと比べて 3Line とも、体重に有意差を認めなかったが、若齢時 (4 週齢時点) から随時血糖は高値であった。特に Line316 ではオスメスともに 4 週齢時から随時 300~400mg/dl 程度と明らかな高血糖を認め、オスマウスは 8 週齢前後で死亡したため、残りの 2Line について解析を進めた。

インスリン負荷試験では Rip-Xbp1s Tg マウスはコントロールマウスと比較してインスリン感受性に差を認めなかった。経口ブドウ糖負荷試験を行ったところ、Rip-Xbp1s Tg マウスはインスリン分泌低下を伴う耐糖能異常を認めた。

Rip-Xbp1s Tg マウスの膵島を単離し mRNA の解析を行った。インスリン遺伝子はコントロールマウスと比べて低下傾向であり、*Pdx1* と *MafA* および下流の *Nkx6.1*, *Glut2* の発現が低下していた。

次に単離膵島を用いてグルコース応答性のインスリン分泌の検討を行った。Rip-Xbp1s Tg マウスではコントロールマウスと比較して、単離膵島 1 個当たりのインスリン分泌量が低下していたが、インスリン含量も著明に低下しており、インスリン分泌率の低下は認めなかった。

Line316 の組織学的検討では、Rip-Xbp1s Tg マウスの膵 β 細胞面積が低下している可能性が示唆された。

### 【考察】

膵 β 細胞における小胞体ストレスとインスリン分泌低下の関与を検討するため、膵 β 細胞で XBP-1s を過剰発現させた in vitro および in vivo のモデルを作製し解析した。どちらのモデルにおいてもインスリン分泌低下を認め、膵 β 細胞において XBP-1s を過剰発現させることでインスリン分泌が低下することを、生体モデルで初めて明らかにした。

膵 β 細胞特異的 *Xbp1* 欠損マウスの表現型や、XBP-1 の小胞体ストレス応答因子としての役割から、XBP-1s を過剰発現させることで小胞体ストレスを緩和しインスリン分泌を促す方向に働く可能性が予想されるが、予想に反し XBP-1s 過剰発現 MIN6 細胞および Rip-Xbp1s Tg マウスとともにインスリン分泌の低下を認めた。

インスリン分泌低下の要因としては、膵β細胞量の減少のほか、①インスリン遺伝子の転写レベルの低下、②翻訳低下、③プロセシングの障害、④開口分泌経路の障害などが考えられる。

#### ① 転写レベルでのインスリンの減少

XBP-1s 過剰発現 MIN6 細胞では *Ins1*、*Ins2* 遺伝子の発現低下を認め、Rip-Xbp1s Tg マウスの単離膵島でも有意差はつかないものの *Ins1*、*Ins2* の mRNA レベルの発現は低下していた。

#### ② 翻訳レベルでの低下

小胞体ストレス応答による翻訳抑制により、インスリンの翻訳も低下している可能性が考えられる。

#### ② プロセシングの障害

XBP-1s 過剰発現 MIN6 細胞のマイクロアレイでは、インスリンのプロセシングに関わる酵素である PC1、PC2 の低下を認めた。膵β細胞特異的 XBP-1 欠損マウスではインスリンのプロセシングが障害されることが報告されており、XBP-1s の過剰発現においてもプロセシングに影響を与えている可能性が考えられる。

#### ④ 開口分泌経路の障害

XBP-1s 過剰発現 MIN6 細胞でのマイクロアレイ解析および qPCR の解析において、開口分泌に関わる *Snap25* および *Vamp2* の低下を認めた。Rip-Xbp1s Tg マウスの単離膵島でも有意差はつかないものの *Snap25*、*Vamp2* とともに低下を認めた。しかしながら、グルコース応答性のインスリン分泌の検討では、XBP-1s 過剰発現 MIN6 細胞および Rip-Xbp1s Tg マウスでともにインスリン含量が著明に低下しており、インスリン分泌率の低下は認めなかった。

Rip-Xbp1s Tg マウスではグルコース応答性のインスリン分泌量とインスリン含量の低下を認めたものの、インスリン分泌率は低下していなかったことから、Rip-Xbp1s Tg マウスにおいては膵β細胞の機能低下というよりは膵β細胞量の低下がインスリン分泌低下につながっている可能性が示唆される。

また今回 XBP-1s 過剰発現 MIN6 細胞および Rip-Xbp1s Tg マウスの単離膵島とともに *Pdx1* と *MafA* の発現が低下している可能性が示唆された。ラットの単離膵島にアデノウイルスを用いて XBP-1s を過剰発現させた報告においても *Pdx1* と *MafA* の低下を認めており、これらの遺伝子の発現低下が本モデルマウスのインスリン分泌低下の原因となっている可能性が考えられる。

Rip-Xbp1s Tg マウスは発生の段階から XBP-1s を過剰発現させたモデルであり、少なくとも 4 週齢時から随時血糖が高値であった。特に Line316 は顕性高血糖の経過を認めており、膵β細胞量の減少が、糖毒性などの二次的な変化を見ている可能性は否定できない。

また今回解析した膵β細胞特異的 XBP-1s 過剰発現マウスと、既に報告のある膵β細胞特異的 *Xbp1* 欠損マウスがともにインスリン分泌低下を伴う耐糖能異常という共通の表現型を示した要因として、XBP-1s とインスリンの産生がベルカーブを示す可能性のほか、生理的な XBP-1s の発現と、ラットインスリンプロモーターによる強制発現の発現時期は異なることが予想され、発

生段階における影響を観察している可能性もある。発生段階での影響を除外するため、現在 Tet-on システムを用いた Inducible 過剰発現マウスを作製中である。

#### 【結論】

膵  $\beta$  細胞に XBP-1s を過剰発現させた in vitro および in vivo でのモデルを解析し、ともにインスリン分泌低下を認めた。XBP-1 をはじめとする小胞体ストレスの制御機構は複数の転写因子を変動させ、インスリンの発現・翻訳・開口放出など、様々な経路を介して膵  $\beta$  細胞のインスリン分泌機能に影響を与えることが示唆される。