

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 野本 博司

### 学位論文題名

膵β細胞における small Maf 転写因子群の意義とインクレチン効果に関する検討  
(Function of small Maf transcriptional factors on pancreatic beta-cells and incretin effects)

#### 【背景と目的】

膵β細胞において、実に様々な因子がインスリン合成・分泌に関わっているが、なかでも最も重要なものの一つは血中のグルコース濃度である。このグルコース濃度依存性のインスリン合成・分泌応答には、インスリン遺伝子のプロモーター領域における、種々の転写因子による調節が関与していることが明らかとされている。中でも Maf 転写因子群のひとつである MafA は膵β細胞特異的に発現し、インスリンの転写・合成のみならず、膵β細胞の分化・成熟にも深く関与することが明らかとされてきた。Maf 転写因子群は MafA を含む large Maf 群と MafF, MafG, MafK を含む small Maf 転写因子群とに大別され、前者では basic domain と DNA 結合領域に加え N 末端側に転写活性部位を有するが、small Maf 転写因子群では同部位を有さない。しかしながら small maf 転写因子群は Maf recognition element (MARE) を介して種々の生体機構を調節することが明らかとされてきている。Maf 転写因子群は 2 量体を形成し MARE に結合するが、small Maf 転写因子群は homodimer を形成した際には転写活性化部位を有さないという特徴のため転写活性を負に制御するとされ、一方で他の転写因子と heterodimer を形成した際にはもう一方の因子の性質を支持し、転写に対し抑制的にも促進的にも作用するとされている。過去に報告された膵β細胞において MafK を過剰発現させた実験では、グルコース応答性のインスリン分泌の低下と MafA の代償的な DNA 結合能の上昇が示されている。一方で今回の我々の研究に先立ち、当研究室において DNA 結合領域を有さない MafK 配列を過剰発現させ内因性の small maf 転写因子群の機能を競合的に抑制(dominant-negative MafK; DN-MafK)するコンストラクトを用い、膵β細胞株への DN-MafK 発現実験を行ったところ、インスリン転写活性の上昇が認められるという結果を得た。これらの結果からは small maf 転写因子群それ自身は膵β細胞においてはインスリン転写に関し抑制的に働いており、他の Maf 転写因子群と競合的に作用していると考えられる。しかしながら small Maf 転写因子群の膵β細胞における局所作用に関しての知見は現在まで限定的である。そこで当研究室では C57BL6/J マウスを背景に膵β細胞特異的 DN-MafK トランスジェニックマウス(DN-MafK Tg マウス)を作製し、その表現型解析を行った。上述の細胞実験の知見から本 Tg マウスでは耐糖能が改善すると考えたが、通常食飼育下ではワイルドタイプ(Wt)マウスと比較し明らかな表現型の違いを認めなかった。そこで small Maf 転写因子群が酸化ストレスにて誘導される因子であることを考慮し、本研究では DN-MafK Tg マウスを高脂肪食下で摂餌しその表現型を解析することとした。またそれらの結果を、膵β細胞株を用いて *in vitro* の系で確認を行うこととした。

## 【方法と結果】

### 1. 膵β細胞特異的 DN-MafK Tg マウスの高脂肪食下における表現型解析

6週齢の雄性 C57BL6/J マウス(Wt マウス)と DN-MafK Tg マウスを高脂肪食で摂餌し、10週間飼育した。両マウス間で体重・摂餌量に差は認めず、16週齢で施行したインスリン低血糖試験ではインスリン抵抗性に有意な差を認めなかった。しかしながら2週毎に測定した随時血糖では DN-MafK Tg マウスにおいて有意に改善を認め、経口ブドウ糖負荷試験においても DN-MafK Tg マウスにおいて耐糖能の改善ならびにインスリン分泌の増強を認めた。組織学的解析では、各群の膵β細胞量・膵β細胞増殖率に有意な差は認めなかった。単離した膵島の解析においては、DN-MafK Tg マウスにおいてインスリン遺伝子・グルコキナーゼ遺伝子の有意な発現亢進を認め、グルコース応答性インスリン分泌も上昇を認めた。

### 2. 高脂肪食下 DN-MafK Tg マウスへの liraglutide 投与実験

6週齢から高脂肪食で摂餌した Wt マウスと DN-MafK Tg マウスに、8週齢から GLP-1 受容体作動薬 liraglutide を 200µg/kg/日で 16週齢まで連日投与した(liraglutide 群)。liraglutide 群は control 群と比較し、両マウスともに有意な体重減少とインスリン抵抗性の改善を認めた。Wt マウスでは liraglutide 群で有意な随時血糖の改善と経口ブドウ糖負荷試験での耐糖能の改善が確認されたが、DN-MafK Tg マウスにおいては随時血糖・ブドウ糖負荷試験での耐糖能のいずれにも有意な変化は認められなかった。組織学的検討では、Wt マウスにおいても DN-MafK Tg マウスにおいても liraglutide 投与による膵β細胞量・膵β細胞増殖率の変化は認めなかった。

### 3. マウス膵β細胞株 MIN6 を用いた検討

DN-MafK を発現するアデノウイルスベクター(Ad-DN-MafK)とそのコントロールベクター(Ad-GFP)をそれぞれ MIN6 細胞に同力価で感染させ、liraglutide への反応性、細胞増殖、インスリン分泌能、遺伝子発現への影響を検討した。MIN6 細胞においては DN-MafK 発現の有無にかかわらず、liraglutide による細胞増殖効果は認められた。コントロール MIN6 細胞では、グルコース応答性のインスリン分泌上昇と liraglutide 投与によるインスリン分泌上昇が確認された。一方で DN-MafK 発現 MIN6 細胞では、低グルコース刺激下でコントロール MIN6 細胞と比較し有意なインスリン分泌の上昇を認めたが、高グルコース刺激ならびに liraglutide によるインスリン分泌の有意な上昇は認められなかった。DN-MafK 発現 MIN6 細胞においては、コントロール MIN6 細胞と比較しインスリン遺伝子の有意な上昇を認めた。

## 【考察】

DN-MafK 発現による内因性 small Maf 転写因子群の抑制の効果を *in vivo*、*in vitro* の両方向から検討した。DN-MafK Tg マウスは高脂肪食下において耐糖能の改善を認め、その背景にはインスリン分泌・遺伝子発現の上昇を認めた。空腹時に高インスリン血症が認められること、DN-MafK を発現する単離膵島や MIN6 細胞において低グルコース刺激でもインスリン分泌の亢進が認められたことは、グルコキナーゼ遺伝子発現の上昇を介している可能性がある。また liraglutide 投与による耐糖能の改善やインスリンの分泌上昇が減弱している点からは、内因性 small Maf 転写因子群が GLP-1 シグナルの経路に影響している可能性が示された。これらの結果からは small Maf 転写因子群は膵島においてインスリン分泌を抑制的に調節するのみならず、血糖に応じた適切なインスリン分泌を調節している可能性があり、その背景にはインスリン遺伝子・グルコキナーゼ遺伝子の発現調節や GLP-1 経路へ関与が存在する可能性が示唆された。