

氏 名	武 井 祥 子
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 583 号
学位授与年月日	平成 31 年 3 月 20 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	膵β細胞におけるコレステロール合成酵素抑制の役割の解明
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教 授 原 一 雄 (委 員) 准教授 豊 島 秀 男 講 師 木 村 博 昭

論文内容の要旨

1 研究目的

コレステロール合成を行うメバロン酸経路の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素 (HMGCR) の阻害薬スタチンは、強力な血中リポ蛋白代謝改善作用を有し、これまで動脈硬化症の治療に広く使用されている。しかしながらスタチンは、糖尿病の新規発症リスクを約 9%増加させる。さらに *HMGCR* の遺伝子多型でも糖尿病の新規発症が増えることが報告されている。主に *in vitro* の研究報告ではあるがスタチンによる糖尿病発症機序の一つとして、膵β細胞におけるインスリン分泌障害が挙げられる。一方でスタチンには、メバロン酸経路外に作用する非特異的効果 (off-target effects) が報告されている。そこで遺伝学的に HMGCR を阻害できれば、スタチンの off-target effects の可能性を排除して実験結果の解釈が可能となる。しかし、以前我々が作製した全身での *Hmgcr* を欠損させたマウスは胎生致死となった。これらの知見に基づき我々は膵β細胞特異的な *Hmgcr* 欠損マウスを作製し、膵β細胞における HMGCR の役割を解析した。

2 研究方法

Hmgcr 遺伝子の開始コドンの位置するエクソン 2 を含むエクソン 2、3、4 の上流及び下流に loxP 配列を挿入した floxed *Hmgcr* マウスに、膵β細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する rat insulin 2 promoter Cre トランスジェニックマウス (Ins2-Cre) を交配することにより、膵β細胞特異的 *Hmgcr* 欠損 (以下 β-KO) マウスを作製した。コントロールとして Ins2-Cre を用いた。

生体における実験として、耐糖能の評価のために空腹時、摂食時の血糖値及び血中インスリン値を測定し、経口ブドウ糖負荷試験およびインスリン感受性試験を行った。また血中の脂質の評価も行った。膵島の組織学的な評価のために、膵臓を採取して HE 染色及びインスリン染色、グルカゴン染色、TUNEL 染色、Ki67 に対する免疫染色を行った。さらにマウスの膵管よりコラゲナーゼを灌流し、膵島の単離を行った。単離した膵島のインスリン含量、インスリン分泌能、脂質組成を評価した。膵島において、β細胞の変化を説明するインスリン分泌およびβ細胞の分化に関わる遺伝子、脂質代謝関連遺伝子の発現動態を調べた。

3 研究成果

β -KO マウスの膵島における *Hmgcr* 遺伝子発現は、コントロールと比較して 78%抑制されていた。完全に欠損しないのは、膵島に残存する α 細胞に起因すると考えられた。

生後 10 週齢において体重はコントロール 24.44 ± 1.72 g に対し、 β -KO マウス 22.58 ± 1.10 g と有意な減少を認めた。また空腹時血糖値はコントロール 72.78 ± 17.94 mg/dL に対し、 β -KO マウス 373.24 ± 99.47 mg/dL と顕著な上昇を認めた。空腹時の血漿インスリン値はコントロール 0.73 ± 0.61 ng/mL に対し、 β -KO マウス 0.24 ± 0.05 ng/mL と低下が認められた。体重減少はインスリン作用の低下で説明ができると考えられた。また摂食時グルカゴン値はコントロール 2.93 ± 1.97 pmol/L に対し、 β -KO マウス 8.42 ± 4.09 pmol/L と上昇が認められた。空腹時血糖値は生後 9 日目で既に上昇が認められた。経口ブドウ糖負荷試験ではコントロールと比較して β -KO マウスで血糖値の上昇を認めたが、インスリン感受性試験では 2 群間で有意差は認められず、 β -KO マウスでインスリン分泌障害により高血糖を来していると考えられた。 β 細胞特異的に *Hmgcr* 遺伝子を欠損させたが、血漿総コレステロールは 2 群間で有意差はなかった。

組織学的には、 β -KO マウスにおいて全膵臓面積に対する膵島の数 は 46%減少し、膵島面積は 65%減少していた。 β 細胞の面積も 83%減少したが、 α 細胞の面積に変化は認められなかった。また β -KO マウスの膵島ではマントル・コア構造が破壊されており、この変化は生後 9 日目で既に認められた。生後 9 日目及び 14 日目の膵島ではインスリン - グルカゴン共陽性細胞が認められ、transdifferentiation が示唆された。膵 β 細胞数の減少の原因が細胞死の増加か、細胞増殖の低下のどちらに起因するかを評価するため、TUNEL と Ki67 に対する免疫染色を行った。TUNEL 染色陽性細胞数や Ki67 陽性細胞数については 2 群間に有意差は認められなかった。

β -KO マウスの膵島ではインスリン含量の低下を認め、低濃度のグルコース刺激によるインスリン分泌は保たれていたものの、高濃度のグルコース刺激によるインスリン分泌の低下を認めた。 β -KO マウスの膵島ではインスリン遺伝子や、 β 細胞の分化や成熟に重要な *Mafa* (musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family A) 及び *Pdx1* (pancreatic and duodenal homeobox 1)、*Neurod1* (neurogenic differentiation 1) 遺伝子の発現の低下を認めたが、*Ngn3* (neurogenin 3) の遺伝子発現は保たれていた。

β -KO マウスの膵島では *Hmgcr* 遺伝子の欠損のため、総コレステロール含量の低下を認めた。またコレステロール代謝を制御する転写因子である *Srebf2* (sterol regulatory element binding transcription factor 2) や、*Srebf2* の標的遺伝子である *Ldlr* (LDL receptor) 等の遺伝子の発現低下が β -KO マウスで認められた。

4 考察

膵 β 細胞特異的な *Hmgcr* 遺伝子の欠損は、膵 β 細胞の減少を来とし、また膵島のインスリン分泌障害も来すため、糖尿病を引き起こすことが明らかとなった。transdifferentiation も β 細胞の減少に関わっている可能性があると考えられた。また、生後 9 日目には既に空腹時血糖値の上昇や膵島の形態学的変化が認められ、5 週齢の時点では β 細胞のアポトーシスの増加や細胞増殖低下は認められないことから、 β 細胞の減少は胎生期から出生前後に起きている可能性が考えられた。

Hmgcr の上流に位置する *Srebf2* を膵 β 細胞に過剰発現させると、 β 細胞の減少及び形態が変化し、 β 細胞の分化に関わる転写因子である *Pdx1* の発現低下を伴っていたことが報告されている。

β -KO マウスでも同様な所見が認められているが、*Srebf2* とその標的遺伝子群の発現亢進は認められず、異なる機序が考えられた。器官のサイズや形の制御に関わる Hippo 経路の YAP (Yes-associated protein) 及び TAZ (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) が細胞組増殖を促進し、メバロン酸経路によって制御されることが最近報告されている。YAP/TAZ の活性化は、メバロン酸経路の下流で産生される GGPP (Geranylgeranyl pyrophosphate) によるゲラニルゲラニル化に関わっている。また YAP はマウスの膵臓の発生初期に高度に発現しており、 β 細胞の増殖に重要であることが報告されているため、*Hmgcr* 遺伝子の欠損により YAP/TAZ の活性化が抑制されることが β 細胞の減少を引き起こしているかもしれない。

5 結論

膵 β 細胞特異的な *Hmgcr* 遺伝子の欠損は、膵 β 細胞の減少を来とし、また膵島のインスリン分泌障害も来すため、糖尿病を引き起こすことが明らかとなった。出生前後の β 細胞の増殖障害や、transdifferentiation が β 細胞の減少に関わっている可能性が考えられ、発生段階における β 細胞の維持にメバロン酸経路が重要であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究はスタチンによる糖尿病発症のメカニズムを明らかにするのみならず、コレステロール代謝の β 細胞発生・分化と細胞機能維持における役割を解明する可能性のある学問的意義と新規性のある研究と評価できる。

HMGCR 遺伝子欠損の β 細胞減少への影響は胎生期から見られることが予測される実験結果で胎児の組織学的検討も望まれるが、学位論文として可否判断を超えたレベルであり今後更に研究を進展させていけば好ましいと思われる。

最終試験の結果の要旨

2 次審査の指摘事項は軽微なもので改訂も適切になされている。 よって本学位論文審査としては合格とする。