

グルコース感受性転写因子 ChREBP に注目した 2 型糖尿病患者の膵β細胞機能障害（ブドウ糖毒性）の 分子機構の解明

岐阜大学医学部附属病院 生体支援センター

講師 飯塚 勝美

(共同研究者)

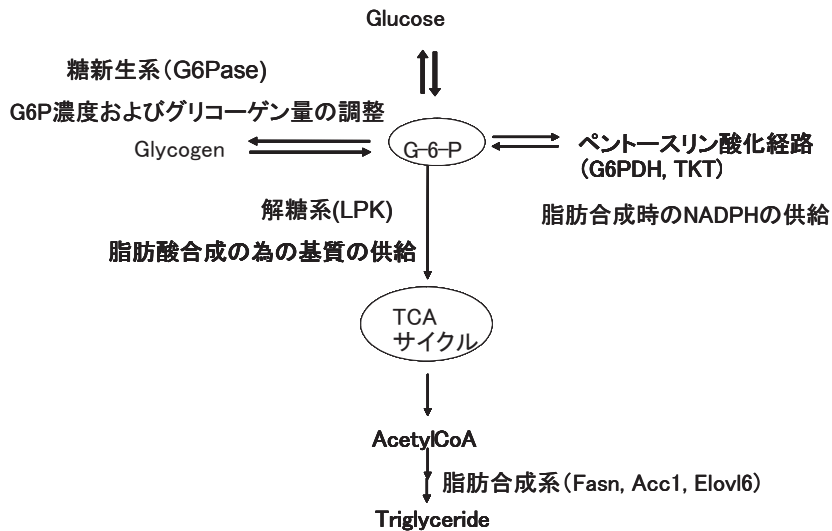
岐阜大学大学院医学系研究科 内分泌代謝病態学 准教授 堀川 幸男

岐阜大学大学院医学系研究科 内分泌代謝病態学 教授 武田 純

緒言

現代社会においては、過剰な糖質や脂質の摂取がメタボリックシンドロームを引き起こし、重大な社会問題となっている。過剰な糖質が摂取された場合、肝臓では貯蔵効率の悪いグリコーゲンでなく効率の良い中性脂肪として貯蔵する。その際に中心的な働きをする転写因子としてインスリンにより活性化される SREBP1c とグルコースにより活性化される Carbohydrate Response Element Binding Protein (ChREBP) が知られている。我々はこれまでメタボリックシンドロームにおける ChREBP の役割について明らかにしてきた。ChREBP は脂肪合成に直接関与する解糖系や脂肪合成系遺伝子のみならずエネルギー代謝調節に関与する分泌蛋白や時計関連遺伝子の発現をつかさどることを明らかにした (図 1)。さらに、ChREBP の機能抑制により遺伝性肥満モデルマウスである ob/ob マウスで見られる耐糖能障害、肥満、脂肪肝などの代謝異常が改善することを明らかにした。したがって肝臓での ChREBP の機能抑制は糖尿病の改善効果があることは証明されたが、他の臓器における役割は不明のままであった。

図1 ChREBPの標的遺伝子と機能



そのほか、時計遺伝子、血糖降下ホルモンなどがある。

他方、日本人2型糖尿病の特徴の一つとして、インスリン分泌の相対的な低下すなわち膵β細胞の機能不全が挙げられる。膵β細胞の機能不全を引き起こす主要な要因の一つは高血糖状態であることから、グルコース刺激により活性化されるグルコース感受性転写因子 Carbohydrate Response Element Binding Protein (ChREBP) の膵β細胞における役割に注目する。本研究ではChREBPとグルコースによる膵β細胞機能不全(ブドウ糖毒性)との関連を明らかにし、ChREBPの機能抑制が糖尿病状態における膵β細胞の機能保持に寄与するかを培養細胞および糖尿病モデル動物を用いて明らかにする。

方法と結果

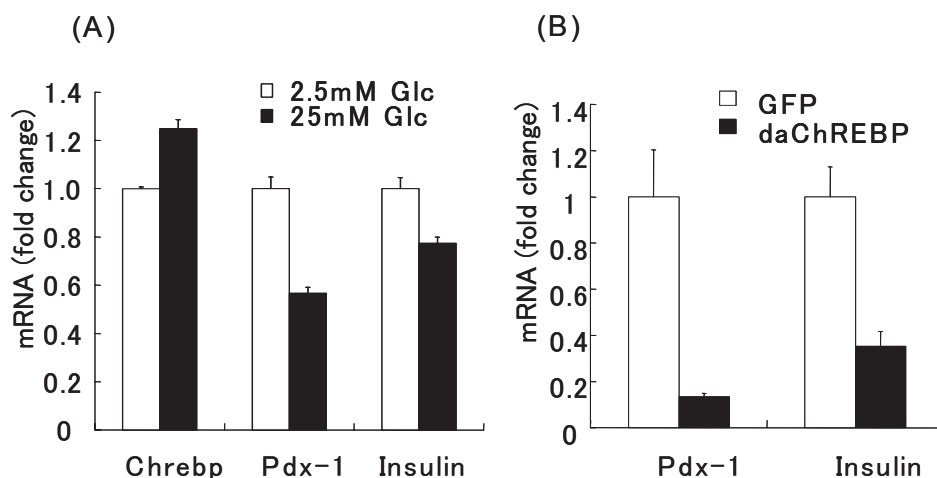
インスリン分泌におけるグルコース応答性の保持されているラットインスリノーマINS-1E細胞を用いて、以下の解析をおこなった。

1) グルコースおよびChREBP過剰発現アデノウイルスの感染によるPDX-1遺伝子発現への効果。

INS-1細胞において、グルコース刺激およびアデノウイルスを用いた恒常活性型ChREBPの過剰発現により、ChREBPの標的遺伝子群は発現誘導が見られ、逆にinsulin

遺伝子やPdx-1 遺伝子は発現抑制が見られた(図2A および2B)。次に、Pdx-1 は insulin 遺伝子の発現に加えて膵β細胞の分化に関わる遺伝子の発現を制御することから、Pdx-1 発現へのChREBP の関与を検討した。Pdx-1 遺伝子に関しては、上流-4kbp のプロモーターのdeletion study ではChREBP の過剰発現では変化が見られなかったため、ChREBP による直接的な発現調節をうけないと考えられた。

図2 グルコース刺激と恒常活性型ChREBP 過剰発現(正常の7倍)によるPdx-1およびinsulin遺伝子発現変化



2) グルコースおよび ChREBP 過剰発現アデノウイルスの感染による Thioredoxin interacting protein(Txnip) 遺伝子発現への効果。

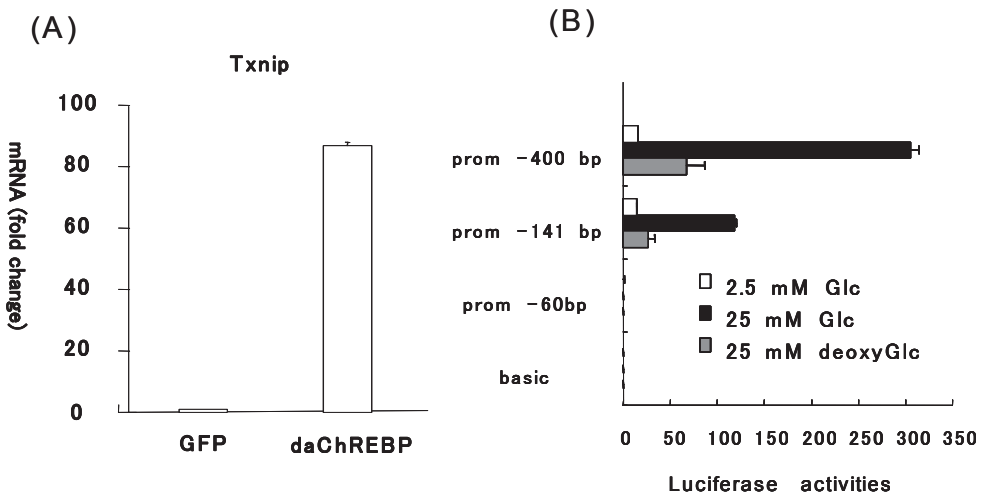
β細胞におけるChREBP 活性化メカニズムは、ペントースサイクルはβ細胞ではあまり使われてないため、肝臓で見られるChREBP 活性化機構とは異なる可能性がある。

Txnip は膵β細胞におけるブドウ糖毒性において重要な役割をされると考えられているため、同遺伝子に注目してChREBP 活性化機構について検討した。

Txnip はグルコースおよび恒常活性型 ChREBP の過剰発現により誘導される。さらにChREBP の転写活性を阻害する dominant negative Mix を過剰発現し、グルコースによるTxnip の誘導を調べたところ、他のChREBP 標的遺伝子の発現が抑制されたあともTxnip 遺伝子の発現は部分的にしか抑制されなかった。グルコースによるTxnip 遺伝子発現機構にChREBP を介さない経路が存在すると考え、2-デオキシグルコースによ

る ChREBP 活性化の可能性を検証した。2-デオキシグルコースは、グルコース-6-リン酸レベルまでしか代謝されず、解糖系代謝産物や ATP の増加にいたらないグルコールアナログ(結果としてグルコース-6-リン酸の ChREBP 転写活性化への寄与をみる)である。他の ChREBP 標的遺伝子と異なり、Txnip は 2-デオキシグルコースにより誘導された。次に、グルコースや 2-デオキシグルコースによる ChREBP の Txnip 遺伝子プロモーター内 ChREBP 結合部位 (ChoRE) に対する結合能を調べたところ、グルコース刺激では ChREBP の ChoRE への結合能が増加するのに対して、2-デオキシグルコース刺激では逆に ChREBP の ChoRE への結合は阻害された。この現象に一致して、Txnip 遺伝子の ChoRE を 3 つタンデムに並べたエレメントを含む pGL3 プロモーターベクターを用いたレポーターアッセイでもグルコースに対する反応は見られたものの、2 デオキシグルコースに対する反応は見られなかった。したがって、グルコースによる Txnip 遺伝子誘導効果は、ChREBP 依存性、非依存性の 2 つの経路があることが明らかになった。

図 3 TXNIP はグルコースおよび 2-デオキシグルコースにより活性化される。

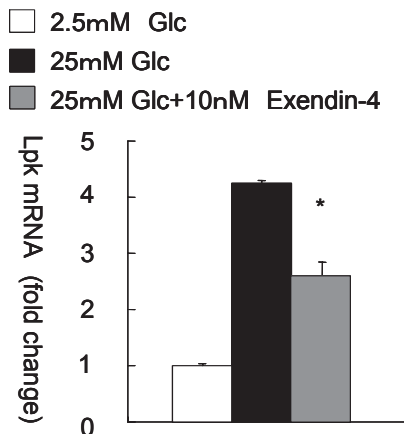


3) cAMP および GLP-1 による ChREBP 転写活性抑制効果の検証

cAMP は ChREBP の転写活性を抑制することが既に知られている。INS-1E 細胞でも同様のメカニズムが成立することを確かめるために、1mM dibutyril-cAMP 存在下で ChREBP の転写活性を測定した。INS-1 細胞でも同様の抑制が確認された。次に新規糖尿病治

療薬であるインクレチン（GLP-1）による ChREBP 転写活性抑制効果を調べたところ、弱いながらもグルコースによる Txnip 遺伝子の発現誘導が抑制された（図 4）。

図4 GLP-1によるグルコース誘導性LPK遺伝子抑制効果



考察

膵β細胞においても肝臓同様に、グルコースにより ChREBP は活性化され、ChREBP の抑制は膵β細胞のブドウ糖毒性からの解除に有用と考えられた。しかしながら、グルコースによる Pdx-1 やインスリン遺伝子の発現低下さらに高グルコース刺激によるアポトーシスの発症に関与するとされる Txnip 遺伝子の発現には、部分的に関与し、ChREBP 非依存性の経路が存在することが示された。これはとりもなおさず、ChREBP の機能抑制だけでなく高血糖状態の是正が膵β細胞のブドウ糖毒性の解除に重要であると思われる。幸いなことに全身での ChREBP の抑制でも血糖が改善することから、今回一例として示した GLP-1 は ChREBP の機能抑制を介した有望な糖尿病治療薬といえる。

要約

ChREBP は肝臓において脂肪合成系酵素の発現を調節する転写因子である。膵β細胞においても ChREBP は発現し、グルコースによる遺伝子発現を制御する。ChREBP は膵β細胞の主要遺伝子であるインスリンおよび Pdx-1 の発現を間接的に抑制し、ブドウ糖毒性に関与する Txnip 遺伝子を部分的に調節する。したがって、ChREBP に加えて高血

糖解除が重要である。最後に新規糖尿病薬である GLP-1 は ChREBP の機能を抑制することから、ChREBP も GLP-1 による治療標的のひとつであることが示唆された。

謝辞

本研究を遂行するに当たり研究助成を賜りました財団法人大和証券ヘルス財団に深謝いたします。

文献

- 1) Iizuka K, Horikawa Y. ChREBP: a glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome. *Endocr J*: 55(4):617-624, 2008.
- 2) Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD, Uyeda K. . Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:7281-7286, 2004.
- 3) Iizuka K, Miller B, Uyeda K. . Deficiency of carbohydrate-activated transcription factor ChREBP prevents obesity and improves plasma glucose control in leptin-deficient (ob/ob) mice *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 291:E358-364, 2006.
- 4) Iizuka K, Horikawa Y. Regulation of lipogenesis via BHLHB2/DEC1 and ChREBP feedback looping. *Biochem Biophys Res Commun*. 374:95-100, 2008.
- 5) Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol*. 11:136-140, 2010.