

「膵β細胞量調節におけるヒストン脱アセチル化酵素の機能解析」

神戸大学大学院医学研究科

浅原 俊一郎

1. 研究の背景と目的

日本人の2型糖尿病発症において、インスリン抵抗性およびインスリン分泌不全が重要であることが知られている。また、発症初期からの膵β細胞量の減少が糖尿病発症の要因の一つとして挙げられている。膵β細胞量調節においてはインスリンシグナルが重要であることがこれまでに報告されており、このインスリンシグナルが減弱することで膵β細胞量の減少を引き起こすことが明らかとなっている。

そこで、このインスリンシグナルの調節機構に焦点を当てた。マウスにおいて膵β細胞特異的にPDK1(3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1)を欠損させることで膵β細胞量は減少することを我々は報告した。また、膵β細胞特異的にTSC2(tuberous sclerosis complex 2)を欠損させた場合には、4週～28週の若年齢では低血糖および高インスリン血症を呈し、その後40週以降には高血糖および低インスリン血症を呈する、という2相性の応答を示すことをこれまでに明らかにしている。しかしながら、膵β細胞におけるインスリンシグナルがどのように制御されているかというメカニズムについては未だ明らかとなっていない。

マウス膵β細胞腫瘍株MIN6細胞を用いた検討では、継代回数が増えると増殖率が亢進することが報告されている。そこで、継代回数の異なる2群のMIN6細胞について解析したところ、継代回数の多い群においてインスリンシグナルが亢進していた。このインスリンシグナル亢進の機序を探るべく上流分子の発現を解析すると、IRS2の発現亢進が認められた。

近年、糖尿病発症におけるエピジェネティクス制御の関与が注目されている。エピジェネティクスとはDNAの塩基配列変化を介さない遺伝子変化であり、DNAメチル化やヒストンアセチル化などが知られている。我が研究室においても、インプリンティング遺伝子であるCdkn1cプロモーターのエピジェネティクス修飾変化によって膵β細胞不全が起こることを報告している。そこで、継代回数増加群でIRS2の発現が亢進している機序として、エピジェネティクス修飾の変化を検討することにした。その結果、MIN6細胞では継代回数によらずIRS2の転写因子であるCREB結合部位を含むIRS2プロモーター領域においてDNA非メチル化であった。しかしながら、継代回数の多い群において、H3K9/14の有意なヒストンアセチル化亢進が認められた。この結果は、膵β細胞のIRS2発現制御には、ヒストンアセチル化が重要な役割を担っていることを示唆するものである。

ヒストンアセチル化はヒストンアセチル基転移酵素(HAT)やヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)によって調節される。これまでに肥満ラットにおいてHDAC3阻害が血糖やインスリン分泌を改善することが報告されている。しかしながら、膵β細胞におけるHDACの役割に関する報告はない。

そこで本研究では、ヒストンアセチル化を制御するヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)に関して、膵β細胞のインスリンシグナル調節における役割を検討することを目的とし、実験を開始した。

2. 研究方法

細胞負荷

エピジェネティクス制御および翻訳後修飾解析のため、MIN6 細胞に 100nM の Trichostatin A(TSA, Sigma-Aldrich)を負荷した。さらに、核内移行検討のため、0.5mM のパルミチン酸(Sigma-Aldrich)を負荷した。

免疫沈降

MIN6 細胞から抽出し、protein assay および蛋白質濃度補正した蛋白に ProteinG Sepharose™4Fast Flow(GE Healthcare)と抗 IRS2 抗体(upstate)を作用させたのち沈降させ、SDS によりビーズから解離させた抗原提示蛋白-抗 IRS2 抗体複合体を sample として Western blotting を行った。一次抗体には抗 IRS2 抗体、抗アセチル化 Lysine 抗体、抗リン酸化 Tyrosine 抗体 (上記すべて Cell Signaling)、抗 β -actin 抗体 (Sigma-Aldrich)を用いた。

3. 研究成果

HDAC classI の阻害によって IRS2 の発現が亢進した

HDAC にはアイソフォームが存在し、それぞれ、HDAC1,2,3,8 が class I、HDAC4,5,7,9 が class IIa、HDAC6,10 が class IIb、SirT1~7 が class III、HDAC11 が classIV に分類される。そこで、選択性の異なる HDAC 阻害剤を用いて検討を開始した。HDAC classI,II 選択的阻害剤である TSA を負荷した MIN6 細胞では、予想通り mRNA およびタンパクレベルでの IRS2 の有意な発現亢進(Fig.1A,B)が認められた。そこで、IRS2 発現亢進に伴って、その下流シグナルであるインスリンシグナルが増加するかどうかを検討した。しかしながら意外な事に、TSA 負荷 MIN6 細胞ではインスリンシグナル活性が有意に低下していた (Fig.1C)。

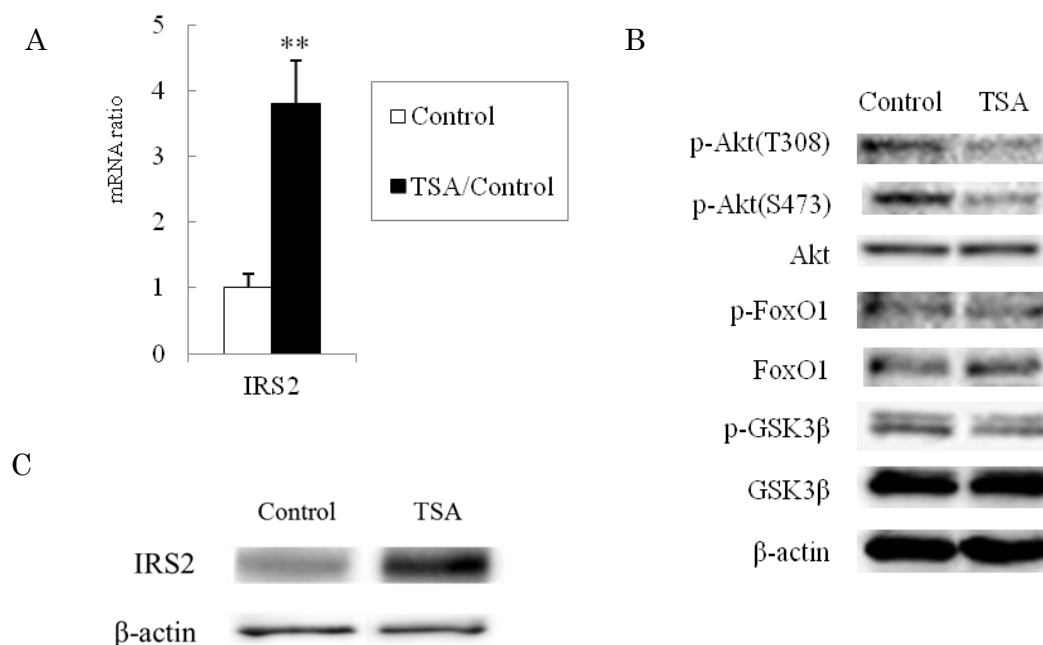


Figure1. MIN6 細胞における TSA 負荷によるインスリンシグナル変化

A TSA 負荷で IRS2 発現亢進 (Realtime-PCR)

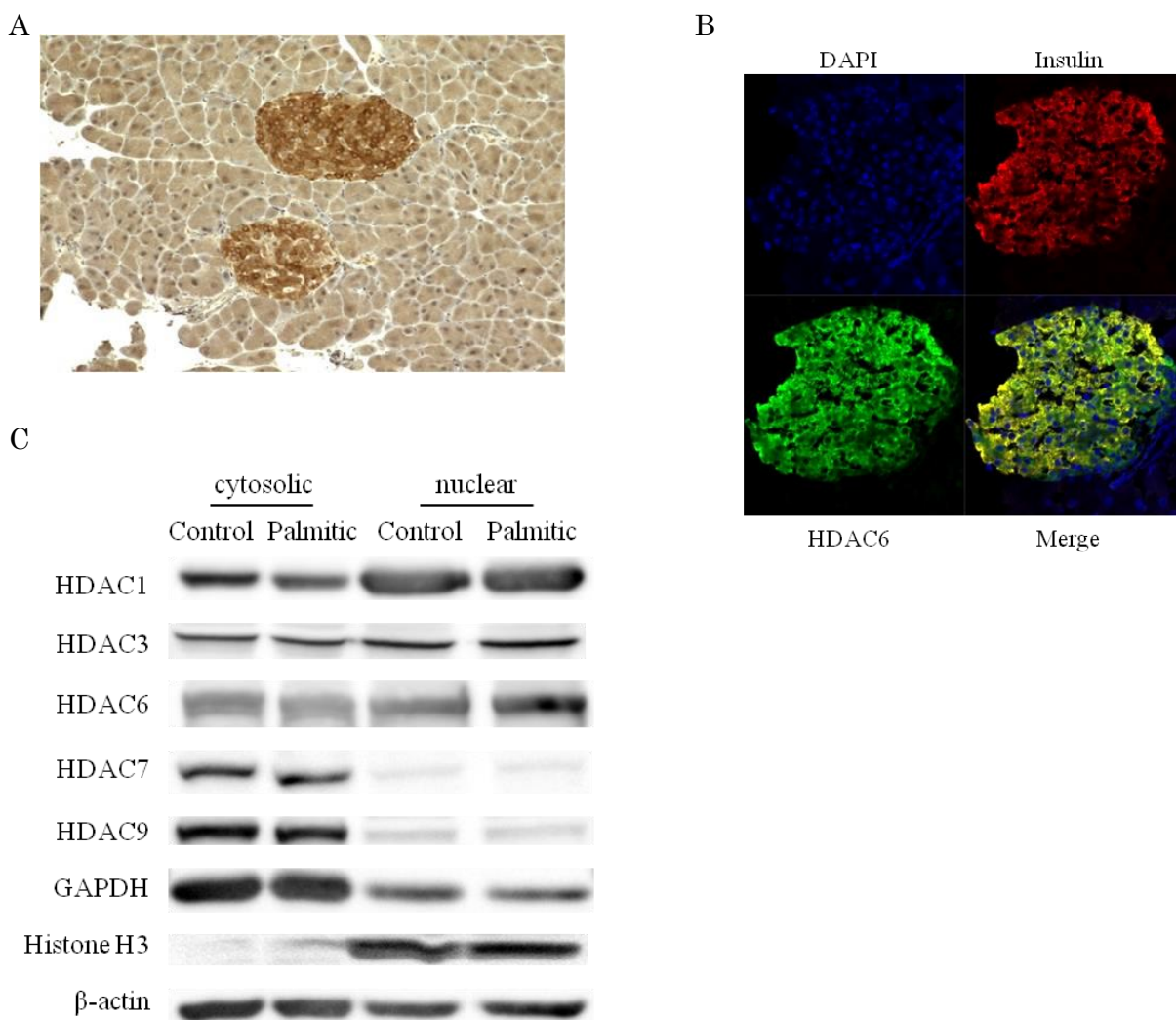
B TSA 負荷で IRS2 発現亢進(WB)

C TSA 負荷でインスリンシグナル活性低下(WB)

HDAC6 は膵島に限局して発現し、パルミチン酸負荷によって細胞内局在が変化した

次に我々は、国内で唯一治療薬として用いられている HDAC 阻害剤ゾリンザ（一般名 Vorinostat）に着目した Vorinostat は HDAC classI および HDAC6 に対して強い阻害活性を有している。これまでの臨床試験において、副作用として高血糖を呈することが報告されているが、その機序は分かっていない。この Vorinostat を MIN6 細胞に負荷した所、TSA 負荷と同様に IRS2 の発現は増加しており、インスリンシグナルは低下していた(データ未掲載)。そこで、我々は HDAC6 に着目した。HDAC6 は HDAC classIIb に属する酵素である。核内移行シグナルと核外輸送シグナルの両方を併せ持つことが報告されているが、ヒストンに対する脱アセチル化作用の報告はない。免疫染色を行った所、膵臓においては膵島に限局して発現している事が明らかとなった(Fig.3A,B)。しかしながら膵 B 細胞における役割に関する報告はこれまでにない。

高脂肪食をマウスに投与し続けると耐糖能異常を示し、糖尿病状態を呈することが知られている。この時高脂肪食負荷マウスではインスリンシグナルは上昇する。そこで同様の高脂肪食投与状態を細胞で再現するため、パルミチン酸を負荷した MIN6 細胞を用いて検討を行った。興味深いことに、HDAC6 はパルミチン酸負荷によって核内へ移行することが明らかとなった(Fig.3C)。この結果より、高脂肪食投与のマウスにおいても、HDAC6 が局在変化する事によって何らかの影響が生じ、結果としてインスリンシグナルが変化する事が示唆された。



- Figure2.** 膵β細胞における HDAC6 の局在解析
A マウス膵島における HDAC6 免疫染色 (DAB)
B マウス膵島における HDAC6 免疫染色 (蛍光)
C MIN6 細胞における各 HDAC の局在解析(WB)

IRS2 の翻訳後修飾として、リジンアセチル化を介したチロシンリン酸化低下によってインスリンシグナルは低下した

HDAC6 によるインスリンシグナル制御の機序として、我々は IRS2 の翻訳後修飾としてのアセチル化が寄与しているのではないかと考えた。2008 年に、神経細胞において HDAC classIII である Sirt1 の抑制によって IRS2 のリジンアセチル化亢進が起こり、その結果チロシンリン酸化を低下させることが報告されている。そこで、MIN6 細胞において免疫沈降法を用いて IRS2 翻訳後修飾を検討した。その結果、TSA 負荷により IRS2 のリジンアセチル化の亢進およびチロシンリン酸化の低下が認められた (Fig.3A)。

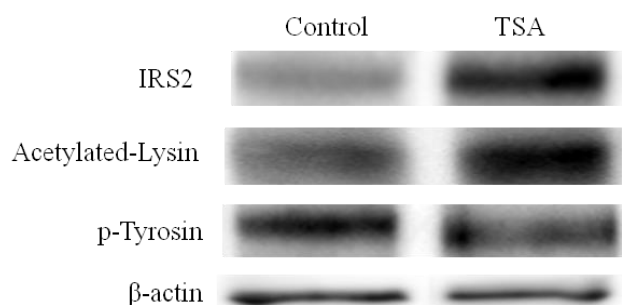


Figure3. HDAC6 阻害による IRS2 翻訳後修飾解析

A. MIN6 細胞の IRS2 におけるリジンアセチル化およびチロシンリン酸化解析

4. 研究がもたらす効果及び波及効果

以上の結果から、我々は HDAC 阻害剤によるインスリンシグナルの変化に関して以下のようなモデルを考えた。HDAC classI を阻害した場合、IRS2 プロモーター領域のヒストンアセチル化が亢進するため、転写活性が亢進し、IRS2 の発現量が増加する。しかしながら一方で、HDAC6 を阻害すると、IRS2 分子修飾としてのリジンアセチル化が亢進するためにチロシンリン酸化が抑制され、その下流のインスリンシグナル低下が起こると考えられた。

この機序から考察すると、HDAC classI 選択的阻害剤は膵β細胞におけるインスリンシグナルを亢進させることによって、膵β細胞量増加効果を持つことが期待される。一方、HDAC6 の阻害剤はインスリンシグナル活性低下を引き起こすことから、膵β細胞量減少に繋がる懸念される。現在、わが国の臨床の現場で使用されている HDAC 阻害剤はゾリンザ (Vorinostat) のみであるが、その副作用として高血糖が報告されている。しかしながら糖尿病を専門としていない医療者が使用することから、その機序については十分に検討されていない。今回の結果がゾリンザの作用と一致している可能性も考えられ、今後検討に値すると思われる。また HDAC classI 選択的阻害剤は新規糖尿病治療薬としても期待されることから、今後さらに研究を進めていきたいと考えている。