

称号及び氏名	博士（応用生命科学）	堀内 寛子
学位授与の日付	平成29年3月31日	
論文名	Regulation of pancreatic β -cell function by the soy-related factor S-equol (大豆関連因子 S-エクオールによる膵 β 細胞機能調節に関する研究)	
論文審査委員	主査	山地 亮一
	副査	北村 進一
	副査	谷森 紳治

論文要旨

序章

糖尿病は高血糖で特徴づけられる代謝疾患である。糖尿病の90–95%を占める2型糖尿病は、膵臓ランゲルハンス島（膵島）に存在する β 細胞からのインスリン分泌量と、筋肉、肝臓、脂肪組織などの末梢組織でのインスリン作用のバランスが崩れて相対的なインスリン不足に陥ることで生じる。健常者と比較して2型糖尿病患者の β 細胞量が少ないことや、2型糖尿病の発症リスクを上昇させる一塩基多型の多くがインスリン分泌や β 細胞の機能に関わる遺伝子であることから、 β 細胞の機能低下が2型糖尿病の発症に直結することが示されている。加えて、日本人を含むアジア人は、欧米人と比較して遺伝的にインスリン分泌能が低い。そのため、アジア人の2型糖尿病の予防には、 β 細胞のインスリン分泌能の保護が特に重要となる。インスリン分泌機能を保護するためには、 β 細胞の量および質（グルコース応答能）の2つの観点からの制御を考える必要があり、 β 細胞の量と質を維持または向上させる食品成分を摂取することは、2型糖尿病の予防につながると期待できる。

エクオールは、大豆イソフラボン的一种であるダイゼインから腸内細菌によって産生される女性ホルモン様作用を持つ物質である。エクオールには鏡像異性体であるS-エクオールとR-エクオールが存在するが、腸内細菌はS体のみを産生する。S-エクオールの産生には腸内細菌叢が関わるため個体差がある。S-エクオール非生産

者において、エクオール摂取により、血糖値の指標となるヘモグロビンA1c値が下がることから、糖尿病の予防作用をもつことが示唆されている。本研究では、S-エクオールのβ細胞への影響を評価し、その作用メカニズムを解明することを目的とした。

第1章: 膵β細胞の増殖、細胞死、インスリン分泌へおよぼすS-エクオールの作用

本章では、β細胞の量および質（グルコース応答能）の観点から、β細胞の①増殖、②細胞死、③インスリン分泌能に与えるS-エクオールの作用を検討した。①増殖：S-エクオールによってラットβ細胞株であるINS-1細胞の細胞数が増加し、0.5 μMから濃度依存的に細胞増殖が亢進したが、R-エクオールによる影響は見られなかった。チミジンアナログである5-bromo-2-deoxyuridineをDNAに取り込んだINS-1細胞の割合がS-エクオールにより増加したことから、S-エクオールが細胞周期を正に制御し、鏡像異性体選択的にINS-1細胞の増殖を促進することが明らかとなった。さらに、S-エクオール（20 mg/kg体重）を7日間1日2回経口投与した6週齢雄性ICRマウスの膵臓切片の解析により、インスリン陽性細胞のうち、細胞増殖マーカーであるKi67陽性細胞の比率がS-エクオール投与群で上昇した。つまり、S-エクオールは*in vivo*で膵β細胞の増殖促進作用を持つことが明らかとなった。②細胞死：β細胞の細胞死を引き起こす重要な原因である酸化ストレスに対するS-エクオールの作用をアロキサンを用いて検討した。INS-1細胞において、S-エクオールはアロキサン誘発性の酸化障害による細胞死を抑制したが、R-エクオールは影響しなかった。S-エクオールの細胞死抑制作用はタンパク質合成阻害剤シクロヘキシミドにより消失したため、タンパク質の新規合成が必要であることが判明した。③インスリン分泌：INS-1細胞において、S-エクオールは高グルコース濃度下（16.7 mM）でのみインスリン分泌を促進したが、低グルコース濃度下（2.8 mM）ではその作用は認められなかった。R-エクオールはグルコース濃度に関わらずインスリン分泌に影響しなかった。同様の結果がマウス単離膵島においても認められたことから、S-エクオールは*ex vivo*においてもグルコース応答性インスリン分泌を増強することが明らかとなった。さらに、INS-1細胞における①細胞増殖促進作用、②アロキサン誘導性細胞死の抑制作用、および、③グルコース応答性インスリン分泌促進作用のいずれにおいても、S-エクオールは前駆体であるダイゼインよりも強い作用を示した。これらの結果から、体内でダイゼインからS-エクオールが産生されることがβ細胞の量および質を維持する観点からは重要であることが考えられる。

第2章: S-エクオールの作用機序の解明

本章では、膵β細胞におけるS-エクオールの作用メカニズムについての検討を行った。エクオールは女性ホルモンである17β-エストラジオール（E2）と同様にエストロゲン受容体（ER）に結合して、ERの転写活性化を誘導する。INS-1細胞において、ERの転写活性を同程度上昇させる濃度のS-エクオール（10 μM）とE2（10 nM）の作用を比較した結果、S-エクオールのみが細胞増殖とインスリン分泌を促進し、細胞死を抑制した。一方で、E2にはこれらの作用は見られなかった。これらの結果

から、 β 細胞におよぼすS-エクオールのは作用は、エストロゲン様作用とは異なるメカニズムによって発揮されると考えられた。そこで、 β 細胞の量と機能の維持に重要な細胞内シグナル伝達系であるcAMP/プロテインキナーゼA (PKA) シグナルにおよぼすS-エクオールのは作用を検討した。cAMPが増加するとPKAが活性化し、cAMP応答配列 (CRE) を介した転写が促進される。実際にcAMP/PKAシグナルの重要性はインクレチンの一つであるglucagon-like peptide-1により実証されているため、S-エクオールがcAMP/PKAシグナルを介して、膵 β 細胞へ作用を發揮するかを検討した。その結果、PKA阻害剤であるH89存在下ではS-エクオールによるINS-1細胞の増殖亢進、細胞死抑制、インスリン分泌促進作用がすべて消失した。また、S-エクオールにより、細胞内cAMPレベル、PKAの標的となるCRE-binding protein (CREB) のリン酸化、およびCREを介した転写活性が上昇し、この活性上昇はH89によって抑制された。S-エクオールによるCREBのリン酸化レベルの上昇はマウス単離膵島においても認められた。これらの結果から、S-エクオールはPKAシグナルを介して作用することが示唆された。次に、S-エクオールによるcAMPの産生機構を検討した。cAMPはアデニル酸シクラーゼによって産生される一方、ホスホジエステラーゼによって分解される。INS-1細胞において、S-エクオール (10 μ M) は細胞膜画分でのcAMPの産生を促進したが、サイトゾル画分では促進しなかった。S-エクオールによるCREを介した転写活性の上昇は、細胞膜に局在するアデニル酸シクラーゼ阻害剤である2',5'-dideoxyadenosineによって抑制されたが、サイトゾル局在型のアデニル酸シクラーゼ阻害剤であるKH7による影響はみられなかった。また、細胞膜画分において、10 μ M のS-エクオールはホスホジエステラーゼの活性に影響を与えなかった。細胞膜に局在するアデニル酸シクラーゼはGタンパク質共役受容体 (GPCR) シグナルによって活性化される。そこで、S-エクオールが細胞膜上のGPCRに作用する可能性を評価するために、GPCRキナーゼ (GRK) の影響を検討した。GRKは、リガンドが結合したGPCRをリン酸化してGPCRを不活性化する。siRNAによりGRK3と6をsiRNAによりノックダウンすると、S-エクオールによるCREを介した転写活性がさらに上昇したが、GRK2のノックダウンによる影響はみられなかった。一方で、GRK2、3、および6の高発現はすべて、S-エクオールによるCREを介した転写活性を減弱させた。三量体Gタンパク質のG α sサブユニットのGTPase活性を阻害することで恒常的にG α sを活性化させるコレラ毒素は、S-エクオールと相乗的にCREを介した転写活性を増加させた。一方、アデニル酸シクラーゼを直接活性化するフォルスコリンとコレラ毒素の作用は相加的であった。さらに、siRNAによりG α sサブユニットをノックダウンした結果、S-エクオールによるCREを介した転写活性の上昇が抑制されるとともに、S-エクオールによる増殖亢進、細胞死抑制、およびインスリン分泌促進作用がすべて消失した。以上の結果から、S-エクオールは細胞膜に局在するGPCRの作用を介してcAMPを産生することで、膵 β 細胞の量とインスリン分泌能を増加させると考えられる。

第3章：ストレプトゾトシン誘発性高血糖に対するS-エクオールの作用

本章では、マウスにおいてストレプトゾトシン (STZ) 誘発性糖尿病に対するS-

エクオールの作用について検討した。6週齢雄性ICRマウスにS-エクオール（20 mg/kg体重、1日2回）をSTZ投与（40 mg/kg体重、5日間）5日前から飼育期間を通して経口投与し、STZ投与終了から5日後に腹腔内糖負荷試験を行った結果、糖負荷後の血糖値の上昇がS-エクオール投与群で有意に抑制された。糖負荷15分後の血中インスリン値は、S-エクオール投与群で上昇傾向であった。一方、インスリン負荷試験によりインスリン感受性を評価した結果、S-エクオール摂取による影響はみられなかった。膵臓切片の解析の結果、S-エクオール投与群でβ細胞量が有意に多く、TUNEL染色により検出されたアポトーシスが誘発されたβ細胞の割合が低下した。これらの結果から、S-エクオールは、膵β細胞に作用して、STZによる糖尿病の誘発を抑制することが示唆された。

まとめ

S-エクオールがcAMP/PKAシグナルの活性化を介してβ細胞の量と質を調節することを見出した。また、S-エクオールによるcAMP/PKAシグナルの活性化機構にはGαsの活性化が関与することが明らかとなった。さらに、マウスにおいてβ細胞を損傷させることによる高血糖の誘発を緩和することが示された。これらの結果から、S-エクオールはβ細胞を標的とした抗糖尿病作用を持つことが示唆された。

審査結果の要旨

糖尿病の90–95%を占める2型糖尿病は、膵臓ランゲルハンス島（膵島）に存在するβ細胞からのインスリン分泌量と、筋肉、肝臓、脂肪組織などの末梢組織でのインスリン作用のバランスが崩れることで発症する。したがってβ細胞の機能低下は2型糖尿病の発症に直結するため、β細胞の量および質（グルコース応答能）を維持または向上させる食品成分を摂取することは、2型糖尿病の予防につながると期待できる。エクオールは、大豆イソフラボンの一種であるダイゼインから腸内細菌によって産生される女性ホルモン様作用を持つ物質である。エクオールには鏡像異性体であるS-エクオールとR-エクオールが存在するが、腸内細菌はS体のみを産生する。S-エクオールを摂取することで血糖値の指標となるヘモグロビンA1c値が下がることから、S-エクオールに糖尿病を予防する作用があると推測されているが、詳細は不明である。本研究は、S-エクオールのβ細胞への影響を評価し、その作用メカニズムを解明することを目的として行われた。

第1章では、β細胞の量および質の観点から、β細胞の増殖、細胞死、インスリン分泌能におよぼすS-エクオールの作用を検証した。ラットβ細胞株INS-1細胞において、S-エクオールが細胞増殖とグルコース応答性インスリン分泌を亢進し、アロキサン誘発性の酸化障害による細胞死を抑制することを見出した。マウスにS-エクオ

ールを投与すると増殖マーカーであるKi67陽性β細胞の割合が高くなること、またS-エクオールがマウス単離膵島でのインスリン分泌を増強することを明らかにした。INS-1細胞の増殖、細胞死抑制、インスリン分泌のいずれにおいても、S-エクオールは前駆体であるダイゼインよりも強く作用することが見出された。以上より、S-エクオールが膵β細胞の量と機能を調節することを示した。

第2章では、β細胞におけるS-エクオールの作用メカニズムを解析した。INS-1細胞において、S-エクオール (10 μM) と女性ホルモンである17β-エストラジオール (E2、10 nM) はエストロゲン受容体の転写活性を同程度上昇させたが、E2が増殖亢進、インスリン分泌促進、および細胞死抑制作用を示さなかったことから、β細胞におよぼすS-エクオールの作用はエストロゲン様作用とは異なるメカニズムによると考えた。S-エクオールにより、細胞内cAMPレベル、protein kinase A (PKA) の標的となるcAMP response element-binding proteinのリン酸化、およびcAMP response element (CRE) を介した転写活性が上昇し、PKA阻害剤によりS-エクオールによるINS-1細胞の増殖亢進、細胞死抑制、およびインスリン分泌促進作用が消失した。これらの結果から、S-エクオールがcAMP/PKAシグナルを介して作用することを明らかにした。S-エクオールによるCREを介した転写活性は、①GPCRを不活性化するGPCRキナーゼ (GRK) 3とGRK6のノックダウンによりさらに上昇し、GRK2、GRK3、およびGRK6の高発現により減弱すること、②三量体Gタンパク質のGαsサブユニットをノックダウンすると、S-エクオールによるCREを介した転写活性の上昇が抑制され、S-エクオールによる増殖亢進、細胞死抑制、およびインスリン分泌促進作用がすべて消失することを見出した。以上から、S-エクオールは細胞膜においてGαsを介してcAMP産生を促進し、cAMP/PKAシグナルを活性化することで、β細胞の量とインスリン分泌能を増加させることを明らかにした。

第3章では、マウスにおいてストレプトゾトシン (STZ) 誘発性糖尿病に対するS-エクオールの作用を検証した。S-エクオール摂取群では糖負荷後の血糖値の上昇が有意に抑制された。糖負荷15分後の血中インスリン値は上昇傾向を示したが、インスリン負荷試験によりインスリン感受性を評価した結果、S-エクオール摂取による影響は見られなかった。膵臓切片の解析により、S-エクオール投与群でβ細胞量が有意に多く、TUNEL染色によりアポトーシスが誘発されたβ細胞の割合が低いことを明らかにした。これらの結果から、S-エクオールはβ細胞に作用してSTZによる糖尿病の誘発を抑制することを示した。

以上、本研究は、S-エクオールがcAMP/PKAシグナルの活性化を介してβ細胞の量と質を調節すること、またS-エクオールによるcAMP/PKAシグナルの活性化機構にGαsが関与することを明らかにした。さらにマウスにおいてβ細胞を損傷させることによる高血糖の誘発をS-エクオールが緩和することを示した。つまり、S-エクオールはβ細胞を標的とした抗糖尿病作用を持つ食品由来因子であることが示唆された。これらの成果は、生化学、細胞生物学、生理学、分子栄養学の分野に大きく貢献するものであり、最終試験の結果と併せて博士 (応用生命科学) の学位を授与することを適当と認める。