

# 膵β細胞のグルコース応答における性ホルモンシグナルに関する研究

原田直樹

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 助教

## 緒言

2型糖尿病は膵臓β細胞におけるインスリン分泌能と筋肉や肝臓、脂肪組織等の末梢組織におけるインスリン感受性のバランスの崩壊により発症する。日本人を含む東洋人においては元々インスリン分泌能が西洋人の約半分ほどであるにもかかわらず、2型糖尿病発症早期からグルコースに応答したインスリン分泌が低下すること、さらに病態の進行とともに膵β細胞量が減少することから、インスリン感受性のみならず、膵β細胞の機能低下も2型糖尿病の発症と深く関連すると考えられる。糖尿病の予防や治療を目的として、インスリン抵抗性に関する研究と膵β細胞機能に関する研究が行われているが、後者に関する研究は、日本人を含む東洋人型の2型糖尿病予防や治療に関して大きく貢献する可能性を持つ。

近年、男性糖尿病患者において男性ホルモンであるテストステロンレベルが低いことや<sup>1)</sup>、ホルモン療法を行いテストステロンレベルが低下した前立腺がん患者において、糖尿病の発症リスクが上昇することが報告されており<sup>2)</sup>、男性ホルモンと糖尿病の関係が注目されている。テストステロンは主に精巣で産生、分泌され、第二次性徴時に血中濃度がピークとなり、それ以後は加齢とともに減少する<sup>4)</sup>。テストステロンは、標的細胞において、そのまま直接、もしくは5α-レダクターゼによってより活性の強い5α-ジヒドロテストステロン(DHT)に変換された後に、受容体型転写因子であるアンドロゲン受容体(AR)を介して生理作用を発揮する。膵β細胞においてもARの発現が認められていることから<sup>4)</sup>、テストステロンが膵β細胞に作用することが示唆されている。本研究では、特に膵β細胞の増殖に及ぼすテストステロンの作用に関して検討を行った。

## 実験方法

### 1. 細胞培養

INS-1細胞及びINS-1細胞に由来するサブクローンは

10%ウシ胎児血清、10 mM HEPES、1 mM ピルビン酸ナトリウム、50 μMメルカプトエタノールを含むRPMI 1640培地を用いた。尚、アッセイ時にはcharcoal-dextran (Sigma) 処理ステロイド除去を行ったウシ胎児血清を用いて作製した培地を使用した。

### 2. Western blot 法

リガンドを加えて24時間培養した細胞より抽出した粗タンパク質溶液は、Bradford法によりタンパク質量を定量後、SDS-PAGEに供し、ウェスタンブロットにより解析した。ブロッキングには6%のスキムミルクを含むphosphate-buffered salineを用い、抗AR抗体(N20)あるいは抗Cyclin D1抗体(DSC-6)と西洋ワサビペルオキシダーゼ結合型2次抗体を用い、化学発光により検出した。

### 3. 細胞増殖アッセイ

各種リガンドや阻害剤の存在下で細胞を96時間培養した後に、アラマーブルー法を用いた励起波長:544 nm、蛍光波長:590 nmの蛍光を測定して細胞増殖を評価した。また、DNA量の測定は、蛍光色素Hoechst 33342と、標準物質としてウシ胸腺由来デオキシリボ核酸ナトリウムを用いて励起波長:355 nm、蛍光波長:460 nmの蛍光度を測定した。

### 4. siRNAの導入

siRNAの一過性トランスフェクションにはLipofectamin RNAiMAX Reagent (Invitrogen)を用い、control siRNA (SIGMA)、もしくはAR siRNA (sense: 5'-GACUCAGCUGCCCAUCCAUCCA (dTdT)-3')が、終濃度20 nMになるように細胞に導入した。

### 5. 統計解析

統計解析にはJMP statistical software version 8.0.1

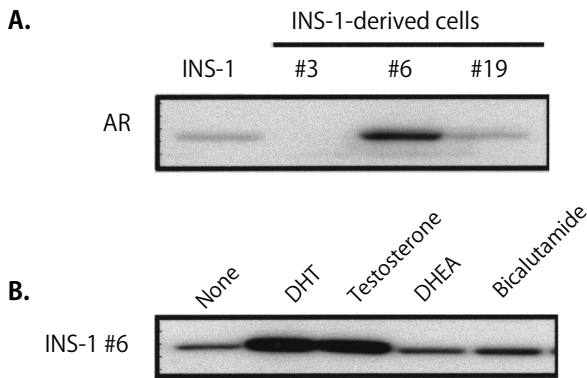


図1 INS-1由来細胞株におけるARの発現

(A) INS-1細胞からARの発現レベルが異なる3種のサブクローン#3、#6、#19を単離し、AR発現レベルをWestern blottingによりタンパク質レベルを比較した。(B) INS-1 #6細胞にARリガンドを加えて(DHT 10 nM、テストステロン 100 nM、DHEA 1000 nM、bicalutamide 10  $\mu$ M) 24時間培養後、ARタンパク質レベルについて検討した。

を用いて、データをANOVA法により解析し、post-hoc分析には無処理群をコントロールとしてDunnett法を行った。p < 0.05をもって統計的有意とした。

## 結果

ラット膵 $\beta$ 細胞株INS-1にARの発現を見出し、さらにARの発現量が異なるINS-1 #3、INS-1 #6、INS-1 #19株を単離した(図1A)。以後の実験には、ARの発現量が高いINS1 #6株を用いた。INS1 #6株においてARの発現レベルに対するリガンドの影響を検討した結果、テストステロンとDHTではARのタンパク質量が増加し、副腎アンドロゲンであるデヒドロエピアンドロステロン(DHEA)とARアンタゴニストであるbicalutamideではARタンパク質量に変化は見られなかった(図1B)。

INS1 #6細胞の増殖に及ぼす男性ホルモンの影響について検討するため、テストステロンあるいはDHT存

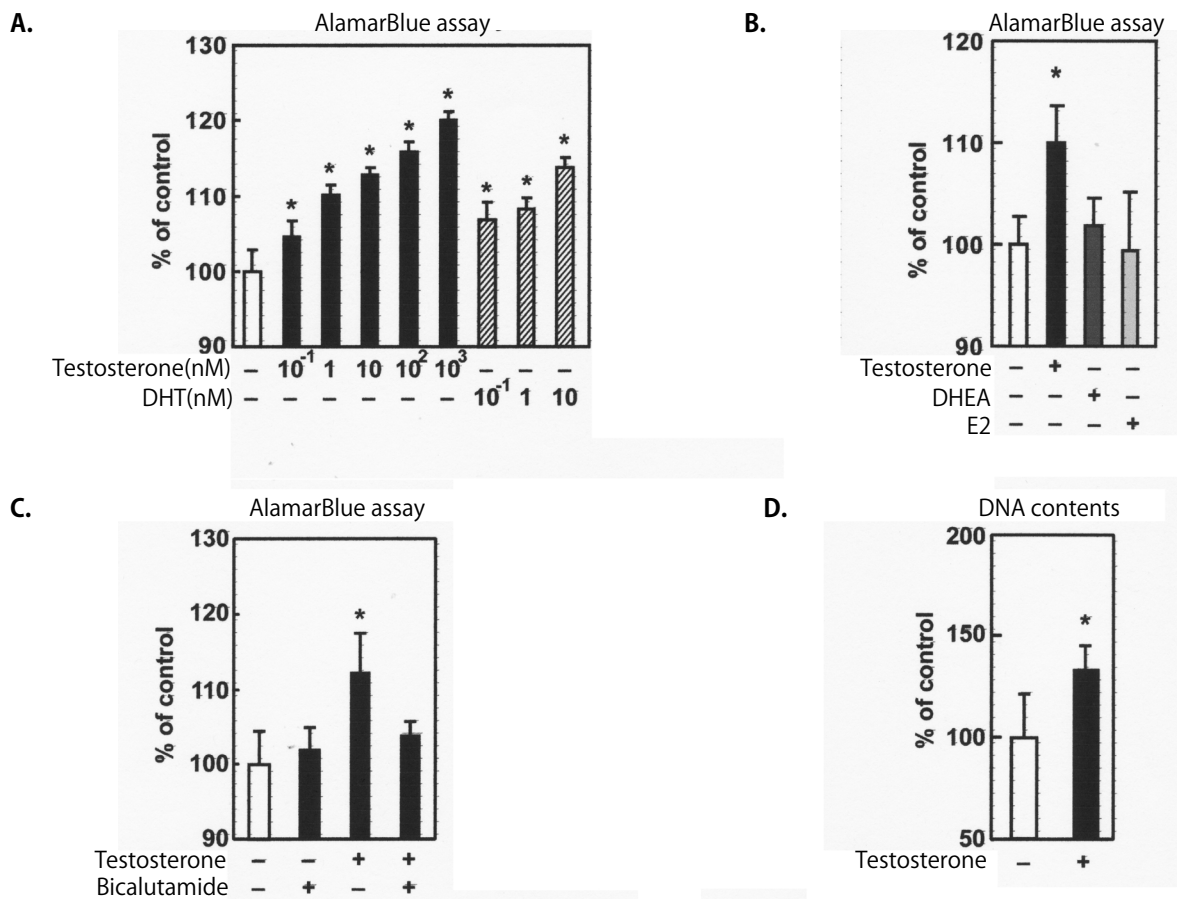


図2 INS-1 #6細胞の増殖における性ホルモンの影響

INS-1 #6細胞の増殖に及ぼす性ホルモンの影響を検討するために、細胞を性ホルモン存在下で96時間培養した。(A) テストステロン及びDHT存在下で培養した細胞をアラマーブルー存在下でさらに4時間培養し、蛍光を測定した。(B、C) テストステロン 100 nM、DHEA 1000 nM、E2 100 nM、bicalutamide 10  $\mu$ Mの存在下で培養後、アラマーブルー存在下でさらに4時間培養し、蛍光を測定した。(D) テストステロン 100 nM存在下で培養後、ディッシュあたりの細胞DNA量を測定した。

在下で細胞を96時間培養後、アラマーブルーを用いた増殖アッセイを行った。その結果、テストステロンとDHTともに0.1 nM以上の濃度で濃度依存的な細胞増殖促進作用が認められた(図2A)。一方で、DHEAや女性ホルモンである17β-estradiol (E2)にはINS-1 #6細胞における有意な増殖促進効果は認められなかった(図2B)。さらに、テストステロン(100 nM)によるINS-1 #6細胞の増殖促進作用は、ARアンタゴニストであるbicalutamide (10 μM)により抑制された(図2C)。テストステロンによる増殖促進作用を裏付けるために、テストステロンで培養後のINS-1 #6細胞を回収してHoechst 33342をDNAにインターカレートさせ、蛍光強度を測定することによりDNA量を測定した。その結果、テストステロン(100 nM)存在下で培養するとディッシュあたりの細胞DNA量が増加したことから、テストステロンが細胞増殖を亢進させたことが裏付けられた(図2D)。さらに、テストステロンによるINS-1 #6細胞の増殖能亢進にARが関与するかどうかを調べた。まず、

INS-1 #6細胞にAR siRNAまたはcontrol siRNAをトランスフェクションし、AR siRNAによりARの発現が抑制されることを確認した(図3A)。次に、siRNA導入後、テストステロン存在下で培養し、アラマーブルーを用いて増殖能を評価した。その結果、control siRNAを導入した場合には、テストステロンにより増殖能の亢進が観察されたが、AR siRNAを導入するとテストステロンによる増殖亢進作用が見られなかった(図3B)。

細胞周期の調節因子であるCyclin D1の発現に及ぼす影響に関して検討した結果、INS1 #6細胞においてテストステロンは、Cyclin D1の発現を上昇させた。一方で、ARアンタゴニストであるbicalutamideはテストステロンによるCyclin D1の発現上昇を抑制した(図4)。

### 考 察

本研究では膵β細胞株であるINS-1 #6株を単離し、細胞増殖に及ぼすテストステロンの影響について検討した。その結果、テストステロン及びDHTは細胞増殖を亢進させる作用を持つことが判明し、その作用はARを介して発揮することが判明した。細胞周期制御因子であるCyclin D1はARの標的遺伝子であり、β細胞においてもテストステロンによって発現が調節されることが判明した。

テストステロンは、雄ラットにおいてインスリンのmRNAを増加させ、インスリンの含有量を増加させることや<sup>4)</sup>、ストレプトゾトシンによる酸化ストレスから保護することが報告されている<sup>5)</sup>。膵β細胞を用いた本研究により、テストステロンは膵β細胞に発現するARを介して直接作用する機構を持つことが明らかとなった。一方で、副腎アンドロゲンであるDHEAは、INS1

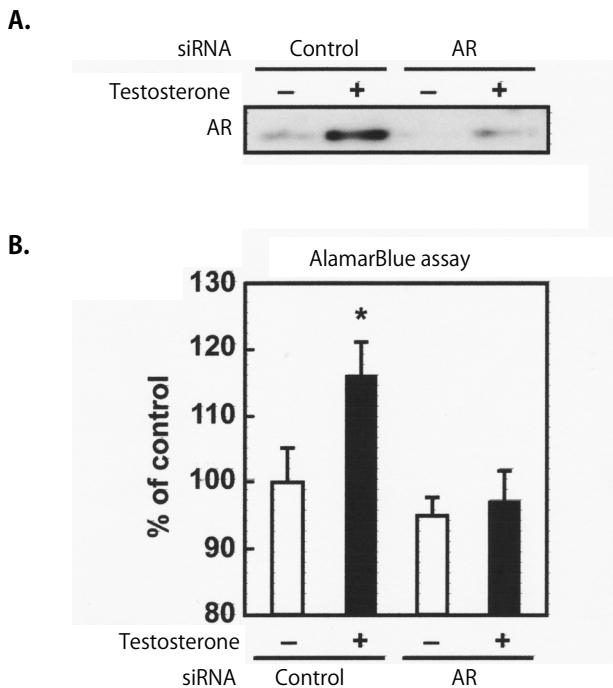


図3 INS-1 #6細胞のテストステロンによる増殖促進におけるARの関与

(A) INS-1 #6細胞にcontrolあるいはAR siRNAを導入した細胞からタンパク質を抽出し、Western blottingにてARレベルを解析した。(B) siRNAを導入したINS-1 #6細胞をテストステロン(100 nM)存在下で96時間培養後、アラマーブルー存在下でさらに4時間培養し、蛍光を測定した。

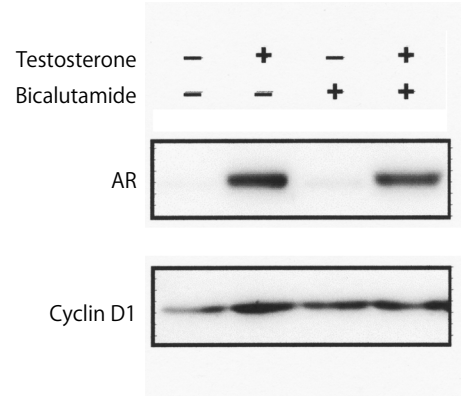


図4 INS-1 #6細胞におけるCyclin D1の発現レベル

INS-1 #6細胞をテストステロン100 nMとbicalutamide 10 μM存在下で24時間培養後タンパク質を抽出し、Western blottingにてAR及びCyclin D1タンパク質の発現を検討した。

#6 細胞においては直接アゴニストとして機能していないことが示唆された。

膵β細胞は幹細胞からの分化よりも自身の細胞分裂により細胞数の調節を行うことから<sup>6)</sup>、テストステロンによるβ細胞の増殖亢進は生理的に重要な意味を持ち、加齢に伴うテストステロンレベルの減少がβ細胞量の減少に繋がり、糖尿病発症に寄与することが示唆された。

## 要 約

本研究では、膵β細胞株を用いて、男性ホルモンがARを介して細胞周期を調節し、細胞増殖亢進作用を持つこと明らかにした。この結果から、加齢等によるテストステロンレベルの低下が膵β細胞量の低下を引き起こし、東洋人型の2型糖尿病発症の一因となることが考

えられる。

## 謝 辞

本研究の遂行にあたりご支援を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に深く感謝申し上げます。

## 文 献 等

- 1) M.Fukui et al.: *Endocr. J.*, **54**, 871-877, 2007.
- 2) N.L. Keating et al.: *J. Clin. Oncol.*, **24**, 4448-4456, 2006.
- 3) J.M. Kaufman JM and A. Vermeulen: *Endocr. Rev.*, **26**, 833-876, 2005.
- 4) S. Morimoto et al.: *Endocrinology*, **142**, 1442-1447, 2001.
- 5) S. Morimoto et al.: *J. Endocrinol.*, **187**, 217-224, 2005.
- 6) L.D. Horb and J.M. Slack: *Int. J. Dev. Biol.*, **44**, 791-796, 2000.