

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	鈴 木 和 代
論文題目	Transcriptional regulatory factor X 6 (Rfx6) increases gastric inhibitory polypeptide (GIP) expression in enteroendocrine K-cells and is involved in GIP hypersecretion in high-fat diet-induced obesity (転写因子 regulatory factor X 6(Rfx6) は腸管内分泌 K 細胞での gastric inhibitory polypeptide (GIP)遺伝子発現を増加させ、高脂肪食肥満状態の GIP 分泌亢進に関与する)		
(論文内容の要旨)			
【背景】 Gastric inhibitory polypeptide (GIP)は主に上部小腸に存在する腸管内分泌 K 細胞より分泌されるインクレチンである。GIP は肥満状態における代償性インスリン分泌増加作用や、脂肪への直接的なエネルギー蓄積作用によって肥満を強く誘導する。また、肥満状態では血中 GIP 濃度が上昇することも知られている。しかし、他の腸管上皮細胞から K 細胞の分離が困難であることから、GIP 合成・分泌の機序に関しては不明な点が多い。そこで、K 細胞の可視化を目的に GIP 遺伝子に GFP 遺伝子を挿入した GIP-GFP knock-in (GIP-GFP) マウスを作製し、このマウスを用いて K 細胞で有意に高い発現を示す転写因子 Regulatory factor X 6 (Rfx6)をマイクロアレイ解析によって同定した。本研究で、Rfx6 の GIP 分泌における機能的な重要性和、高脂肪食肥満状態での Rfx6 の GIP 分泌亢進との関連について検討を行った。 【方法】 GIP-GFP ヘテロマウス上部小腸からフローサイトメトリーによって GFP 陽性細胞(K 細胞)を分離回収し、遺伝子発現量を半定量的 PCR 法で評価した。また GIP-GFP ヘテロマウス小腸内で Rfx6 陽性細胞の局在を免疫組織染色により評価した。マウス腸管内分泌腫瘍株 STC-1 細胞を用いて siRNA による Rfx6 遺伝子抑制下の GIP の遺伝子発現、細胞内含有量、分泌を検討した。Rfx6 と GIP プロモーター遺伝子を用いて、one-hybrid assay 及び luciferase reporter assay を行った。また expression plasmid を用いて、Rfx6 遺伝子強発現下の GIP 遺伝子発現量を評価した。GIP-GFP ヘテロマウスに通常食(10%脂肪)または高脂肪食(60%脂肪)を 8 週間負荷し、経口ブドウ糖負荷試験(OGTT)を行った。両食事負荷後 GIP-GFP ヘテロマウス小腸の K 細胞数と腸管 GIP 含有量、K 細胞内の遺伝子発現を評価した。 【結果】GIP-GFP ヘテロマウス上部小腸上皮細胞からフローサイトメトリーにて分離回収した K 細胞と非 K 細胞で、半定量的 PCR 法においても K 細胞に Rfx6 mRNA の有意に高度な発現を認めた。免疫組織学的評価でも Rfx6 陽性細胞が K 細胞に一致することが確認された。Rfx6-knockdown STC-1 細胞では、コントロールと比較して GIP mRNA 発現、細胞内 GIP 含有量及び GIP 分泌の有意な低下を認めた。Rfx6 と GIP プロモーター遺伝子を用いた one-hybrid assay を行い、GIP プロモーター上流 5216～6215bp に Rfx6 の結合を認めた。また、GIP プロモーター遺伝子を用いた luciferase reporter assay では one-hybrid assay によって確認した Rfx6 結合部位を欠損すると luciferase の活性低下を認めた。expression plasmid を用いた Rfx6 強発現下では GIP mRNA発現量の増加を認めた。正常な GIP 遺伝子を 1 つしか有さない GIP-GFP ヘテロマウスにおいても、通常食負荷と比較して高脂肪食負荷によって有意な			

体重増加を認め、食事負荷終了後の OGTT 時の GIP 分泌とインスリン分泌の増加を認めた。高脂肪食負荷 GIP-GFP ヘテロマウスでは、通常食負荷 GIP-GFP ヘテロマウスと比較して上部小腸内の K 細胞数に差を認めないが、腸管 GIP 含有量の有意な増加を認めた。さらに、高脂肪食負荷 GIP-GFP ヘテロマウス小腸 K 細胞の GIP mRNA 及び Rfx6 mRNA 発現量は、通常食負荷 GIP-GFP ヘテロマウス小腸 K 細胞に比較して有意に増加していた。
【結語】K 細胞を可視化した GIP-GFP マウスを作製し、K 細胞に転写因子 Rfx6 が高発現することをはじめて同定した。Rfx6 は GIP 遺伝子発現を誘導し、細胞内 GIP 含有量の増加を介して GIP 分泌を増加させることが判明した。さらに、Rfx6 は高脂肪食肥満下において K 細胞の数を変化させることなく K 細胞内の GIP 含有量を増加させることで GIP 分泌亢進に関与する可能性が示唆された。
(論文審査の結果の要旨)
gastric inhibitory polypeptide (GIP)は腸管内分泌 K 細胞より分泌される主要なインクレチンである。高脂肪食負荷により血中 GIP 濃度は上昇し、GIP シグナルは代償性インスリン分泌増加作用や、脂肪への直接的なエネルギー蓄積作用によって肥満を強く誘導する。しかし、生体内で K 細胞単離が困難であることから GIP 合成・分泌の機序や、高脂肪食肥満時の GIP 分泌亢進の機序に関しては不明な点が多い。
申請者は K 細胞の可視化による単離を可能とするために GIP-GFP knock-in (GIP-GFP) マウスを作製し、単離した K 細胞を用いて K 細胞に有意に高い発現を示す転写因子 Regulatory factor X 6 (Rfx6)を同定した。GIP 合成・分泌機構における Rfx6 の役割をマウス腸管内分泌腫瘍株 STC-1 細胞にて検討し、Rfx6 が GIP 遺伝子発現を誘導し、細胞内 GIP 含有量の増加を介して GIP 分泌を増加させることを明らかにした。さらに、GIP-GFP ヘテロマウスに高脂肪食負荷を行い、高脂肪食肥満下において K 細胞数の量的な変化は無く、K 細胞内の GIP 含有量を増加させることで GIP 分泌を亢進させる質的な変化に Rfx6 が関与する可能性が示唆された。
以上の研究は、GIP 合成・分泌の機序ならびに高脂肪食肥満時の GIP 分泌亢進機序の解明に貢献し、肥満・糖尿病学の発展に寄与するところが多い。
したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。
なお、本学位授与申請者は、平成 25 年 3 月 8 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日 以降