

平成 21年 5 月 13 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18591004  
 研究課題名（和文）IA-2/IA-2 欠損マウスを用いた内分泌糖代謝異常の検討とヒトへの応用  
 研究課題名（英文）Research of abnormal endocrine and glucose metabolism with IA-2/  
 IA-2 knockout mice and its application for human being  
 研究代表者  
 三浦 順之助（MIURA JUNNOSUKE）  
 東京女子医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：90297515

研究成果の概要：IA-2(Insulin-associate antigen-2)および IA-2 が、1型糖尿病と膵ラ氏島のホルモン分泌にかかわっているかを検討した。IA-2 欠損 NOD マウスでは、雌雄ともに遺伝子欠損マウスの方が糖尿病発症率が有意に低かった。マウス膵ラ氏島および  $\beta$ -TC1 細胞では、遺伝子欠損の方にグルカゴン分泌の低下がみられ、同分子がグルカゴン分泌に関わっていることが示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,600,000	0	1,600,000
2007 年度	900,000	270,000	1,170,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	540,000	3,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：1 型糖尿病、自己抗体、IA-2、IA-2、 $\beta$  細胞、グルカゴン分泌、 $\beta$  細胞、分泌顆粒

## 1. 研究開始当初の背景

IA-2(Insulin-associate antigen-2)及び IA-2(Insulin-associate antigen-2) は 1994 年に発見された分泌膜蛋白で、1 型糖尿病(膵  $\beta$  細胞が主に自己免疫起序により破壊されることにより惹起される糖尿病)の代表的な自己抗原の 1 つである。本抗原に対する自己抗体は 1 型糖尿病の臨床診断に広く用いられるようになった。

これらの膜蛋白は膵ランゲルハンス島(ラ氏島)  $\beta$  細胞では、インスリン分泌顆粒に存

在する。同遺伝子欠損マウスにおいて、ブドウ糖負荷試験時の耐糖能が正常マウスと比較して悪化し、さらにインスリン分泌の低下が認められた。このことはこれらの膜蛋白がインスリン分泌に重要な役割を担っている蛋白質であることを意味している。

一方、同蛋白は膵のみならず、下垂体、副腎、甲状腺など多くの腺組織に存在することも明らかにされつつある。1 型糖尿病ではグルカゴン分泌障害や甲状腺機能異常など他のホルモン分泌障害の合併が報告されており、インスリン以外のホルモン分泌不全と同

蛋白との関連が強く推察される。本蛋白がホルモン分泌過程のどの段階で関与しているかはいまだ明らかになっていない。

また、同蛋白が1型糖尿病の発症に関わっているか否かを検討するために、同遺伝子欠損した NOD (Non-Obese Diabetes) mouse を用いて検討が行われている。サイクロフォスファミドによる誘発試験では、同遺伝子欠損マウスと wild type のマウスでは糖尿病の発症に差はないとされているが、自然発症でのデータはまだ報告されていない。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、IA-2 および IA-2 が 1 型糖尿病の発症にどの程度かかわっているのか、また、膵細胞以外のホルモン分泌機構にかかわっているのかを明らかにしたいと考えた。

(1) NOD background マウスを用いた同分子の 1 型糖尿病発症への関与を検討する。(2) 他のホルモン(グルカゴン、ソマトスタチン他)及び他の腺組織由来のホルモン分泌障害と本蛋白の関連を明らかにする。これは、マウスのラ氏島を分離して行う試験と cell line での検討を行う。(3) 正常及び遺伝子欠損マウスの膵ラ氏島において、インスリン分泌過程のどの段階で組織学的相異が存在するかを検討する。以上のことを明らかにし、最終的に結果をヒトの糖尿病の発症要因を考察する手がかりにすることを目標とした。

## 3. 研究の方法

IA-2 及び IA-2 欠損マウスは、米国 NIH の Dr. Abner L. Notkins から提供いただいた。マウスは tail の先を一部 cut し、DNA を抽出し PCR 法による genotyping により homo-(KO)、hetero-zygote 及び wild type (WT)を選別した。

IA-2 欠損 NOD background マウスは、IA-2 <sup>+/-</sup> マウスに WT の NOD で作成し、heterozygote のマウスに WT の NOD マウスを掛け合わせていき、G10 世代を実験に使用した。genotyping は IA-2 および IA-2 欠損マウスと同様に PCR 法でスクリーニングをおこなった。NOD マウスの糖尿病の発症は、週 2 回尿糖をスクリーニングし、陽性であれば血糖値を簡易血糖測定器で測定。連続した測定日で 250mg/dl 以上であれば、糖尿病と診断した。

膵ラ氏島の分離は、成熟したマウスを全身麻酔下に開腹し、総胆管十二指腸開口部を結紮。コラゲナーゼ注入により膵を膨化後、酵素融解により膵ランゲルハンス島を得た。一

晩培養してラ氏島が酵素反応から回復後、翌日 arginine-potassium 負荷試験を施行した。KRB バッファー中にて、正常ブドウ糖濃度 (5.5mM) を負荷前の条件として 90 分 incubate した。その後同じブドウ糖濃度下で、KCl(20mM)+L-L-アルギニン (20mM) を加えた KRB Buffer にラ氏島を移し、再び 90 分間 incubate した。負荷前後の溶液中グルカゴン濃度を測定し、genotype 別にその相違を検討した。

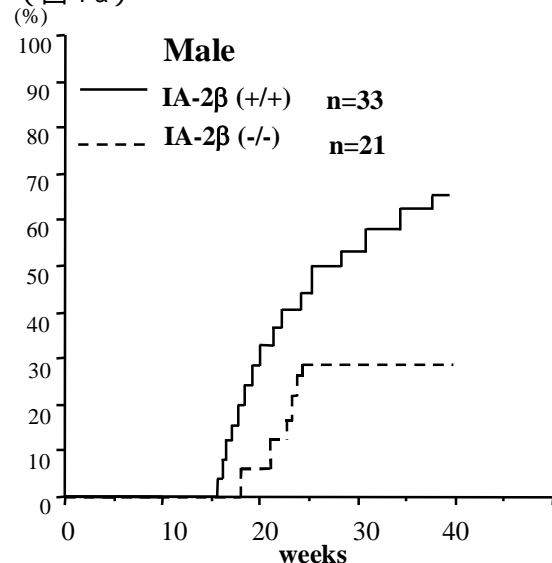
一方、同分子のグルカゴン分泌への関与を細胞レベルでも調べるため、膵ラ氏島のグルカゴン分泌培養細胞 TC1 細胞を用いた。同細胞は DMEM 溶液 (10%FBS、3.0g/l ブドウ糖、4mM グルタミン、15mMHEPES、100U/ml PCG+100ug/ml SM) で培養した。RNAi は stealth RNAi (invitrogen)、IA-2sequence: AACCCAGAATTGAGTCTGCAGAGATT を用いた。6-well plate に TC1 細胞を撒き、48 時間後に IA-2 あるいは IA-2 遺伝子の RNAi をトランスフェクションした。またその 48 時間後に負荷試験を行い、培養液中のグルカゴン濃度を測定した。そして、RNAi トランスフェクション群とコントロール群との分泌の相違を比較した。

## 4. 研究成果

### 1) IA-2 欠損 NOD マウスの自然発症糖尿病の頻度

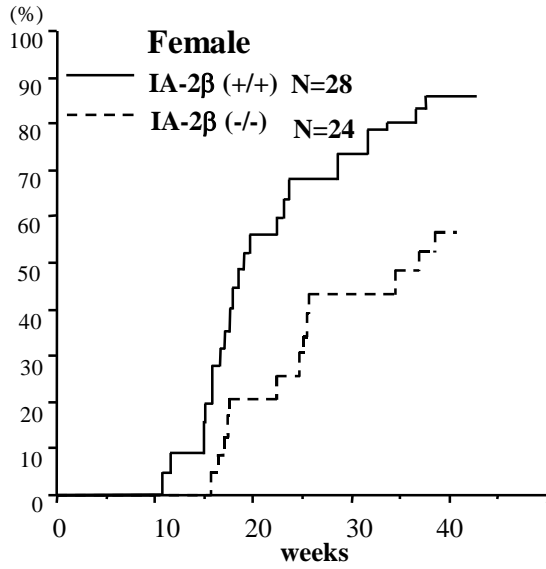
生後 40 週までの糖尿病発症率は、雄では IA-2 <sup>+/+</sup> 66.6% (n=33)、IA-2 <sup>-/-</sup> 28.6% (n=21)、雌では IA-2 <sup>+/+</sup> 85.7% (n=28)、IA-2 <sup>-/-</sup> 58.3% (n=24) であり、雌雄とも糖尿病発症率は IA-2 <sup>-/-</sup> NOD マウスの方が、有意に低値であった (p<0.05) (図 1a,b)

(図 1a)



発症までの期間および発症時の血糖値は WT と KO の間で有意な差はなかった。

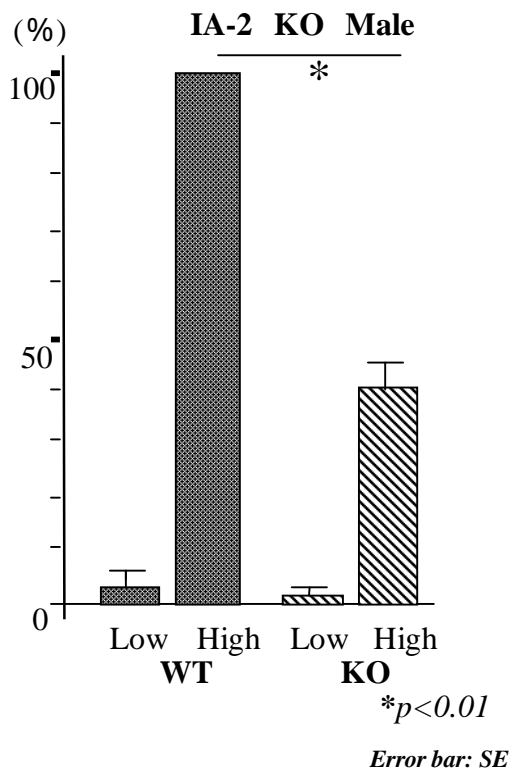
(図 2 b)



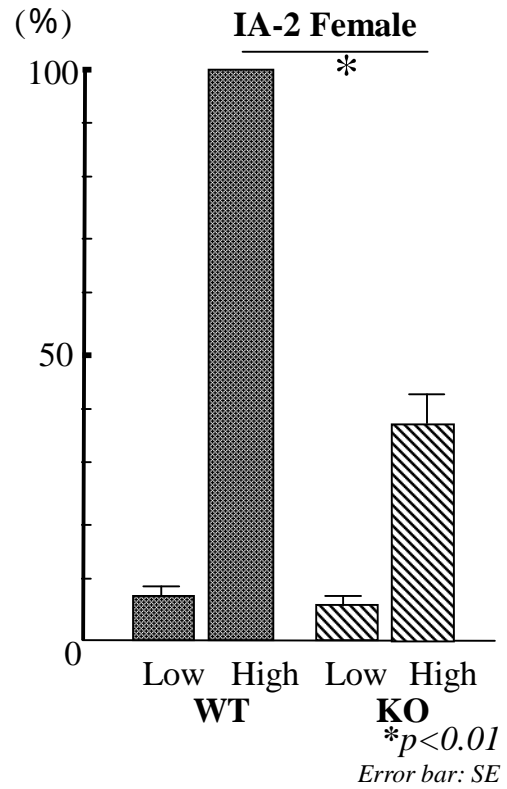
2) IA-2 および IA-2 欠損マウスから分離した膵ラ氏島によるグルカゴン分泌の比較

5 mM ブドウ糖濃度下で、KCl (20mM)+L-アルギニン (2.0 mM) 負荷後の WT マウスのグルカゴン濃度を 100 とした場合、IA-2 欠損マウスのラ氏島の反応は、雌で 38.8%、雄で 39%に低下していることを見出した (図 2a, b)。

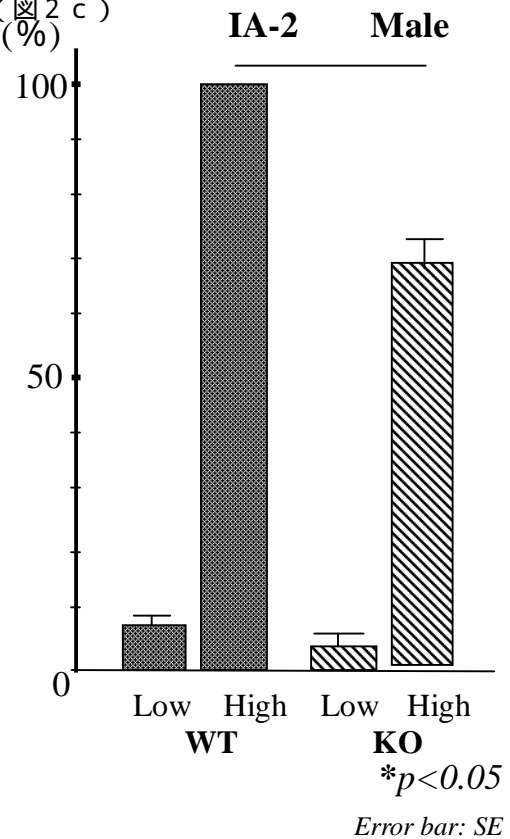
(図 2 a)



(図 2 b)



(図 2 c)



また、IA-2 マウスに関しては、WT マウス

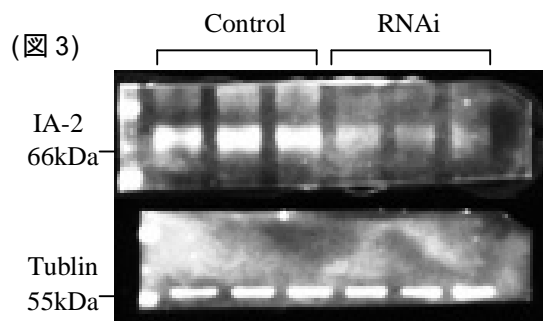
のグルカゴン濃度を 100 とした場合、同遺伝子欠負荷マウスのラ氏島の反応は、雄で 69.9% に低下していた (図 2c)。今後は IA-2 及び IA-2 ダブルノックアウトマウスのラ氏島を用いて、ホルモン分泌の検討をしたいと考えている。

### 3) RNAi を用いた $\alpha$ -細胞 ( $\alpha$ -TC1) における IA-2 遺伝子抑制とグルカゴン分泌

$\alpha$ -TC1 での細胞実験では、RNAi による IA-2 分子の抑制効果を time-course, dose-effect, cell density を検討した。結果はトランスフェクションしてからの time-course は、90nM の RNAi を投与してから、24、48、72 時間後の IA-2 分子の発現をウエスタンブロットで検討したが、48 時間後の発現最も抑制されていた (表)。Dose-effect は 60、90、120、150、180nM の濃度で 72 時間後の IA-2 分子の発現を検討した。Control vector の発現を 100% とした場合、60nM: 54.5%、90nM: 45.2%、120nM: 54.0%、150nM: 88.9%、180nM: 47.6% の発現となった。また cell-density の検討では、 $0.5 \times 10^5$ /well、 $0.75 \times 10^5$ /well、 $1.25 \times 10^5$ /well の条件で 72 時間後の IA-2 分子の発現を検討した。それぞれ 35.5%、42.3%、66.9% に低下しており、 $0.5 \times 10^5$ /well が最も抑制されていた。以上より、RNAi のトランスフェクションの条件として、90nM、48 時間後、 $0.5 \times 10^5$ /well を採用した。

(表)

	The ratio of IA-2 and tubulin		Expression percentage (RNAi / Control)
	Control	RNAi	
48hour	0.55 ± 0.11	0.20 ± 0.10	37.3
72hour	0.39 ± 0.04	0.16 ± 0.07	41.1



上記を基本条件として、ブドウ糖濃度 25mM の KRB 溶液を control 条件とし、30 分の pre-incubation の後に同溶液と負荷条件 2.5mM

の低ブドウ糖濃度でそれぞれ 45 分間 incubation して、上澄み液のグルカゴン濃度を測定した。また、16.7mM ブドウ糖濃度の KRB 溶液を基本条件とし、20mM アルギニン + 20mM KC1 を負荷条件として負荷試験を行った。

前者では IA-2 RNAi をトランスフェクションした細胞では、コントロールと比較してグルカゴン分泌低下傾向が認められた。しかし、後者の負荷条件では、両者で明らかな差は認められなかった。今後は、他の条件を考慮して負荷試験を施行する、また IA-2 単独及び IA-2、IA-2 ダブルノックアウトの条件下で同様の実験を行い、IA-2 および IA-2 分子が、グルカゴンの分泌に明確に関与していることを証明したい。またさらに細胞のソマトスタチン、F 細胞の PP の分泌についても検討したい。また分泌顆粒における分泌起序についても解明していきたいと考えている。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

三浦 順之助 (MIURA JUNNOSUKE)  
東京女子医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 90297515

#### (2) 研究分担者

なし

#### (3) 連携研究者

内潟 安子 (UCHIGATA YASUKO)  
東京女子医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 50193884

岩本 安彦 (IWAMOTO YASUHIKO)  
東京女子医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 60143434