

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18790282

研究課題名 (和文) 膵ラ氏島 β 細胞の分化と糖負荷における Mc1-1 遺伝子の役割研究課題名 (英文) The role of mcl-1 in pancreatic β -cell during differentiation and high glucose stimulation

研究代表者：

佐野 誠 (SANO MAKOTO)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：70339323

研究成果の概要：

糖尿病には、膵ラ氏島のインスリン産生細胞 (β 細胞) が深く関わっている。本研究では、インスリン産生細胞の分化誘導モデルとして AR42J 細胞を用い、 β 細胞の分化過程と糖負荷刺激におけるアポトーシス抑制遺伝子 Mc1-1 の動態を解析した。その結果、 β 細胞への分化過程、ならびに高濃度の糖負荷刺激に伴って誘導されるアポトーシスの抑制に、Mc1-1 遺伝子の発現が密接に関わっていることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,100,000	0	1,100,000
2007 年度	1,100,000	0	1,100,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野：実験病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：膵ラ氏島, β 細胞, Mc1-1 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

精巣由来の胎児性癌 (EC) 細胞株 NCR-G 3 はレチノイン酸や熱などの分化誘導処理により、神経、筋、上皮細胞などへの三胚葉成分のみならず、胚外胚葉成分である栄養膜細胞への多分化能を示す。申請者らは、その分化初期において発現が有意に誘導される新たな遺伝子 EAT/mcl-1 (以下、Mc1-1) の単離に

成功し、Mc1-1 遺伝子が Bcl-2 ファミリーに属するアポトーシス抑制遺伝子であることを明らかにした。一方、マウスホモローグの単離にも成功し、マウス初期胚、さらに胎盤形成過程における Mc1-1 遺伝子の発現動態を解析し、発生過程における同遺伝子の重要性を報告してきた。

その後、ジャンピング転座を伴った急性骨

髓性白血病において、Mc1-1 遺伝子の過剰発現が認められ、また胚細胞腫瘍においても同様に、非腫瘍部の生殖細胞に比べて有意に同遺伝子の高発現が認められた。Mc1-1 トランスジェニックマウスの解析では、濾胞性リンパ腫が好発することを Ruth W. Craig らのグループが発表した。一方で、申請者らは SR α をプロモーターとした Mc1-1 トランスジェニックマウスにおいて、膵ラ氏島の過形成（一部でインスリノーマ）が発生することを報告した。このように、Mc1-1 遺伝子の過剰発現と腫瘍発生が密接に関連していることが示唆される。

一方で、Mc1-1 遺伝子の発現と細胞の分化・成熟との関連が報告されている。胚性幹細胞（ES 細胞）や胎児性癌細胞（EC 細胞）、白血病細胞などの分化誘導初期に Mc1-1 遺伝子の発現が有意に上昇するだけではなく、マウス受精卵では受精後に発現が強く誘導される。Korsmeyer らの Mc1-1 ノックアウトマウスでは、受精卵（4 細胞期）で成熟が抑制されたにもかかわらず、アポトーシスが誘導されなかった。このことは、すなわち、Mc1-1 遺伝子がアポトーシス抑制遺伝子としての機能だけではなく、受精卵の卵割もしくは成熟にも重要であることを示唆している。

膵ラ氏島、特に β 細胞の発生や分化成熟にも Mc1-1 遺伝子が関わっている可能性が高い。胎児期の原始ラ氏島（成人では主に β 細胞）に Mc1-1 遺伝子の発現を認め、Mc1-1 トランスジェニックマウスにおいては、膵ラ氏島の過形成（一部にインスリノーマ）が有意に発生することを報告した。

2. 研究の目的

本研究においては、膵 β 細胞の分化成熟過程における Mc1-1 遺伝子の役割、さらに糖負荷による同遺伝子の発現動態を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)膵ラ氏島（ β 細胞）の分化成熟過程における Mc1-1 遺伝子の役割

a) 小児膵ラ氏島症（nesidioblastosis）における Mc1-1 遺伝子

小児膵ラ氏島症（nesidioblastosis）は、小児の発達過程における膵臓において、インスリン産生細胞が異常増殖することにより、痙攣などの高インスリン性低血糖症を呈する疾患である。本疾患の発生には、11p15 の遺伝子異常（Sur1 あるいは Kir6.2 の変異）が高頻度に関わっていることが知られているが、アポトーシスを調整する Bcl-2 遺伝子群との関連は知られていない。そこで、本疾患における異常インスリン産生細胞と Mc1-1 遺伝子発現との関連性を解析することにより、Mc1-1 遺伝子の役割を考察する。

b) β 細胞の分化過程における Mc1-1 遺伝子

膵 β 細胞への分化能を有する培養細胞株 AR42J を肝細胞増殖因子（HGF）とアクチビン A で分化誘導後、経時的にインシュリン、ならびに Mc1-1 遺伝子を含めた Bcl-2 遺伝子群の発現を RT-PCR 法で解析し、 β 細胞への分化と Bcl-2 遺伝子群の発現との関連を解析する。

(2)分化誘導 AR42J 細胞（ β 細胞）の糖負荷による影響

in vitro の実験系で、AR42J 細胞を β 細胞へ分化誘導させた後、糖負荷刺激による Bcl-2 遺伝子群の発現の変化を解析し、さらにアポトーシスとの関連を検討する。

(3)単離膵ラ氏島に対する糖負荷による影響

Mc1-1 トランスジェニックマウスならびにリッターメイトの膵ラ氏島を単離し、糖負荷による単離ラ氏島の変化、ならびにアポトーシス誘導の有無を解析する。

4. 研究成果

(1) 小児膵ラ氏島症（nesidioblastosis）における Mc1-1 遺伝子

小児膵ラ氏島症（nesidioblastosis）にお

ける異常インスリン産生細胞とMc1-1遺伝子発現との関連性を詳細に検討した。その結果、興味深いことに、Mc1-1遺伝子の発現は異常増殖するインスリン産生細胞にほぼ一致していた。しかしながら、その他のホルモンであるグルカゴンやソマトスタチンの産生細胞の分布とは明らかに異なっていた。正常のラ氏島新生は膵管上皮間から発生することが知られているが、小児膵ラ氏島症 (nesidioblastosis) 例においても、ラ氏島新生を示唆するductulo-insular proliferationが見られる。Mc1-1遺伝子はそのductulo-insular proliferationに発現を認めた。一方、増殖を示唆するMIB-1(Ki-67)との二重染色を行ったところ、MIB-1陽性細胞とMc1-1陽性細胞はほとんど一致していなかった。このことは、すなわち、小児膵ラ氏島症におけるMc1-1遺伝子は、インスリン産生細胞の異常増殖よりも、むしろインスリン産生細胞の新生や分化成熟に深く関わっていることが考えられる (Sano M, Virchows Archiv, 2008)。

(2) β 細胞の分化過程における Mc1-1 遺伝子
インスリン細胞の前駆モデルである AR42J 細胞をインスリン産生細胞へ分化誘導させたところ、アポトーシス抑制分子である Mc1-1, Bcl-2, Bcl-xL の発現はほとんど変化が認められなかったのに対し、アポトーシス促進分子である Bid と Bax は発現が抑制され、逆に、Bax の発現は上昇した。分化誘導後、アポトーシス細胞が有意に増加することから、インスリン産生細胞への分化過程における生存には、Bid と Bax の発現低下が重要と考えられる。

(1) 分化誘導 AR42J 細胞 (β 細胞) の糖負荷による影響

インスリン産生細胞における糖負荷刺激に対する Bcl-2 ファミリー遺伝子群の発現動態を解析した。AR42J 細胞をインスリン産生細胞へ分化誘導させた後、高濃度の糖負荷を行

ったところ、Bcl-2 の発現量にが変化は認められなかったものの、Bcl-xL は低下し、逆に Mc1-1 は上昇した。一方、アポトーシス促進分子 Bad と Bid, Bax の発現は上昇した。これからの結果は、単離ラ氏島においても、同様の結果が認められた。したがって、糖負荷に対するインスリン産生細胞の生存には、Mc1-1 が重要な役割を担っていることが示唆される (Preparation of manuscript)。

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 1 件)

① Sano M, Hayashi E, Murakami H, Kishimoto H, Fukuzawa R, and Nemoto N: Mc1-1, an anti-apoptotic Bcl-2 family member, essentially overlaps with insulin-producing cells in neonatal nesidioblastosis. Virchows Archiv, 452, 2008

[学会発表] (計 1 件)

① 佐野 誠, 林 恵美子, 村上仁彦, 岸本宏志, 福澤龍二, 根本則道: 小児膵島細胞症 (nesidioblastosis) における Mc1-1 遺伝子の発現分布 第 48 回日本組織細胞化学会総会・第 39 回日本臨床分子形態学会総会合同学術集会, 甲府, 2007.9

[図書] (計 1 件)

① Sano M, Suzuki A, and Nemoto N: Testicular Cancer Research Trends; Expression of Bcl-2 family members in testicular germ cell tumors, Chapter II, 11-24, 2007, Nova Science Publishers, Inc., NY

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野誠 (SANO MAKOTO)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：70339323

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし