

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461042

研究課題名(和文) 神経因子由来の遺伝子群の導入による膵B細胞の増殖・再生法の開発

研究課題名(英文) Identification of new nerve-delivered growth factor regarding pancreatic B cells

研究代表者

木場 崇剛 (Kiba, Takayoshi)

岡山理科大学・理学部・教授

研究者番号：80285139

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：以前ラットにおいて迷走神経の中樞である視床下部腹内側核を破壊すると、膵臓において、迷走神経の過興奮が起き、膵B細胞が特異的に増殖することを証明した。膵ランゲルハンス島だけからのRNAを抽出し、cDNAマイクロアレイ解析を行い、現在、神経由来の増殖関連に関与すると思われる遺伝子群を同定した。現在これら新規神経因子の膵B細胞における役割を検討中であり、これにより膵臓の再生の分野に新しい道を開き、膵癌および糖尿病の患者に福音をもたらしたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：We found that vagal hyperactivity produced by ventromedial hypothalamic lesions stimulated cell proliferation of rat pancreatic islet B. Previously, we developed a new technique regarding high-quality RNA extraction from rat pancreas for cDNA microarray analysis. Results of cDNA microarray pick up several genes regarding new nerve-delivered growth factor of pancreatic B cells. Now, we conduct a mammalian vectors carrying the nerve-delivered genes, which are detected by microarray analysis. We believe that these new gene network analysis will lead to Pancreatic cancer and Diabetes Mellitus Treatment.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵B細胞 神経因子 再生 増殖

1. 研究開始当初の背景

ラットにおいて迷走神経の中核である視床下部腹内側核を破壊すると、膵臓において、迷走神経の過興奮が起き、膵B細胞と外分泌細胞が特異的に増殖することを以前証明した(図1)。

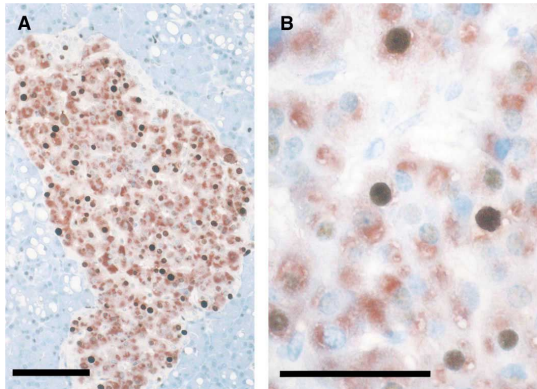


図1

図1は、膵臓組織でのPCNAとinsulin二重染色の結果であり、膵B細胞の増殖が起きていることを示している。また、これまでラット膵臓からマイクロアレイ解析に耐える純度の高いRNAの抽出法を開発し、その手技を用いて、視床下部腹内側核破壊ラットにおける全膵臓組織のcDNAマイクロアレイ解析およびReal time PCRの結果により、神経因子由来の膵B細胞および外分泌細胞の増殖・再生因子に関わる可能性の高い遺伝子群を同定した。論文に掲載した因子は、すでにfunctionの分かっている遺伝子群であり、functionの未知の遺伝子は、いまだ発表していない。さらに、申請者は、ラットの総胆管を選択的に同定する手技を開発し(図2)膵臓からランゲルハンス島を

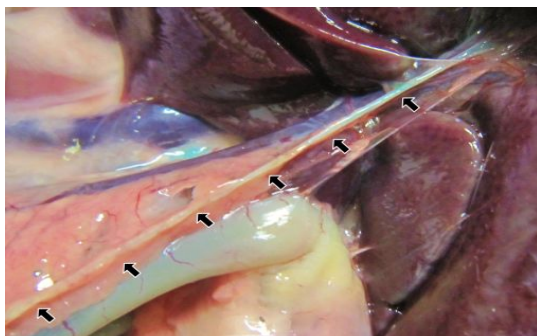


図2

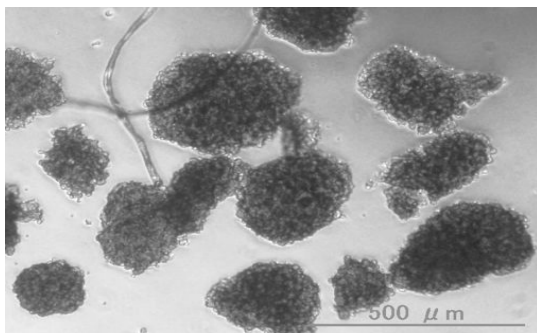


図3

選択的に分離

し(図3) cDNAマイクロアレイの解析に耐える純度の高いRNAの抽出法を開発した。逆転写は、DNAのコンタミネーションに感受性が高いため、cDNAは純度の高いRNAが抽出できたかの有無に関する。図4

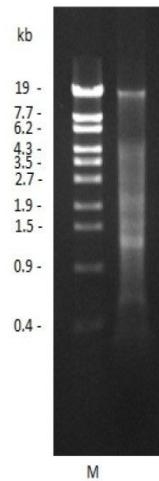


図4

図4では、転写産物は、0.1 kb から>4 kbに散らけているので、純度の高いRNAが抽出できていることを意味している。

2. 研究の目的

視床下部腹内側核破壊ラットでは、A細胞およびD細胞の増殖は起きないことが判明しているために、膵臓のランゲルハンス島のみ cDNAマイクロアレイ解析の結果により、神経因子由来の新規膵B細胞増殖に関わる遺伝子を同定し、ラットランゲルハンス島腫瘍細胞株にこれらの神経由来遺伝子を導入することにより、膵臓B細胞の増殖に関わる新規遺伝子の同定を行う。

3. 研究の方法

(1)膵B細胞に特異的に発現するcDNAマイクロアレイ解析結果による遺伝子群の機能解析とReal time PCRでの確認。cDNAマイクロアレイ解析結果により、膵B細胞の増殖、分化に関わる可能性のある遺伝子に対応したReal time PCR用のprimer setが販売されているかどうかを確認し、発現が確認されれば、NCBIのaction numberを調べて、そのnumberのpageを検索し、これまでに論文上で推定された機能やamino酸配列を探索する。amino酸の配列が判れば、ネット上にあるAll in One sequence analyzerのページにより、その配列からそのdomain名を検索することにより、その機能を解析する。

(2)新規遺伝子の導入による培養細胞でのインスリンの発現量を定量。

ラットランゲルハンス島腫瘍細胞株のRIN-5F, RIN-mの細胞株に哺乳類発現ベクターを用いてこれら神経因子由来の遺伝子をリポフェクション法あるいはエレクトロポレーション法を用いて遺伝子導入を行い、Western blottingおよびELISA法でインスリンの発現量を定量し、インス

リン発現量に影響（発現量の増加ないし減少）を与える遺伝子を拾い上げる。

（3）新規遺伝子の Transgenic mice の作成および解析へと繋げる。

4. 研究成果

（1）視床下部腹内側核破壊により、膵臓の Langerhans 島で多くの既存の細胞増殖および再生に関わる遺伝子の発現の変化を認め、また膵B細胞の増殖および分化に関わる可能性のある、新規の未だ機能の判明していない遺伝子群を発見した（表1、2）。

Category	Term	Count	%	P-value	Benjamini
KEGG_PATHWAY	cell cycle	23	8.4	1.2E-19	8.3E-18
KEGG_PATHWAY	oocyte meiosis	13	4.7	1.6E-8	5.7E-7
KEGG_PATHWAY	p53 signaling pathway	9	3.3	2.0E-6	4.6E-5
KEGG_PATHWAY	DNA replication	6	2.2	8.4E-5	1.5E-3
KEGG_PATHWAY	progesterone-mediate d oocyte maturation	7	2.6	9.5E-4	1.3E-2
KEGG_PATHWAY	small cell lung cancer	5	1.8	2.4E-2	2.4E-1
KEGG_PATHWAY	pyrimidine metabolism	5	1.8	3.3E-2	2.5E-1
KEGG_PATHWAY	ECM-receptor interaction	4	1.5	9.1E-2	4.9E-1

表1 . Enriched pathways in upregulated genes identified by DNA microarray analysis.

Category	Term	Count	%	P-value	Benjamini
KEGG_PATHWAY	haematopoietic cell lineage	17	3.1	5.3E-9	6.8E-7
KEGG_PATHWAY	Toll-like receptor signaling pathway	11	2	9.5E-4	1.2E-2
KEGG_PATHWAY	cell adhesion molecules (CAMs)	14	2.6	1.6E-3	1.7E-2
KEGG_PATHWAY	MAPK signaling pathway	20	3.6	1.8E-3	1.8E-2
KEGG_PATHWAY	cytosolic DNA-sensing pathway	7	1.3	4.3E-3	3.8E-2
KEGG_PATHWAY	colorectal cancer	7	1.3	5.9E-2	2.4E-1
KEGG_PATHWAY	PPAR signaling pathway	6	1.1	9.6E-2	3.5E-1

表2 . Enriched pathways in downregulated genes identified by DNA microarray analysis.

（2）視床下部腹内側核破壊を行うと、高インスリン血症が起こることが知られており、インスリンの発現と細胞増殖には密接な関係があることが知られている。ラット視床下部腹内側核破壊による高インスリン血症の原因の一つとして、膵ランゲルハンス島内の Adora1 遺伝子の発現がこれに関与する可能性があることを報告した（図5）。

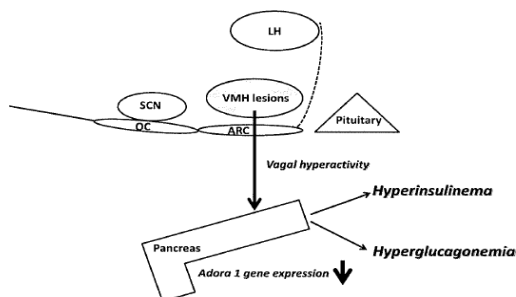


図5 . The schema of the relationships between the Adora1 gene expression in pancreatic islets and ventromedial hypothalamus. ARC indicated arcuate nucleus; LH, lateral hypothalamus; OC, optic chiasm; SCN, suprachiasmatic nucleus; VMH ventromedial hypothalamus.

（3）この他に、視床下部腹内側核破壊により、膵臓の Langerhans 島での多くの既存の内分泌代謝系に関わる遺伝子群の変化（表3）および免疫系に関わる遺伝子群の変化（図6、7）を報告した。

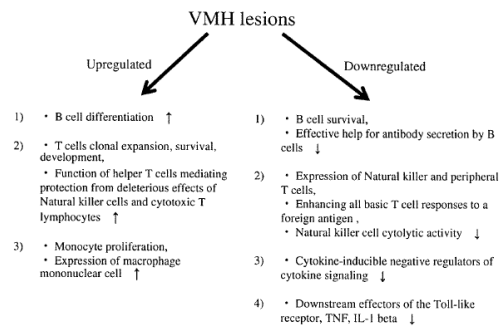


図6 . Schematic diagram showing relationship between ventromedial hypothalamic lesions and the expressions of immune-related genes.

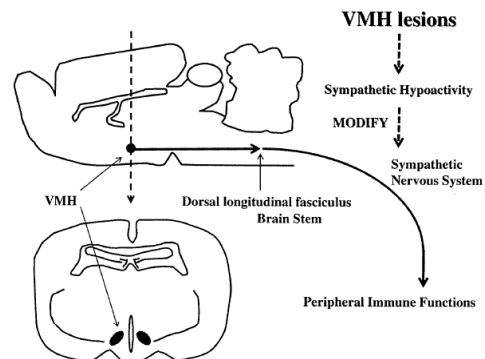


図7 . Schematic diagram showing relationship ventromedial hypothalamic lesions and the peripheral immune functions.

（4）一方、視床下部内側核破壊ラットの膵臓組織から抽出したmRNAを用いて、異なった種類のcDNA microarrayを行ったところ、同定した遺伝子群と機能は同じであるが、これまで同定した遺伝子群とは異なる遺伝子群を発見した。現在、補助金の御援助により同定した新規神経因子の膵B細胞における役割を検討中であり、これにより膵臓の再生の分野に新しい道を開き、膵癌あるいは糖尿病の患者に福音をもたらしたいと考えている。

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5件)

- 1 . Gene expression analysis in rat pancreas observed with whole-transcript exon array after ventromedial hypothalamic lesions. Kiba T. Ann Neurosci 査読有 24; 26-31, 2017.
- 2 . Ventromedial hypothalamic lesions downregulate multiple immune signaling pathways in rat pancreatic islets. Kiba T. Neurosci Lett 査読有 610; 177-81, 2016.
- 3 . Ventromedial hypothalamic lesions downregulate the expression of Adora1 gene in rat pancreatic islets. Kiba T., Ishigaki Y. Pancreas 査読有 45; e1-2, 2016.
- 4 . Changes of the expressions of multiple metabolism genes in rat pancreatic islets after ventromedial hypothalamic lesioning. Kiba T. Neurosci Lett 査読有 604; 64-8, 2015.
- 5 . Ventromedial hypothalamic lesions change the expression of cell proliferation-related genes and morphology-related genes in rat pancreatic islets. Kiba T., Ishigaki Y. Islets 査読有 6; e1012950, 2014.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

木場 崇剛 (KIBA, Takayoshi)

岡山理科大学理学部臨床生命科学科・教授
研究者番号：80285139