

氏 名 (本籍)	とみ 富 おか 岡 とも 智 こ 子
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 1 5 2 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 11 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 条 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 専 攻	東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科 (博 士 課 程) 内 科 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Transgenic mice overexpressing <i>Reg I</i> gene in pancreatic β -cells (<i>Reg I</i> トランスジェニックマウスの作製と解析)

(主 査)

論 文 審 査 委 員	教 授 白 土 邦 男	教 授 松 野 正 紀
	教 授 豊 田 隆 謙	

論文内容要旨

【目 的】

膵ランゲルハンス島（膵ラ島）はインスリンを産生する唯一の臓器であるが、再生増殖能に乏しく、いったん破壊されると再生しない臓器と考えられてきた。したがって免疫反応・感染・外科手術などにより破壊された膵ラ島を再生増殖させることが可能となれば、インスリン依存性糖尿病の治療法の確立に大きな役割を果たすものと期待される。

1984年、90%膵切除したラットに poly (ADP-ribose) 合成酵素阻害剤である nicotinamide を投与することで膵ラ島が再生し、糖尿病が改善することが明らかにされた。この膵ラ島の再生増殖時に特異的に発現する遺伝子 (*Reg* (regenretaining gene) と命名) が分離され、その後、*Reg* 遺伝子は3つのタイプ (type I, II, III) のメンバーからなる遺伝子ファミリーを構成していること、*Reg I* 遺伝子のコードする *Reg I* 蛋白質が膵ラ島β細胞に対して増殖刺激作用を有することが明らかにされた。

本研究では、膵ラ島β細胞で *Reg I* 遺伝子を過剰発現する *Reg I* トランスジェニックマウスを作製し、*in vivo* で作られた *Reg I* 蛋白質がβ細胞に及ぼす増殖刺激作用を明らかにすることを試みた。

【結果・考察】

膵ラ島β細胞で、*Reg I* 蛋白質を過剰に発現させるために、ラットのインスリンIIプロモーターの下流にマウス *Reg I* 遺伝子を連結したハイブリッド遺伝子を3コピー、タンデムに結合したDNAを作製しトランスジーンとした。このトランスジーンをマウス (C57B1/6J×CBA/J) 受精卵の雄性前核に顕微注入し、この受精卵を仮親 (ICR) の輸卵管に移植しトランスジェニックマウスを得た。マウス尾から抽出した genomic DNA を鋳型に PCR 法、サザンブロット法を用いトランスジェニックマウスを同定した。その結果、三系統のマウス (line280, 282, 284) がインスリンII-*Reg I* ハイブリッド遺伝子を持つことが確認された。これら三系統のマウスと ICR mouse を交配し解析に用いた。

トランスジェニック、ノントランスジェニックマウスの膵ラ島から RNA を抽出して Northern blot analysis を行ったところ *Reg I* 遺伝子はトランスジェニックマウスの膵ラ島でのみ発現していた。更に *Reg I* 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、トランスジェニックマウス膵ラ島においてインスリン染色陽性の細胞 (β細胞) のみが染色された。以上の結果から導入した *Reg I* 遺伝子はトランスジェニックマウスの膵ラ島β細胞のみで特異的に発現していると考えられた。

更にトランスジェニックおよびノントランスジェニックマウスの膵ラ島を単離培養し培養上清の Western blot analysis を行ったところ、トランスジェニックマウスの膵ラ島の培養上清中に Reg I 蛋白質が 14kDa (Reg I 蛋白の分子量に相当する) のバンドとして認められた。このことから再生増殖時の膵ラ島 β 細胞で内因性の *Reg I* 遺伝子より Reg I 蛋白質が合成されるのと同様に、トランスジェニックマウスの β 細胞でも *Reg I* トランスジーンより Reg I 蛋白質が合成され、これが細胞外へ分泌されていると考えられた。

そこで、トランスジェニックマウスとノントランスジェニックマウスの膵ラ島を単離し、膵ラ島の増殖活性を [3 H] thymidine の取り込みにより検討した。その結果トランスジェニックマウスの膵ラ島で [3 H] thymidine の取り込みが対照に比して有意に上昇していた。従って、トランスジェニックマウスの膵ラ島 β 細胞から分泌された Reg I 蛋白質は β 細胞の増殖刺激活性を有していることが明らかとなり、*in vivo* でトランスジェニックマウスの膵ラ島の増殖が観察されることが期待された。

しかしながら、*in vivo* ではトランスジェニックマウスはノントランスジェニックマウスに比して発育、成長、体重、血糖、血中インスリン等に差を認めなかった。また、トランスジェニックマウスの膵ラ島は組織形態学的に対照と比較し変化を認めずその体積にも有意な差を認めなかった。ごく最近に至り、シュワン氏細胞の *in vitro* 培養系で、type III *Reg* 遺伝子産物の一つである *Reg III* β 蛋白質が cyclicAMP (cAMP) 合成酵素促進剤である Folskolin の存在下で増殖促進活性を示すことが報告された。そこで、*Reg I* トランスジェニック、ノントランスジェニックマウスに膜透過型 cAMP である dibutyryl cAMP を生下時より連日、腹腔内投与し、膵組織標本を作製し膵ラ島の体積をポイントカウント法で測定した。生後 4 週齢、6 週齢のトランスジェニックマウスの膵ラ島体積はノントランスジェニックマウスと比較して 3~4 倍に増加していた。

以上より、*Reg I* トランスジェニックマウスの膵ラ島 β 細胞で合成・分泌された Reg I 蛋白質は β 細胞増殖刺激活性を有していることが明らかになった。また、*in vivo* の膵ラ島 β 細胞増殖には、*Reg I* 遺伝子の活性化と共に cAMP 情報伝達系の活性化が関与している可能性が考えられた。

審査結果の要旨

本研究は、膵ラ島β細胞で Reg I 蛋白を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、in vivo で作られた Reg I 蛋白がβ細胞に及ぼす増殖刺激作用を明らかにすることを試みたものである。本テーマは、将来、糖尿病患者において、遺伝子治療により患者自身の膵β細胞を再生増殖させるという画期的な治療法に結びつく可能性のある大変独創的なものである。

本申請者は、ラットのインスリンIIプロモーターの下流にマウス *Reg I* 遺伝子を連結したハイブリット遺伝子を用いてトランスジェニックマウスを得、その in vitro の膵ラ島で [³H]thymidine の取り込みが対照に比して有意に上昇していることを示した。これは、autocrine にて分泌された Reg I 蛋白質が膵ラ島β細胞の DNA 合成を有意に促進させることを初めて明らかにしたものである。一方 in vivo では、トランスジェニックマウスは対照に比し、発育、成長、体重、血糖、および血中インスリンに差を認めなかった。また、トランスジェニックマウスの膵ラ島は組織形態学的に対照と比較し変化を認めず、その体積にも有意な差を認めなかった。そこで、本申請者はトランスジェニックマウスに dibutyryl cAMP を生下時より連日、腹腔内投与したところ、膵ラ島体積は対照と比較して3～4倍に増加した。これは、autocrine にて分泌された Reg I 蛋白が cAMP の情報伝達系と関連して、膵ラ島細胞を in vivo で増殖させることを初めて示したものである。

以上より、*Reg I* トランスジェニックマウスの膵ラ島β細胞で合成・分泌された Reg I 蛋白質は、β細胞増殖刺激活性を有していることが初めて明らかになった。また、in vivo の膵ラ島β細胞増殖には、*Reg I* 遺伝子の活性化と共に cAMP 情報伝達系の活性化が関与している可能性が示された。*Reg I* 遺伝子を用いた遺伝子治療が、実際に糖尿病モデル動物あるいは糖尿病患者の治療に有効であるか否かは、さらなる検討が必要ではある。しかしながら、本研究は、Reg I 蛋白質を過剰発現させる遺伝子治療を用いて、患者自身の膵β細胞を再生増殖させるという新しい糖尿病治療法の確立に道を開いた点で、大変意義が深く、学位に十分に値すると思われる。