



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Cytokine-induced apoptotic cell death in a mouse pancreatic beta-cell line : inhibition by Bcl-2                                                |
| Author(s)    | 岩橋, 博見                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 1997, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/40019">https://hdl.handle.net/11094/40019</a>                                                             |
| rights       |                                                                                                                                                 |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|               |                                                                                                                                                      |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | いわはしひろみ<br>岩 橋 博 見                                                                                                                                   |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)                                                                                                                                            |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 3 0 2 0 号                                                                                                                                        |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 9 年 3 月 25 日                                                                                                                                      |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>医学研究科内科系専攻                                                                                                                       |
| 学 位 論 文 名     | Cytokine-induced apoptotic cell death in a mouse pancreatic beta-cell line : inhibition by Bcl-2<br>(サイトカインにより誘導されるマウス膵β細胞株のアポトーシス : Bcl-2蛋白によるその抑制) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 松澤 佑次<br><br>(副査)<br>教 授 辻本 賀英    教 授 荻原 俊男                                                                                              |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目的】

IDDM (insulin - dependent diabetes mellitus) の発症基盤である膵β細胞の広範な脱落の分子機構は、未だ明らかではない。現在まで、一部膵島炎が関与していることが示唆されており、浸潤単核細胞から産生されるサイトカイン (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) が、何らかの細胞傷害を引き起こしていると考えられている。しかし、この過程にアポトーシスが関与しているかどうかは不明である。また、多くの系でアポトーシスを抑制することが明らかにされつつある Bcl-2 が、膵島細胞で機能しているかどうかは明らかでない。本研究では、マウス膵島細胞株を用いて、上記のサイトカインにより膵島細胞がアポトーシスを起こすか、またこの細胞死を Bcl-2 は抑制するかどうか検討を加えることにより、IDDM における膵β細胞死の分子機序の一端を明らかにすることを目的とした。

### 【方法】

1. 培養細胞：膵島細胞株として、 $\beta$ TC1 (マウス膵β細胞株)、 $\alpha$ TC1 (マウス膵 $\alpha$ 細胞株)、NIT1 (NOD マウス由来膵β細胞株) を使用した。
2. 細胞の viability およびアポトーシスの定量：細胞の viability は、trypan blue 染色法にて測定し、アポトーシスの定量は、核を propidium iodide で染色後、FACS にて hypodiploid 分画を計測することにより行った。
3. 断片化 DNA の観察：adherent および non - adherent の全細胞を低張溶解液で溶解後、small DNA 分画を抽出、2% アガロースゲルで電気泳動後、エチジウム染色を行い、断片化 DNA を観察した。
4. Bcl-2 蛋白の発現の検討：各細胞株の endogenous な Bcl-2 蛋白の発現は、cell lysates 10  $\mu$ g protein を SDS - PAGE に展開後、マウス Bcl-2 蛋白に対する抗体を用いた immunoblot 法にて検討した。
5.  $\beta$ TC1 への bcl-2 遺伝子の導入： $\beta$ TC1 における Bcl-2 蛋白の過剰発現は human bcl-2 を挿入したレトロウイルスベクターを用いて行い、コントロールの細胞としてはベクターのみの transfectant を使用した。また、exogenous な Bcl-2 蛋白の発現は、ヒト Bcl-2 蛋白に対する抗体を用いた immunoblot 法および FACS analysis により確認した。

### 【成績】

1. サイトカインによる  $\beta$ TC1 細胞のアポトーシスの誘導： $\beta$ TC1 に 3 種のサイトカイン (IL-1 $\beta$ , 200 U/ml : TNF- $\alpha$ , 200 U/ml : IFN- $\gamma$ , 200 U/ml) を併せて処置すると、その viability は経時的に低下し、

hypodiploid 分画の核が増加してきた。この hypodiploid 分画の核の増加は、endonuclease inhibitor である aurintricarboxylic acid により、ほぼ完全に抑制され、また蛋白合成阻害剤である cycloheximide により enhance された。サイトカイン処置後48時間における断片化 DNA を観察したところ、アポトーシスでしばしば特徴的に見られる oligonucleosome 単位の DNA ladder として観察された。以上の結果より  $\beta$ TC1 は、上記のサイトカインによりアポトーシスを起こすことが明らかとなった。

2. 3種の膵島細胞株におけるアポトーシスの誘導率と Bcl-2 蛋白の発現量の検討： $\alpha$ TC1, NIT1 細胞に対しても同様の処置を行い、hypodiploid 分画の核を測定したところ、これらの細胞株においても、サイトカイン処置後48時間において有意に hypodiploid 分画の核が誘導された。しかし、その誘導率は  $\alpha$ TC1 や NIT1 では、 $\beta$ TC1 に比べて低く、それぞれ  $\beta$ TC1 の場合の  $1/5$ ,  $1/2$  程度であった。一方、各細胞株の endogenous な Bcl-2 蛋白の発現を検討したところ、アポトーシスの誘導率の高い  $\beta$ TC1 では、 $\alpha$ TC1 や NIT1 に比べ、その発現量が極めて低かった。以上の結果より、これら膵島細胞において、Bcl-2 は、サイトカインにより誘導されるアポトーシスを抑制している可能性が考えられた。

3. Bcl-2 による  $\beta$ TC1 細胞のアポトーシス抑制効果：Bcl-2 が  $\beta$ TC1 においてアポトーシスを抑制しうるかどうか検討するため、 $\beta$ TC1 に、さらに Bcl-2 蛋白を強制発現させ、ベクターのみの transfectant と比較した。Bcl-2 蛋白を強制発現させた  $\beta$ TC1 では、ベクターのみの transfectant と比べ、サイトカイン処置による viability の低下及び hypodiploid 分画の核の誘導率が、約  $1/2$  にまで抑制された。この結果は、Bcl-2 が膵  $\beta$  細胞株である  $\beta$ TC1 で機能しうることを示している。

#### 【総括】

サイトカイン (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) により、マウス膵  $\beta$  細胞株である  $\beta$ TC1 はアポトーシスを起こし、Bcl-2 はこのアポトーシスを抑制することが明らかとなった。このことは、IDDM における膵  $\beta$  細胞死の少なくとも一部には、アポトーシスが関与しており、Bcl-2 はそのアポトーシスに対して抑制的に働いている可能性を示している。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は IDDM における膵  $\beta$  細胞死の細胞内分子機構を明らかにする目的で、膵島細胞傷害因子の一つであるサイトカイン、IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  により、膵島細胞がアポトーシスをおこすか、またこの細胞死をアポトーシス制御因子の一つである Bcl-2 が抑制するかどうか、検討を加えたものである。

その結果、上記のサイトカインにより膵  $\beta$  細胞株のアポトーシスが誘導され、膵  $\beta$  細胞株への Bcl-2 蛋白の強制発現により、その細胞死が一部抑制されることが明らかとなった。一方  $\alpha$  細胞株では、 $\beta$  細胞に比べサイトカインによるアポトーシスの誘導に抵抗性を示し、Bcl-2 蛋白の発現量も  $\beta$  細胞より高いことが示された。

本研究により、サイトカインによる膵  $\beta$  細胞傷害に Bcl-2 による抑制可能なアポトーシス分子機構の存在することが明らかにされ、またサイトカインに対する  $\beta$  細胞の脆弱性に、 $\beta$  細胞における Bcl-2 蛋白の低発現が関与する可能性が示された。本研究は、IDDM の発症過程に関与する因子を明らかにしており、糖尿病の成因解明や、膵  $\beta$  細胞死の予防、治療を確立するうえで重要なものであり、学位に値すると思われる。