

Title	遺伝子改変マウスを用いた膵臓β細胞における神経ペプチドPACAPの生理機能の解明
Author(s)	富本, 修平
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/44815">https://hdl.handle.net/11094/44815</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	とみもと しゅう へい 富本 修平
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 18639 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	遺伝子改変マウスを用いた膵臓β細胞における神経ペプチド PACAP の生理機能の解明
論文審査委員	(主査) 教授 馬場 明道 (副査) 教授 八木 清仁 教授 山元 弘 教授 土井 健史

#### 論文内容の要旨

膵臓β細胞から分泌されるインスリンは、唯一の血糖降下ホルモンである。糖尿病はこの膵臓β細胞におけるインスリン分泌低下および、標的細胞におけるインスリン感受性の低下による相対的なインスリン作用不足の結果として引き起こされる。インスリン分泌不全と感受性低下が混在しているインスリン非依存型糖尿病 (NIDDM) 治療においては、残存するβ細胞のインスリンを放出させて血糖を調節するという方法がとられている。インスリン分泌刺激薬としては、60年前のスルホニル尿素剤の発見以来、膵臓β細胞の  $K_{ATP}$  チャネルの閉鎖と  $Ca^{2+}$  流入作用を持ち、開口放出に働く薬剤が開発されてきた。しかし、グルコースや、スルホニル尿素剤による膵臓β細胞への  $Ca^{2+}$  流入は、開口放出ばかりではなく膵臓β細胞のアポトーシスをも引き起こすことが知られている。したがって膵臓β細胞に過負荷をかけない、別のシグナルをターゲットとしたインスリン分泌促進物質についての知見が待望されている。このような背景から近年注目を集めているインスリン分泌促進物質に、7回膜貫通型受容体を介して働くペプチドホルモン、あるいは神経ペプチドがあり、その一つが pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) である。

PACAP は下垂体細胞のアデニレートシクラーゼを活性化する作用を指標に、ヒツジ視床下部より単離・同定された神経ペプチドである。また PACAP が結合する受容体には、PAC1 受容体、VPAC1 受容体、VPAC2 受容体、と呼ばれる三種のサブタイプが知られており、いずれも G 蛋白共役、7回膜貫通型の構造をとっている。PACAP は、セクレチン・グルカゴン・vasoactive intestinal polypeptide (VIP) ファミリーに属し、その生理作用として、下垂体・副腎髄質ホルモンの合成・分泌調節や神経細胞・性細胞の分化および成長など多彩な役割を担うことが知られている。

膵臓においては PACAP 免疫陽性神経が膵島に投射すること、PACAP 受容体のサブタイプのうち PACAP に親和性の高い PAC1 受容体と、VIP と同程度の親和性を示す VPAC2 受容体の発現が膵臓β細胞にみられることが相次いで報告された。また単離膵島を用いた研究において、PACAP はグルコースにより惹起されるインスリン分泌を  $10^{-13}$  から  $10^{-14}$  という極めて低い濃度で著明に促進することが知られている。また PACAP は様々な細胞で、細胞保護作用あるいは、分化、増殖の促進作用を持つことから、膵臓β細胞においてもこのような作用がみられることが予測される。このようなペプチドの生理作用に関する研究は、インスリン分泌機構の解明につながるばかりではなく、細胞保護、分化、増殖促進といった新しい創薬ターゲットの模索に極めて重要であると考えられる。

このような視点から、当研究室ではこれまでに、遺伝子改変技術を用いて、膵臓における PACAP の生理作用を調べることが目的とし、ヒトインスリンプロモーターを PACAP cDNA の上流に連結した融合遺伝子を用いて、膵臓特異的に PACAP を過剰発現する Tg マウスを作製している。遺伝子改変マウスを用いることは、インスリン分泌において重要な役割を果たすことが予測される PACAP の生理的意義を、個体レベルで明らかにすることができるという点で重要であるものと考えられる。第一章では、Tg マウスを用い、PACAP の耐糖能に果たす役割のみならず、ストレプトゾトシン (STZ) 投与時など特定の病態を惹起した条件下では  $\beta$  細胞増殖機能も調節することを明らかにした。

第二章では 2 型糖尿病の病態下における、膵臓での PACAP 過剰発現の影響について調べた。KKA<sup>y</sup> マウスは、本来毛嚢で産生されている分泌タンパクである agouti タンパクが異所性に過剰に発現する優性変異遺伝子を持つマウスである。この agouti タンパクは、視床下部でメラノサイト刺激ホルモン (MSH) の受容体である MC4 受容体上において MSH と拮抗し、摂食抑制のシグナルを遮断することにより、過食を引き起こす。従って KKA<sup>y</sup> マウスは過食・肥満に伴うインスリン感受性の低下や、高血糖、高インスリン血症を呈する 2 型糖尿病となる。今回我々は KKA<sup>y</sup> マウスと、Tg マウスを交配することにより、PACAP トランスジェンあるいは KKA<sup>y</sup> 遺伝子のそれぞれの有無による、4 種類の遺伝型からなる F<sub>1</sub> 世代のマウス (+/+、Tg/+、A<sup>y</sup>+/+、Tg/+ : A<sup>y</sup>+/+) を作製し、2 型糖尿病の発症に際し、PACAP がどのような効果を示すかについて検討した。この結果 KKA<sup>y</sup> マウスの  $\beta$  細胞に過剰発現させた PACAP は、高インスリン血症および膵島の過形成を抑制し、RegIII  $\beta$  を含めた種々の遺伝子発現を上昇させることを見出した。

さらに第三章では内因性の PACAP が代謝に果たす役割について調べた。PACAP は、glucagon/secretin/vasoactive intestinal peptide (VIP)/GHRH ファミリーの中で、最も進化の過程で保存されているペプチドである。その一次構造は調べられている限りの哺乳動物ではほとんど同一であり、また無脊椎動物である tunicate においてもその構造は保存されている。従って、このペプチドは生物の生存にとって普遍的に必要であると考えられてきた。

我々のグループは ICR を遺伝的背景とする PACAP 欠損マウスを用いて糖代謝、および脂肪組織について PACAP 欠損の影響を評価した。この結果、内因性の PACAP は、脂肪組織の増加および脂肪細胞を成熟させる役割を持つこと、また食餌性の脂肪組織重量の増加には関与しないことを明らかにした。

過剰発現させた PACAP が、通常の神経ペプチドとしての PACAP の作用と異なる作用を示す可能性は否定し得ない。しかしながら、PACAP が持つインスリン分泌促進という即時的な作用に加えて、本研究で示された  $\beta$  細胞に対する増殖能の制御という働きから、PACAP シグナル経路が抗糖尿病作用に寄与している可能性が示唆される。また、PACAP が脂肪細胞形成機能を含め、糖、脂質代謝に多面的に寄与することを示した本研究の結果は、PACAP シグナル系が糖尿病治療戦略上、有用な創薬ターゲットであることを改めて示したものであると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

神経ペプチド PACAP はインスリン分泌をはじめとするすい臓機能調節に関わるシグナル系と考えられている。本研究は、PACAP のすい臓特異的トランスジェニックマウスと PACAP ノックアウトマウスを用い、遺伝的 II 型糖尿病モデルマウス (KKA<sup>y</sup>) と交配するなどの遺伝薬理学的手法により、すい臓での PACAP の機能を追求したものである。

その結果

1. 膵島  $\beta$  細胞における PACAP の過剰発現により、ストレプトゾトシン投与による  $\beta$  細胞の障害時において、 $\beta$  細胞の増殖活性が上昇することを見出した。
2. PACAP 欠損マウスでは脂肪組織重量が減少し、未成熟な脂肪細胞が多く認められた。またインスリン抵抗性が亢進し、インスリン分泌量は低下することを見出した。
3. KKA<sup>y</sup> マウスの  $\beta$  細胞に過剰発現させた PACAP は高インスリン血症、および膵島の過形成を抑制した。またこれに伴い、PACAP が  $\beta$  細胞に特異的に発現を変化させる複数の遺伝子を遺伝子発現プロファイルの解析から見出した。

これらの結果は PACAP のすい臓での新しい機能を見出したもので、博士 (薬学) の授与に値するものである。