The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	PACAP遺伝子改変動物を用いた膵内外分泌の病態関連因子の探索と機能解析
Author(s)	濵上, 堅一
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49172
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【17】

氏　　名	濵　上　堅　一（はま　がみ　けん　いち）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　２１９６２　号
学 位 授 与 年 月 日	平成 20 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	**PACAP 遺伝子改変動物を用いた膵内外分泌の病態関連因子の探索と機能解析**
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　馬場　明道 （副査） 教　授　松田　敏夫　　教　授　土井　健史　　教　授　山口　明人

論 文 内 容 の 要 旨

PACAP（pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide）は下垂体細胞のアデニル酸シクラーゼ活性化を指標に単離された、VIP/セクレチン/グルカゴンファミリーに属する神経ペプチドで、中枢および末梢神経系で多様な生理作用を有する。特に膵臓の機能に関して、PACAP 陽性神経が膵島に投射する一方、膵β細胞にも PACAP が発現すること、PACAP が極めて低濃度においてもグルコース依存性インスリン分泌を促進すること、また、PACAP が膵腺房細胞からのアミラーゼ分泌を促進することが報告されている。このように PACAP は、膵臓の内分泌、外分泌機能に共に関与する特徴的な神経ペプチドであるが、その病態における役割や細胞内シグナルについては未だ不明な点が多い。当研究室ではこれまでに、膵島β細胞特異的な PACAP 過剰発現マウス（PACAP-Tg）と２型糖尿病モデルである KKA_y マウスとを交雑させ、その第一世代のマウス（＋/＋、Tg/＋、A_y/＋、Tg/＋：A_y/＋）の表現型を解析したところ、膵島における PACAP の過剰発現が２型糖尿病における膵島の過形成および肥大を顕著に抑制することを明らかにし、さらに、膵島の過形成促進に関わる遺伝子群（A_y/＋および Tg/＋：A_y/＋で同様に発現変動）と、過形成抑制に関わる遺伝子群（Tg/＋：A_y/＋で特異的に発現変動）を同定した。

そこで本研究では、まず、PACAP 過剰発現による膵島過形成抑制の分子メカニズムを明らかにする目的で、PACAP 過剰発現により新規かつ特異的に発現変動した遺伝子に着目し、その発現変化について統計学的解析、定量的解析を行った。その結果、PACAP 過剰発現において糖尿病病態に惹起させた場合（Tg/＋ vs Tg/＋：A_y/＋）、さらには糖尿病病態下において PACAP を過剰発現された場合（A_y/＋ vs Tg/＋：A_y/＋）の両条件において有意に発現変動する遺伝子として、Reg（regenerating gene）IIIβを見出し、マイクロアレイおよび real time RT-PCR の発現解析では、PACAP によって過形成が抑制された Tg/＋：A_y/＋の膵島特異的に RegIIIβの著しい発現増加が示された。以上の結果より、２型糖尿病病態下の膵島において RegIIIβは PACAP のターゲットとなりうることが考えられた。

そこで次に、RegIIIβが膵β細胞でどのような機能を担うのかを明らかにするため、２型糖尿病病態下の膵β細胞 remodeling に着目し、本現象における PACAP および RegIIIβの機能解析を行った。1μM PACAP 処置、RegIIIβ過剰発現は、高グルコース（25 mM）条件下特異的に INS-1 細胞増殖抑制作用を示した。さらに、RegIIIβノックダウンは、細胞増殖を全体的に亢進した。また、PACAP による高グルコース依存性細胞増殖の抑制作用は、RegIIIβのノックダウンにより、完全ではないものの一部減弱した。さらに、β細胞増殖に必須な役割を果たす cyclin D 群の

発現は、1μM PACAP の処置により、高グルコース負荷による cyclin D1 および D2 mRNA の発現増加が抑制されること、また、RegIIIβ過剰発現により、cyclin D1 の発現増加のみが抑制されることが示された。以上の結果より、1）RegIIIβがグルコース依存性膵β細胞増殖を抑制する因子であり、その作用は cyclin D1 依存的に発現されること、2）PACAP の膵β細胞増殖抑制作用は、RegIIIβ-cyclin D1 系と、cyclin D2 系の２つのシグナル系を介することを明らかにした。

次に、近年、RegIIIβは急性膵炎病態との関係が注目される因子であることから、急性膵炎病態における PACAP と RegIIIβの役割を明らかにする目的で、PACAP-Tg マウスを用いた検討を行った。その結果、セルレイン誘発急性膵炎において、PACAP-Tg マウスでは、野生型マウスと比較して、血中酵素活性の上昇が亢進していること、膵腺房細胞の空胞化、浮腫、実質壊死、炎症性細胞の浸潤、などの膵組織障害が亢進していることを明らかにした。さらに、膵臓内で過剰発現した PACAP は、急性膵炎時に特に炎症因子である IL-1β、IL-6 の発現を増加させることを明らかにした。また一方で、PACAP-Tg マウスの膵臓では抗炎症因子である RegIIIβの発現が定常状態ですでに増加しており、また、ラット膵腺房細胞株 AR42J 細胞では、PACAP 単独で RegIIIβの発現上昇が認められるものの、PACAP とセルレインを共処置することで相乗的な発現上昇が認められることが mRNA、蛋白質レベルで明らかとなった。以上の結果は、1）膵臓で過剰発現した PACAP はセルレイン誘発急性膵炎の炎症反応を促進させること、さらに、*in vivo*、*in vitro* での RegIIIβの発現解析から、2）膵腺房細胞においても、RegIIIβ遺伝子が PACAP の標的因子となりうることを示したものであると考えられる。

これらの結果は、膵の内外分泌部における PACAP-RegIIIβシグナルの重要性を強く示唆したものであり、膵機能調節における本シグナルの詳細な解析が、膵臓の生理・病態の分子基盤の解明に繋がるのみならず、その治療への新規創薬標的の探索研究になることを示す。また PACAP および RegIIIβが本研究によって膵臓の内分泌部と外分泌部の両方に作用することが明らかになったことから、本シグナルに着目した機能解析は、膵島・腺房細胞連関（islet-acinar axis）の本態解明に資する研究になる可能性もある。今後本研究を基盤とした新たな膵機能調節シグナル研究の道が拓かれることを期待する。

論文審査の結果の要旨

本研究は、２型糖尿病病態下の膵島過形成抑制に関わる遺伝子群に関して統計的な解析を行ない、神経ペプチド PACAP 過剰発現による膵島過形成抑制時に新規かつ特異的に発現上昇する遺伝子として RegIIIβを同定した。申請者はこの RegIIIβに着目し２型糖尿病病態下でおこる膵β細胞の remodeling と膵腺房細胞の障害を伴う急性膵炎での、それぞれ PACAP-RegIIIβシグナルの役割を明らかにした。

その成果の概要は、RegIIIβが高血糖下のβ細胞の増殖を cyclin D1 の発現抑制を介して抑制する因子であり、これまで知られていた PACAP のβ細胞増殖抑制も一脚、RegIIIβを介するものであることを見出した。更に、外分泌系においては PACAP-RegIIIβシグナルが膵炎の抑制因子であることを見出した。これらの知見は PACAP-RegIIIβが膵病態のリモデリングに重要なシグナル系であることを見出したものであり、薬学博士の取得に充当価するものである。