



Development of pancreatic islets in pancreatic polypeptide-overexpressing mice

杠葉, 英樹

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2004-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2955

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002955>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

【 105 】

氏 名・(本 籍) 杠葉 英樹 (長崎県)

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学 位 記 番 号 博い第1565号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の日付 平成16年3月31日

【 学位論文題目 】

Development of pancreatic islets in
pancreatic polypeptide-overexpressing mice
(膵ポリペプチド過剰発現マウスにおける膵ラ氏島の発達)

審 査 委 員

主査 教 授 千原 和夫

教 授 岡村 均

教 授 寺島 俊雄

【緒言】

以前に我々は消化管ホルモンである胰ポリペプチド(pancreatic polypeptide 以下 PP)の過剰発現マウス(以下 PPTG マウス)を作製し、食欲や体重調節に異常が認められ、やせを呈することを報告してきた。PPTG マウスにおける PP の過剰発現は胰ラ氏島を中心に認められ、PP 産生細胞は胰ラ氏島の大部分を占める。正常のマウスの胰ラ氏島はインスリンを产生する β 細胞が中心に存在し、その周辺にグルカゴンを产生する α 純細胞、ソマトスタチンを产生する δ 細胞、PP を产生する PP 細胞などの非 β 細胞が取り巻く様に存在しているが、PPTG マウスにおいてはインスリン産生細胞が存在するはずの場所、すなわち胰ラ氏島の中央に PP 産生細胞が存在する。PPTG マウスの血清中 PP 濃度は、野生型に比べて約 20 倍の高値を示す。Herrera らが胎生期において、PP 遺伝子発現細胞がインスリン細胞やソマトスタチン細胞の分化に必要であることを示報告した様に、近年、PP ファミリーペプチド(ペプチド YY(PYY)、神経ペプチド Y(NPY)、PP)が、他の胰ラ氏島の内分泌細胞の分化誘導に影響を及ぼす可能性が示唆されてきた。PYY が胎生早期にインスリンやグルカゴンと集簇を形成し、PYY 産生細胞がその他の内分泌細胞の幹細胞の役割を果たしていることなども報告されている。それ故、PPTG マウスでは PP の過剰発現が、胰ラ氏島内分泌細胞の発達と分化に影響を与えることが考えられる。そこで今回の研究では、胎生期の胰ラ氏島内分泌細胞の発達に関して、PPTG マウスを用いて検討を行った。

【方法】

胰ポリペプチド過剰発現マウス(PPTG マウス)と野生型 BDF-1 マウス(日本 SLC、静岡、日本)を用いた。胰ポリペプチド過剰発現マウス(PPTG)は、我々が以前に β -アクチングロモータを用いて作製した。各々の成育後のマウスと胎児期 15 日目、17 日目、19 日目の胎児を用いた。成育マウスは、4°C の 4% パラホルムアルデヒド、0.5% グルタルアルデヒド、0.2% ビクリン酸を含む 0.1M リン酸バッファー溶液で灌流固定した。臍臓を摘出し 4°C の 4% パラホルムアルデヒド、0.2% ビクリン酸を含む 0.1M リン酸バッファー溶液に 24 時間浸漬し後固定した。胎児は子宮から取り出し 4°C で 2 時間浸漬固定した後に 4°C で 24 時間後固定した。臍組織と胎児はゼラチン包埋し、クリオスタットで 20 μ m 切片に薄切した。切片はインスリン(モルモット、ポリクローナル、Linco

Res.St.Charles、MO)、PP(ウサギ、ポリクローナル、Yahaihara Ins.静岡、日本)、ソマトスタチン(マウス、モノクローナル)に対する抗体、別の切片はインスリン、グルカゴン(ウサギ、ポリクローナル、Biogenesis、Kingston、NH)とソマトスタチンに対する抗体を 0.3% triton X 含有リン酸バッファー溶液(PBST)で 5000 倍に希釈した混合溶液中でインキュベートした。洗浄後 Alexa Fluor 488-標識抗モルモット Ig G(Molecular probes Inc.)と Alexa Fluor 568-標識抗ウサギ Ig G(Molecular probes Inc.)と Cy5-標識抗マウス Ig G(Chemicon Co.)の二次抗体混合液にインキュベートした。洗浄後切片をゼラチンコートのスライドグラスに貼りつけ、共焦点レーザー顕微鏡(LSm510、Carl Zeiss Japan、東京、日本)で観察した。

【結果】

まず、PPTG と野生型の成育後のマウスの胰ラ氏島における 4 種のホルモンの局在について調べた。PP 産生細胞とグルカゴン産生細胞の分布に大きな相違が認められた。野生型マウスでは PP とグルカゴン陽性細胞は胰ラ氏島の辺縁に存在するが、PPTG マウスではそれらの細胞は胰ラ氏島の中央部に分布し、PP とグルカゴンは完全にインスリンと共に存していた。野生型マウスでは胰ラ氏島の辺縁でソマトスタチン、PP とグルカゴンは独立して分布するが、PPTG マウスでは PP/ソマトスタチンの共存細胞と、グルカゴン/ソマトスタチンの共存細胞が増加していた。

次に PPTG マウスと野生型マウスの胰ラ氏島の 4 種のホルモンの発達を異なる胎児期について調べた。野生型マウスでは胎生 15 日目にインスリン陽性細胞とグルカゴン陽性細胞が検出できたが、PP 陽性細胞とソマトスタチン陽性細胞は検出できなかった。インスリンとグルカゴンは独立して分布していた。一方、PPTG マウスでは胎生 15 日目にインスリン陽性細胞とグルカゴン陽性細胞とともに PP 陽性細胞とソマトスタチン陽性細胞が検出できた。PPTG マウスではインスリンと PP は独立して分布するが、グルカゴンとソマトスタチンは殆ど共存していた。

野生型マウスでは胎生 17 日目にソマトスタチン陽性細胞が出現し、これらは完全にグルカゴン産生細胞と共存する。PP 陽性細胞はこの時期の野生型マウスの臍臓には認められない。PPTG マウスでは胎生 17 日目に 4 種の全てのホルモンが認められ、グルカゴンとソマトスタチンは共存した。しかしインスリン

と PP は殆ど独立して分布していた。

野生型マウスでは胎生 19 日目に PP 陽性細胞は検出できなかったが、インスリン陽性細胞、グルカゴン陽性細胞、ソマトスタチン陽性細胞は増加し、それらはこの時期に臍ラ氏島に似た細胞塊を形成する。これらの細胞塊においてインスリン陽性細胞は中央に位置し、グルカゴン陽性細胞とソマトスタチン陽性細胞は臍ラ氏島の辺縁に位置することが認められた。この時期では、グルカゴンとソマトスタチンはほとんど共存しない。つまり 4 種の臍ラ氏島のホルモンは野生型マウスではこの時期には独立して分布する。PPTG マウスにおいても胎生 19 日目に臍ラ氏島に似た細胞塊は認められる。この細胞塊では PP 陽性細胞はその数を増加させインスリンと PP の共存は胎生 17 日目に比べ著しく増加する。グルカゴン陽性細胞もその数を増加させ、それらのうちいくつかはインスリン陽性細胞と共存する。

【考察】

成育後の PP TG マウスで最も特徴的な所見は、PP 陽性細胞とグルカゴン陽性細胞の高密度の細胞集団が臍ラ氏島の中央に見られることである。蛍光顕微鏡所見では、PP TG マウスの臍ラ氏島中央部分で 3 つのホルモン(インスリン、グルカゴン、PP)が完全に重複して発現している。これ加えて、PP TG マウスでグルカゴン／ソマトスタチンの重複細胞と PP／ソマトスタチンの重複細胞が、成育後の野生型のマウスに比べて臍ラ氏島の辺縁域で多く見られる。それではどの様にしてこれらの現象が生じたのであろうか。

げっ歯類では臍ラ氏島の個体発生において、グルカゴン産生細胞は胎生 9-10 日目に最も早く現われ、次にインスリン産生細胞は胎生 11-12 日目に、そしてソマトスタチン産生細胞は胎生 17 日目に現われる。PP 産生細胞の発生は更に遅れ、胎生 18-21 日目に現われるとされ、今回の我々の成績もほぼ一致している。一方 PP TG マウスでは PP 産生細胞は胎生早期に出現し、今回の検討ではすでに胎生 15 日目に見出された。PP TG マウスではソマトスタチン産生細胞は胎生 15 日目に出現し、それはグルカゴンと重複する。野生型マウスではグルカゴン／ソマトスタチンの重複細胞は胎生 17 日目に出現し、それらは胎生 19 日目には単独陽性細胞へと分化する。しかし PP TG マウスでは、グルカゴン／ソマトスタチンの重複細胞は出生後も存在し、成育後も単独陽性細胞への分化は妨げられる。

これらの結果は、早期の PP の発現が、ソマトスタチンの発現を少なくとも 2 日早く誘導することを示している。成育後の PP TG マウスのグルカゴン産生細胞は、臍ラ氏島の中央部分の大部分を占め、それらは完全にインスリン産生細胞に重複する。出生前には PP TG マウスと野生型マウスの間にグルカゴン産生細胞の数と分布に大きな違いは認められない。インスリン／グルカゴン産生細胞が、胎生 19 日目には PP TG マウスでやや多く認められることが僅かな違いである。

臍ラ氏島の発達において、内分泌細胞の増殖速度は出生前と出生後早期に最も大きいことが知られている。出生後にグルカゴン産生細胞の増殖速度は 4 種の内分泌細胞の中で最大であるが、成育後のマウスにおいては、臍ラ氏島の僅かな部分を占めるのみである。その際に起こりうる機構としては出生後早期に起こる細胞死、一つの型からもう一つの型への形質転換を含む細胞数の調節機構などが考えられる。臍ラ氏島の細胞数の調節過程において、未熟な内分泌細胞はアポトーシスによって成熟した細胞に取って代わられる。PP TG マウスでは成育後のマウスでさえもグルカゴン、インスリン分泌細胞が完全に重複していることより、PP TG マウスにおいては内分泌細胞の成熟やアポトーシス調節の過程などに異常が生じていることが想定される。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第1565号	氏名	杠葉 英樹
論文題目	<p>Development of pancreatic islets in pancreatic polypeptide-overexpressing mice</p> <p>胰ポリペプチド過剰発現マウスにおける膵ラ氏島の発達</p>		
審査委員	主査	千原 和夫	
	副査	河村 純	
	副査	寺島 俊祐	
審査終了日	平成16年2月16日		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

げつ歯類における正常な膵ラ氏島の形成過程は、まず胎生9—10日にグルカゴン産生細胞が現われ、次に胎生11—12日にインスリン産生細胞が、そして胎生17日にソマトスタチン産生細胞が現われ、膵ポリペプチド (pancreatic polypeptide 以下 PP) 産生細胞は胎生18—21日に現われると報告されている。一方、Herreraらは、胎生期におけるPP遺伝子発現がインスリン細胞やソマトスタチン細胞の分化に必要であることを示唆する成績を報告し、PPファミリーペプチドの膵ラ氏島発生における役割が注目されている。申請者たちの研究グループは、PPの生体における役割を明らかにする目的で、PP過剰発現マウス(以下PPTGマウス)を作製したところ、そのマウスは食欲や体重調節に異常をきたしやせを呈することを見出した。PPTGマウスの血清中PP濃度は、野生型に比べて約20倍の高値を示していたが、このPP過剰発現は膵ラ氏島を中心認められ、本来インスリン産生 β 細胞が存在するはずの膵ラ氏島の中央部にPP産生細胞が存在し、またPP産生細胞は膵ラ氏島の大部分を占めていた。因みに正常のマウスの膵ラ氏島では、インスリンを産生する β 細胞がその中心部に存在し、その周辺を取り巻くようにグルカゴンを産生する α 細胞、ソマトスタチンを産生する δ 細胞、PPを産生するPP細胞などの非 β 細胞が配置されている。そこで申請者は、胎生期の膵ラ氏島内分泌細胞の発達におけるPPの関与を明らかにするために、PPTGと野生型BDF-1各々の成育後のマウスと胎児期15日目、17日目、19日の胎児を用い、膵ラ氏島での4種のホルモン即ちインスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、PPの局在について免疫組織化学で染め共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

まず成熟マウスでの比較では、野生型のPPとグルカゴン陽性細胞が膵ラ氏島の辺縁に存在するが、PPTGではこれらの細胞は膵ラ氏島の中央部に分布し、PPとグルカゴンは完全にインスリンと共存していた。また野生型では膵ラ氏島の周辺にソマトスタチン細胞、PP細胞とグルカゴン細胞は独立して分布するが、PPTGではPP/Somatostatinの共存細胞と、グルカゴン/Somatostatinの共存細胞が数多く見られた。経時に胎生期の差を見ると、胎生15日目に野生型ではインスリン細胞とグルカゴン細胞が出現するがPP細胞とソマトスタチン細胞は検出認められず、またインスリン細胞とグルカゴン細胞は独立して分布していた。一方、PPTGでは胎生15日目にインスリン細胞とグルカゴン細胞に加えてPP細胞とソマト

スタチン細胞が出現していた。PPTG ではインスリン細胞と PP 細胞は独立して分布していたが、グルカゴンとソマトスタチンは殆ど一つの細胞に共存していた。胎生 17 日目に野生型ではソマトスタチン細胞が出現し、これらは完全にグルカゴンを共有していた。PPTG では胎生 17 日日に 4 種の全てのホルモンが認められ、グルカゴンとソマトスタチンは一つの細胞に共存した。しかしインスリンと PP は殆ど独立して分布していた。胎生 19 日目においても野生型では PP 陽性細胞を検出できなかったが、インスリン細胞、グルカゴン細胞、ソマトスタチン細胞はそれぞれ細胞数を増し、細胞塊を形成してきた。これらの細胞塊においてインスリン陽性細胞は中央部に位置し、グルカゴン陽性細胞とソマトスタチン陽性細胞は膵ラ氏島の辺縁に存在していた。この時期では、グルカゴンとソマトスタチンの共存細胞は見あたらなかった。PPTG の胎生 19 日目の膵ラ氏島にはインスリンと共存した PP 陽性細胞がその数を著しく増加させ、またグルカゴン陽性細胞数も増加しそれらの幾らかはインスリンを共存していた。

即ち、PPTG マウスでは、成熟後にも PP・グルカゴン・インスリン陽性細胞の集団が膵ラ氏島の中央部を占め、辺縁部には分化しきれていないグルカゴン／ソマトスタチンの重複細胞や PP／ソマトスタチンの重複細胞が多く見られることより、PPTG マウスにおいては内分泌細胞の成熟やアポトーシス調節の過程になんらかの異常が生じている可能性が考えられた。膵ラ氏島内分泌細胞の発生・分化・成熟において、それぞれの細胞増殖・細胞死・形質転換による細胞数の調節は出生前と出生後早期にもっとも激しくおこなわれており、生理的には内因性 PP はそれらの調節に関与している可能性が考えられる。

以上、本研究は、膵ラ氏島細胞の発生・分化における膵ポリペプチド(PP)の役割について、PP 過剰発現マウスと野生型マウスの膵ラ氏島細胞を免疫組織化学で比較、研究したものであるが、PP の早期過剰発現が膵ラ氏島細胞の分化およびラ氏島内における細胞分布に大きな影響を与えることを初めて明らかにした価値ある知見の集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。