



Cell adhesion molecule 1 is a novel pancreatic-islet cell adhesion molecule that mediates nerve-islet cell interactions

粕, 雄一郎

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2010-03-05

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙3105

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003105>

※ 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。



氏 名	粕 雄一郎
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博ろ第 3105 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位授与の 日 付	平成 22 年 3 月 5 日

【 学位論文題目 】

Cell adhesion molecule 1 is a novel pancreatic-islet cell adhesion molecule that mediates nerve-islet cell interactions(Cell adhesion molecule 1 は神経細胞とランゲルハンス島細胞の結合を介在する新規の膵臓ランゲルハンス島細胞接着分子である)

審 査 委 員

主 査	教 授	林 祥剛
	教 授	東 健
	教 授	清野 進

(論文博士関係)

学位論文の内容要旨

Cell adhesion molecule 1 is a novel pancreatic-islet cell adhesion molecule that mediates nerve-islet cell interactions

Cell adhesion molecule 1は神経細胞とランゲルハンス島細胞の結合を介在する新規の膵臓ランゲルハンス島細胞接着分子である

粕 雄一朗, 古野 忠秀, 萩山 満, 浜口 和之,
中西 守, 増田 万里, 廣田 誠一, 横崎 宏, 伊藤 彰彦

(指導教員：神戸大学大学院医学研究科医科学専攻病理学講座病理学分野横崎宏教授)

粕 雄一朗

Cell adhesion molecule 1 (CADM1)は免疫グロブリンスーパーファミリーに属す細胞間接着分子であり、神経細胞のシナプス形成に関与する事から synaptic cell adhesion molecule とも呼ばれる。CADM1 による細胞間接着には、CADM1 同士の結合によるホモフィリックな細胞間接着と、CADM1 と他の分子の結合によるヘテロフィリックな細胞間接着がある事が知られている。ホモフィリックな細胞間接着の例として神経細胞間、マスト細胞と神経細胞間の接着等が、また、ヘテロフィリックな細胞間接着の例として精子形成細胞とセルトリ細胞間、マスト細胞と線維芽細胞間の接着等が報告されている。以前の研究で、マウス胎児を CADM1 に対する抗体で免疫染色したところ膵臓の一部が染色される事を見出していた。本研究は膵臓における CADM1 の発現部位の詳細な検討と機能解析を目的として行った。

発生過程のマウス膵臓における CADM1 の発現を検討した。ウェスタンブロット法では、胎生 17 日目のマウス膵臓では CADM1 は単一のバンド (100kDa) として検出されたが、生後 21 日目には 2 本のバンド (100kDa と 90kDa) として検出された。Peptide: N-Glycosidase F 処理によって CADM1 は約 65kDa の単一のバンドとなった事から、発生段階において CADM1 は N 型糖鎖の結合量が異なる事が示された。免疫組織化学では、胎生 11 日目の膵臓原基ではすべての細胞で CADM1 が発現していたが、発生が進むにつれて発現細胞は減少していき、出生後ではランゲルハンス島辺縁部の細胞とランゲルハンス島周囲にある神経線維に強いシグナルが検出された。CADM1 陽性神経線維は、CADM1 陽性ランゲルハンス島細胞に近接していた。マウス膵臓に Collagenase P を注入して分離したランゲルハンス島と腺房を用いてウェスタンブロット法と RT-PCR 法によって CADM1 の発現を検討したところ、CADM1 はタンパク質レベルと RNA レベルのいずれにおいてもランゲルハンス島で発現していた。マウス成体の膵臓を用いて CADM1 とホルモン (インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、膵ペプチド) の免疫蛍光二重染色をしたところ、CADM1 発現細胞の大部分はグルカゴン陽性であり、一部ソマトスタチンも陽性であった。以上より、マウスのランゲルハンス島では CADM1 は主に α 細胞、一部 D 細胞で発現している事が分かった。ヒトの膵臓では CADM1 発現細胞はインスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、膵ペプチドのいずれも陽性であった。

マウス α 細胞由来のグルカゴノーマの細胞株 (α TC6 細胞) における CADM1 の発現を検討したところ、ウェスタンブロット法と免疫蛍光染色のいずれにおいても CADM1 の発現を確認できた。アグリゲーション法では α TC6 細胞は凝集塊を形成したが、CADM1 の接着能を阻害する中和抗体を添加すると濃度依存性に凝集能が低下した。以上より CADM1 は α TC6 細胞同士の細胞間接着に関与する事が分かった。マウス膵臓の免疫組織化学では、ランゲルハンス島とこれに近接する神経線維のいずれも CADM1 を発現していた事から、CADM1 がこれらの細胞間接着に関与する可能性を考えた。これを *in vitro* で検討するため

にマウス上顎神経節から神経細胞を樹立して α TC6細胞と共培養した。 α TC6細胞は神経細胞に接着し、また、これらの細胞の接着面にCADM1の強いシグナルを検出できた。さらにこの共培養系にCADM1の接着能を阻害する中和抗体を添加したところ濃度依存性に接着細胞数は減少した。以上よりCADM1は α TC6細胞と神経細胞間の細胞間接着分子の一つとして機能する事が分かった。

神経細胞と α TC6細胞との間に機能的相互作用が存在するかどうかを検討した。用いた方法は以前の研究で神経細胞とマスト細胞間の機能的相互作用を検討した細胞内カルシウムイメージング法であり、具体的にはこれらの細胞を共培養する事で接着させ、サソリ毒を添加して神経細胞を脱分極させた時の細胞内のカルシウム濃度を、カルシウムと結合する事によって蛍光を発する蛍光色素で検出する。サソリ毒添加直後に神経細胞内のカルシウム濃度が上昇し、それから約20秒後に神経細胞に接着している α TC6細胞内でもカルシウム濃度の上昇を観察できた。神経細胞に接着していない α TC6細胞の場合には同濃度のサソリ毒では同様の変化は認めなかった。以上から、神経細胞と α TC6細胞との間には機能的相互作用が存在する事が分かった。次にこの機能的相互作用にCADM1が関与するかどうかを検討するため、siRNA法を用いてCADM1の発現を低下させた α TC6細胞を樹立した。まず、ウェスタンブロット法にてCADM1の発現がコントロールの細胞と比べて十分に抑制されている事を確認した。この細胞を用いてカルシウムイメージング法を行い、神経細胞に接着する細胞のうちカルシウム濃度の上昇が見られた細胞の割合を応答率として比較した。CADM1発現抑制細胞ではコントロールの細胞と比べて有意に応答率が低下していた。以上の結果より、 α TC6細胞と神経細胞との機能的相互作用にCADM1が関与する事が分かった。

ヒトの膵臓ランゲルハンス島腫瘍21例でCADM1の発現を検討したところ、7例でCADM1陽性、14例でCADM1陰性であった。ランゲルハンス島由来の腫瘍にはホルモンの過剰分泌によって臨床症状を示す機能性腫瘍とホルモンの過剰分泌を示さない非機能性腫瘍がある。CADM1陽性であった7例のうち6例が機能性腫瘍、CADM1陰性であった14例のうち12例が非機能性腫瘍であり、CADM1の発現とホルモンの過剰分泌との間に有意な相関関係を認めた($p = 0.0032$)。

以上の結果から、CADM1は膵臓ランゲルハンス島細胞の新規の細胞間接着分子であり、膵臓ランゲルハンス島細胞と神経線維間の細胞間接着や機能的な相互作用を介在する分子である事が分かった。さらには、CADM1はヒトの膵臓ランゲルハンス島腫瘍の一部で発現し、ホルモン過剰分泌と有意に相関していた。CADM1は膵臓ランゲルハンス島腫瘍のうち機能性腫瘍のホルモン過剰分泌に関与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	乙 第 2072 号	氏 名	狛 雄一朗
論 文 題 目 Title of Dissertation	Cell adhesion molecule 1 is a novel pancreatic-islet cell adhesion molecule that mediates nerve-islet cell interactions Cell adhesion molecule 1 は神経細胞とランゲルハンス島細胞の結合を介在する新規の膵臓ランゲルハンス島細胞接着分子である		
審 査 委 員 Examiner	主 査 林 祥 岡 Chief Examiner 副 査 清 路 進 Vice-examiner 副 査 東 健 Vice-examiner		

(要旨は1, 0 0 0 字～2, 0 0 0 字程度)

Cell adhesion molecule 1 (CADM1)は免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、CADM1 による細胞間接着には、ホモフィリックな細胞間接着と、CADM1 と他の分子の結合によるヘテロフィリックな細胞間接着がある。免疫組織化学では、胎生11 日目の膵臓原基ではすべての細胞でCADM1 が発現していたが、出生後ではランゲルハンス島辺縁部の細胞とランゲルハンス島周囲にある神経線維に強いシグナルが検出された。CADM1 陽性神経線維は、CADM1陽性ランゲルハンス島細胞に近接していた。ウェスタンブロット法とRT-PCR 法によってCADM1 の発現を検討したところ、CADM1 はタンパク質レベルとRNA レベルのいずれにおいてもランゲルハンス島で発現していた。マウス成体の膵臓を用いてCADM1 とホルモン（インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、膵ペプチド）の免疫蛍光二重染色をしたところ、CADM1 発現細胞の大部分はグルカゴン陽性であり、一部ソマトスタチンも陽性であった。以上より、マウスのランゲルハンス島ではCADM1 は主にα細胞、一部D 細胞で発現している事が分かった。ヒトの膵臓ではCADM1 発現細胞はインスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、膵ペプチドのいずれも陽性であった。マウスα細胞由来のグルカゴノーマの細胞株（αTC6 細胞）におけるCADM1の発現を検討したところ、ウェスタンブロット法と免疫蛍光染色のいずれにおいてもCADM1 の発現を確認できた。アグリゲーション法ではαTC6 細胞は凝集塊を形成したが、CADM1 の接着能を阻害する中和抗体を添加すると濃度依存性に凝集能が低下した。以上よりCADM1 はαTC6 細胞同士の細胞間接着に関与する事が分かった。マウス膵臓の免疫組織化学では、ランゲルハンス島とこれに近接する神経線維のいずれもCADM1 を発現していたことから、CADM1 がこれらの細胞間接着に関与する可能性を考えた。これをin vitro で検討するためにマウス上頸神経節から神経細胞を樹立してαTC6 細胞と共培養した。αTC6細胞は神経細胞に接着し、また、これらの細胞の接着面にCADM1 の強いシグナルを検出できた。さらにこの共培養系にCADM1 の接着能を阻害する中和抗体を添加したところ濃度依存性に接着細胞数は減少した。以上よりCADM1 はαTC6 細胞と神経細胞間の細胞間接着分子の一つとして機能する事が分かった。神経細胞とαTC6 細胞との間には機能的相互作用が存在するかどうかを検討した。用いた方法は以前の研究で神経細胞とマスト細胞間の機能的相互作用を検討した細胞内カルシウムイメージング法であり、具体的にはこれらの細胞を共培養する事で接着させ、サソリ毒を添加して神経細胞を脱分極させた時の細胞内のカルシウム濃度を、カルシウムと結合する事によって蛍光を発する蛍光色素で検出する。サソリ毒添加直後に神経細胞内のカルシウム濃度が上昇し、それから約20 秒後に神経細胞に接着しているαTC6 細胞内でもカルシウム濃度の上昇を観察できた。神経細胞に接着していないαTC6 細胞の場合には同濃度のサソリ毒では同様の変化は認めなかった。以上から、神経細胞とαTC6 細胞との間には機能的相互作用が存在する事が分かった。次にこの機能的相互作用にCADM1 が関与するかどうかを検討するため、siRNA 法を用いてCADM1 の発現を低下させたαTC6 細胞を樹立した。まず、ウェスタンブロット法にてCADM1 の発現がコントロールの細胞と比べて十分に抑制されている事を確認した。この細胞を用いてカルシウムイメージング法を行い、神経細胞に接着する細胞のうちカルシウム濃度の上昇が見られた細胞の割合を応答率として比較した。CADM1 発現抑制細胞ではコントロールの細

胞と比べて有意に応答率が低下していた。以上の結果より、 α TC6 細胞と神経細胞との機能的相互作用にCADM1 が関与する事が分かった。ヒトの膵臓ランゲルハンス島腫瘍21 例でCADM1 の発現を検討したところ、CADM1 の発現とホルモンの過剰分泌との間に有意な相関関係を認めた。

本研究は、CADM1 が膵臓ランゲルハンス島細胞の新規の細胞間接着分子であり、膵臓ランゲルハンス島細胞と神経線維間の細胞間接着や機能的な相互作用を介在する分子である事を明らかにした。さらには、CADM1 はヒトの膵臓ランゲルハンス島腫瘍の一部で発現し、ホルモン過剰分泌と有意に相関しており、CADM1 は膵臓ランゲルハンス島腫瘍のうち機能性腫瘍のホルモン過剰分泌に関与している可能性を示唆する貴重な研究であり、重要な知見を得たものとして価値ある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。