

db 遺伝子による肥満糖尿病発症の分子機構の解明

— db 遺伝子負荷が膵β細胞機能に及ぼす影響 —

菅田 有紀子

レプチン受容体異常という遺伝的背景を持つ *db* 遺伝子ホモ接合体 (*db/db*) マウスは、摂食過剰が高度の肥満と代謝異常を示し、膵β細胞機能不全に陥り糖尿病を発症するため肥満2型糖尿病モデルマウスとして汎用されている。*db* 遺伝子ヘテロ接合体 (*db/+*) マウスでは糖尿病は発症しない。肥満糖尿病発症に関連する *db* 遺伝子が膵β細胞機能に及ぼす分子機構を明らかにするため、*db/db*, *db/+*, *+/+* マウスにおける膵β細胞関連遺伝子の発現様式を特異的に解析し、比較検討した。8・12週齢の雄の *db/db*, *db/+*, *+/+* マウスを用いて、体重、空腹時血糖およびインスリン値を測定した。また、Laser Capture Microdissection (LCM) 法にてマウスの膵ラ氏島コア領域を採取し、内分泌、増殖、アポトーシス等における主要遺伝子の発現プロファイルを Sybr Green を用いた Real time RT-PCR により比較解析した。*+/+* マウスを正常コントロールとした。8・12週齢の *db/db* において体重・空腹時血糖・インスリン値は他群より有意に高かった。12週齢の膵インスリン含量は *db/db* マウスで有意に減少しており、*db/+* マウスでは他群と比較して有意な増加を認めた (5.1 ± 3.3 , 58.0 ± 31.7 , 24.4 ± 15.4 ng/islet, respectively, $p < 0.05$)。LCM と Real time RT-PCR 法で得られたインスリン遺伝子発現をみると、8週齢の *db/+* で、insulin II 遺伝子のより顕著な発現を認めたが (*db/+*: 9.57 ± 3.96 , *db/db*: 1.72 ± 0.96 , $p < 0.05$)、12週齢では *db/db* においても *db/+* と同等に増加していた (*db/+*: 7.86 ± 3.56 , *db/db*: 6.97 ± 3.78)。8週齢の *db/db* において、増殖促進関連遺伝子である cyclin E と ERK1 およびアポトーシス促進関連遺伝子である CAD の発現増加を認めるものの、12週齢では増殖促進関連遺伝子の発現は低下し、アポトーシス促進関連遺伝子の発現はさらに増加していた。一方、アポトーシス抑制に働く bcl-2 遺伝子の発現は、他群と比較して *db/+* で有意に増加していた。本研究結果より、*db/db* マウスの糖尿病発症には膵β細胞アポトーシスの亢進と増殖抑制によるβ細胞量の減少が関与することが強く示唆された。また *db* 遺伝子ヘテロ接合体 (*db/+*) マウスにおいてはアポトーシス抑制機構が働くこと、インスリン遺伝子高発現といった糖尿病発症を抑制する代償性機構が存在することが明らかになった。*db/db* マウスにおける代償性機構の消失の分子メカニズムの解明はヒト2型糖尿病における膵β細胞機能不全の機構解明に結びつくものと考えられる。

(平成18年8月30日受理)

Molecular Mechanism of *db* Gene-induced Diabetes Mellitus — Effect of *db* Gene Load on Pancreatic β Cell Specific Gene Expression —

Yukiko KANDA

Background and Aims : The *db* gene is a splicing variant caused by a point mutation of the leptin receptor gene. Diabetes develops in *db* gene homozygous BKS. Cg $-+Lepr^{db}/+Lepr^{db}/Jcl$ (*db/db*) mice and is characterized with a marked obesity, severe insulin resistance, and a limited capacity for insulin secretion. The diabetes phenotype is not demonstrated in heterozygous mice (*db/+*). To clarify the molecular mechanism of pancreatic β cell dysfunction related to the *db* gene, the cell function and gene expression profile of pancreatic islets were analyzed in *db* gene homozygous *db/db*, heterozygous *db/+*, and lean littermates ($+/+$). Laser Capture Microdissection (LCM) and real-time RT-PCR were applied to analyze islet cell specific gene expression.

Materials and Methods : Male *db/db*, *db/+* and $+/+$ were provided free access to standard feed. Body weight (BW), fasted blood glucose (FBG) and insulin (FIRI) were measured at the age of 8 and 12 weeks. To analyze the gene expression profile in β cells, the islet core area was selectively obtained by LCM. Primer pairs encoding genes associated with pancreatic hormones, cell proliferation, cell differentiation, apoptosis, cell cycle, and organization construction were prepared, and a real-time RT-PCR with Sybr Green was applied. Each gene expression was relatively quantified by the comparative Ct method with each result in the $+/+$ mice as a control.

Results : BW, FBG and FIRI in 8 and 12 week-old *db/db* mice increased significantly compared with those in the other groups. At 12 weeks of age, however, insulin content in the islet was markedly reduced in *db/db* mice and had increased significantly in *db/+* mice as compared with $+/+$ mice (5.1 ± 3.3 , 58.0 ± 31.7 , 24.4 ± 15.4 ng/islet, respectively, $p < 0.05$). Insulin II gene expression had significantly increased in *db/+* mice compared with *db/db* mice at 8 weeks of age (*db/+* : 9.57 ± 3.96 , *db/db* : 1.72 ± 0.96 , $p < 0.05$), but did not differ between the two groups at 12 weeks of age (*db/+* : 7.86 ± 3.56 , *db/db* : 6.97 ± 3.78). Gene expression involved in cell proliferation (cyclin E & ERK1) and apoptosis (CAD) was accelerated in 8-week-old *db/db* mice. However, cyclin E & ERK1 gene expression was down-regulated and CAD gene expression was up-regulated at 12 weeks of age. On the other hand, a significant increase in bcl-2 gene expression was observed in *db/+* but not in *db/db* mice.

Conclusion : The present results demonstrated that diabetes development in *db/db* mice was associated with pancreatic β cell dysfunction induced by acceleration of apoptosis and reduction of cell proliferation. The *db* gene heterozygous mice have a protective mechanism against the β cell damage observed in *db* gene homozygous mice. The increases in islet insulin content and gene expression suggest the existence of a compensatory mechanism in *db* gene heterozygous mice to reduce susceptibility to diabetes. (Accepted on August 30, 2006) *Kawasaki Medical Journal* 33(1) : 11-21, 2007

Key Words ① Obese diabetes ② *db* gene ③ *db/db* mice
④ LCM ⑤ β -cell gene expression

はじめに

我が国における糖尿病の大多数を占める2型糖尿病の発症および進展に関わる普遍的病態としてインスリン分泌障害およびインスリン抵抗性があげられる^{1), 2)}。これらの病態の成立には先天的因子としての遺伝的背景と共に食事、環境といった後天的因子の影響が想定されている。2型糖尿病にみられるインスリン分泌障害は、何らかの遺伝子異常に基づく膵β細胞の機能異常が想定されるものの、その分子機構については未だ不明な点が多い。膵β細胞機能をいかに保持するかは、2型糖尿病の長期管理において重要な課題であり、膵β細胞機能障害機構の詳細解明が糖尿病臨床に及ぼす影響は極めて大である。

突然変異系 BKS.Cg-*+Lepr^{db}/+Lepr^{db}*/Jcl マウス（以下 *db/db* マウス）は、レプチン受容体遺伝子889 Lys の下流イントロン内の点変異によるスプライシング異常を認め、レプチンに不応性である。このためホモ接合体マウス (*db/db*) は、生後、摂食行動が抑制されず肥満となり、著明なインスリン抵抗性が惹起され、高インスリン血症、高血糖をきたし、生後3～6ヶ月後には膵ラ氏島のβ細胞が萎縮し、高度のインスリン分泌不全に陥る^{3)–6)}。

遺伝的支配に加えて過食という後天的因子により発症する *db/db* マウスは、ヒト肥満2型糖尿病モデルとして広範に実験使用されている。ヘテロ接合体マウス (*db/+*) は、糖尿病発症には至らない。一方、遺伝的背景が近い *ob/ob* マウスは *db/db* 同様摂食過剰により高度の肥満をきたすものの、インスリンの代償的分泌により糖尿病の発症には至らない。*db/db* マウスのインスリン分泌不全に至る機序については、膵β細胞機能を制御する何らかの遺伝的支配を示唆する報告⁷⁾がみられるが、糖毒性および脂肪毒性の関与の可能性⁸⁾も含めて、解明されるべき点が多い。

膵β細胞機能の分子機構を解明するには、膵

ラ氏島あるいはβ細胞での遺伝子発現を選択的に解析せねばならず、しばしば単離膵ラ氏島やマウスのインスリノーマ由来細胞株である MIN6 細胞⁹⁾が用いられてきた。しかし単離膵ラ氏島では採取過程で修飾が加わることから、得られた結果の信頼性が問われかねない¹⁰⁾。MIN6 はインスリン分泌反応がみられることから、膵β細胞の代用として頻繁に使用されているが、何よりも腫瘍由来であること、β細胞以外の細胞に特異的な遺伝子発現をも認めるとの報告¹¹⁾もあることから、その応用には限界がある。これらの問題点を解消するため、我々は、Laser Capture Microdissection (LCM) 法に注目し、膵ラ氏島のコア領域を用いて、膵β細胞の遺伝子発現を選択的に解析することが可能であることを確認した。

本研究の目的は、マウスの肥満糖尿病を引き起こす *db* 遺伝子負荷が膵β細胞機能に及ぼす分子機構を明らかにすることである。そのため *db* 遺伝子ホモ接合体 *db/db*、ヘテロ接合体 *db/+*、正常コントロール *+/+* マウスから LCM 法により得られた膵ラ氏島を用いて、膵β細胞の遺伝子発現様式の比較検討を試みた。

材料および方法

使用動物

6週齢、雄のホモ接合体 (*db/db*)、ヘテロ接合体 (*db/+*)、正常コントロール (*+/+*) マウスを日本クレア（東京）より購入した。飼育は一般飼料（MF オリエンタル酵母、東京）と飲料水を自由に摂取させ、室温25℃下で行った。本実験は川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け（No. 05-086）、川崎医科大学動物実験指針に基づき実施した。

生化学マーカーの測定

8週齢より2週ごとに体重測定とともにマウスの尾部から血液を採取した。直ちに血糖値測定後、血漿分離し、インスリン濃度の測定まで-80℃で保存した。血糖は Free Style®（キッセイ薬品工業、長野市）を用いて酵素電極法に

より測定した。インスリン値はインスリン測定キット(森永生科学研究所, 横浜市)を用いてELISA法にて測定した。

膵ラ氏島採取とインスリン含量測定

膵ラ氏島の単離にはKitamuraらの方法¹²⁾に準じてコラゲナーゼ消化法を用いた。1.5 mg/ml コラゲナーゼ(collagenase P, Roche, Swiss)と10% NCSを含むHBSS(Hanks' balanced salt solution: 137 mM NaCl, 5.36 mM KCl, 0.44 mM KH_2PO_4 , 5.55 mM Glucose, 0.03 mM Phenol Red, 0.34 mM Na_2HPO_4 , 0.27 mM MgSO_4 , 1.26 mM CaCl_2 , 5.83 mM NaHCO_3)を, ペントバルビタール(0.05 mg/g)にて腹腔内麻酔を行ったマウスの胆管に, 27 Gの注射器で3 ccを注入し, 膵管へ逆流させた。コラゲナーゼ注入によって膨張した膵臓を採取し, 50 ml コニカルチューブに移し, 37°C, 19分間継続的に振とうした。HBSS 30 mlを加えて遠心(1100 rpm, 2分間)を3度繰り返し, 最後のペレットに10 mlのHBSSを添加して金属製フィルターに通した。そして, Histopaque-1077(sigma, St. Louis, MO, USA)を用いて遠心(2500 rpm, 22分間)し, 内分泌組織と外分泌組織を分離した。中間層を採取し, HBSSを30 ml入れて遠心(1100 rpm, 2分間)する操作を3度繰り返した。最後に残った膵ラ氏島をシャーレに移し実体顕微鏡下で, ピペットを用いてラ氏島を採取した。インスリン含量測定までは, -80°Cにて凍結保存しておき, インスリン含量測定は, 膵ラ氏島を酸エタノールで溶解し, 前述したELISA法にて測定した。

膵ラ氏島の組織学的検討

8週齢および12週齢に, ペントバルビタール(0.05 mg/g)にてマウスの腹腔内麻酔を行い, 膵臓を摘出し, ホルマリン固定・パラフィン包埋した後, 4 μm の薄切スライド標本作製した。一般染色としてhematoxylin-eosin(HE)染色を行い, 抗膵ホルモン2種混合抗体(グルカゴン, ソマトスタチン)による免疫染色を行った。

免疫染色は酵素抗体法に従って行った。まず

膵パラフィン切片をLemosol R(和光純薬工業, 大阪市), エタノールにて脱パラ後, 内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックするため, 3%過酸化水素加メタノールに15分間浸した。PBS(10 mM phosphate buffer saline, pH 7.4)で洗浄後, 1次抗体として抗膵ホルモン2種混合抗体(ウサギ抗グルカゴン抗体: ウサギ抗ソマトスタチン=1:1, いずれもニチレイ社, 東京)による免疫染色を行った。25°Cにて20分間インキュベーションした。PBSにて洗浄後, シンブルステインMAX-PO®(ニチレイ社)を添加し, 25°Cにて30分間反応させた。PBSにて洗浄後, シンブルステインDAB溶液(ニチレイ社)を添加し, 25°Cにて7分間反応させ, 発色させた。対比染色はhematoxylinにて行った。

LCM法

ペントバルビタール(0.05 mg/g)にてマウスの腹腔内麻酔を行い, 膵臓を採取後, OCTコンパウンドに入れ凍結保存し, 凍結切片をクライオスタットで8 μm にスライスし, スライドガラスに張り付けた。スライスしたスライドは, 一部は直ちに染色しLCMを行ったが, 残りのものは染色まで-80°Cにて凍結保存した。スライドを70%エタノール, DEPC処理水にそれぞれ30秒間浸した後, ヘマトキシリンで数秒間染色した。さらにDEPC処理水, 70%, 95%, 100%エタノールに各30秒間浸した後, キシレンに5分間浸した。組織染色を行った後, PixCell system(Arcturus, Mountain View Ca. USA)を用いて, 組織切片内のラ氏島にレーザーを照射し, 専用転写フィルムに採取した。最初に周辺領域を30 μm とり, コア領域を採取した(Fig. 1)。

RNA抽出とReversed transcription

RNA抽出にはPicoPure RNA Isolation Kit(Arcturus PN 12206-01)を使用した。DNase処理を追加し, ゲノムDNAのコンタミネーションを回避した。Reversed transcriptionにはTaqMan Reverse Transcription Reagents(AB N808-0234)を使用し, cDNA合成のためのプライマーにはRandom Hexamersを用いた。

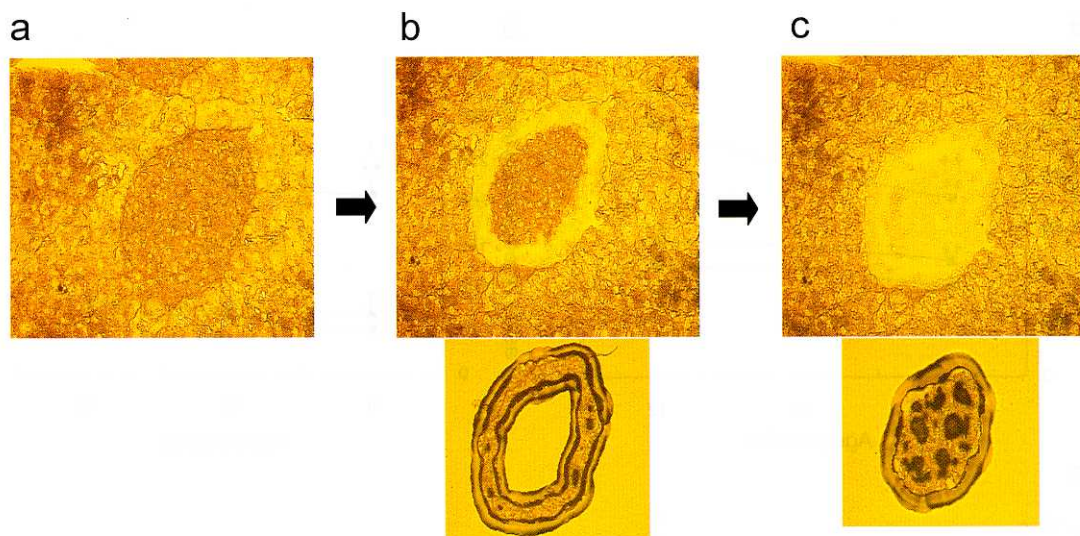


Fig. 1. Laser capture microdissection (LCM) 法による膵ラ氏島組織採取の手順.

(a)染色直後の膵ラ氏島, (b)採取した周辺領域と膵ラ氏島, (c)採取したコア領域と膵ラ氏島

Real time-PCR 法

Sybr Green による Real time-PCR 法を用いた. Primer は GenBank の nucleotides から download した mRNA sequence に基づき Primer Express で設計し, blast を用いてプライマーの相同性について確認した. 増殖, 細胞周期, 分化, 内分泌, 外分泌, アポトーシス等に関する primer を使用し遺伝子発現プロファイルの解析を行った.

サンプル量 0.5 ml, primer 溶液を $1 \mu\text{l}$, Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 希釈水の混液を $9 \mu\text{l}$ いれて最終 $10 \mu\text{l}$ の反応液を作成した. ABI PRISM 7700 で 55 cycle の Real time-PCR を行った. PCR 条件は 50°C 2 分, 95°C 10 分, 95°C 15 秒, 60°C 1 分とした. 全ての実験において Dissociation curve 分析を行い解離温度, アガロースゲル電気泳動で PCR products の確認を行った.

遺伝子発現量の定量化のため, 内部コントロールとして 18S rRNA を用い, $2^{-\Delta\text{CT}}$ を計算した. $+/+$ マウスを正常コントロールとして比較定量化した.

解 析

全てのデータは平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SEM) で記した. 多群間の比較は Mann-Whitney U test を用い, $p < 0.05$ を有意差ありとした. 統計検定には StatView- ver. 5 (SAS, NC, USA) を使用した.

結 果

生化学パラメータの変化

体重は, *db/db* マウスにおいて 8 週齢より *db/+*, $+/+$ と比較して有意に増加していた (*db/db*; $35.2 \pm 0.3 \text{ g}$ vs *db/+*; $23.2 \pm 0.4 \text{ g}$, $p < 0.0001$, vs $+/+$; $17.8 \pm 0.3 \text{ g}$, $p < 0.0001$) (Fig. 2). 8 週齢の空腹時血糖値は, *db/db* マウスで $207.6 \pm 22.2 \text{ mg/dl}$, *db/+* マウスで $71.8 \pm 6.7 \text{ mg/dl}$ ($p < 0.05$), $+/+$ マウスで $50.2 \pm 3.3 \text{ mg/dl}$ ($p < 0.0001$) と *db/db* マウスでは他群と比べて有意に高かった. また, 空腹時インスリン値も, *db/db* マウスで $4.5 \pm 1.7 \text{ ng/ml}$, *db/+* マウスで $0.6 \pm 0.1 \text{ ng/ml}$ ($p < 0.05$), $+/+$ マウスで $0.2 \pm 0.1 \text{ ng/ml}$ ($p < 0.05$) と空腹

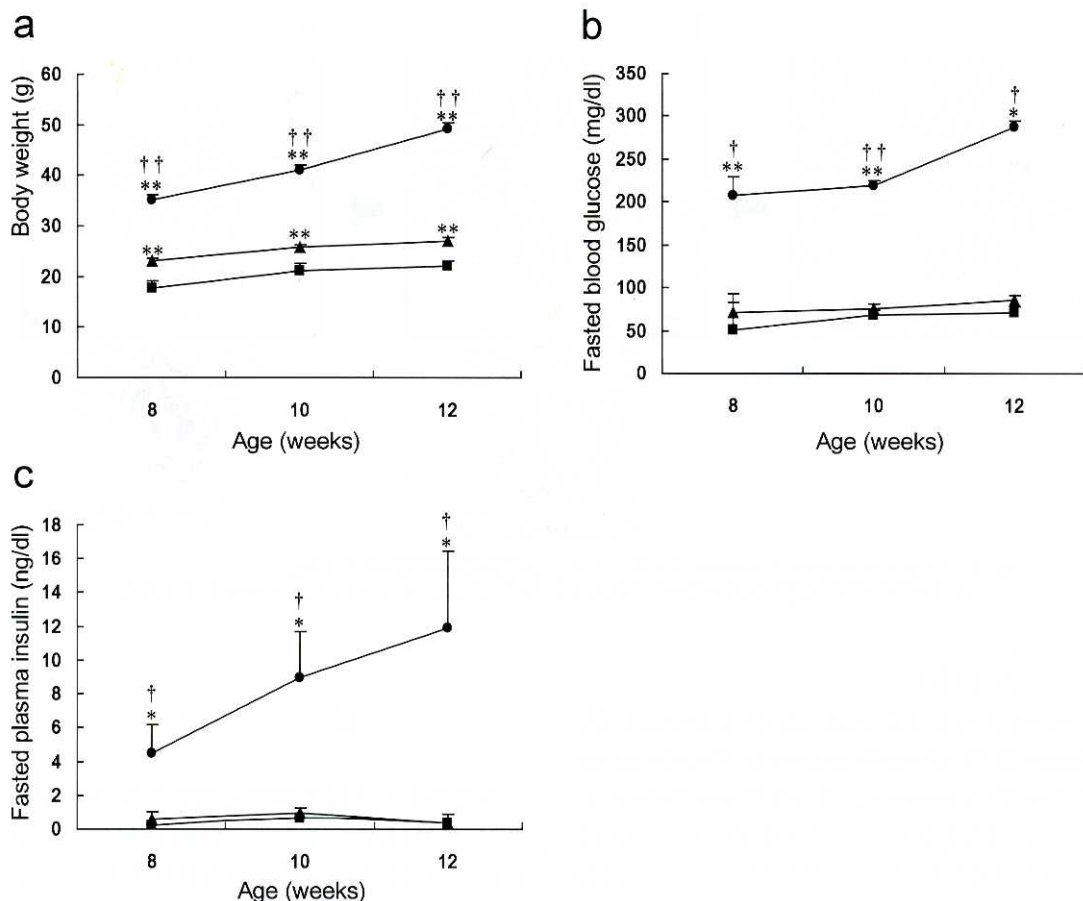


Fig. 2. 生化学パラメータの変化

(a)体重の比較. (b)空腹時血糖値の比較 (c)空腹時血中インスリン値の比較

+/+マウス (■), db/+マウス (▲), db/dbマウス (●)

平均±標準誤差 (n=5). *: $p < 0.05$ vs +/+マウス, **: $p < 0.0001$ vs +/+マウス (各週齢)

†: $p < 0.05$ vs db/+マウス, ††: $p < 0.0001$ vs db/+マウス

時血糖と同様に有意差を認めた. これらパラメータの差異は12週齢においても, 同様の傾向にあった. 12週齢の膵ラ氏島インスリン含量は, db/dbマウスで明らかな低下を認め, db/+マウスでは+/+マウスと比べて有意な増加を認めた (各々 5.1 ± 3.3 , 58.0 ± 31.7 , 24.4 ± 15.4 ng/islet, $p < 0.05$) (Fig. 3).

膵ラ氏島の組織学的変化

8週齢のdb/dbマウスの膵ラ氏島は+/+およびdb/+マウスと比較して, 全般的に肥大し, 類円形から楕円形まで様々な形態を呈するとともに, 構成細胞の配列の乱れと繊維成分の増加がうかがわれた. 免疫組織学的解析のためグル

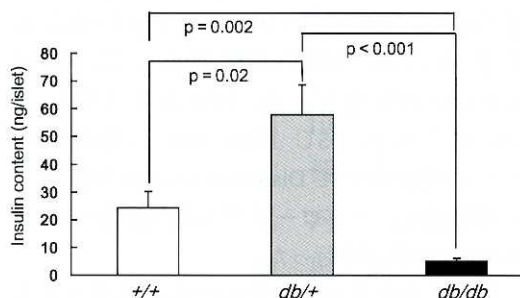


Fig. 3. +/+, db/+, db/dbマウス (いずれも12週齢) の膵ラ氏島インスリン含量.

カゴンおよびソマトスタチンの2重染色を行ったところ, db/dbマウスでは周辺領域だけでなく, コア領域も染色され, 膵ラ氏島組織の構築

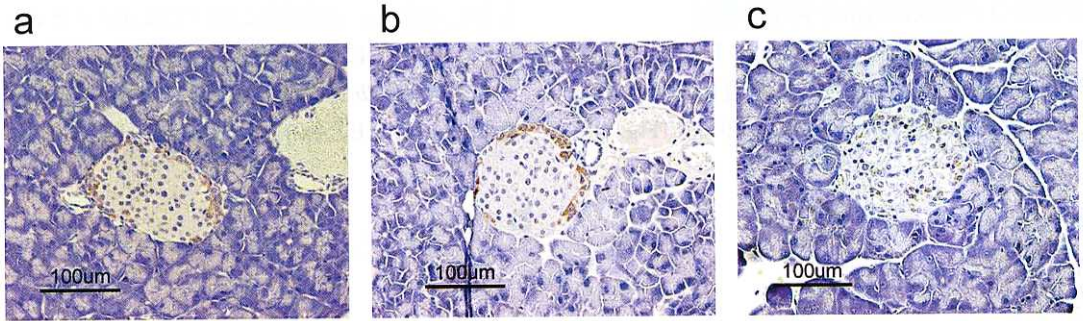


Fig. 4. 膵ラ氏島組織像の比較

膵ラ氏島抗グルカゴン・ソマトスタチン抗体による2重免疫染色組織像(×200)を示した。
(a) +/+マウス, (b) *db*/+マウス, (c) *db*/*db* マウス (いずれも8週齢)

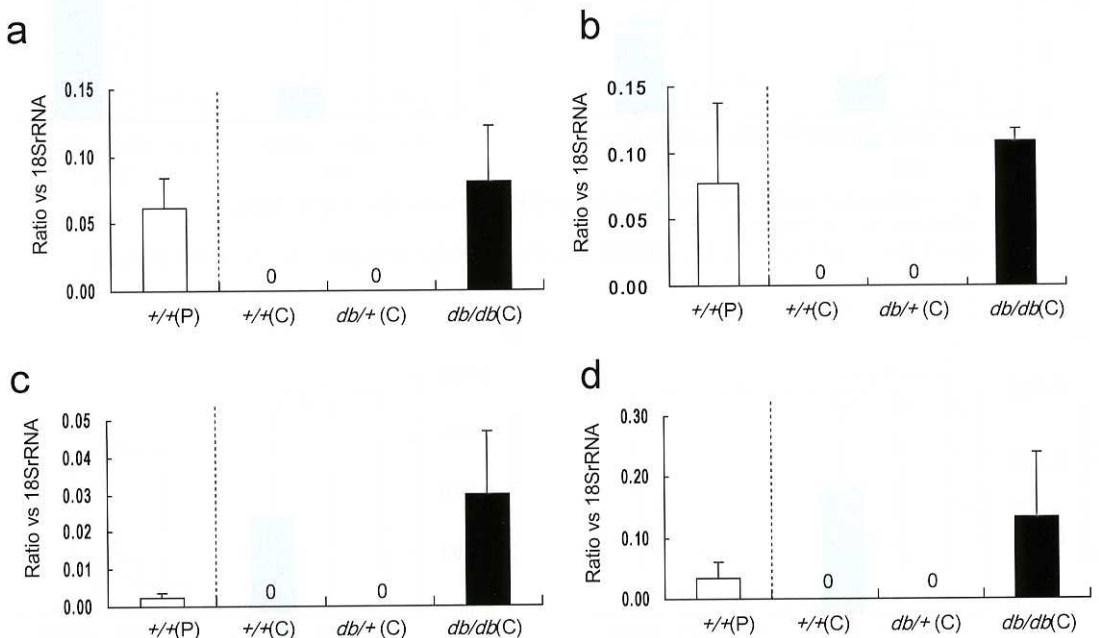


Fig. 5. 8週齢マウスの膵ラ氏島コア領域と周辺領域の遺伝子発現の相違

(a) Glucagon, (b) Somatostatin, (c) Pancreatic Polypeptide (PP), (d) metabotropic glutamate receptor4 (mGluR4),
C: 膵ラ氏島コア領域, P: 膵ラ氏島周辺領域
データは平均±標準誤差 (n = 5)

の破壊を認めた (Fig. 4).

膵ラ氏島コア領域および周辺領域における遺伝子発現の比較

正常の膵ラ氏島ではコア領域にβ細胞が、周辺領域にはα細胞、δ細胞が分布している。8週齢の+/+マウスにおいて、周辺部のみグルカゴン・ソマトスタチン・pancreatic polypeptide (PP) や metabotropic glutamate receptor4 (mGluR4) が発現し、コア領域にはそれらの遺

伝子の発現を認めなかった。このことより、LCM法によって得られたラ氏島コア領域にはほぼβ細胞のみが含まれることが判明した (Fig. 5)。しかし、*db/db* マウスにおいてはグルカゴン・ソマトスタチン・PPや mGluR4 の遺伝子発現がコア領域にも認められ、8週齢ですでに組織構築の乱れを認めた。12週齢でも同様の結果であった。以上より、前述の免疫組織学的所見を支持する結果が得られた。

ラ氏島コア領域の遺伝子発現の検討

8 週齢 *db/+* マウスの insulin II 遺伝子発現は, *db/db* マウスと比較して有意に増加していた (9.57 ± 3.96 と 1.72 ± 0.64 , $p < 0.05$) (Fig. 6).

しかしながら, 12 週齢においては *db/+* と *db/db* マウスの間には, 有意差を認めなかった。

8 週齢 *db/db* マウスにおいて, 増殖促進に関連する cyclin E, extracellular signal-regulated

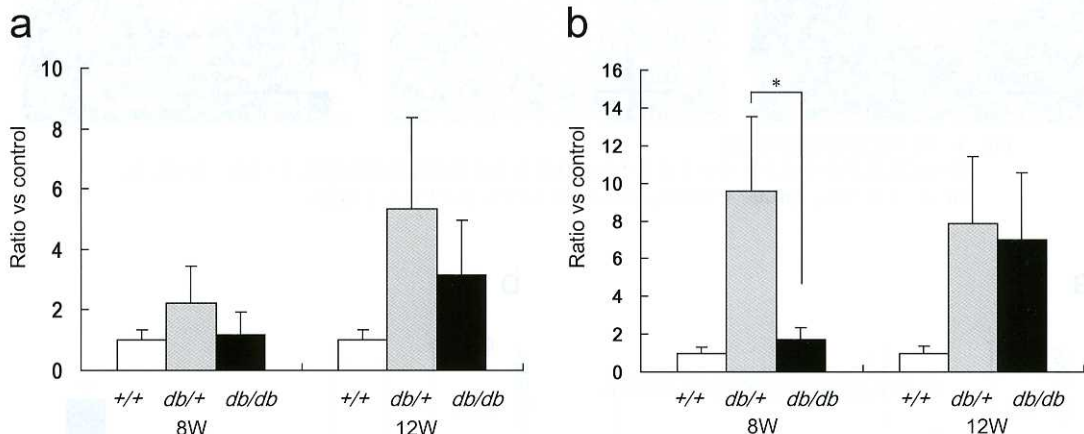


Fig. 6. 8 週齢および12週齢マウスの膵ラ氏島コア領域のホルモン遺伝子発現の比較.

(a) Insulin I, (b) Insulin II

データは *+/+* マウスを 1 として相対量を示している. 平均 \pm 標準誤差 ($n = 5$). *: $p < 0.05$

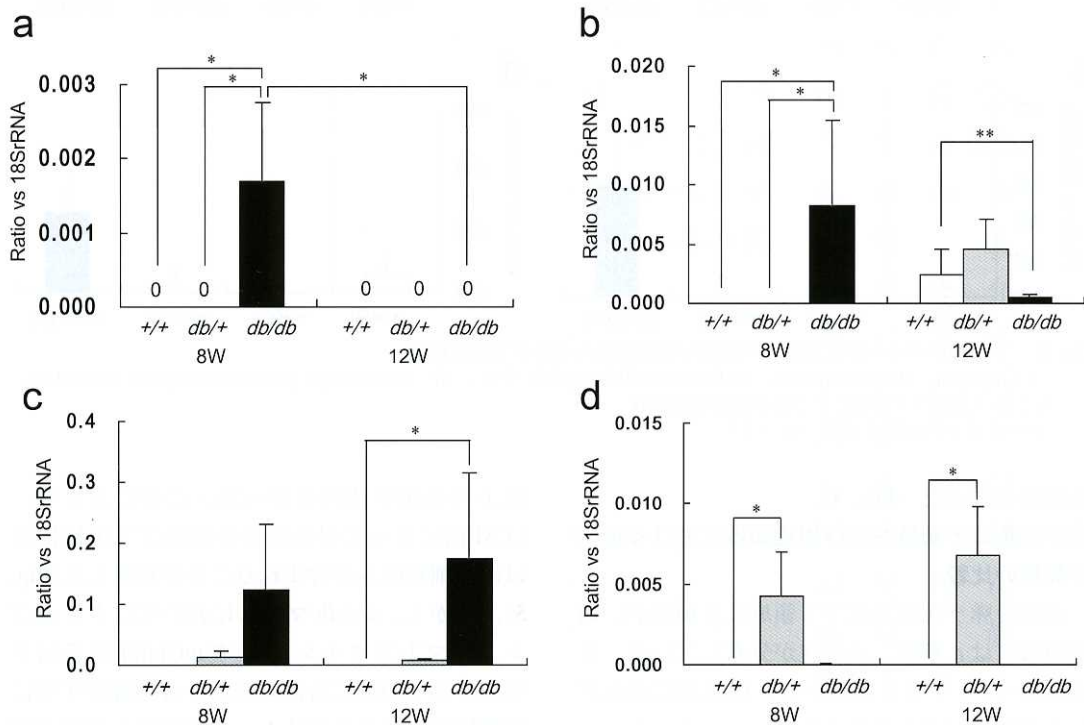


Fig. 7. 8 週齢および12週齢マウスの膵ラ氏島コア領域の増殖およびアポトーシス関連遺伝子発現の比較.

(a) Cyclin E, (b) extracellular signal-regulated kinase 1 : ERK1, (c) caspase-activated DNase : CAD, (d) Bcl-2
平均 \pm 標準誤差 ($n = 5$), *: $p < 0.05$, **: $p < 0.005$

kinase 1 (ERK1) 遺伝子やアポトーシスを促進する caspase-activated DNase (CAD) 遺伝子の発現が他群のマウスより有意に亢進していた (Fig. 7). しかし, 12週齢では cyclin E, ERK1 の遺伝子発現は有意に低下し, CAD 遺伝子の発現は増加していた. 一方, *db/+* マウスにおいてアポトーシスを抑制する *bcl-2* 遺伝子の発現が, 有意に増加していた.

考 察

db/db マウスは過食による肥満とインスリン過剰分泌がインスリン抵抗性の増大を招き, ついにはインスリン分泌不全に陥るという経過をたどることから, 肥満を伴うヒト 2 型糖尿病モデルとして広く用いられている. 生後 4~5 週齢頃より肥満が始まり, その摂餌量は *db/+* マウスの 1.5~1.8 倍量に達する (日本クレア社の社内資料より). 耐糖能の低下により血糖値は上昇し, 尿糖陽性率は生後 10 週齢以降には, ほぼ 100% に達する. 本研究では, 肥満糖尿病発症に関連する *db* 遺伝子が膵 β 細胞に及ぼす分子機構を明らかにするため, 血糖が上昇し始める 8 週齢および糖尿病が発症している 12 週齢のマウスを用いて, 生化学パラメータおよび膵 β 細胞の遺伝子発現様式を解析した.

膵 β 細胞の機能解析には, 従来 MIN6 細胞や単離膵ラ氏島が用いられていたが, MIN6 は純粋な β 細胞ではなく, α 細胞, δ 細胞も存在するとの報告が散見される¹¹⁾. また, 単離膵ラ氏島では β 細胞に特異的な解析はできないこと, コラゲナーゼ処理をして単離するため採取過程でアポトーシスが進んでいること¹²⁾などが問題となる. これら従来の手法の難点を克服するため, 本研究では, 膵 β 細胞機能不全進展の分子機構解明のために, LCM 法と RT-PCR 法を組み合わせ, β 細胞特異的に遺伝子発現解析する方法を確立した. LCM を用いた遺伝子解析法は 1999 年ごろより行なわれており^{13), 14)}, 膵ラ氏島での解析については, これまでに幾つかの報告^{15) 16)}がある. Laybutt らはラットを用

いて, ラ氏島のコア領域のみを採取している¹⁵⁾. マウスを用いる本研究では, β 細胞を特異的に解析できる方法として, 非 β 細胞の混入を防ぐために, まず周辺領域を最初にとり, 次いでコア領域を採取する 2 段階の手順をふんだ. 我々の手法の妥当性は, 正常 (+/+) マウスの遺伝子発現解析により確認できた. Katsuta らは膵ラ氏島全体を採取し microarray による解析を行なったものであり, β 細胞特異的な遺伝子解析ではない¹⁶⁾. 遺伝子プロファイル解析には 1 万以上の遺伝子プロファイリングが行える microarray 法¹⁷⁾⁻¹⁹⁾の応用が普及してきている. しかし遺伝子の同定と定量のためには Real time-PCR が同時に要求される. 従って, ある程度ターゲットとなる遺伝子群が明確な実験では, 本法のように既知の遺伝子の発現プロファイリングがより実用的である.

我々は既に *db/db* マウスの膵 β 細胞機能不全の形成過程について, 膵ラ氏島の形態学的, 生化学的解析を行い, β 細胞の質的, 量的変化を明らかにしている⁸⁾. 本研究において *db/db* マウスでは, 8 週齢ですでに膵 β 細胞のアポトーシス亢進がみられ, 12 週齢では細胞増殖能の低下がみられることが関連遺伝子の発現解析により明らかとなり, 膵 β 細胞量の調節機構を分子レベルで解明できた. すなわち増殖に関与する MAPK (mitogen-activated protein kinase) カスケードに含まれる ERK1 遺伝子, 細胞周期に関与する遺伝子の中で DNA 複製を開始する S 期の開始に発現する cyclin E 遺伝子の発現は, 8 週齢では *db/+* や *+/+* マウスと比較して有意に高いものの, 12 週齢では低下していた. 一方, アポトーシスに関与する caspase3 の下流にある CAD 遺伝子発現は, 週齢を追うごとに増加していた. 8 週齢では, 血糖上昇に対して膵 β 細胞量を増加させようとする代償機構が働くが, 12 週齢ではその代償機構は破綻し, アポトーシスの亢進は進むものと解釈できる. *db/db* マウスでは *db/+* マウスと比べ, ラ氏島細胞量が増加しているとの報告²⁰⁾があるが, 本研究の結果は, その機序を分子レベルで解明したも

のといえよう。血糖値、血中インスリン値、膵ラ氏島インスリン含量、インスリン遺伝子発現量の変動は、*db/db* マウスにおける膵β細胞機能不全の進展過程を支持するものであった。

一方、血糖値、血中インスリン値が正常である *db* 遺伝子ヘテロ接合体 (*db/+*) マウスの膵ラ氏島インスリン含量およびインスリン遺伝子発現は増加していた。また、アポトーシスを抑制する *bcl-2* 遺伝子発現が *db/db*, *+/+* マウスに比し、有意に増加していた。これらの成績は、*db/+* マウスでは膵β細胞のアポトーシスを抑制し、代償的にインスリン遺伝子発現を増加させることによって糖尿病の発症を抑制する機構が存在することを強く示唆しており、極めて興味深い。一方、*db/db* マウスでは代償機構が機能しないために、膵β細胞機能不全が進展し、糖尿病の発症に至るものと考えられた。代償機構の破綻に関わる機構の解明は今後の課題である。

ま と め

糖尿病の大多数を占める2型糖尿病の発症抑制あるいは病態進展抑制をはかることは、今後

の糖尿病の臨床における大きな目標である。その目標達成には膵β細胞機能不全をいかに抑制し、機能保持を行うかが極めて重要な課題となる。*db/db* マウスにおける代償機構消失の過程を分子レベルで明らかにした本研究の成果は、肥満を伴うヒト2型糖尿病における膵β細胞機能不全の機構解明に結びつくものであり、糖尿病の臨床に多大な貢献を果たすものである。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導、御高閲を賜りました川崎医科大学内科学(内分泌・糖尿病)教室 加来浩平教授に深甚なる謝意を表します。また本研究に当たり御協力、御助言を頂いた中島弘二博士、各教室員および技術員の皆様に厚くお礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は第48回日本糖尿病学会(2005年、神戸)、第49回日本糖尿病学会(2006年、東京)、41st annual meeting of European Association for the Study of Diabetes (2005. 9. 13, Athens) において発表した。

文 献

- 1) DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E: Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care* 15: 318-368, 1992
- 2) Taylor SI, Accili D, Imai Y: Insulin resistance or insulin deficiency. Which is the primary cause of NIDDM? *Diabetes* 43: 735-740, 1994
- 3) Hummel KP, Dickie MM, Coleman DL: Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science* 153: 1127-1128, 1966
- 4) Coleman DL: Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia* 14: 141-148, 1978
- 5) Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JJ, Friedman JM: Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379: 632-635, 1996
- 6) Orland MJ, Permutt MA: Quantitative analysis of pancreatic proinsulin mRNA in genetically diabetic (*db/db*) mice. *Diabetes* 36: 341-347, 1987
- 7) Kaku K, Province M, Permutt MA: Genetic analysis of obesity-induced diabetes associated with a limited capacity to synthesize insulin in C57BL/KS mice: evidence for polygenic control. *Diabetologia* 32: 636-643, 1989
- 8) Kawasaki F, Matsuda M, Kanda Y, Inoue H, Kaku K: Structural and functional analysis of pancreatic islets preserved by pioglitazone in *db/db* mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E510-518, 2005

- 9) Miyazaki J, Araki K, Yamato E, Ikegami H, Asano T, Shibasaki Y, Oka Y, Yamamura K : Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion : special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology* 127 : 126 – 132, 1990
- 10) Bottino R, Balamurugan AN, Tse H, Thirunavukkarasu C, Ge X, Profozich J, Milton M, Ziegenfuss A, Trucco M, Piganelli JD : Response of human islets to isolation stress and the effect of antioxidant treatment. *Diabetes* 53 : 2559 – 2568, 2004
- 11) Miyazaki S, Yamato E, Miyazaki J : Regulated expression of pdx-1 promotes in vitro differentiation of insulin-producing cells from embryonic stem cells. *Diabetes* 53 : 1030 – 1037, 2004
- 12) Kitamura T, Kido Y, Nef S, Merenmies J, Parada LF, Accili D : Preserved pancreatic beta-cell development and function in mice lacking the insulin receptor-related receptor. *Mol Cell Biol* 21 : 5624 – 5630, 2001
- 13) Fend F, Emmert-Buck MR, Chuaqui R, Cole K, Lee J, Liotta LA, Raffeld M : Immuno-LCM : laser capture microdissection of immunostained frozen sections for mRNA analysis. *Am J Pathol* 154 : 61 – 66, 1999
- 14) Goldsworthy SM, Stockton PS, Trempus CS, Foley JF, Maronpot RR : Effects of fixation on RNA extraction and amplification from laser capture microdissected tissue. *Mol Carcinog* 25 : 86 – 91, 1999
- 15) Laybutt DR, Sharma A, Sgroi DC, Gaudet J, Bonner-Weir S, Weir GC : Genetic regulation of metabolic pathways in beta-cells disrupted by hyperglycemia. *J Biol Chem* 277 : 10912 – 10921, 2002
- 16) Katsuta H, Koyanagi-Katsuta R, Shiiba M, Anzai K, Irie T, Aida T, Akehi Y, Nakano M, Yasunami Y, Harada M, Nagafuchi S, Ono J, Tachikawa T : cDNA microarray analysis after laser microdissection in proliferating islets of partially pancreatectomized mice. *Med Mol Morphol* 38 : 30 – 35, 2005
- 17) Maitra A, Hansel DE, Argani P, Ashfaq R, Rahman A, Naji A, Deng S, Geradts J, Hawthorne L, House MG, Yeo CJ : Global expression analysis of well-differentiated pancreatic endocrine neoplasms using oligonucleotide microarrays. *Clin Cancer Res* 9 : 5988 – 5995, 2003
- 18) Parton LE, Diraison F, Neill SE, Ghosh SK, Rubino MA, Bisi JE, Briscoe CP, Rutter GA : Impact of PPARgamma overexpression and activation on pancreatic islet gene expression profile analyzed with oligonucleotide microarrays. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287 : E390 – 404, 2004
- 19) Wang H, Horikawa Y, Jin L, Narita T, Yamada S, Shihara N, Tatemoto K, Muramatsu M, Mune T, Takeda J : Gene expression profile in rat pancreatic islet and RINm5F cells. *J Mol Endocrinol* 35 : 1 – 12, 2005
- 20) 川崎史子 : 薬剤介入による肥満糖尿病マウス膵 β 細胞機能障害の抑制効果 – Diazoxide と Pioglitazone の作用および作用機序の比較検討 – . 川崎医学会誌 29 : 115 – 130, 2003