

妊娠時の膵 β 細胞容積増加のメカニズムの研究

順天堂大学大学院 医学研究科 代謝内分泌内科学
綿田 裕孝

1. はじめに

糖尿病は1型糖尿病、2型糖尿病、その他特定の機序、疾患によるもの、妊娠糖尿病に分類される。日本での糖尿病患者の95%は2型糖尿病に罹患していることが知られている。2型糖尿病は、インスリン分泌異常やインスリン抵抗性といった遺伝的異常と食生活の欧米化、運動不足、ストレスなどの様々な要因により発症することが知られている。本来、膵 β 細胞にはインスリン抵抗性に対し、細胞機能および細胞容積量を増加させることにより、インスリン分泌量を増加させ、結果として血糖値を正常に保つ機構が備わっている。その機構が何らかの原因により破綻した場合、2型糖尿病の発症につながることが知られている。妊娠もまたインスリン抵抗性が引き起こされるモデルである。妊娠は、ヒトでは約10ヶ月、げっ歯類動物では約20日という短期ではあるが、胎児の生育に伴い、母体のホルモンが変化する。胎盤ホルモンであるプロラクチン(PRL)や胎盤性ラクトゲン(PL)の成長ホルモン様作用により脂肪分解が促進され、血中遊離脂肪酸が増加し、インスリン抵抗性の増加が起こる。このインスリン抵抗性の増大は、胎児へ週齢を増すごとに需要の高まるグルコースを供給する上で合目的な生理的变化であると同時に母体のインスリン分泌量を増加させ、母体の血糖値を一定に保つ機構が働くことが知られている。この機構が破綻した場合には、妊娠糖尿病が発症すると考えられる。この母体のインスリン分泌量を増加は、*in vivo*の検討で膵 β 細胞容積量が劇的に増加していることが既に知られている。このような妊娠期に膵 β 細胞容積量の劇的な変化を遂げるメカニズムについて注目が集まり、様々な検討が行われてきた。主な細胞増殖に関与するシグナルとして、PRLやPLがPRL受容体に結合することにより、Jak2-Stat5経路が活性化し、cyclinなどの細胞増殖因子の転写を増加させる事が報告されている(Sorenson, R. L. et al. *Horm Metab Res* 29, 301-7, 1997)。さらに、その下流の因子として、癌抑制遺伝子であるMenin(Karnik SK et al. *Science* 318(5851):806-9, 2007)やアポトーシスに関与する遺伝子Bcl-XL(Fujinaka Y. et al. *J Biol Chem* 282(42):30707-17, 2007)の関与が示唆されていたが、再現性に乏しく、更なる網羅的解析が必要であった。そこで、我々は妊娠期に膵 β 細胞増殖を引き起こす因子を詳細に解明

するための検討を行った。まず、マウス妊娠期における母体の膵 β 細胞容積量が最大になる時期の特定を行い、その時期は妊娠 16.5 日目であることを確認した。その上で、膵島の細胞増殖が最も活発になる時期の特定を行い、その時期は妊娠 12.5 日目であることを明らかにした。そこで妊娠 12.5 日目のマウスと非妊娠マウスの膵島を単離し、細胞増殖期に変化している遺伝子の網羅的解析をマイクロアレイを用いて比較検討した。その結果、妊娠期の膵島では、2 倍以上に発現が増加している因子が 54 個あり、約半分以下に発現が減少している因子が 7 個あることが明らかとなった。その中で注目したのが、セロトニン合成の律速酵素である Tryptophan Hydroxylase1 (Tph1) とその isoform である Tph2 である。その変化率は Tph1 が約 700 倍、Tph2 が約 12 倍であった。その発現増加から、膵島内でのセロトニン合成が示唆されたため、妊娠期の母体マウス膵組織をセロトニン抗体を用いて染色したところ、膵島内でセロトニンが合成されていることが明らかとなり、セロトニン合成が行われている細胞の大半が膵 β 細胞であることがわかった。さらに、ヒト妊娠期においても膵島内でセロトニンが合成されていることが組織染色により確認された (Kim H, Toyofuku Y, et al., Nat Med. 2010 16(7):804)。そして、単離培養膵島への刺激実験において、セロトニンが細胞周期に関連する遺伝子の発現増加や細胞増殖抑制因子 p21^{cip1} の減少を介して、細胞増殖作用を持つことが明らかにされた。

合成されたセロトニンがどのように膵 β 細胞増殖を引き起こすであろうか。セロトニン (serotonin, 5-hydroxytryptamine, 5-HT) の受容体は 14 種類あり (表 1)、それらの細胞内シグナルには様々なパターンがあると考えられている。セロトニン受容体は 5-HT₃ 受容体ファミリーはイオンチャネル型の受容体であるが、他は全て G タンパク共役型受容体に分類される。その中で、先に報告した 5-HT_{2b} 受容体は、直接的に細胞増殖に関係する G_q タンパクに結合する受容体である。セロトニン受容体の中で G_q タンパクに結合するのは 5-HT₂ 受容体ファミリーがある。他のセロトニン受容体には、アデニル酸シクラーゼを活性化させる G_s タンパクに結合するものと、抑制する G_i タンパクに結合するものに分けられる。G_i タンパク結合するセロトニン受容体の中で 5-HT_{1b} 受容体は SERT と関係して、ERK1/2 を活性化させ、肺高血圧症の発症の際の肺動脈血管平滑筋細胞の増殖に関与することが報告されている。また、マイクロアレイで変化していた因子にも細胞増殖に関与しているシグナルが存在していることも考えられる。非常に興味深いことに、我々の検討では、非妊娠時と妊娠 12.5 日目の比較において 5HT_{1b} および 5-HT_{2b} 受容体の遺伝子発現が増加していた。既に 5-HT_{2b} 受容体に関してはノックアウトマウスが入手可能であったため、解析を先行し、妊娠期

の膵β細胞増殖における重要な役割を報告した(Kim H, Toyofuku Y, et al., Nat Med. 2010 16(7):804)。

本研究では、そのような背景をもとに妊娠期なぜ、膵β細胞において Tph1 発現が増加するのかに関して検討をおこなった。

2. 方法

Tph 遺伝子のプロモーター領域を同定し、その DNAfragment を用いて、レポーター遺伝子を作成。その遺伝子を膵β細胞株 MIN6 細胞に遺伝子導入し Pr1 応答性 Tph 遺伝子発現のメカニズムを解明せんとした。

3. 結果

まず、MIN6 細胞において Pr1 を添加すると Tph1 遺伝子の発現が約 5 倍に増加した。このところより MIN6 細胞は Pr1 応答性 Tph 遺伝子活性化を検討するのに有用な細胞株であることが明らかとなった。次に、既報に基づいて Tph 遺伝子のプロモーター領域を含むレポーター遺伝子を作成し、MIN6 細胞株にレポーター遺伝子を導入したが、プロモーター活性は検出されなかった。そこで、ectopic promoter がある可能性を考え、5' RACE を施行、既存の Exon1 の約 2000bp 下流に膵β細胞特異的プロモーターを同定した。その後、この上流に potential STAT binding site を見出した。この element を含む領域は Pr1 応答性にプロモーター活性が増加することが明らかとなった。

4. 考察

以上のデータより、現在、Pr1-Pr1R-STAT5-TPH の発現増加という機構が膵β細胞におけるセロトニン合成に関与している可能性に関してさらに検討を加えている。

5. 発表論文、参考文献

特になし