

氏 名 (本 籍) 野 村 哲 (高知県)

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博 士 第 5 4 5 号

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 9 年 3 月 2 6 日

学 位 論 文 題 目 MafA differentiates rat intestinal cells into  
insulin-producing cells

(MafA はラット腸細胞をインスリン産生細胞に分化させる)

審 査 委 員 主 査 教 授 遠 山 育 夫

副 査 教 授 鳥 居 隆 三

副 査 教 授 谷 徹

## 論文内容要旨

*整理番号	551	(ふりがな) 氏名	のむら さとし 野村 哲
学位論文題目	MafA differentiates rat intestinal cells into insulin-producing cells (MafA はラット腸細胞をインスリン産生細胞に分化させる)		
<p><b>【目的】</b> 我々は、ラット小腸幹細胞株 (IEC-6 細胞) に、転写因子 pancreatic and duodenal homeobox gene-1(Pdx-1)及び islet factor-1(Isl-1)を同時に発現させると、インスリンを産生し培養液中に分泌すること、つまり、小腸幹細胞が膵β細胞へと分化することを報告した (Diabetes, 51:1398-1408, 2002)。一方、MafA は主に膵β細胞に発現する転写因子であり、インスリン遺伝子プロモーターの RIPE3b 領域と呼ばれる cis-element に結合し、血糖値の上昇時にインスリン遺伝子の転写を活性化すること、発生段階での膵β細胞の分化に強く関わっていることが報告されている。今回、この転写因子 MafA をラット小腸に発現させることで、小腸上皮幹細胞がインスリン産生能を獲得することを検討し、更に、小腸への MafA 発現によるインスリン産生が streptozosin (STZ) 誘発糖尿病ラットの高血糖を改善しうるか否か検討した。</p> <p><b>【方法】</b> MafA と、遺伝子発現の確認を容易にするため、Internal Ribosome Entry Site (IRES) 配列を用いて green fluorescent protein (GFP) も同時に発現するアデノウイルス (Ad-MafA) を作成した。対照として LacZ 遺伝子を発現するアデノウイルス (Ad-LacZ) を作成した。培養細胞 (HEK293 細胞) に作成したウイルスを感染させ、挿入遺伝子の発現をウエスタンブロット法にて確認した。次に6週齢の雄SDラットに STZ (50mg/kg) を尾静脈より投与し、糖尿病ラットを作成した。次にこのラットに STZ 投与4日後と6日後の計2回、作成したアデノウイルスを、ゾンデを用いて経口投与し、2回目のウイルス投与3日後、血糖値及びインスリン値を測定した。一部のラットには経口糖負荷試験 (OGTT; ブドウ糖 1g/kg) を施行した。その後、小腸を採取し、RT-PCR 法、免疫組織化学法にて、転写因子及びインスリン蛋白、その他の膵β細胞関連蛋白の発現を検討した。</p> <p><b>【結果】</b> MafA をコードするアデノウイルスを経口投与し免疫組織化学法にて検討すると、MafA は小腸上皮細胞の核に、また、GFP は細胞質に発現していることが確認された。以上の結果は</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。  
2. ※印の欄には記入しないこと。

Ad-MafA が小腸上皮細胞に感染したこと意味している。RT-PCR 法を用いた検討では Ad-MafA 投与群で、新規のインスリン遺伝子発現を認め、免疫組織化学法による検討ではインスリン蛋白が小腸内分泌細胞に発現していることが確認された。また、prohormone convertase 1/3(PC1/3) や、カリウムチャネル・サブユニット Kir6.2 といった膵β細胞関連蛋白の発現も Ad-MafA 投与群で認められた。空腹時血糖は Ad-MafA 投与群で Ad-LacZ 投与群に比較し有意に低下し、血中インスリン濃度も有意に上昇した。OGTT では Ad-MafA 投与群において、インスリン基礎分泌が増加したが、血糖値に応じたインスリンの追加分泌は認められなかった。

#### 【考察】

ラット小腸に転写因子 MafA を発現させることにより、小腸内分泌細胞にてインスリン蛋白の発現を誘導することが認められた。この MafA による小腸内分泌細胞のインスリン産生細胞への分化誘導における詳細な分子機構は不明であるが、小腸は発生学的にも膵臓に近く、また、膵臓において認められる Pdx-1、Ngn-3、Isl-1、NeuroD、Pax4、Nkx2.2 といった様々な転写因子が小腸においても発現していることが知られている。このため、膵β細胞の発生の最終段階で発現することが知られている MafA を強制的に小腸に発現させることにより、小腸内分泌細胞がインスリン分泌細胞に分化したと考えられた。

#### 【結論】

ラット小腸上皮細胞にアデノウイルスを用い転写因子 MafA を発現させることにより、小腸内分泌細胞からインスリンが分泌され、STZ 誘導糖尿病ラットの血糖値が改善した。以上の事実は、アデノウイルスを用いた経口投与による MafA 遺伝子導入が糖尿病の新たな治療になりえる可能性を示唆している。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	551	氏名	野 村 哲
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>MafA は膵 B 細胞の発生の最終段階で発現する転写因子である。本研究では、アデノウイルスベクターを用いて MafA をラット小腸細胞に強制発現させることで、小腸上皮幹細胞がインスリン産生能を獲得しうるか、また streptozosin 誘発糖尿病ラットの高血糖を改善しうるか検討した。その結果、MafA アデノウイルス経口投与群では、</p> <ol style="list-style-type: none"><li>① MafA は小腸上皮細胞に発現した。</li><li>② MafA 陽性細胞で、新たにインスリン遺伝子と Kir6.2 などの膵 B 細胞関連遺伝子の発現を認めた。</li><li>③ 免疫組織化学法による検討で、インスリン蛋白は小腸内分泌細胞に検出された。</li><li>④ 血糖値の有意な低下とインスリンの基礎分泌量の有意な上昇を認めたが、血糖値に応じたインスリンの追加分泌は認められなかった。</li></ol> <p>本論文は、MafA アデノウイルスベクター経口投与による MafA 遺伝子導入が、小腸内分泌細胞にインスリン遺伝子を発現させることを明らかにしたものであり、医学の発展に寄与すると考えられ、博士 (医学) の学位論文に値するものである。</p>			
(平成19年 2月 1日)			