

氏名 (本籍)	山内 雅裕 (岐阜県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	甲第 891 号
学位授与日付	平成 24 年 3 月 25 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Localization of a multi-domain adaptor proteins, p140Cap and vinexin, in the pancreatic islet of a spontaneous diabetes mellitus model, Otsuka-Long-Evans-Tokushima Fatty rats
審査委員	(主査) 教授 森脇 久隆 (副査) 教授 小澤 修 教授 原 明

論文内容の要旨

【目的・緒言】

神経細胞に発現している蛋白質はしばしば内分泌細胞にも発現していることがあり、それらの機能的な関連には興味深いものがある。p140Cap (Cas associated protein) は神経細胞に多く発現しているマルチドメインアダプター蛋白であり、神経内分泌に関与していると考えられている。p140Cap は海馬神経細胞で SH3 ドメインを持つ vinexin と prolin-rich motif を介して結合する。vinexin は p140Cap と相互に作用し、神経細胞内で同部位に分布していることが報告されており、前シナプスでの p140Cap と vinexin の共局在は、これらの物質の神経伝達物質分泌における協調作用を示唆していると考えられる。我々は、ラット膵臓の免疫染色を行う事により p140Cap と vinexin が膵組織においては共局在しておらず、p140Cap と vinexin は異なった働きをしていると考えられた。これら二つの蛋白はインスリン分泌機構に極めて重要な役割を担っている可能性があり、今回我々は野生型ラットと糖尿病モデル動物である Otsuka-Long-Evans-Tokushima Fatty (OLETF) ラットの膵臓を用いて p140Cap と vinexin の特徴を検討した。

【対象と方法】

p140Cap と vinexin が膵臓に発現しているか否かをみる目的で、Wistar ラットの膵臓の cell lysate で各種抗体を用いてウェスタンブロットを行った。次いで 4 週齢の雄の Wistar ラットを用い、膵組織の免疫組織染色により p140Cap, vinexin のラット膵臓における分布を検討した。また、遺伝的肥満糖尿病モデル動物である OLETF ラットおよびコントロールの LETO ラットを用いて、糖尿病発症前後での p140Cap, vinexin の発現を検討した。29 週齢の高インスリン血症を来した OLETF ラット、39 週齢の明らかな高血糖を呈した OLETF ラット、コントロールの 29 および 39 週齢の LETO ラットを用いた。

免疫染色は penntobarbital 麻酔後、4% paraformaldehyde, 0.2% picric acid を含む 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) で灌流後、摘出膵臓を固定し、以下の抗体を使用して免疫染色に供した。

抗体は精製されたポリクローナルラビット抗 p140Cap 抗体、抗 vinexin 抗体、Dako Japan のポリクローナルモルモット抗インスリン抗体、モノクローナルマウス抗グルカゴン抗体を使用した。

【結果】

ウェスタンブロットにより Wistar ラットの膵臓に p140Cap と vinexin が存在する事が証明された。4 週齢の Wistar ラットの膵臓ランゲルハンス氏島（膵ラ氏島）を免疫染色したところインスリンと p140Cap が膵β細胞に共局在し、グルカゴンと vinexin が膵α細胞に共局在する事が明らかにされた。正常血糖の OLETF ラットやコントロールの LETO ラットでは膵β細胞の周囲にα細胞が存在する典型的な膵ラ氏島の構造が保たれており、p140Cap, vinexin の発現様式は正常であった。29 週齢の高インスリン血症を示した OLETF ラットでは、膵の典型的構造が破壊されており、周辺に存在していたα細胞はβ細胞の中に混入していた。39 週齢の明らかな高血糖を示した OLETF ラットでは、インスリンと p140Cap の細胞内局在の不一致が認められ、インスリンに比して p140Cap の発現の減少が認められた。

【考察】

膵α細胞に vinexin とグルカゴンの、膵β細胞に p140Cap とインスリンの発現の共局在を認めた。この事は p140Cap や vinexin が膵内分泌に関与している事を示唆する所見である。OLETF ラットではインスリン抵抗性が顕著な高インスリン血症の時期から高血糖が顕在化する時期にかけて、膵ラ氏島の破壊が徐々に進行した。これに伴い、対象群でみられた膵β細胞におけるインスリンと p140Cap の共局在がみられなくなり、発現も低下した。以上から糖尿病の発症に p140Cap が関与している可能性が考えられた。

【結論】

ラット膵β細胞に p140Cap とインスリンの発現の共局在を認めた。更に p140Cap のインスリン分泌への関与や、2 型糖尿病への発症・進展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

申請者 山内雅裕は transport vesicle の exocytosis に関与するとされる p140Cap 蛋白, vinexin 蛋白の膵臓における発現を、2 型糖尿病モデルラット (OLETF), コントロールラット (LETO) で免疫組織化学的に解析した。その結果、β細胞でインスリンと p140Cap が、α細胞でグルカゴンと vinexin が共発現すること、顕性糖尿病を発症すると p140Cap 発現が不均一に低下することを見出した。この知見は糖尿病におけるインスリン分泌異常のメカニズムを考える上で重要な示唆を与えるものであり、内分泌・代謝学の進歩に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Masahiro Yamauchi, Kaori Sudo, Hidenori Ito, Ikuko Iwamoto, Rika Morishita, Toshihiro Murai, Kazuo Kajita, Tatsuo Ishizuka, Koh-ichi Nagata: Localization of a multi-domain adaptor proteins, p140Cap and vinexin, in the pancreatic islet of a spontaneous diabetes mellitus model, Otsuka-Long-Evans-Tokushima Fatty rats

Medical Molecular Morphology. (in press)