

[別紙 1]

## 論文の内容の要旨

論文題目 膵β細胞株におけるミトコンドリア DNA の転写抑制とアポトーシス

指導教官 門脇 孝 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 山下 滋雄

ミトコンドリア DNA 3243 変異による糖尿病は我が国の糖尿病の約 1%を占めると考えられ、日々の臨床で遭遇する糖尿病の中にも、ミトコンドリア DNA の変異による糖尿病(以下、ミトコンドリア糖尿病)が相当数含まれる。通常インスリン抵抗性は軽度で、発症当初は食事療法やスルフォニルウレア(SU)剤によって数年以上インスリン治療を必要としない例も散見されるが、大部分は進行性にインスリン分泌の低下を来す。剖検例では、膵β細胞数および細胞量の減少が報告されている。

ethidium bromide(EB; 0.4 $\mu$ g/ml) 処理を行ったβHC9 細胞では、ミトコンドリア DNA に由来する遺伝子の転写が特異的に低下する。これによって、EB による処理 6 日目にはグルコース応答性インスリン分泌が抑制され、このことから、EB 処理βHC9 細胞はミトコンドリア糖尿病の膵島のよいモデルと考えられる。この系においてアポトーシスの有無およびその機序を検討した。

EB 処理後のβHC9 細胞のアポトーシスを蛍光法(propidium iodide 及びヘキスト 33342)、電子顕微鏡、TUNEL法 (TdT-mediated dUTP nick end labeling)により観察し、対照細胞と比較したところ、蛍光法で EB 6 日処理後の EB 群でアポトーシス像が認められ、EB 10 日処理後の EB 群においてアポトーシス像の増加が認められたが、10 日目と 14 日目は大きくは異ならなかった。電顕では EB 群(10, 14 日処理)において、細胞質の濃縮と核のクロマチン凝縮を伴うアポトーシス像がみられたが、対照群では観察した範囲で認められなかった。

TUNEL法でアポトーシスの頻度を定量したところ、EB 群では 6 日処理で 3.8%[対照(1.1%)の 3.4 倍( $p < 0.05$ )], 10 日処理で 23.9%[対照(4.2%)の 5.7 倍( $p < 0.0001$ )]であった。対照群では培養期間によるアポトーシス頻度に違いはみられなかった。

また、rhodamine123(Rh123)と propidium iodide(PI)の二重染色を行い、フローサイトメトリーにて PI 陰性、Rh123 陽性の細胞の解析を行った結果でも、EB 処理 2, 4, 6 日後の細胞では対照群との差異はなく、10 日後の EB 群において、Rh123 の取り込みが低い細胞群が出現していた (Mean: control Day 2 358.66(SD 479.86), Day 4 352.27(SD 596.25), Day 6 368.47(SD 444.94), Day 10 324.88(SD 370.15), EB Day 2 289.03(SD 306.76), Day 4 313.40(SD 469.77), Day 6 286.44(SD 495.96), Day 10 205.35(SD 453.26), EB Day 10 left 44.91(SD 26.14), right 395.96(SD 497.93)。5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)を用いた細胞増殖能の評価では、EB 処理 6 日後( $p < 0.0001$ )、10 日後( $p < 0.0001$ )とも EB 群において増殖能の低下が認められた。

細胞質におけるチトクローム *c* を免疫沈降-ウェスタン法で確認したところ、細胞質へのチトクローム *c* の放出が確認された。細胞質におけるチトクローム *c* の濃度を ELISA assay で測定したところ、EB 群では 6, 10 日処理で対照群の約 1.5 倍の濃度であった[6 日: 対照の 1.45 倍( $p < 0.005$ ), 10 日: 対照の 1.46 倍( $p < 0.05$ )]。一方、チトクローム *b* のウェスタン法による測定では、ミトコンドリア DNA によってのみコードされるチトクローム *b* の産生は予想通り低下していた。

細胞質中のチトクローム *c* により活性化されるカスパーゼ 9 は、EB 処理 10 日目の群において活性が対照群の 1.60 倍に増加していた ( $p < 0.001$ )。EB 処理 2 日目、6 日目においても有意差を認めたが、EB 群における活性上昇の割合は、それぞれ 1.16 倍( $p < 0.05$ )、1.29 倍( $p < 0.05$ )とわずかであった。また、カスパーゼ 9 の活性化により活性化されると考えられているカスパーゼ 3 も、EB 処理 10 日目の EB 処理群において活性が対照群の 1.48 倍に増加しており( $p < 0.01$ )、EB 処理 2 日目、6 日目においては有意差は認められなかった。一方、アポトーシス・シグナルの最終共通経路であると考えられているカスパーゼ 3 の活性化は、カスパーゼ 9 以外の経路によってもなされることが知られているが、この中の一つであるカスパーゼ 8 の活性を測定したところ、EB 処理後 2, 6, 10 日目の実験群と対照群との間に有意差は認められなかった。

また、ミトコンドリア内から細胞質中へのチトクローム *c* の放出を抑制する Bcl-2 と、促進する Bax は、ともにウェスタン法によって大きく変化していないことが確認された。

本系において、グルコース応答性インスリン分泌の抑制が EB 処理 6 日後に認められており(既報)、一方、今回の結果では、アポトーシスは処理 6 日よりあとに増加していた。したがって後者は前者より遅れて認められる事象であり、これはミトコンドリア糖尿病でみられる進行性のインスリン分泌低下と  $\beta$  細胞量の減少の原因となっている可能性がある。

また、本系におけるアポトーシス出現の機序は、ミトコンドリア DNA 由来であるチトクローム *b* など複合体形成蛋白の産生が低下することにより、電子伝達系において核 DNA 由来の蛋白であるチトクローム *c* との不均衡が生じ、その結果チトクローム *c* がミトコンドリア内から細胞質中へと遊離し、カスパーゼ 9、カスパーゼ 3 の活性化によってアポトーシスが惹起されたと考えた。

しかし、アポトーシスは  $\beta$  細胞量減少の原因の一端を説明する現象であるに過ぎず、細胞増殖能が低下している理由の詳細な検討、アポトーシスとセルサイクル停止との関連の検討が、今後の課題として残された。