

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 山下 滋 雄

本研究は、ミトコンドリア DNA の変異による糖尿病(ミトコンドリア糖尿病)における β 細胞量減少の原因を明らかにするため、マウス由来の膵 β 細胞株である β HC9 細胞に、DNA、RNA の合成阻害作用を有するエチジウムブロマイド(EB; $0.4 \mu\text{g/ml}$)を作用させてミトコンドリア DNA の転写を特異的に抑制した系において、アポトーシス及び細胞増殖能の検討を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. EB 処理後の β HC9 細胞を蛍光法(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、蛍光法では EB 6 日処理後の EB 群で軽度のアポトーシス像が認められ、EB 10, 14 日処理後の EB 群においてアポトーシス像の著明な増加が認められた。10 日と 14 日処理の間には大きな変化はなかった。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。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 日後に認められている(既報)。アポトーシスはこれより遅れて認められる事象であり、これが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 β 細胞量の減少の原因となっている可能性が示唆された。
2. 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、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 の取り込みの低い細胞群が出現していた。このことからミトコンドリア膜電位が低下していたアポトーシスの初期像が、EB 処理 10 日で多く出現していることが示された。
3. 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、10 日後とも EB 群において増殖能の低下が認められた。 β 細胞量減少の原因はアポトーシスだけではなく、細胞増殖能の低下も関与していることが示された。

4. 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($p < 0.05$)].
5. ミトコンドリア内膜に存在し、チトクローム *c* を介して電子の受け渡しを司る複合体 III の構成蛋白であるチトクローム *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* の産生が低下していた。
6. 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と、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。
7. 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 は、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。
8. アポトーシス・シグナルを活性化する別系統のシグナル伝達物質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いずれも有意差は認められなかった。
9. 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示された。

これらのことより、本系におけるアポトーシス出現の機序は、チトクローム *b* などミトコンドリア DNA 由来の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、以上の成績からはアポトーシスが β 細胞量減少の原因の一端を説明することが導かれるに過ぎず、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は、今後の課題として残された。

以上、本論文はマウス由来の膵 β 細胞株である β HC9 細胞株のミトコンドリア DNA 転写を抑制した系において β 細胞数減少の解析を行うことで、ミトコンドリア糖尿病患者において膵 β 細胞量が減少する一因として、アポトーシスが関与している可能性を明らかにした。当研究はミトコンドリア糖尿病におけるインスリン分泌低下と膵 β 細胞量減少の病態解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。