

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 吉汲 祐加子

本研究では、AR42J細胞がインスリン産生細胞へ分化する際に発現が著明に亢進する遺伝子群の中から、JAM (Junctional Adhesion Molecule) -1 に注目した。AR42J 細胞の分化過程ではタイトジャンクション (TJ) を形成しない為、JAM-1 には TJ 構成蛋白以外の新たな機能があるのではないかと推察し、発現の時間的変化、局在、糖尿病状態における発現の変化等から、JAM-1 の発現変化を解析し、下記の結果を得ている。

1. AR42J 細胞がインスリン産生細胞へ分化する際の JAM-1 の発現の変化を mRNA と蛋白レベルで比較検討した。ノザンブロットでは JAM-1 の発現はアクチビン A (Act) + ベータセルリン (BTC) に反応して 3 時間後に急速に増加した。ウエスタンブロットでは Act+BTC 添加 24 時間後に発現が増加した。JAM-1 は AR42J 細胞の分化の初期にその機能を発揮する事が示された。
2. 細胞間接合部に局在する他の蛋白に関して、AR42J 細胞が分化する際の時間経過における発現の変化を調べた。アドヘレンスジャンクションに局在するE-カドヘリンは時間経過に無関係にほぼ一定量が発現していた。TJ に局在して JAM-1 と結合し、情報を伝達する分子である PAR-3 と aPKC λ は、JAM-1 と同様に Act+BTC 添加 24 時間後に発現が増加した。以上より、JAM-1 関連の情報伝達系が AR42J 細胞のインスリン産生細胞への分化に関与していると考えられた。

2-1

3. 細胞内における JAM-1 の局在を免疫細胞染色、細胞分画法により検討した。インスリン産生細

胞へと分化した AR42J 細胞は JAM-1 の発現が亢進しているにもかかわらず、抗 JAM-1 抗体では染色されなかった。そこで強制発現系を利用して、JAM-1 の細胞内での局在を検討した。発現ベクター (JAM-1/His-Myc) を MDCK 細胞にトランスフェクションし、抗 Myc 抗体で染色した所、細胞間結合部以外にも、細胞内が顆粒状に染色された。抗 JAM-1 抗体を用いても細胞内が顆粒状に染色された。以上より、JAM-1 は TJ に存在するが、それ以外に細胞内にも局在する可能性が示唆された。細胞分画法により、インスリン産生細胞に分化した AR42J 細胞の細胞画分を集め、ウエスタンブロットにより、細胞内のどの画分に JAM-1 が存在するのかを検討したところ、JAM-1 はミクロソーム分画、ミトコンドリア分画に局在した。細胞膜貫通ドメインを持つことから、細胞内小胞の上に存在すると考えられた。

4. ラット膵ラ氏島での JAM-1 の局在を免疫組織化学にて検討した。膵ラ氏島において JAM-1 は、 β 細胞ではなく、辺縁の α 細胞に発現していた。より詳しく調べるために、膵ラ氏島を抗 JAM-1 抗体と抗グルカゴン抗体で二重染色し、共焦点顕微鏡で観察した。JAM-1 は α 細胞の細胞間結合部以外にも、細胞内で染色され、MDCK 細胞の染色パターンと同様であった。
5. ラットにストレプトゾトシン (STZ) を投与して、糖尿病ラットを作成し、再生を促された膵ラ氏島の JAM-1 の発現がどのように変化するかを検討した。正常ラットと糖尿病ラットにおける膵ラ氏島での JAM-1 の発現量を RT-PCR 法、ウエスタンブロットにより比較した。mRNA レベルでも、蛋白レベルでも JAM-1 の発現は糖尿病ラットで上昇していた。
6. STZ 投与後 6 週のラットの膵ラ氏島の免疫組織染色を行った。正常ラットと比較して、 β 細胞が減少し、 α 細胞が増加して膵ラ氏島の辺縁のみでなく中心寄りにも認められた。

2-2

JAM-1 も糖尿病ラットの膵ラ氏島では正常ラットと比べ増加し、 α 細胞に局在していたが、JAM-1 の染まらない α 細胞も認められた。

以上、本論文において、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞間接着分子 JAM-1 が

TJ だけでなく、細胞内にも局在することを明らかにした。JAM-1 は細胞内で膵内分泌細胞の分化に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた。本研究は JAM-1 の発現変化の解析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。