

論文の内容の要旨

氏名：古川麻美

専攻分野の名称：博士（医学）

論文題名：高効率遺伝子導入を可能とするインスリン分泌細胞株の樹立と応用

糖尿病とは、インスリン作用の不足により起こる慢性高血糖を主徴とし、種々の特徴的な代謝異常を伴う疾患群である。1型糖尿病は免疫学的機序あるいは原因不明のメカニズムによって膵β細胞が広範に破壊されることによるインスリン欠乏が病態の基本である。一方、日本国において、糖尿病全体の90%近くを占める2型糖尿病は、インスリン分泌低下とインスリン感受性低下の両者が発病に関わっている。ゲノムワイド相関解析により、現在までに90を超える遺伝子異常が報告されているが、それらは膵β細胞でのインスリン分泌機能やβ細胞の生存機構に関与したものがほとんどである。このような背景に鑑みて、β細胞のインスリン分泌機構を詳細に理解すること、およびβ細胞の生存・死のメカニズムを解明することは、糖尿病の病態解明や創薬標的の同定のために重要であり、さらに将来のβ細胞の遺伝子治療・再生医療に重要な情報を提供する可能性がある。

膵β細胞の機能を解明する上で、分子生物学的方法は強力な手法である。しかしインスリンを分泌するβ細胞やその細胞株に核酸を導入する際には、導入効率が非常に低いという欠点がある。アデノウイルスベクターを用いる方法は強力な方法であるが、作製に時間がかかる、一定量以上のアデノウイルスの細胞障害性も懸念される。

これらの問題点を克服するため、効率的に遺伝子導入インスリン分泌細胞株を作製する方法の開発を試みた。導入したい遺伝子が染色体上の特定の位置に挿入されるように、マウス由来のインスリン分泌細胞株であるMIN6細胞の染色体にacceptor配列を設置した。Accepter配列には、Flip recombinase recognition target (FRT)配列が含まれ、Flip recombinaseの存在下で、同様のFRT配列をもつdonor plasmidとDNAの交換が可能である。

まず、染色体のRosa26 locusを挿入位置に選択し、acceptorを挿入し、green fluorescent protein (GFP)を含むplasmidとFlip recombinaseを発現するplasmidを導入して交換反応を起こさせた。交換反応は成功したと考えられたが、GFPの発現が細胞ごとに異なるモザイク状で、平均的発現レベルも高くないと推定された。そこで、染色体の任意の位置にacceptorを挿入し、その結果、転写活性の高い染色体の位置に挿入され、交換反応後のGFPの発現が高くなるクローンを選択するという方法をとった。その結果得られたクローンは、細胞での発現レベルが高く、均一に発現しており、さらにGFPをred fluorescent protein (RFP)に交換することも可能であった。

このように樹立したインスリン分泌細胞株での遺伝子導入システムが応用可能かどうかを検証するために、まず遺伝子導入の効果が知られているグルコキナーゼcDNAを用いた。その結果、これまでの報告と同様に中間レベルのグルコース濃度でのインスリン分泌が増強することが観察された。このことは、このシステムにおける外来蛋白の過剰発現が、影響を及ぼしうるほど十分なレベルであると考えられた。

次に、グルコースによるインスリン分泌に重要な役割を担う分子を探索する一環として、オーファンG蛋白共役受容体であるGPCR5Cの遺伝子導入を試みた。グルコース刺激によりインスリン分泌の増加が認められ、GPCR5Cがインスリン分泌に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。