

論文の内容の要旨

氏名：盛 川 愛

専攻分野の名称：博士（医学）

論文題名：膵 α 細胞株および β 細胞株からなる偽膵島の形態とインスリン分泌応答

2型糖尿病は、複数の遺伝因子と環境因子による膵 β 細胞からのインスリン分泌不全と、骨格筋・脂肪細胞・肝臓におけるインスリン抵抗性の両者がさまざまな程度に関与し発症する。膵 β 細胞からのインスリン分泌機構を詳細に理解することは、糖尿病のさらなる病態解明のために重要である。細胞を再凝集させて3次元構造を構築したスフェロイドでは、接着培養と比較して、インスリン分泌が促進され、機能的な反応性を向上させることが示されている。本研究では、インスリン分泌細胞株であるMIN6細胞とグルカゴン分泌細胞株である α TC1細胞を用いて偽膵島を作製し、偽膵島の形態とインスリン分泌応答を観察し、インスリン分泌機構を研究する上で有用なモデルの確立を目指した。 α TC1細胞とMIN6細胞を1スフェロイドあたりの細胞数が200個になるようにSphericalplate 5D™に混合して播種したところ、24時間後にはmicrowellに均一な大きさのスフェロイドが形成され、これを偽膵島とした。 α TC1細胞とMIN6細胞を同時に、混合比率を変えて播種すると、いずれの比率においてもMIN6細胞は球体の中心部に位置し、 α TC1細胞がMIN6細胞を囲むように辺縁部に位置していた。MIN6細胞と α TC1細胞に繊維芽細胞株であるNIH-3T3細胞をそれぞれと混合して播種しても、特徴的な細胞分布を示さなかったことから、 α TC1細胞とMIN6細胞を合わせたときに生じる構造は両細胞の特異的な親和性によって形成される構造であると考えられた。グルコースによるインスリン分泌は、解糖系の律速酵素であるグルコキナーゼ (Gck) の発現により増強される。インスリン分泌実験には、ドキシサイクリン(Dox)添加にてGckが過剰発現するMIN6oeGck細胞を用いた。MIN6oeGck細胞が200個となるようにスフェロイドを形成し、インスリン分泌実験を行うと、Gckの過剰発現を誘導しない状態では、5mMグルコースでのインスリン分泌は基礎レベルであり、12.5mMグルコースで約10倍に分泌量が増えていた。一方、Dox 0.3 μ g/mlでGckを過剰発現させたスフェロイドにおいては、5mMグルコースで、1mMグルコースの4.7倍、12.5mMグルコースで、1mMグルコースの18.9倍に増加した。次に、1個の偽膵島あたりの総細胞数は200個とし、構成する α TC1細胞とMIN6oeGck細胞の比が、0.33:1、0.5:1、1:1の比率になるように偽膵島を作製した。まず、Dox添加を行わない状態では、いずれの比率においても、グルコース濃度依存性にインスリン分泌が増加したが、 α TC1細胞を混合して作製した偽膵島では、1mMおよび5mMグルコースでのインスリン分泌量が増加し、12.5mMグルコースでのインスリン分泌に大きな変化はなかった。DoxでGck過剰発現を誘導したMIN6oeGck単独スフェロイドでは12.5mMグルコースにおいて、Dox(-)の場合と比較してDox(+)によるGckの過剰発現によりインスリン分泌が2.04倍増加したが、 α TC1細胞の比率が増えるにつれて、Dox有無でのインスリン分泌の差が認められなくなり、 α TC1細胞:MIN6oeGck細胞比が1:1の場合には、ほぼDoxの効果が認められなかった。MIN6細胞と α TC1細胞の200個の細胞から作製された偽膵島では、膵島と同様の特徴的な構造が再現され、低濃度でのインスリン分泌が増強し、より本来の膵島でのインスリン分泌に近いグルコース濃度依存性を認めることが明らかとなった。さらに、 α TC1細胞を10%~30%程度混合させた偽膵島は、インスリン分泌細胞における遺伝子発現修飾の効果を検討する上でも有用であることが明らかとなった。