

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 奥 山 朋 子

横浜市立大学大学院医学研究科 医科学専攻

分子内分泌・糖尿病内科学

審 査 員

主 査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 石川 義弘

副 査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 梁 明秀

副 査 横浜市立大学大学院医学研究科准教授 芝田 渉

博士の学位論文審査結果の要旨

Identification of the matricellular protein Fibulin-5 as a target molecule of glucokinase-mediated calcineurin/NFAT signaling in pancreatic islets

(膵島における新規グルコキナーゼ標的分子である Fibulin-5 の同定と発現制御機構の解析)

【発表要旨】

グルコキナーゼは主に膵β細胞および肝に発現する解糖系の律速段階酵素であり、生体内の糖恒常性維持に重要な役割を果たしている。我々はマウス単離膵島において、グルコキナーゼ活性化薬 (GKA) により細胞外マトリックス蛋白である Fibulin-5 (Fbln5) の発現が上昇することをマイクロアレイ解析により同定した。Fbln5 は弾性線維形成に必須の分泌蛋白であるが、糖代謝との関連についてはこれまでに報告がなく、本研究では膵島におけるグルコキナーゼを介した Fbln5 の発現制御機構および Fbln5 の糖代謝における役割を明らかにすることを目的とした。

マウス単離膵島において、Fbln5 の遺伝子発現は高グルコースおよび GKA 刺激により上昇した。また膵島における GKA による Fbln5 の発現誘導は高脂肪食負荷やグルコキナーゼヘテロ欠損、*Irs-2* 欠損により変化を認めたことから、膵島における Fbln5 が生体レベルで耐糖能に重要であることが示唆された。さらに膵島における Fbln5 の発現が、膵β細胞機能に重要な役割を果たしているグルコキナーゼ/カルシニューリン/NFAT シグナルにより制御されていることを見出した。次に Fbln5 欠損マウスの表現型を解析したところ、生後 8 週齢において耐糖能およびインスリン分泌能は野生型マウスと同等であり、また膵β細胞量および膵β細胞増殖能についても野生型との間に明らかな差を認めなかった。一方、ラットインスリノーマ細胞株である INS-1 細胞における Fbln5 過剰発現により、インスリン分泌は上昇し細胞増殖は低下する傾向を認めた。Fbln5 の膵β細胞における機能性を示唆する結果であり、Fbln5 が膵β細胞機能のマーカーとなる可能性が示唆された。細胞外マトリックス蛋白である Fbln5 による膵β細胞機能の制御について、今後さらなる解明が望まれる。

審査にあたり、上記論文要旨の説明後以下の質疑応答がなされた。

まず、芝田副査により以下の質問があった。

- 1) マイクロアレイの結果、なぜ Fbln5 に着目したのか。
- 2) 増殖の評価に関して、膵β細胞の stem cell は存在するか。またそれを検討に用いているか。
- 3) 細胞増殖の評価において Ki67 の免疫染色による評価は行っているか。
- 4) グルコキナーゼを介した Fbln5 の発現制御機構を提示しているが、Fbln5 の下流については同定しているか。
- 5) 免疫染色で血管内皮との共染色をみているか。

6) 成人マウスでは *Fbln5* 欠損による表現型の変化が観察されなかったが、非糖尿病状態において *Fbln5* は糖尿病を予防するわけではないと考えてよいか。糖尿病のマウスにおいては *Fbln5* 欠損による表現型の変化が出る可能性があるか。

以上の質問に対し、以下の回答がなされた。

- 1) *Fbln5* は発現上昇の程度とその特異度が高かったため着目した。 *Fbln5* よりも発現上昇の程度と特異度が高かった分子に関しては他のプロジェクトで解析を進めている。
- 2) 今回 stem cell の系は用いていない。膵島を形成する内分泌細胞は共通の前駆細胞から分化することが知られているが、膵 β 細胞自体も細胞増殖能を有しており *Fbln5* による膵 β 細胞の増殖能への作用を評価した。
- 3) EdU の取り込みにより評価しており、Ki67 染色による評価は行っていない。
- 4) 現時点では *Fbln5* の下流に関しては同定できていない。今後の研究課題である。
- 5) 免疫染色で血管内皮マーカーである CD34 との共染色を行い、CD34 陽性細胞付近に *Fbln5* の局在を確認している。
- 6) 非糖尿病状態において生理的な発現範囲での *Fbln5* は耐糖能に明らかな作用を持たないと考えられたが、糖尿病状態においては表現型の変化が出現する可能性も考えられる。

次に梁副査より以下の質問があった。

- 1) *Irs-2* 欠損マウスの膵島では非刺激下で *Fbln5* の発現が上昇しているが、*Irs-2* 欠損による耐糖能異常が影響していると考えてよいか。
- 2) *Fbln5* の発現は胎生期に高く生後低下するとのことであったが、より若齢のマウスを用いた検討が必要ではないか。
- 3) *Fbln5* の発現が組織リモデリングにより上昇するとのことであったが、ストレプトゾトシン投与など膵 β 細胞が減少するモデルでは検討しているか。その際には *Fbln5* の発現が上昇している可能性は考えられるか。
- 4) *Fbln5* は膵島内の間質より分泌され膵 β 細胞の細胞外に付着して作用しているのか。膵 β 細胞におけるインテグリンのシグナルの関与は検討しているか。
- 5) 免疫染色の結果からは成人のマウス膵島に *Fbln5* は発現していないということで良いか。胎生期のマウス膵島における発現および高血糖状態が遷延して膵 β 細胞死が起こる段階にかけて、時系列を追った検討が有効ではないか。

以上の質問に対し、以下の回答がなされた。

- 1) *Irs-2* 欠損による慢性高血糖状態やインスリン抵抗性の影響により *Fbln5* の発現が上昇した可能性を考えている。
- 2) 本研究では膵島における *Fbln5* の発現が生後徐々に低下する結果を得ており、指摘の通り、今後より若齢マウスを用いた表現型の解析が必要だと考えている。
- 3) ストレプトゾトシン投与の検討は行っていない。膵 β 細胞が破壊され減少した結果、

組織リモデリングが起こり *Fbln5* の発現が上昇する可能性は考えられる。

- 4) 本研究ではグルコキナーゼを介した *Fbln5* の発現誘導を示しており、膵島の間質細胞からも分泌されている可能性はあるが、少なくとも膵 β 細胞においても *Fbln5* は発現していると考えている。インテグリンを介した機構については検討していない。
- 5) 成人マウスの膵組織で膵 β 細胞における *FBLN5* の発現は確認されなかったが、胎生期の膵島や *INS-1* 細胞における発現は確認していることから膵 β 細胞にも *Fbln5* が発現していると考えている。胎生期から代償性膵 β 細胞増加の段階を経て膵 β 細胞量が低下する段階まで時系列を追った *Fbln5* の発現変化の検討は興味深く、今後検討したい。

最後に石川主査より以下の質問があった。

- 1) 本研究における申請者の貢献度はどうか。 *Fbln5* 欠損マウスはどのようにして入手したのか。
- 2) *Fbln5* 欠損マウスで耐糖能の表現型に変化がなかったが、 *Fbln5* の過剰発現により膵 β 細胞に対する機能性を認めており、どのような機構が考えられるか。
- 3) 今回の検討において他の *Fibulin* ファミリーの発現変化はみているか。
- 4) *Fbln5* 欠損マウスで耐糖能に変化を認めていないが、他の表現型に変化は見られたか。
- 5) 今回は *Irs-2* 欠損マウスでの解析も行っているが、 *IRS-1* に関しても解析しているか。

以上の質問に対し、以下の回答がなされた。

- 1) マウス膵島のマイクロアレイ解析による *Fbln5* の同定および *Fbln5* 欠損マウスの入手は直接関与していないが、その後の解析は全て申請者自身で行っている。 *Fbln5* は Southwestern 大学柳沢裕美教授 (現筑波大学) より入手した。
- 2) *Fbln5* は弾性線維形成に必須の分子であるが、機能性としては腫瘍における細胞増殖への作用が多数報告されている。生理的な発現レベルでは膵 β 細胞への機能性を発揮しないとしても、過剰発現することで膵 β 細胞への機能性を持った可能性がある。これに対し石川主査より過剰発現時にはリダンダンシーにより機能性が出た可能性もあると示唆があった。
- 3) 今回の検討では他の *Fibulin* ファミリーの発現はみていない。今後の検討課題である。
- 4) *Fbln5* 欠損マウスでは耐糖能に変化がなかったものの、インスリン感受性の亢進を認めており、現在その機構の解析を進めている。
- 5) *IRS* のうち *IRS-1*・*IRS-2* が重要とされているが、 *IRS-1* は主に肝・骨格筋におけるインスリン感受性に寄与しており、膵 β 細胞においては主に *IRS-2* が発現していることから *IRS-2* 欠損マウスを用いた。

これら以外にもいくつかの質問がなされたが、申請者によりいずれも的確な返答がなされた。また、申請者が本研究に十分に貢献していることを確認した。以上の審査より、申請者は本学の学位 (博士) を授与されるにふさわしいと判断された。