

論文の内容の要旨

論文題目

Development of the pancreas and regeneration process of β cells in medaka

(メダカにおける膵臓の正常発生および β 細胞再生過程の解析)

氏名 大塚 堯慶

【序論】

膵臓は大別して外分泌細胞と内分泌細胞から構成されており、それぞれ消化液の分泌、血糖値の調整に関与する重要な器官である。内分泌細胞はランゲルハンス小島という構造を作り、その大部分を占める β 細胞は血糖値を下げる働きを持つ唯一のホルモンであるインスリンを産生する。この β 細胞の機能不全は糖尿病を始めとした様々な重篤な疾患に関与しており、 β 細胞の再生メカニズムに関する研究が哺乳類を中心に盛んに行われてきたが、哺乳類の β 細胞は再生能が低く、再生メカニズムの理解は遅れている。一方で、ゼブラフィッシュにおいて β 細胞が再生することが報告されたが、哺乳類と比較して高い再生能を持つメカニズムは明らかになっていない。魚類に注目した β 細胞の再生メカニズムの解明は重要であると考えられるが、魚類の膵臓に関する知見はゼブラフィッシュを用いた初期発生についての限定的な理解に留まり、成魚における膵臓全体構造はほとんど理解されていない。

脊椎動物における膵臓発生は様々なモデル生物で研究が進んでおり、羊膜類では腸管から背側・腹側の2ヶ所から膵臓芽が出芽することで膵臓の誘導が行われる。出芽した膵臓芽は内分泌細胞・外分泌細胞へと上皮組織の分岐・伸長に伴い分化が進行し、それらが融合することで1つの器官を形成することが知

られている。一方、ゼブラフィッシュにおいても初期発生において、背側・腹側膵臓芽が出芽するという発生様式は保存されていることが知られているが、背側膵臓芽は内分泌細胞へ分化し、腹側膵臓芽は外分泌細胞へ分化するという哺乳類とは異なる分化能を有する。また、背側膵臓芽が単一のランゲルハンス小島（第一次小島）を形成する一方で、発生時期・部位が異なる少数の第二次小島群が存在することも知られており、魚類特有の発生様式・構造が示唆されている。

そこで、ゼブラフィッシュと進化的な距離が離れ、かつモデル生物として広く利用されているメダカを用いて、初期発生過程・成魚における膵臓構造を解析することで、硬骨魚類に保存された一般的な発生様式・膵臓構造を明らかにし、哺乳類との比較を通して、魚類の膵臓に関する包括的な理解を目指した。また、 β 細胞再生研究を可能とする系を確立するため、 β 細胞を任意のタイミングで破壊できる系を確立し、その再生能の検証を行った。

【結果】

まず膵臓を可視化するため、共に膵臓の分化誘導に必須で、分化後に内分泌細胞と外分泌細胞にそれぞれ発現が限局する2つの転写因子 *pdx1* と *ptfla* を GFP または mCherry で可視化したトランスジェニック系統 (*pdx1-GFP*, *ptfla-mCherry*、以降 double Tg) を作出し、正常発生を追った。その結果、体節形成初期に腸管内前方領域に両転写因子が共発現する膵臓前駆細胞を同定した。また、体節形成中期には腸管から背側・腹側の2ヶ所で膵臓芽が出芽する様子が観察された。また、この時点で背側膵臓芽において *pdx1* が強く発現する様子が観察された。実際、内分泌細胞マーカーである *Isl1* は背側膵臓芽でのみ発現しており、膵臓芽出芽時に既に、背側膵臓芽と腹側膵臓芽で分化運命が異なることを示唆している。これらの結果はゼブラフィッシュにおける先行研究とも一致しており、膵臓芽が背側・腹側から出芽するという初期発生様式は保存されているものの、その分化能は魚類と羊膜類では異なることが明らかとなった。

続いて double Tg の成魚を観察することで、魚類の膵臓構造を初めて明らかにした。その結果、mCherry 陽生の外分泌組織は腹腔内に広がっており、腸管に複数の接続を持つ巨大な組織であることが明らかとなった。哺乳類の膵臓は1本の膵管を通して十二指腸と接続しているが、魚類の膵臓は外分泌組織が腸管の前部から肛門に至るまで複数の接続を行っている。この構造は、メダカの腸

管に胃・小腸・大腸などの機能分化が明確に行われておらず、摂取した食物を消化するために消化液を腸管全体に分泌する必要があるためと考えられる。

double Tg の観察により、内分泌組織はゼブラフィッシュと同様にメダカにおいても背側膵臓芽由来の巨大な第一次小島に加え、少数の第一次小島と比較して小さな第二次小島群が存在していることが明らかとなった。この第二次小島群は第一次小島と比較して大きさは小さく、孵化後に第一次小島とは離れた位置に出現し、成長とともに数を増やしていく様子が観察された。このようなランゲルハンス小島にサブタイプが存在することは哺乳類とは異なる特徴である。また、哺乳類におけるランゲルハンス小島は背側・腹側膵臓芽両方から生じ、上皮組織の分岐を介してその数を増やし、初期発生後はその数を一定に保つことが知られており、成長とともに数や大きさを増やす第二次小島の可変的な性質は魚類に特徴的な性質であるといえる。このような性質を有する第二次小島は内部環境（摂食量、血糖量など）に応じて、数や大きさを調整している可能性が高い。

最後に、メダカ β 細胞を特異的に破壊できる *ins-GFP-NTR* トランスジェニックシステムを作出し、 β 細胞の再生能の検証を行った。NTR は大腸菌由来の酵素であり、基質である Mtz 存在下で細胞死を引き起こす。咽頭胚期に Mtz を 6 日間投与した胚において、 β 細胞が顕著に減少している様子が観察された。なお、この時点で第二次小島はまだ出現しておらず、第一次小島のみを破壊した後の再生過程を観察した。 β 細胞破壊後約 2 週間で β 細胞の再生が確認できたことから、メダカもゼブラフィッシュと同様に β 細胞の高い再生能を持つ可能性が高いと結論した。また興味深いことに、 β 細胞破壊後 5 ヶ月の成魚を観察したところ、コントロール群と比べ、第二次小島がより大きく発達していることが明らかとなった。

【結論・今後の展望】

本研究におけるトランスジェニックメダカの解析とゼブラフィッシュ、哺乳類の知見との比較から、魚類の膵臓はいくつかのユニークな特性を持つことが明らかとなった。特に顕著なものとして、巨大な外分泌組織および第二次小島の存在があげられる。魚類の外分泌組織の全体構造は本研究により初めて明らかとなったが、哺乳類とは大きく異なる形態的特徴を有している。これは腸管の機能分化と外分泌構造の関係性を示唆している。また、第二次小島の機能は不明な点が多く残されているが、正常発生においても可変的な性質を有してい

ること、 β 細胞再生過程において、第二次小島が第一次小島と比較して大きく発達することから、魚類に特徴的な高い再生能と何らかの関係が示唆され、第二次小島のもつ特性の1つを明らかにできたと考えられる。本研究で確立したトランスジェニックメダカは、 β 細胞を特異的に破壊することができ、今後魚類における β 細胞再生のメカニズムに迫る上で有用な系であると考えられる。成魚における再生能の検証や再生源となる細胞の同定（リネージ解析）、再生過程における遺伝子発現制御の解析といった、より詳細な解析を特に第二次小島に着目して進めることで、魚類が高い再生能を生み出すメカニズムに迫ることが可能であり、再生生物学の発展に大きく貢献できると期待される。