

論文審査の結果の要旨

氏名 大塚 堯 慶

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。中でも内分泌細胞の1つであるβ細胞の機能不全は糖尿病などの重篤な疾患を引き起こすため、これまで哺乳類を用いて再生メカニズムの研究が盛んに行われてきた。しかし、哺乳類はβ細胞の再生能が低く、再生メカニズムの理解は遅れている。一方、ゼブラフィッシュにおいて、β細胞の高い再生能を持つことが報告され (Moss *et al.*, 2009)、魚類は膵臓の再生メカニズムを明らかにする上で魚類は有用なモデルになりうると考えられるが、初期発生過程や膵臓の全体構造など、基礎となる知見が不足している。そこで論文提出者はメダカを用いて魚類における膵臓初期発生様式、膵臓の器官構造を包括的に理解するために、博士課程の研究を行った。また、魚類を用いた膵臓再生研究の系を確立することも目指した。

本論文は2章で構成されている。第1章ではトランスジェニックメダカを用いた解析および分化マーカーの発現解析を通して、膵臓の初期発生及び全体構造を記載した。膵臓の発生初期から成魚にいたる全ての段階を可視化するために外分泌または内分泌細胞で特異的に発現する2つの転写因子を異なる蛍光で同時に可視化したトランスジェニックメダカ (*pdx1-GFP, ptf1a-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。そして、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。この際、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おり、ゼブラフィッシュにおける先行研究とも一致する。したがって、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、その分化プロパティは魚類と羊膜類では異なることが明らかとなった。

次に **double Tg** の成魚を観察することで、魚類の膵臓構造の全体像を初めて明らかにした。その結果、外分泌の組織は、広く腹腔内に広がり、腸管に複数の接続を持つ巨大なもの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厳密に見られないために、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と考えられる。

第2章では、 β 細胞を特異的に破壊できるトランスジェニックメダカを作出し、再生能の検証を行った。特異的な破壊には NTR/Mtz システムを利用した。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。 β 細胞のみで NTR を発現するトランスジェニックメダカ (*ins-NTR-GFP*) を作出し、Mtz の投与を咽頭胚期の胚に対して行ったところ、 β 細胞のみが顕著に減少している様子が観察された。また、実際に β 細胞が再生する様子が観察された。興味深い観察として、第二次小島の挙動があげられる。魚類のランゲルハンス小島は、背側膵臓芽に由来する第一次小島と、それとは異なる時期、部位に発生する少数の第二次小島群から形成されることが知られている。今回の観察において、第二次小島が正常より大きく発達することが β 細胞破壊群でのみ観察され、第二次小島の可変的な性状が初めて明らかとなった。

本研究におけるトランスジェニックメダカの詳細な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。顕著な特徴として、巨大な外分泌組織および第二次小島の存在が挙げられる。これまで外分泌組織はその全体構造が不明であったが、本研究で魚類の膵臓構造全体を初めて明らかにした。また、第二次小島の機能に関しては未知であるが、 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る。また、本研究において作出した β 細胞を特異的に破壊できるトランスジェニックメダカを利用することで、魚類に特徴的な高い β 細胞再生を可能にするメカニズムを明らかにすることができると考えられ、再生生物学の発展および糖尿病治療へ向けた重要な知見を明らかにすることが期待できると考えられる。

なお、本論文は塚原達也（ハーバード大学）、武田洋幸（東京大学）との共同研究であるが、論文提出者が主体となって研究戦略の設定、実験、考察を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。従って、博士（理学）の学位を授与できると認める。