

母体副腎が胎子膵島細胞の発達に及ぼす影響

Effects of maternal adrenals on development of fetal islet cells

山本雅子, 白井明志, 村上 賢

麻布大学大学院獣医学研究科

Masako Yamamoto, Mitsuyuki Shirai, Masaru Murakami

Graduate School of Veterinary Science, Azabu University

Abstract. To investigate the effect of maternal adrenocortical hormones on the development of fetal pancreatic islet cells, pregnant rats were adrenalectomized on day 6 of gestation. On days 14–16 the cell division index were estimated. Maternal adrenalectomy resulted in decreased cell division index of both endocrine ducts and pancreatic islets. On day 15, Ngn3, the transcriptional factor that is expressed in epithelial pancreatic progenitor cells before endocrine differentiation, was up regulated in fetal pancreases from ADX group. But maternal adrenalectomy did not alter glucocorticoid receptors mRNA expression. These results suggest that maternal adrenocortical hormones maintain the early development of fetal pancreatic cells, although its action mechanism is not clear.

1. 目的

胎生期の器官発生に母体由来の副腎皮質ホルモンが関与していることはよく知られている。例えば前腸から十二指腸が発生する場合はこれに該当する。膵臓は前腸から腹側膵芽と背側膵芽として出芽する。膵芽は分岐を繰り返し、樹状の分泌管となり、分泌管の先端から膵臓外分泌部（腺房）が、分泌管の壁から膵島が発生する。ラットでは胎齢11日にグルカゴン陽性細胞が、胎齢12日にインスリン陽性細胞が初めて現れる(1)。

胎子膵臓内分泌部の発生に対する副腎皮質ホルモンの影響は、おもに *in vitro* の実験によって、特にB細胞について研究されてきた。それらの研究によると、コルチコステロンが濃度によっては膵島の発育を刺激し(2)、膵島の発育を刺激するホルモン濃度は、膵島からのグルカゴン分泌を抑制(3)するが、

ソマトスタチン分泌を促進する(4)。しかし、これらの研究で使用した胎子は16日以降であり、胎生期後半では膵島細胞は細胞の分化がある程度完了しており、この期間は膵島細胞の分化の時期というよりは、膵島が発育増大する時期である。そこでKomatsuら(5,6)は、胎生中期(胎齢12~16日)の膵島細胞の分化に対する副腎皮質ホルモンの影響を *in vivo* で調べた。Komatsuら(6)は膵臓発生の初期の段階(胎齢12~16日)の胎子を用い、妊娠6日後に母体ADXし、膵臓が発育を開始する時期に胎子を副腎皮質ホルモンがない環境に置き、その胎子の膵島細胞の総体積を無処置群の胎子膵島の発育と免疫組織化学的に比較した。その結果、ADXは胎子膵島のインシュリン陽性細胞の初期分化を抑制し、その主な要因は母体由来の副腎皮質ホルモンの欠損であることが示唆された。そこで本研究は、ラットを用いて、母体由来の副腎皮質ホルモンが胎子膵島B細胞の発達にどのように関与するかを検討するこ

とを目的とした。

2. 方法

実験動物として Wistar ラットを用い、成熟雌のラットを雄と一晩同居させて、翌朝膣垢中に精子が認められた日を妊娠0日とした。妊娠6日目にエーテル麻酔下で母体の両側副腎を除去した (ADX 群)。副腎皮質ホルモンは胎盤を通過し、母体から胎子へ、あるいは胎子から母体へ輸送される。ラット胎子は胎齢16日前後までは副腎皮質ホルモン合成能力を獲得しないので、母体副腎を除去することによって、胎子体内に副腎皮質ホルモンが全く欠除した環境を作出することができる。

実験1：妊娠14、15あるいは16日の午後1時に剖検した。細胞分裂を観察するため、剖検2時間前に Bromodeoxyuridine (BrdU) 100 mg/kg を母体皮下に投与した。剖検時にラット胎子の膵臓を取り出し、Bouin's 液を用いて固定し、常法に従って脱水・包埋した。4 μ m の連続切片を作成し、抗 BrdU 血清を用いて抗体染色した。

膵島細胞は分泌管の壁を構成している分泌管細胞が分裂することによって形成される。そこで母体由来の副腎皮質ホルモンが欠除すると胎子膵島 B 細胞体積が減少する要因として、①分泌管の細胞分裂の抑制、②膵島細胞の分裂抑制、が考えられる。染色した標本は光学顕微鏡を用いて、胎子膵臓の分泌管及び膵島における BrdU 陽性細胞数と全細胞数をカウントし、細胞分裂指数を算定した。

実験2：母体由来副腎皮質ホルモンが胎子膵島 B 細胞の細胞分裂をコントロールしているという実験1の結果を受けて、そのメカニズムを検討するため、グルココルチコイド・レセプター (GR) と未分化細胞が膵島細胞に分化するときに最初に発現する Neurogenin 3 (Ngn3) の mRNA 発現量を調べた。胎齢15日の胎子膵臓の RNA を抽出し、半定量的 RT-PCR 法を用いて Ngn3 mRNA 発現量を測定した。

3. 結果と考察

実験1

ADX 群の分泌管における細胞分裂指数は全ての胎齢で有意に減少していた。一方胎齢14日の胎子膵臓では、ADX 群の膵島における細胞分裂指数は変化し

なかったが、胎齢15および16日の分裂指数はコントロール群の値に比べて有意に減少していた。

上記結果から、母体由来の副腎皮質ホルモンは膵島細胞の分裂を調整していることが明らかになった。また分泌管だけでなく、膵島の細胞分裂も変化したことから、分泌管からの細胞新生だけでなく、いったん膵島細胞に分化した後の細胞増殖にも関与していることが示唆された。

実験2

実験1の結果を受けて、胎齢15日の膵臓において、母体由来の副腎皮質ホルモンが膵島 B 細胞の分化にどのように関与しているかについて検討した。GR mRNA 発現量は全く変化しなかったが、ADX 群の Ngn3 mRNA 発現量はコントロール群と比較して有意に増加していた。

以上の結果から、母体由来の副腎皮質ホルモンは、胎子膵島の細胞分裂を調整していることが明らかとなった。しかし、この調節は、胎子膵臓における GR mRNA 発現量を変化させることなく、影響することが示唆された。このことは、母体由来の副腎皮質ホルモンが GR を介さずに膵島細胞の細胞増殖を調節する経路が存在する可能性も示唆する。

膵島内分泌細胞の発達と分化には多くの転写因子が関わっているが、Neurogenin 3 (Ngn3) は発達過程の中樞神経系、および胎子膵臓に発現する転写因子である (7, 8)。Ngn3 を過剰発現させた膵臓の前駆細胞は内分泌細胞への分化が促進される (9)。また、Ngn3 をノックアウトしたマウスでは膵島は形成されない (10) ことから、Ngn3 は内分泌前駆細胞マーカーであることが知られている。そこで本実験において、母体 ADX によって胎子膵臓における細胞分裂が抑制されたことから、ADX 群の膵臓では未分化細胞から膵島前駆細胞へのマーカーである Ngn3 は増加するものと予想していた。しかしながら、ADX 群の Ngn3 mRNA 発現量は予想に反して増加していた。本実験と同様の実験デザインで、膵島 B 細胞の体積を調べたところ、ADX 群の体積は胎齢12日から15日の期間はコントロール群の体積に比べて有意に減少するが、胎齢16日では体積に差は無くなった (6)。つまり ADX 群では未分化細胞から膵島細胞への分化がコントロール群に比べて幾分促進されなければならないので、ADX 群での Ngn3 mRNA が増加した可

能性も考えられる。今後さらにB細胞体積が急増する胎齢14日から16日における膵島の分化に関与する遺伝子マーカーについてさらに詳細に検討することによって、この疑問が解決する可能性もある。また母体由来の副腎皮質ホルモンが膵島での細胞分裂をどのようなメカニズムによって抑制するかについても、シグナル伝達系を検討する必要がある。

4. 要約

妊娠6日目に妊娠ラットの両側副腎除去(ADX)を行い、胎齢14日から16日の胎子膵臓を採取して、母体由来の副腎皮質ホルモンが胎子膵臓内分泌部の発生に及ぼす影響を検討した。

母体ADXは胎齢14日以降の膵島および分泌管における細胞分裂を抑制していた。しかしADX群の膵臓では未分化細胞から膵島前駆細胞へのマーカーであるNgn3は増加していた。前者の実験結果から、母体由来の副腎皮質ホルモンは胎子膵島における細胞分裂に関与することが明らかとなった。しかし、それ以降に分化過程(含むシグナル伝達系)にどのように関与しているかについては今後さらに検討すべきであると思われた。

文献

- 1) Yoshinari M, Daikoku S. 1982. *Anat Embryol* 165: 63-70.
- 2) McEvoy RC, Herge OD, and Lazarow A. *Differentiation*, 6: 14-26, 1976.
- 3) McEvoy RC. *Am. J. Anat.*, 157: 319-327, 1980.
- 4) McEvoy RC, and Madson KI. *Biol. Neonate*, 38: 248-254, 1980.
- 5) Ravassard P, Chatail F, Mallet J, Icard-Liepkalns C. 1997 *J Neurosci Res* 48: 146-158.
- 6) Komatsu S, Yamamoto M, Takizawa T, Shirai M, Arishima K, and Eguchi Y J. *Vet. Med. Sci.*, 58: 995-999, 1996.
- 7) Komatsu S, Yamamoto M, Arishima K, and Eguchi Y. *J. Anat.*, 193, 551-557, 1998.
- 8) Ravassard P, Chatail F, Mallet J, Icard-Liepkalns C. 1997 *J Neurosci Res* 48: 146-158.
- 9) Apelqvist A, Li H, Sommer L, Beatus P, Anderson DJ, Honjo T, Hrabe de Angelis M, Lendahl U, Edlund H 1999 *Nature* 400 (6747): 877-881.
- 10) Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F. 2000 *Proc Natl Acad Sci USA* 97 1607-1611.