

【19】

氏 名	はちやひろゆき 蜂谷裕之
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第636号
学位授与の日付	平成26年3月5日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (消化器外科学)
学位論文題目	Advanced glycation end products impair glucose-induced insulin secretion from rat pancreatic β-cells (最終糖化産物 [AGEs] は膵ラ氏島インスリン分泌を抑制する)
論文審査委員	(主査) 教授 麻生好正 (副査) 教授 平石秀幸 教授 安西尚彦

論文内容の要旨

【背景】

グルコースなどの糖とアミノ酸（タンパク質）が非酵素的に結合することにより、アマドリ産物が産生される。これらの反応は、メイラード反応と呼ばれている。ヘモグロビンの場合、生体内のアマドリ産物は、HbA1cと言われ、糖尿病の診断・治療効果判定として使用されている。また、グルコースとアルブミンが結合した糖化アルブミン（GA：glycated albumin）も高血糖の指標として使われている。申請者らはGA自体が膵ランゲルハンス氏島（膵ラ氏島）からのインスリン分泌を阻害することを指摘した。そして、アマドリ産物は長期間を経ると不可逆的な結合となり、advanced glycation end products (AGEs) を形成する。AGEsは実際にヒト血液中に存在しており、AGEsのレセプターは、RAGE (receptor of AGEs) と言われ、すべての臓器に存在している。それらが各臓器のレセプターに結合することによって糖尿病合併症、アルツハイマー病、NASH (nonalcoholic steatohepatitis) 等の慢性疾患の原因となる。AGEsはいくつかの種類があることが報告されており、今回の実験はグルコース由来のAGE (Glu-AGE) とグリセルアルデヒド由来のAGE (Gly-AGE) を使用した。

【目的】

Glu-AGEとGlycer-AGEによる膵ラ氏島からのインスリン分泌に対する作用を調べ、そのメカニズムを同定することを目的とした。

【対象と方法】

本研究は獨協医科大学動物実験委員会の承認後、指針に従って行った。9-10週齢のWistar rat (♂) からcollagenase法を用いて膵ラ氏島を単離した。膵ラ氏島は、10% RPMI-1640培地で終夜培養後に、bovine serum albumin (BSA)、Glu-AGE、Glycer-AGEをそれぞれ0.1mg/mLの濃度になる様に添加し、48時間接触させた。膵ラ氏島からのインスリン分泌量は、3種類のグルコース濃度(3mM : G3, 7mM : G7, 15mM : G15) 下で、培養後上清中のインスリン量を測定した。インスリン量はMean \pm SEM μ U/ 3 islets/60minで、BSA (Control)、Glu-AGE、Glycer-AGEの順で表記した。また、インスリン分泌の信号伝達系を駆動するNADH (nicotinamide adenine dinucleotide) シヤトルの遺伝子発現をRT-PCRを用いて調べた。

【結 果】

インスリン分泌量はG3において 32.5 ± 2.3 (BSA), 31.1 ± 2.8 (Glu-AGE) ($P=0.70$), and 35.3 ± 2.8 (Glycer-AGE) ($P=0.42$) とほぼ同じであった。G15においては 164.1 ± 6.0 (BSA)、 124.4 ± 4.4 (Glu-AGE) ($P<0.05$)、 119.8 ± 7.1 (Glycer-AGE) ($P<0.05$) とGlu-AGE、Glycer-AGEで有意に低下していた。細胞外高カリウム濃度 (30mM K^+)、tolbutamide (10mM)、 α -KIC (α -ketoisocaproic acid) (10mM) 添加で分泌抑制が拮抗された。また、解糖系における中間物質のglyceraldehyde (10mM)、dihydroxyacetone (10mM)、TCAサイクルの中間物質のmethylpyruvate (10mM)、インクレチンであるGLP-1 (glucagon-like peptide-1) (10nM) 添加におけるインスリン分泌促進刺激時においても抑制効果が認められた。Glu-AGE、Glycer-AGE添加によってNADHシヤトルを担っているMDH (*malate dehydrogenase*) 1/2の遺伝子発現が低下していた。

【考 察】

グルコースが細胞内に入り解糖系ならびにミトコンドリアの電子伝達系を経てATPが産生されることでK-ATPチャネルが閉鎖する。細胞膜の脱分極が起こり電位依存性L型Ca²⁺チャネルから、細胞外Ca²⁺が流入して細胞質のCa²⁺濃度が上昇することにより、インスリンが分泌される。このカスケードの中間代謝産物を添加することで、AGEsの作用点を同定するレスキュー実験を行った。細胞外高カリウム、tolbutamide添加によってインスリン分泌抑制が拮抗されたことは、K_{ATP}チャネルよりも上流に作用点があることを証明している。DHAとglyceraldehydeは解糖系に直接作用してインスリンを分泌させるが、レスキューされなかったため作用部位は解糖系よりも下流にあると考えられた。また、ミトコンドリアの燃料であるmethylpyruvateの結果からも、ミトコンドリアよりも下流で作用することを示している。 α -KICはミトコンドリアの代謝に入り、NADPHを生成する。 α -KIC添加によって分泌抑制がレスキューされたことは、作用点がTCA回路に作用することの証明である。NADHはミトコンドリアの内膜を通過することができないためNADHシヤトルという機構を利用して輸送する。それらはMdh1とMdh2によって構成されており、*Mdh1/2* 遺伝子の発現レベルが低下していた。

【結 論】

グルコース濃度 (15mM) 刺激による膵ラ氏島からのインスリン分泌は、Glu-AGE、Glycer-AGEよっ

て抑制される。Glycer-AGEは毒性を持つことが報告されているが、Glu-AGEとのインスリン分泌抑制の程度に差は認められなかった。Glu-AGE、Glycer-AGEは、エネルギー産生系にかかわるNADHシャトルに作用し、膵ラ氏島からのインスリンの分泌を低下させる。

論文審査の結果の要旨

【論文概要】

グルコースなどの糖とアミノ酸（タンパク質）が非酵素的に結合することにより、アマドリ産物が産生される。アマドリ産物は長期間を経ると不可逆的な結合となり、advanced glycation end products (AGEs) を形成する。AGEsは、各臓器で蓄積することによって糖尿病合併症、アルツハイマー病、NASH (non-alcoholic steatohepatitis) 等の慢性疾患の原因となる。申請論文ではグルコース由来のAGE (Glu-AGE) とグリセルアルデヒド由来のAGE (Glycer-AGE) を使用し、ラットの膵ラ氏島からのインスリン分泌に対する作用を調べ、そのメカニズムを同定することを目的としている。膵ラ氏島からのインスリン分泌量は、3種類のグルコース濃度 (3mM : G3, 7mM : G7, 15mM : G15) 下で、培養後上清中のインスリン量を測定した。G15においてはGlu-AGEとGlycer-AGEを添加するとインスリン分泌が有意に低下した。細胞外高カリウム濃度 (30mM K⁺)、tolbutamide (10mM)、 α -KIC (α -ketoisocaproic acid) (10mM) 添加で分泌抑制が拮抗された。また、解糖系における中間物質のglyceraldehyde (10mM)、dihydroxyacetone (10mM)、TCAサイクルの中間物質のmethylpyruvate (10mM)、インクレチンであるGLP-1 (glucagon-like peptide-1) (10 nM) 添加におけるインスリン分泌促進刺激時においても抑制効果が認められた。Glu-AGE、Glycer-AGE添加によってNADHシャトルを担っているMDH (malate dehydrogenase) 1/2の遺伝子発現が低下していた。以上の結果より、Glu-AGEとGlycer-AGEはTCAサイクルに作用して膵ラ氏島からのインスリン分泌を抑制すると結論づけている。

【研究方法の妥当性】

申請論文では、比重遠心分離法で回収したラットの膵ラ氏島を用いて、ラジオイムノアッセイ法でインスリンの分泌量を測定している。様々な中間代謝産物の添加によるレスキュー実験でAGEsの作用部位を絞り込んでいる。また、インスリン分泌に関与するNADHシャトルの遺伝子発現も評価しており、本研究方法は妥当なものである。

【研究結果の新奇性・独創性】

AGEsによってインスリン分泌が減少させることが報告されている。しかし、それらは細胞ストレスがかかる状態のAGEs濃度下で行われている。本研究では細胞ストレスがかからない低濃度のAGEsを使用して行われた。この点において本研究は新奇性に優れた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

申請論文では、確立した実験手技と統計解析を用いてAGEsによるインスリン分泌低下の作用機序を解明した。そこから導き出された結論は、論理的に矛盾するものではなく、過去の報告における知見を踏まえても妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

外科分野では周術期の血糖管理は術後合併症を減少させる上で重要である。AGEは高血糖下で多く産生されることが明らかになっており、手術前後にしっかりと血糖管理をすることの重要性に結び付くと思われる。

【申請者の研究能力】

申請者は、AGEsに関する知識（生成や生体への影響）を得たうえで、作業仮説を立て、実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。その研究結果は当該領域への国際誌への掲載が承認されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって博士（医学）の学位授与に相応しいと判定した。

（主論文公表誌）

Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences

21 : 134-141, 2014