

【12】

氏 名	多 胡 和 馬
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第691号
学位授与の日付	平成29年3月7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	Receptor for advanced glycation endproducts signaling cascades are activated in pancreatic fibroblasts, but not in the INS1E insulinoma cell line : Are mesenchymal cells major players in chronic inflammation? (Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) シグナルは膵線維芽細胞では活性化するが、インスリノーマINS1E細胞株では活性化しない：慢性炎症における間質細胞の果たす役割)
論文審査委員	(主査) 教授 麻 生 好 正 (副査) 教授 白 瀧 博 通 教授 杉 本 博 之

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

近年、自然免疫におけるパターン認識受容体であるTolls like receptor (TLR) やnucleotide-binding oligomerization domain (NOD) -like receptor (NLR) が慢性炎症に関連していることがわかってきた。同様にパターン認識受容体として知られているreceter for advanced glycation endproducts (RAGE) がTLRと共通のシグナルを共有している報告やRAGE下流のmitogen-activated protein (MAP) kinaseが活性化され炎症が惹起されるとの報告がある。これらのことはRAGEもTLR、NLRと同様に自然免疫を担う受容体であることを示唆している。以前我々は、RAGEのリガンドであるadvanced glycation endproducts (AGEs) がラット膵ラ氏島におけるインスリン分泌を抑制することを報告した。しかし、遺伝子発現を調べたところ、AGEsについてそれまで報告されたような毒性や酸化ストレスは確認されなかった。これはAGEsが毒物一般として作用するよりむしろ、RAGEを介して特定のシグナルを刺激している可能性を示唆している。

【目 的】

本研究の目的は、AGEsによる膵ラ氏島におけるインスリン分泌抑制の機序を調べることにある。

【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を得て、指針に従って行った。

RAGEのリガンドとしてAGEsとhuman recombinant high mobility group box 1 (HMGB1) を、炎症シグナルの阻害剤として梅肉エキスのMK615を使用した。膵実質細胞としてインスリノーマ INS1E-cell lineを、膵間質細胞として膵線維芽細胞を使用した。培養液中に放出されたインスリンはELISAで測定した。実質・間質それぞれの細胞においてRAGE受容体下流のリン酸化カスケードとしてc-jun N-terminal kinase (JNK)、p38、protein kinase B (AKT)、I κ B kinase (IKK)、nuclear factor κ B(NF- κ B)をWestern blot analysisで測定した。また炎症サイトカインのRANTES、IL-1 β 、IL-6の発現変化をreal-time PCR systemで測定した (delta-cycle of threshold: Δ CT値を使用した)。統計にはanalysis of variance(ANOVA)及び、post hoc testとしてT検定を用い $p < 0.05$ を有意差とした。

【結 果】

ラット膵線維芽細胞においてAGEsまたは、HMGB1がMAPKを介した炎症性シグナルを活性化していた。さらに、炎症性サイトカインであるRANTES、IL-1 β 、IL-6の発現に関しても、膵線維芽細胞ではAGEs刺激による Δ CTはRANTES: $5.1 \pm 2.96 \rightarrow 10.85 \pm 1.85$ ($p=0.036$)、IL-1 β : $8.1 \pm 5.46 \rightarrow 14.11 \pm 1.99$ ($p=0.024$)、HMGB1刺激による Δ CTはRANTES: $5.1 \pm 2.96 \rightarrow 11.45 \pm 3.69$ ($p=0.041$)、IL-1 β : $8.1 \pm 5.46 \rightarrow 15.16 \pm 3.37$ ($p=0.010$)、IL-6: $9.1 \pm 6.26 \rightarrow 14.35 \pm 3.12$ ($p=0.037$) で、両方の刺激によって発現が有意に増加した。しかし、INS-1E細胞ではMAPKを介した炎症性シグナルを活性化や炎症性サイトカインの発現増加はみられなかった。次に、膵線維芽細胞で活性化した炎症反応が膵ラ氏島におけるインスリン分泌にどのような影響を及ぼすか検討するために、線維芽細胞の培養上清をINS-1E細胞に接触させた後のインスリン分泌を測定した。その結果、AGEs刺激によりインスリン分泌が低下している傾向があった。これらの結果はAGEsが膵線維芽細胞において、RAGEシグナル経路を活性化し、間接的に膵 β 細胞内に影響を及ぼすことを示唆した。ラットランゲルハンス島 whole mount培養においてAGEsはインスリン分泌を抑制したことに対し、MK615投与群はAGEsによるインスリン分泌抑制を有意に改善していた。

【考 察】

以前我々は、AGEsがラット膵ラ氏島におけるインスリン分泌を抑制することを報告した。しかし、AGEsについてそれまで報告されたような毒性や酸化ストレスは確認されなかった。そこで我々は近年炎症に関連すると報告されているRAGEを介して、AGEsはインスリン分泌を抑制すると仮定した。さらに、慢性炎症において線維芽細胞が重要な因子であるとする様々な報告があり線維芽細胞での反応に着目した。我々のデータではAGEsやHMGB1が膵臓線維芽細胞中のRAGEを活性化し、続いてサイトカインを分泌しINS-1E細胞からのグルコース刺激によるインスリン分泌を間質的に抑制することが示唆された。また、膵実質細胞より膵間質細胞の方がRAGE シグナルにおいて重要な役割を果たしていることも明らかになった。以前、我々はMK615が肝細胞癌におけるRAGEの発現を抑制することを報告した。これと同様にINS-1E細胞ではMK615刺激によりRAGE発現は減少したが、膵線維芽細胞では増加した。一方、AGEsやHMGB1刺激ではRAGEの発現は減少した。MK615の作

用に関しては不明な点があるが、膵線維芽細胞でのこれらの変化はRAGEシグナルを介するフィードバックが影響していると思われた。AGEsは膵線維芽細胞におけるRAGEシグナルを介して、炎症性シグナルを活性化し、炎症性サイトカインを増加し、間接的に膵β細胞におけるインスリン分泌を抑制し、さらにMK615はその作用を改善していることが考えられた。

【結 論】

RAGEリガンドは膵線維芽細胞においてはRAGEリン酸化カスケードを活性化し、炎症性サイトカインを誘導したが、インスリノーマINS-1E細胞ではそのような現象は見られなかった。RAGEリガンドは膵臓間質細胞のRAGEシグナル活性化を介して、パラクラインシグナルを介して膵β細胞からのインスリン分泌を抑制している可能性が示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

Advanced glycation endproducts (AGEs) がラット膵ラ氏島におけるインスリン分泌を抑制することを以前報告した。申請論文ではAGEsによる膵ラ氏島におけるインスリン分泌抑制の機序を調べることを目的に、receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) のリガンドとしてAGEsと human recombinant high mobility group box 1 (HMGB1) を、炎症シグナルの阻害剤として梅肉エキスのMK615を使用した。

膵実質細胞としてインスリノーマINS-1E細胞株を、膵間質細胞として膵線維芽細胞を使用した。培養液中に放出されたインスリンはELISAで測定した。実質・間質それぞれの細胞において、RAGE受容体下流のリン酸化カスケード (c-jun N-terminal kinase (JNK)、p38、protein kinase B (AKT)、IκB kinase (IKK)、nuclear factor κB (NF-κB)) をWesternブロッティングで測定した。また上記カスケードの標的遺伝子である、炎症性サイトカインRANTES、IL-1β、IL-6の発現変化をreal-time RT-PCR systemで測定した。

ラット膵線維芽細胞においてAGEsまたは、HMGB1がRAGEシグナルを活性化し、さらに、炎症性サイトカインであるRANTES、IL-1β、IL-6の発現も有意に増加した。しかし、INS-1E細胞ではRAGEシグナル活性化や炎症性サイトカインの発現増加はみられなかった。次に、膵線維芽細胞で活性化した炎症反応が膵ラ氏島におけるインスリン分泌にどのような影響を及ぼすか検討するために、線維芽細胞の培養上清をINS-1E細胞に接触させた後のインスリン分泌を測定した。その結果、AGEs刺激によりインスリン分泌が低下している傾向があった。しかしながら、INS-1E細胞をAGEsで直接刺激したときは、このような現象は見られなかった。これらの結果から、AGEsは膵線維芽細胞におけるRAGEシグナルを介して、炎症性サイトカインを増加し、間接的に膵β細胞におけるインスリン分泌を抑制している可能性が考えられたと結論づけている。

【研究方法の妥当性】

申請論文では、古典的な膵β細胞モデルであるINS-1E細胞を実験系として採用している。AGEsおよびHMGB1は代表的なRAGEリガンドであり、抗炎症化合物として使用したMK615の毒性・有効濃

度も他施設で確認されている。RAGE受容体の下流リン酸化カスケードおよび標的遺伝子も文献情報から妥当な分子を選択した。その他使用した測定系や実験系は、経験ある共著者により指導されたもので技術的な不安点はない。また妥当な比較対象を用いて十分な例数の実験を繰り返したことで、結論を導き出す上で統計的な根拠が得られたと考えている。

【研究結果の新奇性・独創性】

AGEsによる膵ラ氏島におけるインスリン分泌抑制の機序は明らかではない。

申請論文では、AGEsがRAGEシグナルを活性化することに着目した。興味深いことは、AGEsは膵β細胞に直接作用せず、膵線維芽細胞におけるRAGEシグナルを介して、炎症性サイトカインを増加し、間接的に膵β細胞におけるインスリン分泌を抑制している点である。従来RAGE受容体はユビキタスに発現していると考えられていたが、最近の報告によると膵β細胞では発現が見られず、糖尿病モデルラットの間質細胞で発現上昇する。また心筋梗塞・再還流モデルマウスでは、インフラマゾーム炎症シグナルが心臓線維芽細胞で活性化するのに対して、心筋実質細胞では活性化しない。これらの事実から、RAGEシグナルはインフラマゾームと同様、間質細胞で機能する自然免疫シグナルであることが示唆される。

【結論の妥当性】

申請論文ではラット膵線維芽細胞においてWestern blot analysis、及びreal-time PCR systemでAGEsまたは、HMGB1がRAGEシグナルを活性化し、さらに炎症性サイトカインであるRANTES、IL-1β、IL-6の発現も増加した。これらの結果から検討された作用機序は細部に検討の余地はあるものの論理的な矛盾はない。またこの仮説を支持する他施設での報告も合わせると、生物学的に妥当な結論を導き出したと考えている。

【当該分野における位置付け】

申請論文は、RAGEシグナルを介する自然免疫における線維芽細胞つまり間質組織の重要性を再認識させる興味深い論文である。膵臓における炎症疾患の機序解明、治療に貢献できる意義深い研究と評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、これまでの研究成果や様々な論文を学び、独自の仮説を立て、適切に本研究を遂行し興味深い結果を得ている。その研究成果は膵臓領域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博士（医学）に相応しいと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究であり、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）

Islets

8 : 135-144, 2016