

氏名	おおもり けいこ 大森 恵子
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	乙第 725号
学位授与年月日	平成 28年 12月 12日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第4条第3項該当
学位論文名	膵臓低温保存による膵島障害の機序の解明およびアポトーシス誘導遺伝子 BBC3 の関与について
論文審査委員	(委員長) 教授 富永 眞一 (委員) 准教授 西村 渉 准教授 佐久間 康成

論文内容の要旨

1 研究目的

近年、膵島細胞移植は、1型糖尿病の治療として効果があると報告されている。しかし、膵臓の長時間保存により、膵島分離操作後の膵島の収率および生存率が低下することから、移植に必要な膵島が十分に回収できないことが課題となっている。膵臓低温保存は細胞代謝を最小限に抑制し、虚血による細胞の障害を抑えることから、移植時の膵臓搬送に必要な手段となっているが、現在の保存法には限界がある。従って、膵臓低温保存法および膵島分離法の改善により、膵島細胞の障害や細胞死（アポトーシス）を防ぐ必要がある。アポトーシス誘導遺伝子 BCL2 Binding component 3 (BBC3) はβ細胞死を司る遺伝子であり、炎症性サイトカインや酸化ストレス、低酸素、小胞体ストレス等で誘導されることが知られているが、BBC3 と低温保存に起因する膵島細胞死の関連は明らかではない。そこで、膵臓低温保存に起因する膵島細胞死の機序を解明し、その過程における BBC3 の関与を明らかにすることを目的に研究を行った。

2 研究方法

ラット膵臓を16時間4℃で University of Wisconsin(UW)液にて保存後、コラゲナーゼを用いて膵島を消化・遠心分離し、顕微鏡下でハンドピック（膵島をピペットにて回収）により分離直後の膵島数を評価した。続いて37℃で培養し、経時的な膵島生存率を Propidium Iodide (PI) 蛍光染色にて観察した。また、β細胞の形態の変化を電子顕微鏡にて観察した。培養前後の mitogen-activated protein kinase (MAPK) の活性化、Heat shock protein (HSP)70 蛋白、Caspase-3 の活性化、および Bbc3 蛋白の変化をウエスタンブロット法にて、小胞体ストレス応答関連遺伝子、Bbc3 遺伝子の変化を RT-PCR 法にて評価した。膵島内酸化ストレスの関与を 4-hydroxynonenal (HNE) Adduct Competitive ELISA 法にて測定した。

膵島の低温保存障害と BBC/Bbc3 の関連は以下の3つの実験モデルを用いて評価した。1) Bbc3 siRNA もしくはコントロール siRNA をトランスフェクションしたルシフェラーゼ遺伝子導入ラット (Firefly ラット) の膵島を18時間 UW 液にて低温保存した後、6時間培養後の細胞活性をルシフェラーゼ-ルシフェリン反応によって測定した。2) Bbc3 欠損マウスおよび野生型マウスの膵臓を8時間 UW 液にて低温保存後、分離した膵島数、24時間培養後の膵島生存率 (PI 染色)、

および 3 mM に引き続く 17 mM グルコース灌流刺激による膵島のインスリン分泌能を評価した。また、High-mobility group box 1 protein (HMGB1) 蛋白、Caspase-3 の活性化および 4-HNE 蛋白付加体をウェスタンブロット法にて、膵島培養液中の HMGB1 濃度を ELISA 法にて測定した。3) ヒト膵臓および膵島を用いて膵臓保存、膵島分離中の BBC 蛋白の変化、および膵島の低酸素下 (1%酸素) における低温保存-培養前後の BBC3 蛋白および遺伝子の変化を、それぞれウェスタンブロット法、RT-PCR 法にて評価し、低温保存-培養前後の膵島生存率 (PI 染色) を比較した。

3 研究成果

16 時間の膵臓低温保存は、低温保存なしの膵臓に比べて、膵島の収率を有意に減少させ、続く 6 時間の培養においても膵島生存率を著明に低下させた。電子顕微鏡観察では、細胞の膨張、細胞膜およびミトコンドリア膜の崩壊、小胞体のバルーン化が低温保存膵臓から分離した β 細胞に確認された。また、低温保存により膵島の MAPK の活性化と脂質リン酸化の副産物である 4-HNE の増加、および細胞保護蛋白である HSP70 発現の増加が認められた。一方、膵島の小胞体ストレスが、低温保存の有無に関わらず膵島分離後に検出された。膵島分離後の培養にて Caspase-3 の活性化、Bbc3 遺伝子および蛋白の上昇が認められ、膵島のアポトーシスとの関与が示唆された。

Bbc3 siRNA によって Bbc3 遺伝子発現を抑制した Firefly ラットの膵島の低温保存-培養後の膵島細胞活性は、コントロール膵臓に比較して有意に高く保たれ、Bbc3 と膵島低温保存障害の関与が示唆された。次に、Bbc3 と膵臓低温保存後の膵島障害の関与を調べたところ、低温保存後の Bbc3 欠損マウス膵臓から分離した膵島数は野生型マウスの膵臓から分離した膵島数と有意な相違はなかった。これに対し、分離に続く 24 時間培養後の Bbc3 欠損膵島の生存率は野生型に比べて有意に高く、低温保存を行わなかった野生型膵臓から分離した膵島の生存率と同等であった。また、膵島および培養液中の HMGB1 は Bbc3 遺伝子欠損膵島では野生型膵臓に比較して有意に低く、Bbc3 遺伝子欠損膵島における 4-HNE 低値と同様の傾向を示した。一方、Caspase-3 の活性化は低温保存の有無に関わらず検出されなかった。培養後の膵島機能を第一相インスリン分泌量によって比較したところ、低温保存後の膵臓から分離した野生型膵島では Bbc3 欠損膵臓に比較して有意な低値を示した。ヒト膵臓保存、膵島分離の過程における BBC3 蛋白の発現の変化を調べたところ、消化後膵組織では、低温保存前膵組織に比較して BBC3 蛋白の著明な上昇を示した。ヒト膵島を低酸素条件下で低温保存した後に 24 時間培養すると、膵島内の BBC3 遺伝子および BBC3 蛋白は培養前に比べ培養後に有意に上昇したのに対し、常酸素下で低温保存した場合にはその上昇は認められなかった。低温保存に続く培養後の膵島の生存率を評価したところ、低酸素下で低温保存した膵島では通常酸素下で低温保存した膵臓に比較して生存率が有意に低下した。一方、低酸素の有無にかかわらず、低温保存した膵島の生存率を低温保存前と比較すると、生存率が有意に低下した。

4 考察

膵臓低温保存による膵島細胞死の機序として、低温保存による酸化ストレスの上昇が培養後の膵島内の細胞膜およびミトコンドリア膜の破壊をもたらす一因となったと考察された。膵島細胞死におけるアポトーシスの関連が示されたが、Caspase-3 の活性化のピークが培養 2 時間後であ

ったのに対し、Bbc3 蛋白発現のピークは 6 時間後であり、早期の Caspase-3 の活性化は Bbc3 と独立した機序により引き起こされている可能性がある。また、このピークの時差は蛋白の安定性の相違による可能性も考えられた。本研究では、低温保存後膵臓から分離された Bbc3 遺伝子欠損膵島中の HMGB1 の低下の機序を解明することは出来なかったが、HMGB1 の低下が 4-HNE 産生の低下につながり培養後の細胞死を抑制すると考察された。膵臓保存後に分離した膵島内の Caspase-3 の活性化が検出されなかった理由としては、検体採取のタイミングの問題が考えられた。ヒト膵島分離中の膵組織の BBC3 蛋白の上昇を示したが、膵島の膵組織中に占める割合は 2-3%にすぎないため、膵島に特異的な反応とは確定できない。また、ヒト膵島中の BBC3 遺伝子および蛋白発現は低酸素の有無に関わらず低温保存前後で変化がなかったのに対し、低酸素で低温保存すると培養後に BBC3 の上昇が認められた。このことから、低温保存中の低酸素による細胞障害は、37°C 復温による細胞活性上昇時に増強され、BBC3 遺伝子および蛋白の上昇、さらには細胞死に至ると考察された。

5 結論

膵臓低温保存に引き続く膵島分離および培養中の膵島細胞死は、細胞膜や細胞小器官膜の破壊および脂質リン酸化をともなう酸化ストレスの上昇と関連すること、膵臓および膵島の低温保存に起因する膵島細胞障害にはアポトーシス誘導遺伝子 BBC3/Bbc3 が関与することが明らかになった。本研究の成果は、膵島移植療法における膵島低温保存障害を抑制する長期低温保存法の開発、および膵島分離法の改善に貢献することが期待される。

論文審査の結果の要旨

膵島移植は難治性 1 型糖尿病の治療として有効である。問題点は、ドナー不足に加えて、長期虚血低温保存後の再灌流障害による成功率の低下である。現在まで様々な炎症起因物質が β 細胞死をもたらすことがわかっているが、本研究はアポトーシスを誘導することが知られている Bbc3 遺伝子に焦点を当て、低温保存後の復温による細胞障害と Bbc3 との関連の有無を調べ、これを指標に今後の膵島移植の成功率上昇を目指した取り組みに資することを目的に行われた。

ラット、マウス、ヒトの膵臓を材料に、様々なアッセイ法を駆使して研究を行った結果、

- (1) 低温保存後の復温により、caspase-3 の活性化が促進されること。
- (2) 低温保存後の復温にて、Bbc3 mRNA および Bbc3 タンパク質が増加すること。さらに siRNA による Bbc3 発現のノックダウンで細胞障害が軽減されること。
- (3) Bbc3 欠損マウスでは、低温保存後復温の場合に野生型の場合と比べて、膵島細胞の HMGB1 が減少、脂質過酸化物が減少し、一方でグルコース反応性インスリン分泌能は高くなること。

がわかった。

以上より、アポトーシス誘導遺伝子として知られる Bbc3 が低温保存後の膵島細胞生存に負の影響を与えていることが明らかにされた。この成果は既に申請者を筆頭著者として、*Cryobiology* 73 (2016) 126-134 と *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 310 (2016) E1016-E1026 に報告されて

いる。

なお、提出された論文の中に図の不備と、日本語として誤解を生じる部分があり、改訂が指示された。

本研究の成果は臍島移植の方法改善に役立つと考えられ、学位論文に値すると委員全員により判断された。

試問の結果の要旨

申請者は、本研究の目的、背景と意義、用いた方法、結果、考察をわかりやすく説明できた。その後審査委員により質疑応答がなされた。臍島の障害が低温保存のためなのか、低酸素のためなのかを切り分ける実験ができないかとの質問に対して、実験系の限界を述べることができた。また、提出された論文の中に図の不備があったが、単純なミスであり発表の際に申請者から訂正の申し出があった。長年国外で研究、診療活動をしていたためか、国語の表現で何箇所か誤解を生じる部分があった。例えば、caspase-3の活性化とすべきところがcaspase-3活性とされていた。審査委員の指摘には真摯な態度で応じ、わからないことについては正直にわからないと表明できていた。関連領域に関する知識は、十分とは言えないが一定のレベルに達していると判断された。

紹介教員の指導のもと論文を改訂してもらった上で、最終試験合格とした。