

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
佐野寛行	主査 教授 石坂 信和 副査 教授 浮村 聡 副査 教授 朝日 通雄 副査 教授 佐野 浩一
主論文題名 Exendin-4, a Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonist, Suppresses Pancreatic β -Cell Destruction Induced by Encephalomyocarditis Virus (グルカゴン様ペプチド-1 受容体作動薬 exendin-4 は脳心筋炎ウイルスにより誘導される膵 β 細胞破壊を抑制する)	
学位論文内容の要旨	
《背景および目的》 劇症 1 型糖尿病は、感冒様症状の後に糖尿病ケトアシドーシスに陥って発症するのが特徴で、その背景に極めて急激な膵 β 細胞破壊が存在する。発症直後の膵組織の検討で、膵島への高度なマクロファージ浸潤、膵組織内のエンテロウイルスの存在が確認され、ウイルス感染との関わりが強く示唆されるに至った。しかし膵 β 細胞破壊の詳細なメカニズム、破壊を抑制する有用な方法は未だ明らかではない。 グルカゴン様ペプチド-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) は食事刺激によって小腸から分泌されるホルモンで、血糖依存的にインスリン分泌を促進する。近年、2 型糖尿病の治療薬として GLP-1 受容体作動薬が開発されたが、それと同時に GLP-1 に膵 β 細胞のアポトーシス抑制作用、心筋保護作用などの多面的な薬理作用が存在することが明らかとなった。そこで我々は、GLP-1 受容体作動薬がウイルス誘発性の膵 β 細胞破壊に与える影響をモデル動物で明らかにし、劇症 1 型糖尿病の治療法の開発に資することを目的とした。	

《方 法》

モデル動物の作成と GLP-1 受容体作動薬の作用の検討

劇症 1 型糖尿病のモデルマウスとして 200PFU の encephalomyocarditis virus (EMCV) を DBA/2 マウスに感染させ糖尿病を誘発させた。ウイルス感染の 2 日前から、GLP-1 受容体作動薬である exendin-4 を高用量 (40nmol/kg/day) または低用量 (20nmol/kg/day) で 10 日間腹腔内投与し、14 日間にわたって非投与群と糖尿病の発症率、血糖値の推移、死亡率、体重変化を比較した。また感染 15 日目に糖負荷試験を行い、耐糖能を比較した。その後マウスより膵臓を摘出し、塩酸エタノール法および ELISA を用いて膵インスリン含有量を測定した。

組織学的解析

ウイルス感染から 48、72、96、120 時間後、高用量投与群と非投与群のマウスから膵臓を摘出し、パラフィン包埋切片を作成。膵β細胞を抗インスリン抗体で、マクロファージを抗 Mac-2 抗体で染色し、膵島当りの膵β細胞面積、マクロファージ数を算出した。

フローサイトメトリーによるアポトーシスアッセイ

膵β細胞株 MIN6 に EMCV (1PFU/cell) を感染させ 48 時間培養した。その後 annexin V-FITC でアポトーシス細胞を、PI (propidium iodide) でネクローシス細胞を染色し、フローサイトメトリーで比率を解析した。MIN6 に apoptosis inducer である staurosporine 2μ M exendin-4 12nM を添加して 18 時間培養し、同様の解析を行った。

マクロファージにおける TNF-α、IL-1β、iNOS 遺伝子発現解析

マクロファージ細胞株 RAW264 に EMCV (1PFU/cell) を感染させ 12 時間培養した。また、RAW264 に lipopolysaccharide (LPS) 1μg/ml を添加して 1 時間培養した。それぞれにおいて、exendin-4 12nM または exendin-4 12nM と adenylate cyclase inhibitor である MDL-12330A 5μ Mをその 1 時間前より添加する群を設定した。培養終了後、各群マクロファージより RNA を抽出し、TNF-α、IL-1β、

iNOS 遺伝子発現をリアルタイム PCR にて解析した。

《結 果》

高用量投与群の糖尿病発症率は、非投与群と比べ有意に低く、血糖値の推移も低用量投与群および非投与群と比べて有意に低かった。体重減少はすべてのマウスで観察されたが、高用量投与群において最も軽度であった。生存率は高用量投与群で最も高かった。感染後 15 日目の糖負荷試験において、高用量投与群の糖負荷後の血糖上昇は非投与群と比べ有意に抑制された。膵インスリン含有量は用量依存的に維持されていた。組織学的検討において、高用量投与群は非投与群に比べ有意に膵β細胞面積が保持され、感染 72 時間後と 120 時間後における膵島浸潤マクロファージ数が有意に少数であった。*In vitro*において、EMCV は膵β細胞を直接的に破壊しなかったが、staurosporine による膵β細胞アポトーシスを、exendin-4 は抑制した。*In vitro*において、EMCV と LPS はマクロファージを活性化し、TNF- α 、IL-1 β 、iNOS 遺伝子の発現を上昇させたが、exendin-4 はそれらを抑制した。

《考 察》

本研究において、exendin-4 が EMCV によって誘導される糖尿病の発症を抑制することが示された。exendin-4 は膵β細胞のインスリン分泌を促進させて血糖値を改善させるが、膵β細胞破壊が抑制され、膵島へのマクロファージ浸潤も軽減していたことから、それとは異なる機序が作用したと考えられた。フローサイトメトリーの結果、exendin-4 は、staurosporine による膵β細胞アポトーシスを抑制したが、EMCV は直接膵β細胞を破壊しなかったため、本マウスにおける膵β細胞破壊はマクロファージを介した何らかの液性因子により惹起されているものと考えられた。そこで、感染マクロファージ、および LPS 刺激マクロファージに対する exendin-4 の影響を検討したところ、exendin-4 は TNF- α 、IL-1 β 、iNOS 遺伝子

発現の上昇を抑制することが明らかとなった。

以上より exendin-4 は活性化マクロファージに対する炎症性サイトカインの発現抑制効果、膵β細胞に対する抗アポトーシス効果を介して、EMCV により誘導される糖尿病発症を抑制したと考えられた。

《結 語》

Exendin-4 は、マクロファージの膵への遊走を抑制し、さらにマクロファージに対する炎症性サイトカインの発現抑制効果、膵β細胞に対する抗アポトーシス効果を介して、EMCV 誘導性の膵β細胞破壊を抑制する。本研究により、exendin-4 が劇症 1 型糖尿病の治療に資する可能性が示唆された。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲第 号	氏 名	佐野 寛行
論文審査担当者		主査 教授 石坂 信和	
		副査 教授 浮村 聡	
		副査 教授 朝日 通雄	
		副査 教授 佐野 浩一	
主論文題名			
<p>Exendin-4, a Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonist, Suppresses Pancreatic β-Cell Destruction Induced by Encephalomyocarditis Virus</p> <p>(グルカゴン様ペプチド-1 受容体作動薬 exendin-4 は脳心筋炎ウイルスにより誘導される膵β細胞破壊を抑制する)</p>			
論文審査結果の要旨			
<p>劇症 1 型糖尿病は、ウイルス感染の後に極めて短期間で膵β細胞が破壊されて発症すると推察されているが、膵β細胞破壊の詳細なメカニズムや、それを抑制する有用な治療は未だ確立されていない。申請者は、encephalomyocarditis virus をマウスに感染させ、劇症 1 型糖尿病類似の病態を再現し、多面的作用を持つとされる消化管ペプチドホルモン、グルカゴン様ペプチド-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1)の受容体作動薬である exendin-4 の投与が、ウイルスによって誘導される膵β細胞破壊にどのような影響を及ぼすかを検討した。</p> <p>その結果、GLP-1 受容体作動薬である exendin-4 をウイルス感染前より投与すると、糖尿病の発症を有意に低下させた。その効果の背景として、exendin-4 による膵β細胞に対する抗アポトーシス効果、活性化マクロファージの TNF-α、IL-1β、iNOS の遺伝子発現抑制効果が重要であり、それらの結果として膵島浸潤マクロファージ数の減少、および膵β細胞破壊の抑制へと繋がったことを示した。</p> <p>ウイルス感染糖尿病モデルにおいて、exendin-4 が活性化マクロファージに対し</p>			

て炎症性サイトカインの発現を抑制したことは、GLP-1 受容体作動薬の臨床的応用に新たな可能性を提示したと言える。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

（主論文公表誌）

Biochemical and Biophysical Research Communication

404(3): 756-761, 2011