



Title	High-mobility group box 1 fragment ameliorates chronic pancreatitis induced by caerulein in mice
Author(s)	北國, 大樹
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/101820">https://hdl.handle.net/11094/101820</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

# 論文内容の要旨

## Synopsis of Thesis

氏 名 Name	北國 大樹
論文題名 Title	High-mobility group box 1 fragment ameliorates chronic pancreatitis induced by caerulein in mice (High-mobility group box 1 フラグメントはマウスにおいてセルレインにより誘導された慢性膵炎を改善させる)
<p>論文内容の要旨</p> <p>〔目 的 (Purpose) 〕</p> <p>慢性膵炎 (CP: Chronic pancreatitis) は、アルコール摂取や結石により膵臓に持続的な炎症が起こり、膵機能が廃絶し、膵臓組織が線維組織に置換される疾患である。約20%は原因不明であり、炎症・線維化を改善する根治的治療はない。このように炎症・線維化の進行を伴う疾患はCPや肝硬変等、多数あり、各々の疾患モデルマウスを用いた研究がおこなわれ、近年では、抗炎症作用や抗線維化作用を有する間葉系幹細胞 (MSC: Mesenchymal stem cell) を投与する方法が検討されている。しかしながら、この方法では、MSCの培養過程で機能を喪失すること、細胞培養や保存に費用と時間を要することなどの問題がある。ところで、炎症反応の際に血中に分泌される蛋白としてHigh mobility group box1 (HMGB1) がある。HMGB1は、骨髄中のCXCR4<sup>+</sup>PDGFR <math>\alpha</math><sup>+</sup>MSCを血液中に動員する作用を持つA-boxと炎症反応を誘導するB-boxで構成される。本研究では、HMGB1蛋白のうちA-box (HMGB 1 フラグメント) のみを製剤としたHMGB1ペプチドに着目し、HMGB1ペプチドがCPにおける炎症・線維化を改善させるかどうかを検討することを目的とした。</p> <p>〔方法ならびに成績 (Methods/Results) 〕</p> <p>1) CPモデルの作成</p> <p>C57BL/6Jマウスに1日6回のセルレイン (50 <math>\mu</math> g/kg) を週3回、4週間腹腔内に投与しCPモデルを作成した。投与開始から28日目に膵臓を摘出し、組織学的評価を行った。炎症細胞の浸潤を膵臓小葉の50%以上に認め、またコラーゲン線維を膵臓小葉の面積の約14%に確認した (10視野平均、N=5)。摘出した膵臓からmRNAを抽出し、炎症関連遺伝子 (<i>Interleukin-1 beta (Il1b)</i>、<i>Interleukin-6 (Il6)</i>) の発現をRT-PCRで評価した。非セルレイン投与群 (非CP群) と比較しそれぞれ21.8<math>\pm</math>7.1倍、7.6<math>\pm</math>4.3倍であった (p&lt;0.05, N=5/群。以下p&lt;0.05を有意差ありとした)。</p> <p>2) CPモデルにおけるHMGB1ペプチドの治療効果の検討</p> <p>次にHMGB1ペプチドの効果を評価した。CPモデル作成に並行し、生理食塩水 (以下生食) を週3回経静脈的に投与する生食群 (N=5) と同量の生食を溶媒としたHMGB1ペプチド (5 <math>\mu</math> g/g) を週3回投与するペプチド群 (N=5) の2群に分け、28日目に膵臓を摘出し、組織学的評価を行った。膵臓小葉における炎症細胞の浸潤は、生食群では50%以上に認めたが、ペプチド群では50%以下であった。また膵臓小葉におけるコラーゲン線維は、生食群では面積で約14%、ペプチド群は約8%であった (10視野平均)。また、炎症性サイトカイン関連mRNA (<i>Il1b</i>、<i>Il6</i>) の発現は、ペプチド群で0.39<math>\pm</math>0.15倍、0.19<math>\pm</math>0.09倍に低下した。膵臓組織におけるコラーゲン線維の濃度を、間接的ではあるが、Hydroxyproline assayで測定すると、Hydroxyprolineの濃度は、ペプチド群で低値であった (生食群: 24.8<math>\pm</math>4.0 <math>\mu</math> g/mg、ペプチド群: 19.1<math>\pm</math>2.1 <math>\mu</math> g/mg)。</p> <p>3) CPモデルにおけるHMGB1ペプチドの効果発現メカニズムの検討</p> <p>CPの進行に<i>Cellular communication network factor 2 (Ccn2)</i>の発現上昇と<i>Phosphatase and tensin homolog (Pten)</i>の発現低下が関与することが報告されており、膵臓を構成する単一細胞レベルの遺伝子発現にHMGB1ペプチド投与が与える影響を解析するため、非CP群、生食群、ペプチド群から膵臓を28日目と56日目に摘出し、Single-cell RNA sequencingを実施した (N=3/群)。コラーゲン関連遺伝子を発現するPDGFR <math>\alpha</math><sup>+</sup>細胞集団において、非CP群と生食群を比較すると、56日目で生食群において<i>Ccn2</i>の発現は5.39倍と上昇し、<i>Pten</i>の発現は0.73倍に低下していた。生食群とペプチド群を比較すると、56日目でペプチド群において<i>Ccn2</i>の発現が0.45倍に低下し、<i>Pten</i>の発現は1.53倍に上昇した。</p> <p>次に、HMGB1ペプチド投与により線維化した膵臓へのCXCR4<sup>+</sup>PDGFR <math>\alpha</math><sup>+</sup>MSCの遊走を確認するため、C57BL/6JマウスとGFP-トランスジェニック (GFP-Tg) マウスを外科的に結合するパラバイオーシスモデルを作成した。C57BL/6Jマウスにセルレイン (50 <math>\mu</math> g/kg) を1日6回を週3回、4週間腹腔内投与し、それと並行してGFP-TgマウスにHMGB1ペプチド (5 <math>\mu</math> g/g) または生食 (5 <math>\mu</math> L/g) を経静脈的に投与した。56日目にC57BL/6Jマウスから膵臓を摘出し、膵臓組織に蛍光免疫組織染色を実施した。ペプチド群では生食群と比較し、GFP<sup>+</sup>細胞中のCXCR4<sup>+</sup>PDGFR <math>\alpha</math><sup>+</sup>MSCの割合が高く (35.6<math>\pm</math>7.9%、4.8<math>\pm</math>5.2%、N=4/群)、CXCR4<sup>+</sup>PDGFR <math>\alpha</math><sup>+</sup>MSCが膵臓に遊走していることが示された。</p> <p>〔総 括 (Conclusion) 〕</p> <p>セルレイン誘導慢性膵炎モデルマウスにHMGB1ペプチドを投与することで膵線維化の改善を認め、CXCR4<sup>+</sup>PDGFR <math>\alpha</math><sup>+</sup>MSCの膵臓への誘導が関与することを示した。</p>	

【記入要領

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名)				
北國 大樹				
論文審査担当者	(職)	氏 名		
	主 査	大阪大学教授	江口 英利	署 名
	副 査	大阪大学教授	妻木 乾行	署 名
	副 査	大阪大学教授	下村 洋一郎	署 名

論文審査の結果の要旨

本論文は、現在根本的な治療法が存在しない線維化を主体とする慢性膵炎に対して新たな治療戦略を見出すための基礎医学研究として、同じく線維化が原因となる肝硬変や肺線維症で、炎症関連タンパクであるHMGB1のA Box部位（以下HMGB1ペプチド）が組織再生効果を持つことを利用した治療が、効果をあげていることから、動物実験において慢性膵炎におけるHMGB1ペプチド投与による効果およびその機序を検証した。

マウス慢性膵炎モデルを、C57BL/6Jマウスの腹腔内にセルレインを反復投与することで作成し、HMGB1ペプチドをマウス慢性膵炎モデルに投与し（以下ペプチド投与群）、生理食塩水投与群と比較したところ、膵組織の炎症細胞浸潤や線維化が軽度であることを明らかとした。また、膵組織のSingle-cell RNA-sequencingを行うと、ペプチド投与群において、線維化に関連する細胞集団で、慢性膵炎関連遺伝子の発現が抑制されていることを明らかとした。最後に、HMGB1 A Boxペプチドは、骨髄中のCXCR4<sup>+</sup>PDGFR  $\alpha$ <sup>+</sup>間葉系幹細胞を血中に動員することで組織再生を促すことが報告されていることから、Parabiosisモデルを作成して検討し、同ペプチドの投与により傷害膵臓に同幹細胞が誘導されることを確認した。

本研究によって慢性膵炎モデルマウスにHMGB1ペプチドを投与することで骨髄中のCXCR4<sup>+</sup>PDGFR  $\alpha$ <sup>+</sup>間葉系幹細胞が膵臓に遊走され、慢性膵炎が改善することが明らかとなった。

この内容は、学位の授与に値すると考えられる。