

Title	PACAP-RegIII β パスウェイを介した腓疾患の制御に関する研究
Author(s)	桜井, 佑介
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59424
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【11】

氏名	さくら い ゆう すけ 桜 井 佑 介
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬学)
学位記番号	第 25170 号
学位授与年月日	平成24年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	PACAP-Reg III β パスウェイを介した膵疾患の制御に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 橋本 均 (副査) 教授 松田 敏夫 教授 藤尾 慈 教授 辻川 和丈

論文内容の要旨

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) は、中枢および末梢神経系で多様な生理作用を発揮する神経ペプチドである。膵臓では、インスリンやアミラーゼの分泌を促進するといったホルモン様作用が報告されている。一方で、II型糖尿病モデルであるGKラットや高脂肪食負荷マウスにおける高血糖がPACAPにより減弱することや膵 β 細胞株RIN-m5F細胞においてPACAPがstoreptozotocin (STZ) 誘発のアポトーシスを抑制することなど、膵内分泌系での役割が明らかにされている。また、PACAPの静脈内投与が急性膵炎を増悪させることや慢性膵炎患者の膵臓ではPACAPの蓄積が認められることなど、膵外分泌系との関連も報告されている。すなわち、PACAPはこれら内分泌系と外分泌系の両方の膵疾患で重要な役割を果たす可能性が示されている。

当研究室では、PACAPの膵臓での役割を解明する目的で、膵 β 細胞特異的なPACAP過剰発現 (PACAP-Tg) マウスを作製し、I型糖尿病モデルであるSTZの複数回投与モデルで、PACAPの過剰発現が膵 β 細胞の増殖を亢進させることを明らかにした。さらに、本マウスとII型糖尿病モデルであるKKA^yマウスとの交雑で得られたF₁マウス (+/+, PACAP+/+, A^y/+, PACAP/+;A^y/+) の解析から、PACAPの過剰発現がII型糖尿病の病態進行に伴う膵島過形成を抑制することを明らかにし、膵島特異的なGeneChip解析からPACAP/+;A^y/+マウス選択的に分泌タンパクである、RegIII β が発現増加することを見出した。そこで本研究では、以上のように同定されたPACAP-RegIII β パスウェイのII型糖尿病や急性膵炎など、膵疾患の制御における意義の解明を目的として、各種膵疾患に対する本パスウェイの作用を解析した。

まず、PACAP/+;A^y/+マウスでのRegIII β 蛋白の発現を解析したところ、膵島周辺の膵腺房細胞および膵 β 細胞でRegIII β 蛋白の発現が認められ、RegIII β のシグナルが認められた膵島は、シグナルが認められない膵島と比較して肥大していることが明らかになった。さらに、膵腺房細胞株AR42J細胞においてinsulinがPACAPと協調して、RegIII β 発現を相乗的に誘導することを見出した。また、

RegIII β が発現するアデノウイルスを感染させたAR42J細胞の培養上清を膵 β 細胞株INS-1細胞に添加し、RegIII β の膵 β 細胞に与える影響を解析したところ、正のフィードバックループを介して培養上清中のRegIII β がINS-1細胞のRegIII β 発現を誘導すると共に、高グルコース条件下選択的に細胞増殖を抑制することを明らかにした。

次に、PACAPの急性膵炎に与える影響をPACAP欠損 (PACAP-KO) マウスを用い、解析したところ、膵炎誘発剤であるceruleinの投与により、PACAP-KOマウスの約半数で著明な体温低下および個体死の誘発が認められた。さらに、体温が低下しないPACAP-KOマウスでは、急性膵炎病態は野生型マウスと同程度であったのに対し、体温が低下したPACAP-KOマウスでは、急性膵炎病態が減弱していた。つまり、一部のPACAP-KOマウスで低体温と予期せぬ個体死を示したものの、PACAPの欠損は急性膵炎に影響を与えないことが明らかになった。

続いてAR42J細胞を用い、膵外分泌系でもPACAP-RegIII β パスウェイが機能しうるのか解析したところ、PACAPがcerulein誘発のRegIII β 発現を相乗的かつ濃度依存的に増加させることを明らかにした。さらに、その機能解析として、膵炎の重症化に関与する酸化ストレスによる細胞死に対する作用を解析したところ、PACAPおよびceruleinの長時間処置がH₂O₂誘発細胞死を有意に抑制することを明らかにし、また中和抗体やアデノウイルスを用いた解析から、この抑制作用にRegIII β が関与していることを見出した。さらに本パスウェイのシグナル解析より、p38 MAPKがRegIII β の発現増加および細胞死抑制作用に関与することを示した。

最後に、膵 β 細胞特異的RegIII β 過剰発現マウスを作製し、本マウスとKKA^yマウスを交雑させ得られたF₁マウス (+/+、Reg+/、A^y/+、Reg/+;A^y/+) を用い、II型糖尿病におけるRegIII β の役割を解析したところ、RegIII β の過剰発現はII型糖尿病で認められる血糖値や血中インスリン値の上昇に影響を与えなかったのに対し、耐糖能の増悪を改善する傾向が認められた。さらに組織学的解析より、Reg/+;A^y/+マウスでは、A^y/+マウスと比較して単位面積あたりの膵島数の増加が亢進していることが明らかになった。つまり、RegIII β はII型糖尿病に対して保護的に働く可能性が示された。

以上の結果は、PACAP-RegIII β パスウェイが糖尿病や急性膵炎といった種々の膵疾患時に活性化され、その病態制御、特に病的な組織変化に対し保護的に働くこと、つまり本パスウェイが膵組織の恒常性維持に関与する可能性を示すものである。

一方、膵内分泌系と膵外分泌系は形態学および機能的に連関し、これは膵島-腺房細胞連関という概念として知られている。RegIII β がI型糖尿病時に膵腺房細胞を膵 β 細胞へとtransdifferentiationに関与する可能性があることや膵腺房で発現したRegIが膵島の再生に関与することが知られていることから、Regファミリーの分子が膵島-腺房細胞連関に関与し得ると考えられている。本研究の結果からも、PACAP-RegIII β パスウェイが膵内分泌系と膵外分泌系との複雑な相関の中で機能を発揮し、膵組織の恒常性維持に関与する可能性が示唆された。したがって、本研究の成果や今後の本パスウェイの機能解析は、このような膵島-腺房細胞連関の機構の解明につながるるとともに、各種膵疾患の分子基盤の解明にも寄与することが期待される。

論文審査の結果の要旨

「PACAP-RegIII β パスウェイを介する膵疾患の制御に関する研究」と題する学位論文において桜井は、本パスウェイの糖尿病や急性膵炎などの膵疾患における機能を分子生物学的・細胞生理学的に詳細に解明した。この研究は、これら膵疾患の分子基盤の解明につながるものであり、その意味において神経薬理学的にも非常に興味深い研究である。

以下、本学位論文で発表された研究成果とその評価を示す。

膵臓は、膵内分泌系と膵外分泌系という機能が異なる2つの系から成り立っており、両者が複雑に連関していることが知られている(膵島-腺房細胞連関)。したがってその分子機構の解明は、膵疾患やその創薬に関する研究領域における重要な研究課題である。神経薬理学分野では、膵臓

におけるPACAPの役割の解明から、PACAPがII型糖尿病における代償的な膵島過形成を抑制することを見出し、さらに、GeneChip解析からPACAPの新規標的因子としてRegIII β を同定している。そこで桜井は、遺伝子改変動物や各種の培養細胞を用いて本パスウェイに着目した解析を行い、以下の4点を明らかにした。

- ① II型糖尿病下の膵臓において、insulinがPACAPと協調して膵腺房細胞のRegIII β を誘導し、これが膵 β 細胞でのRegIII β 自身の発現を誘導し、高グルコース選択的に細胞増殖を抑制することを明らかにした。
- ② Cerulein誘発性急性膵炎において、PACAPの欠損により、一部の個体でceruleinに対する感受性の変化が認められ、低体温や個体死が誘導されることを示した。
- ③ 膵腺房細胞において、ceruleinとPACAPは協調的に働き、p38 MAPKを介してRegIII β を誘導し、酸化ストレスへの耐性を示すことを明らかにした。
- ④ 膵 β 細胞特異的RegIII β 過剰発現マウスでは、II型糖尿病における膵島数の有意な増加と耐糖能が亢進する傾向が認められることを示した。

以上の結果は、PACAP-RegIII β パスウェイが糖尿病や急性膵炎などの種々の膵疾患時に活性化され、その病態(とくに病的な組織変化)に対して保護的に働くこと、すなわち本パスウェイが膵組織の恒常性維持に関与する可能性を示すものである。また、上述のように膵臓は、膵内分泌系と膵外分泌系が相互に機能的に連関している。本パスウェイもこの連関のなかで機能を発現していることが示された。したがって本研究の成果は、このような膵島-腺房細胞連関の分子機構や膵疾患の病態基盤の解明に貢献するものと考えられる。

以上の通り、本論文は、薬学博士の授与に値するものであると判断する。