

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790629

研究課題名（和文）新たな膵性糖尿病治療法の開発に向けた膵線維化に伴う膵島障害機序の解析

研究課題名（英文）The analysis of correlation between pancreatic fibrosis and pancreatic diabetes.

研究代表者

菊田 和宏（KIKUTA KAZUHIRO）

東北大学・病院・助教

研究者番号：80420024

研究成果の概要（和文）：近年、膵星細胞が膵の炎症と線維化に中心的役割を担っていることが解明されつつあるが、膵性糖尿病進展への関与については明らかでなかった。ラット膵島細胞株 RIN-5F 細胞に対し膵星細胞が与える影響について検討した。ラット活性化膵星細胞は RIN-5F 細胞のインスリン発現を抑制するとともにアポトーシスを誘導することが明らかになった。膵星細胞が膵島細胞に量的ならびに質的な変化をもたらすことにより、膵性糖尿病進展に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：It remains unknown that pancreatic stellate cells (PSCs) play a role in the development of pancreatic diabetes. We examined the interaction between PSCs and pancreatic beta-cells. PSCs inhibited insulin expression and induced apoptosis of beta-cells, suggesting that PSCs might play a role in the development of pancreatic fibrosis and anti-fibrosis therapy targeting PSCs might be useful for the prevention of pancreatic diabetes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：膵性糖尿病・膵線維化・膵星細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 膵性糖尿病の診断基準は明確なものは知られていないが、膵疾患の進展に伴って膵内分泌機能が低下したものである。2005 年の全国実態調査によれば全糖尿病患者に占める膵性糖尿病患者の割合は 0.8%とされる。

(2) 一次性糖尿病との違いについては、成因のみならず、内分泌学的にはインスリンの分

泌障害に加えグルカゴン分泌障害も合併しており、更に消化吸收機能低下による栄養障害も伴っているなど異なった病態を呈し、臨床では低血糖を起しやすい。膵疾患においてインスリン治療導入を予防することは低血糖の問題のみならず QOL の観点からも極めて重要である。膵疾患が糖尿病に先行した場合には、より早期から膵性糖尿病の進展を

阻止できるチャンスがあるにもかかわらず、膵性糖尿病において膵内分泌機能維持を目的とした治療法は確立していない。

(3) 膵性糖尿病では、膵線維化の進展とそれに伴う膵島の循環障害による膵島数の減少、インスリン分泌障害が報告されているが、進展機序の詳細は明らかでない。

(4) 近年、膵の線維化に膵星細胞が中心的役割を担っている事が明らかになってきたが、膵性糖尿病の進展における膵星細胞の役割については未だ明らかでない。

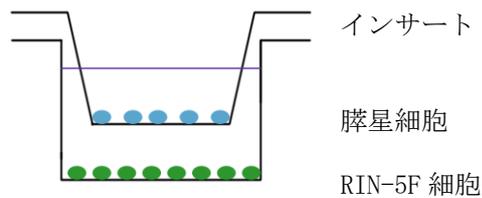
## 2. 研究の目的

膵星細胞と膵島の相互作用に着目し、膵性糖尿病の進展機序を明らかにすること。

## 3. 研究の方法

(1) 膵星細胞は Wistar 系雄性ラットより既報に従い分離し、継代培養により活性化したものを実験に用いた。ラット膵島細胞株 RIN-5F は ATCC より入手したものを実験に用いた。

(2) 1 $\mu$ m の孔の開いたセルカルチャーインサート (BD) を用いて、膵星細胞と RIN-5F 細胞を非接触下に共培養した。



(3) RNA は RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて抽出した。

(4) insulin, inducible nitric oxide synthase (iNOS), BiP, Ero1L の mRNA 発現は、StepOnePlus リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) を用いて定量化した。

(5) 培養上清中に分泌された insulin はインスリン測定用 ELISA キット (シバヤギ) を用いて測定した。

(6) 細胞死は MTT アッセイにより検討した。

(7) 細胞内ヒストン結合 DNA 断片化は Cell Death Detection ELISA (Roche) を用いて検討した。

(8) アポトーシスは ApopTag apoptosis detection kit (Millipore) を用いて検討した。

(9) 培養上清中の nitric oxide (NO) は NO Colorimetric Assay Kit (BioVision) を用いて測定した。

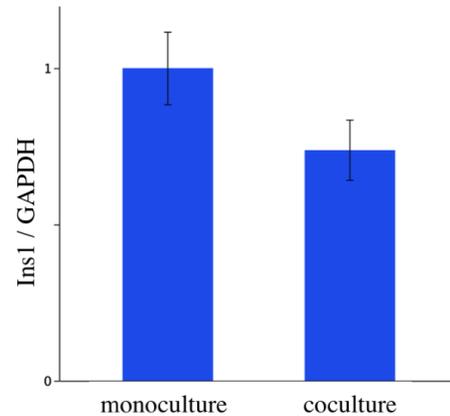
(10) cleaved caspase-9、CHOP の発現は蛍光免疫染色法にて検討した。

## 4. 研究成果

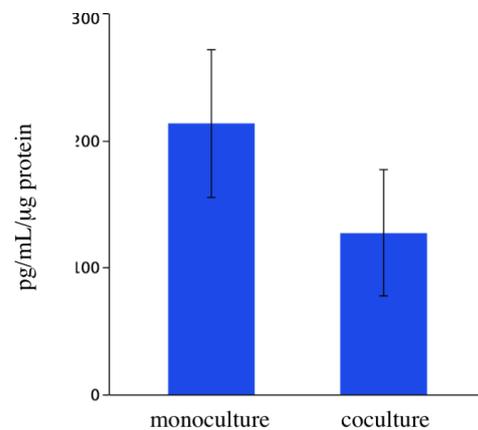
(1) 膵星細胞は RIN-5F のインスリン発現を抑

制した。

RIN-5F をラット活性化膵星細胞と 48 時間共培養した後、RIN-5F より RNA を抽出し、インスリン mRNA 発現変化を検討したところ、単培養に比べ 26% 発現が低下していた ( $p=0.002$ )。



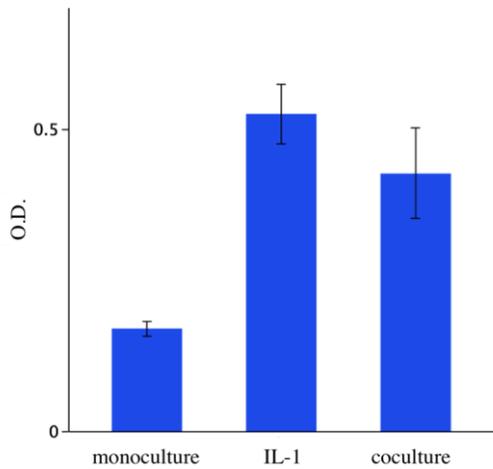
RIN-5F を膵星細胞と 72 時間共培養した後、培養上清を fresh medium に交換し、3 時間インキュベーションし、培養上清中に分泌されたインスリンを測定したところ、単培養 RIN-5F に比べインスリン分泌が有意に減少していた (共培養  $126.9 \pm 49.8$  vs 単培養  $213.3 \pm 58.4$  pg/ $\mu$ L/mg protein,  $p=0.007$ )。



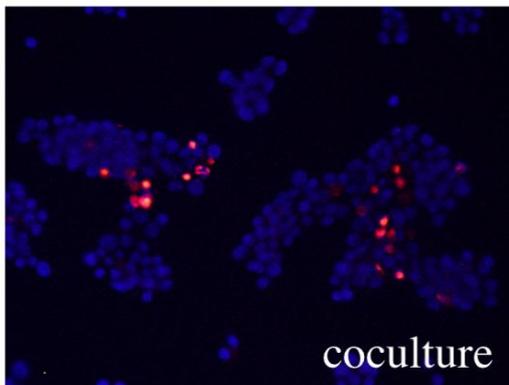
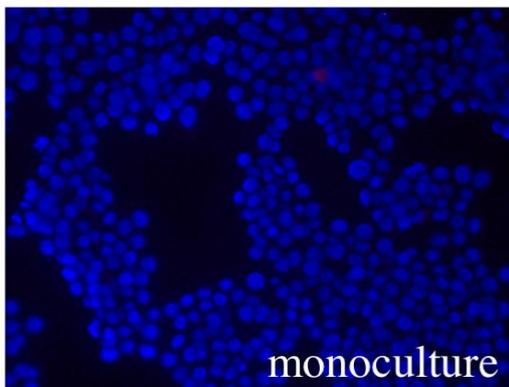
一方、グリベンクラミドに対する反応性は単培養、共培養いずれの RIN-5F でも保たれていた。

(2) 膵星細胞は RIN-5F のアポトーシスを誘導した。

膵星細胞が RIN-5F に細胞死を誘導することが MTT アッセイにより確認された ( $p=0.002$ )。共培養 72 時間後に RIN-5F の細胞内ヒストン結合 DNA 断片化が有意に増加していた ( $p<0.0001$ )。



膵星細胞と共培養した RIN-5F に TUNEL 染色陽性の細胞が認められた。



DAPI:blue、 Apoptag:red

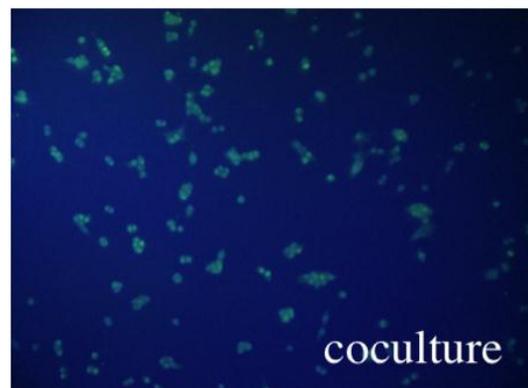
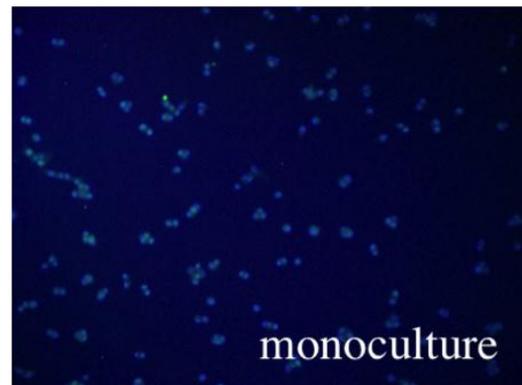
(3)膵星細胞による RIN-5F のアポトーシス誘導における NO の関与。

膵島細胞のアポトーシスの一つの機序として、iNOS 誘導が非膵性の糖尿病では報告されている。そこで、膵星細胞によるアポトーシス誘導における同機序の関与を検討したが、膵星細胞との共培養では RIN-5F における iNOS 誘導は認められなかった。また、共培養上清中の NO を測定したが有意な上昇は

認めなかった。膵星細胞による RIN-5F のアポトーシス誘導における NO の関与は乏しいと考えられた。

(4)膵星細胞による RIN-5F のアポトーシス誘導における caspase-9 の活性化。

膵島細胞のアポトーシスの一つの機序として、ミトコンドリアからの cytochrome c 放出に続く caspase-9 の活性化とその下流の caspase カスケードの活性化が非膵性の糖尿病では報告されている。そこで、膵星細胞によるアポトーシス誘導における同機序の関与を検討した。膵星細胞と共培養した RIN-5F では cleaved caspase-9 が増加していることが、蛍光免疫染色法により確認された。



DAPI: blue、 Cleaved caspase-9:green

(5)膵星細胞による RIN-5F のアポトーシス誘導における小胞体ストレス関連分子の発現。

膵島細胞のアポトーシスの一つの機序として、小胞体ストレスの関与が非膵性の糖尿病では報告されている。そこで、膵星細胞によるアポトーシス誘導における同機序の関与を検討した。小胞体ストレス誘導時に上昇が報告されている CHOP は蛍光免疫染色による検討では有意な上昇を確認しえなかった。小胞体ストレス関連分子 (BiP、Ero1L) の発現もリアルタイム PCR 法による検討では有意な上昇を確認しえなかった。

(6)本研究では膵線維化において中心的役割

を担う膵星細胞が膵性糖尿病における膵島障害に関与している可能性が示された。膵性糖尿病予防において、膵星細胞をターゲットとする新たなアプローチが今後期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Hamada S, Satoh K, Hirota M, Kanno A, Umino J, Ito H, Masamune A, Kikuta K, et al., The homeobox gene MSX2 determines chemosensitivity of pancreatic cancer cells via the regulation of transporter gene ABCG2., J Cell Physiol, 査読有、227 巻、2012 年、729-738
2. Hamada S, Satoh K, Fujibuchi W, Hirota M, Kanno A, Unno J, Masamune A, Kikuta K, et al., MiR-126 Acts as a Tumor Suppressor in Pancreatic Cancer Cells via the Regulation of ADAM9., Mol Cancer Res., 査読有、10 巻、2012 年、3-10
3. Hirota M, Tsuda M, Tsuji Y, Kanno A, Kikuta K, et al., Perfusion computed tomography findings of autoimmune pancreatitis., Pancreas, 査読有、40 巻、2011 年、1295-1301
4. Hirota M, Asakura T, Kanno A, Kikuta K, et al., Long-period pancreatic stenting for painful chronic calcified pancreatitis required higher medical costs and frequent hospitalizations with surgery., Pancreas, 査読有、40 巻、2011 年、946-950
5. Satoh K, Shimosegawa T, Masamune A, Hirota M, Kikuta K, et al., Nationwide epidemiological survey of acute pancreatitis in Japan., Pancreas, 査読有、40 巻、2011 年、503-507
6. Kikuta K, Masamune A, et al., Pancreatic stellate cells promote epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells, Biochem Biophys Res Commun, 査読有、403 巻、2011 年、380-384
7. Hamada S, Satoh K, Hirota M, Kanno A, Ishida K, Umino J, Ito H, Kikuta K, et al., Calcium-binding protein S100P is a novel diagnostic marker of cholangiocarcinoms, Cancer Sci, 査読有、102 巻、2011 年、150-156

8. Masamune A, Watanabe T, Kikuta K, et al., Nuclear expression of interleukin-33 in pancreatic stellate cells, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 査読有、299 巻、2010 年、G821-G832

[学会発表] (計 4 件)

1. Kazuhiro Kikuta, Atsushi Masamune, Noriaki Suzuki, Tooru Shimosegawa, Pancreatic stellate cells induce apoptosis of islet cells. - Possible mechanism of pancreatic diabetes, The 6<sup>th</sup> International Symposium on Alcoholic Liver and Pancreatic Diseases and Cirrhosis, 2011 年 10 月 21 日、福岡
2. 菊田和宏、正宗淳、下瀬川徹、膵島細胞のインスリン発現、アポトーシス誘導における膵星細胞の関与に関する解析、第 53 回日本消化器病学会大会、2011 年 10 月 21 日、福岡
3. 菊田和宏、正宗淳、下瀬川徹、膵星細胞は膵島細胞のインスリン発現を抑制しアポトーシスを誘導する、第 42 回日本膵臓学会大会、2011 年 7 月 29 日、弘前
4. Kazuhiro Kikuta, Atsushi Masamune, et al., Pancreatic stellate cells induce epithelial-mesenchymal transition and proliferation of pancreatic cancer cells, 第 14 回国際膵臓学会・第 41 回日本膵臓学会大会、2010 年 7 月 11 日、福岡

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

該当なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊田 和宏 (KIKUTA KAZUHIRO)

東北大学・病院・助教

研究者番号：80420024

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者