

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 2 月 1 日現在

機関番号：32513

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861530

研究課題名(和文)炎症性刺激における膵B細胞の自食作用の機能形態解析と遺伝子治療

研究課題名(英文)Functional morphology analysis of an autophagy and Gene therapy on the pancreatic B cell in an inflammation stimulus

研究代表者

寺前 洋生(TERAMAE, Hiroki)

秀明大学・人文社会・教育科学系・准教授

研究者番号：90599028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症の重症病態は炎症性サイトカインの産生により全身性炎症を合併しやすいが、未だに有効な治療法の確立には至っていない。本研究では、膵B細胞株min6を培養し、それらに炎症刺激を与え、自食作用の影響がmRNA、タンパク質、形態でどのように変化するかを検討した。これまでの結果を踏まえ、継続してオートファジー誘導蛋白をノックダウンすると、どのような変化が生じるのかを解析し、論文にまとめていくこととする。

研究成果の概要(英文)：Severe sepsis is easy to combine systemic inflammation by pro inflammatory cytokines production but an effective remedy hasn't been established yet. In this study, I cultured pancreatic B cell line Min6, provided inflammation stimulus on it and examined how the autophagy effects mRNAs, proteins and morphology in this cell line. Together these results, I will analyze those of the cells knocked down autophagy derived protein and summarized this monograph.

研究分野：救急医学

キーワード：膵B細胞 Autophagy オートファジー 炎症

1. 研究開始当初の背景

全身性炎症反応症候群 (SIRS : systemic inflammatory response syndrome) は、外傷、熱傷、急性膵炎、敗血症などの多くの救急関連疾患に合併する徴候である。また、これらを重症化させる敗血症 (sepsis) は 1991 年に開かれたアメリカ胸部疾患学会 (American College of Chest Physicians) とアメリカ集中治療医学会 (Society of Critical Care Medicine) の合同会議の定義に従い、感染症を基盤とした SIRS と理解されている。このような SIRS が遷延し、重症化すると、過剰なサイトカイン産生により、急性肺障害、ショック、急性腎障害、播種性血管内凝固症候群 (DIC: disseminated intravascular coagulation) を合併し、多臓器不全に至りやすい。

私は本研究に先立ち、敗血症モデルマウスの主要臓器に tumor necrosis factor receptor (TNF 受容体) などの Death 受容体シグナルが増強し、アポトーシスや自食作用 (autophagy, オートファジー) が進行することを確認した。(Matsuda N, Teramae H, et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2010;298:92-101)。自食作用は、電子顕微鏡観察において autophagosome 形成、fingerprint profile, granular osmiophilic deposit などの所見を特徴とするものであり、細胞質内蛋白を自食する細胞死である (参考文献: Toxicology. 2008;254:147-57)。本研究の遂行に先立って施行した研究により、SIRS 病態の血管内皮細胞は、自食作用により細胞内蛋白をアミノ酸に変換し、炎症性物質の新規産生を行っている可能性を確認した。また、膵内分泌細胞にも自食作用が確認され (図 1 参照)、全身の細胞で炎症に起

因する飢餓に対応していることが示唆されている。

これまで、敗血症などの SIRS 病態の治療として、誘導型一酸化窒素合成酵素阻害薬や抗 TNF- α 抗体など、炎症性分子の抑制に治療の照準が当てられてきた。この学術的検討を踏まえて、本研究は、膵 B 細胞の自食作用を抑制することにより、炎症病態の膵 B 細胞障害を軽減させ、血糖調節機構を保護するという新たな学術的背景を持つ。

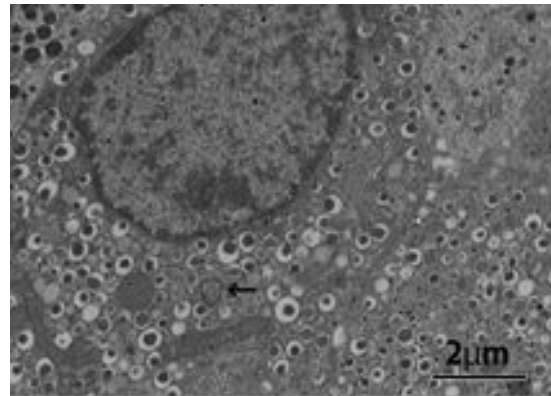


図 1 : 盲腸結紮穿孔マウスの膵 B 細胞の自食作用

盲腸結紮穿孔 12 時間後のマウスの膵 B 細胞で核の下部、ミトコンドリアの上部に autophagosome の形成が認められる。

2. 研究の目的

敗血症の重症病態は炎症性サイトカインの産生により全身性炎症を合併しやすいが、未だに有効な治療法は確立されていない。私は本研究の遂行に当たり、予備研究として敗血症病態マウスの膵臓の内分泌細胞に細胞質融解を主体とする自食作用が生じることを確認した。本研究では、炎症病態を導いた培養膵 B 細胞の自食作用を分子レベルで評価し、炎症による自食作用誘導蛋白群の転写調節因子

を同定し、全身性炎症病態における血糖調節機構を維持するための細胞治療を考案することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 血管内皮細胞の培養と炎症刺激

脾 B 細胞株 Min6m9 を入手し、脾 B 細胞培養を行う。細胞培養に用いる培地には、10%血清存在下、25mM グルコース、50mg/L streptomycin、75mg/L penicillin を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) を用いる。この至適培養条件において、LPS (E. coli O55:B5, List Biological Laboratories, Inc.), TNF- α (Human Recombinant, R&D Systems, Inc.), IL-6 (Human Recombinant, R&D Systems, Inc.) を添加し、炎症刺激を加える。炎症性刺激は、既に予備研究で炎症惹起が確認された LPS 10 μ g/mL および 100 μ g/mL、TNF- α 10 ng/mL および 100 ng/mL、IL-6 100 ng/mL および 300 ng/mL とし、刺激後 30 分、1 時間、3 時間、6 時間、24 時間などを研究対象とした。

上述した培養脾 B 細胞の炎症性反応の時系列において、未刺激、刺激後 30 分、1 時間、3 時間、6 時間、24 時間などで培養細胞の一部を回収し、フェノール・クロロフォルム法を用いて mRNA を抽出・精製し、RT-PCR 法で、自食作用誘導蛋白の mRNA 発現を評価した。RT-PCR 解析における total RNA の内部指標としては、 β -Actin を用いた。

(2) 脾 B 細胞の形態学的・免疫組織化学的学検討

自食作用の形態学的評価は、免疫組織化学ならびに電子顕微鏡を用いて行った。正常ならびに炎症刺激を加えた培養細胞

を固定、脱水後、エポキシ樹脂に包埋した。その後、超薄切したものを観察した。また、これらの多重免疫組織化学的評価を行い、自食作用と ATG 蛋白の発現関連を空間的に解析した。

4. 研究成果

脾 B 細胞株 Min6m9 に炎症性刺激を加え、自食作用に関連する遺伝子の発現を RT-PCR 法を用いて確認した。ATG1、ATG5、ATG6、ATG7、ATG10、ATG12、LC3 に関して調べた結果、複数の遺伝子群で炎症刺激により mRNA の発現が増加することが明らかになった。LC3 に関しては、TNF- α 刺激、IL-6 刺激により mRNA の発現の増加が確認できたが、特に IL-6 の刺激では、経時的な変化が見られた (図 1)。

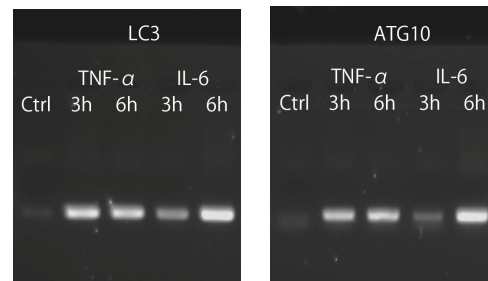


図 1 TNF- α 並びに IL-6 による炎症性刺激下での LC3、ATG10 の mRNA の発現

TNF- α による刺激では、早い段階から mRNA の発現が高まり、IL-6 では刺激開始後 3 時間より 6 時間でより mRNA の発現が増えていることが分かった。これらの結果は、トリガーとなる因子によって、反応形態が異なることが示唆される。これは、全身性炎症反応症候群などの炎症時に、ターゲットとする細胞において経時的な変化が見られ、時間との関連性を意識した治療法の開発へとつながると考えられる。すべてのデータを本報告に掲載はしていないが、詳細な検討を

行い、炎症性刺激とオートファジーに関連した遺伝子の発現、経時的变化を明らかにし、細胞保護へのプロセスの解明が期待できる。

本報告で示した LC3 は、オートファゴソームの形成に関わることが報告されている。膵 B 細胞株 Min6m9 において、炎症性刺激によりオートファジー関連遺伝子の活性が上がることを示唆された。

炎症性刺激により、細胞は各種のシグナル伝達を活性化させ、細胞内の生理活性が惹起される。オートファジーは、飢餓状態で活性化されるだけでなく、様々な疾患との関連が報告されている。本研究では、膵 B 細胞の Cell line である Min6m9 における、炎症性刺激とオートファジーの関連性について調査したが、膵 B 細胞は体内では、血糖値を下げる唯一のホルモンであるインスリンを分泌する細胞である。敗血症に代表されるような全身性炎症では、様々な炎症性サイトカインが分泌され、多くの細胞で炎症性シグナルが惹起される。一定以上の細胞障害により、細胞死をもたらすことになれば、膵 B 細胞の減少は糖尿病やそれに付随する様々な疾病へとつながる。膵 B 細胞に炎症性刺激が伝えられた際に起こる減少を明らかにすることで、全身性炎症反応症候群における細胞保護の概念の構築へとつながると考えられる。

今後、さらに実験を重ね、全身性炎症反応症候群と膵 B 細胞との関連、ならびに保護に関する知見を深め、医療への応用につなげられるように研究を進めていく予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Smooth muscle-like tissue constructs with circumferentially oriented cells formed by the cell fiber technology. Amy Y. Hsiao, Teru Okitsu, Hiroaki Onoe, Mahiro Kiyosawa, Hiroki Teramae, Shintaroh Iwanaga, Tomohiko Kazama, Taro Matsumoto, and Shoji Takeuchi. PLoS One. 2015 Mar 3;10(3)

3D Tissue Formation of Unilocular Adipocytes in Hydrogel Microfibers. Amy Y. Hsiao, Teru Okitsu, Hiroki Teramae, and Shoji Takeuchi. Adv Healthc Mater. 2015 Dec 17.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

寺前 洋生 (TERAMAE, Hiroki)

秀明大学・学校教師学部・准教授

研究者番号 : 9 0 5 9 9 0 2 8

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし