

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 藏 谷 大 輔

学位論文題名

NF- κ B 阻害剤 DHMEQ は HMGB1 を抑制することによりマウス膵島移植後
早期グラフト傷害を抑制する

(DHMEQ, a NF- κ B inhibitor, prevents early islet graft damage by suppressing HMGB1
in murine pancreatic islet transplantation)

【背景と目的】糖尿病は、全世界で患者数が最も多い慢性疾患のひとつである。特に 1 型糖尿病では、膵 β 細胞の特異的障害のためインスリンの絶対的欠乏をきたし、著しい高血糖からケトアシドーシスや昏睡に至る。長期間の血糖値の安定化と恒常性が得られる治療法として、膵移植が行われている。しかし膵移植は高い手術合併症率と治療関連死を伴う治療法である。膵移植の代替治療として、手技がより簡便・安全な、膵島移植、つまりドナーの膵から膵島のみを分離し、経門脈的に肝に移植する方法が期待されている。しかしながら、1 人の糖尿病患者が血糖正常化に至るためには、2~3 人のドナーから提供された膵島を移植する必要がある。これはレシピエントの肝内に経門脈的に移植された膵島グラフトは、主にマクロファージを中心とする免疫担当細胞が引き起こす炎症反応により、その大部分が破壊されるためである。この反応において、nuclear factor (NF)- κ B はマクロファージの活性化や炎症性サイトカインの分泌において中心的な役割を果たしている。マクロファージなどの免疫細胞が分泌する核タンパクである HMGB1 は、NF- κ B 経路を介して免疫細胞を活性化し、炎症反応を促進する。また HMGB1 は膵島が損傷した際にも放出される。本研究においては、NF- κ B を阻害しマクロファージを抑制することで、膵島移植後の炎症反応が抑制され、移植成績が改善するという仮説を検証した。

【材料と方法】マウス同種同系膵島移植モデルにおいて、新規 NF- κ B 阻害剤 dehydroxymethylepoxyquinomicin(DHMEQ)を使用した。C57BL/6 マウスの膵から分離された膵島 175 個を、streptozotocin によって糖尿病を誘発したマウスの肝臓内に、経門脈的に移植した。移植後、レシピエントの腹腔内に 20mg/kg の DHMEQ を 1~4 回、または静脈内に同量のリポソーム化 DHMEQ を投与した。膵島移植後 14 日目に腹腔内ブドウ糖負荷試験を行った。6 時間の絶食の後、2g/kg のブドウ糖溶液を腹腔内投与し、投与直前、投与 30、60、90、120 および 180 分後に血糖値を測定した。レシピエントの肝から mRNA を抽出し、real-time PCR で炎症性サイトカインの発現量を測定した。DHMEQ による膵島保護作用のメカニズム解明のため、分離された膵島とマウスマクロファージ類似細胞株である RAW264.7 細胞を共培養した。培養上清中およびレシピエント血清中の tumor necrosis factor (TNF)- α 、interleukin (IL)-6、HMGB1 のタンパク量を ELISA 法で測定した。各群間の血糖正常化率は Kaplan-Meier 法を用い、log-rank test で比較した。定量的結果は平均値 \pm 標準偏差で表記した。統計学的解析は Student の t 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

【結果】対照群において、糖尿病化したレシピエントの 11%のみが膵島移植後に血糖正常化した。DHMEQ 投与群では投与量依存性に血糖正常化率が改善し、DHMEQ 3 回投与群では 66.7%、DHMEQ 4 回投与群では 83.3%と、有意に改善した。リポソーム化 DHMEQ 投与群では、単回のみの静脈内投与により 85.7%で血糖正常化した。腹腔内グルコース負

荷試験において、DHMEQ 治療群は非糖尿病マウスと同様の血糖パターンを呈した。DHMEQ 治療群では、移植 12 時間後のレシピエント肝内における炎症性サイトカイン、TNF- α 、monocyte chemoattractant protein-1、macrophage inflammatory protein-1 β 、IL-18 および IL-6 の mRNA 発現量が有意に低値であった。また移植 12 時間後のレシピエント血清中の HMGB1 の濃度が有意に低値であった。分離されたマウス膵島 200 個を、事前に HMGB1 (20 μ g/ml)で刺激した RAW 264.7 細胞と共培養した。HMGB1 で刺激した RAW 264.7 細胞と共培養した対照群では、12 時間後および 24 時間後に膵島数がそれぞれ 189 \pm 7.3 個、133 \pm 15 個に減少していた。一方、DHMEQ 添加により、膵島数の減少は有意に抑制され、24 時間後においても 194 \pm 2.8 個であった。また培養上清中の HMGB1、TNF- α 、IL-6 のタンパク量は対照群と比較して有意に減少した。

【考察】わずか 175 個の膵島を移植するマウス膵島移植モデルにおいて、移植直後の DHMEQ 短期投与が血糖正常化率を改善することを示した。この効果は膵島を移植されたレシピエントの肝内で、膵島に障害を引き起こすことが知られている炎症性サイトカインの mRNA を有意に減少させたことと関連していた。またマウス膵島移植後早期に、レシピエントの血清 HMGB1 濃度上昇が起こっていた。HMGB1 はマクロファージなどの免疫細胞から分泌されるだけでなく、 β 細胞を始めとする細胞や組織が損傷した際にも放出される。すなわち活性化した免疫細胞から分泌されるものと、傷害された膵島グラフトから放出されるものの両方が、膵島移植後の血清 HMGB1 上昇の原因である。これがさらにマクロファージを活性化し、膵島を傷害すると考えられる。活性化マクロファージが引き起こす膵島傷害に対する DHMEQ の効果を検証するため、HMGB1 で刺激した RAW 264.7 細胞と膵島との共培養モデルを用いた。DHMEQ は RAW264.7 細胞による膵島の減少を防止し、同時に培養上清中の HMGB1、IL-6、TNF- α を有意に抑制した。以上の結果より、レシピエントの肝内に膵島が移植された後、活性化マクロファージが分泌する炎症性サイトカインにより膵島グラフトが傷害され、破壊される。破壊された膵島から放出されたものに加え、マクロファージ自体が分泌する HMGB1 は、さらにマクロファージを活性化し、早期グラフト傷害を助長する。DHMEQ は、HMGB1 が誘発するマクロファージの活性化を阻害し、活性化マクロファージが分泌する炎症性サイトカインによる傷害から膵島を保護することで、より多くの膵島グラフトが生着し、血糖正常化率を改善することが示唆された。この結果は、NF- κ B 阻害によりマクロファージの活性を制御することにより、門脈内膵島移植で生じる傷害から膵島を保護することを示している。NF- κ B 阻害という治療戦略は、HMGB1 とマクロファージによるフィードバックループを遮断し、より少ない膵島で膵島移植を成功させるために不可欠であると考えられる。

【結論】DHMEQ による NF- κ B 阻害が、マウス同種同系膵島移植における早期グラフト傷害を抑制することが示された。活性化したマクロファージが産生し、破壊された膵島からも放出される HMGB1 がさらにマクロファージを活性化し、マクロファージが分泌する炎症性サイトカインによって膵島の破壊が引き起こされ HMGB1 が放出されるというフィードバックループにおいて、DHMEQ による NF- κ B 阻害がマクロファージの活性化を抑制することで膵島の破壊を防止するという機序が明らかになった。