

氏 名	すたんうおん ぱとらだ SUTHAMWONG PATLADA
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 番 号	博甲第 1013 号
学 位 授 与 の 日 付	令和 3 年 9 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専 攻	工芸科学研究科 物質・材料化学専攻
学 位 論 文 題 目	Targeting the pancreatic β-cells to treat obesity-related type 2 diabetes (肥満誘発性 2 型糖尿病の治療標的胰 β 細胞に関する研究)
審 査 委 員	(主査)教授 亀井 加恵子 教授 堀内 淳一 教授 宮田 清司 国立研究開発法人国立循環器病研究センターデータサイエンス部長 南 学

論文内容の要旨

本論文は、胰 β 細胞を標的とした肥満 2 型糖尿病治療に関する探索的研究成果をまとめたものであり、4 章で構成されている。

第 1 章「序論」2 型糖尿病を概説し、胰臓ラングルハンス島の役割、2 型糖尿病における胰 β 細胞の代償および機能不全、インスリン耐性の分子機構および現在の治療方法について説明した。また、本研究で用いた桑葉について含有成分を紹介するとともに、報告済みの糖尿病抑制機構および臨床治験の結果を説明した。

第 2 章「肥満・2 型糖尿病モデルマウスへの桑葉の投与は糖尿病で胰臓 β 細胞を維持する」2 型糖尿病は、胰 β 細胞の機能不全とインスリン耐性を伴う。インスリン分泌を担う胰 β 細胞の機能を保持させることは 2 型糖尿病の治療に有効であると期待できる。一方、桑葉には糖尿病抑制効果が知られているが、経口摂取による胰臓への影響は明らかではなかった。本章では、肥満・2 型糖尿病モデルマウスである db/db マウスに桑葉乾燥粉末を経口投与し、胰 β 細胞への影響を明らかにすることを目的とした。桑葉粉末を経口投与した投与群はコントロール群と比較して胰 β 細胞容量が有意に増加し、15 週齢での血清インスリンレベルが維持されていた。増殖性細胞マーカー PCNA を用いた組織免疫染色の結果、桑葉投与により代償期での胰 β 細胞の増殖が有意に増加していた。また、桑葉投与群では移行期における胰 β 細胞のアポトーシスが抑制されており、小胞体ストレスマーカーの発現も抑制されていた。これらの結果から、桑葉の経口投与によって少なくとも部分的には小胞体ストレスの抑制によってインスリンレベルと胰臓 β 細胞量を維持することが示された。

第 3 章「桑葉の経口投与は肥満・2 型糖尿病モデルマウスの胰臓で MAPK 経路が活性化する」本章では、桑葉経口投与による肥満・2 型糖尿病モデルマウスの胰臓での小胞体ストレス抑制機構を解明するため、インスリン受容体シグナル伝達経路への影響を明らかにした。胰臓のタンパク

質のウェスタンブロッティング法による解析の結果、桑葉投与群で Akt タンパク質が増加し、MEK/ERK タンパク質のリン酸化も増大し、小胞体ストレスによって誘導されるアポトーシスに関与するカスパーゼ 3 およびカスパーゼ 12 が減少していた。一方、IL-6、IL-1 β やTNF α などの炎症性サイトカインの発現は桑葉投与によって変化が認められなかった。これらより、桑葉の経口投与による膵 β 細胞の機能保護は、炎症抑制効果ではなく、MAPK および Akt 経路の活性化を介した膵 β 細胞のアポトーシス細胞死の抑制によることが明らかとなった。

第4章「EP4シグナル経路は、マクロファージの活性化抑制を介した膵島の炎症抑制と膵 β 細胞の機能制御に必須である」膵島に侵入し活性化されたマクロファージは、膵島の炎症と β 細胞の機能不全を引き起こし、「炎症誘発性M1」マクロファージから「抗炎症性M2」マクロファージに切り替わることによりインスリン感受性が改善することが報告されている。第2章、第3章において、桑葉の経口投与による炎症抑制効果は認められなかったことから、膵 β 細胞を標的とした肥満2型糖尿病治療方略の開発には、膵臓での炎症を抑制する方法の検討も必要である。

プロスタグランジンE2はEP4受容体シグナル伝達を介してマクロファージのM1への活性化を抑制することが示唆されている。これに基づき、本章ではEP4選択的アゴニストによって膵臓の炎症を抑制できるかどうかを検討した。肥満・2型糖尿病モデルマウスにEP4選択的アゴニストを投与した結果、耐糖能異常の及びグルコース応答性インスリン分泌の改善とともに、膵臓のM1/M2比は減少した。次に、マウス膵 β 細胞由来のMIN6細胞およびマクロファージの共培養システムを使用して、膵島におけるEP4シグナル伝達の役割を評価した。その結果、M1極性化マクロファージとの共培養は、MIN6細胞による炎症性サイトカインの発現を増加させる一方でインスリン発現を著しく抑制するが、EP4アゴニストであらかじめ処理したM1マクロファージとの共培養では、MIN6細胞からの炎症性サイトカインの発現やインスリン産生が大幅に改善した。これらの結果は、EP4アゴニストは、糖尿病性膵臓の炎症性マクロファージの機能を変化させることにより、膵島の炎症を抑制し、 β 細胞の機能を保護することを示唆している。

第5章「結論」第2章から第4章を総括している。

論文審査の結果の要旨

肥満2型糖尿病患者は世界で4億人を超えており、その治療方法の開発は重要な課題である。2型糖尿病は膵 β 細胞の機能不全とインスリン耐性を伴うことから、インスリン分泌を担う膵 β 細胞の機能保持は2型糖尿病の治療に有効であると期待できる。本論文は、膵 β 細胞の機能保持を目的とした研究成果をまとめている。

2型糖尿病の進行に伴い、代償期では膵 β 細胞が増加しその機能を補うが、移行期にはいると膵 β 細胞は減少し、やがて死滅する。本論文では2型糖尿病の抑制効果が知られている桑葉に着目し、肥満・2型糖尿病モデルマウスへの桑葉の経口投与による膵 β 細胞への効果を検討した。その結果、桑葉投与群では移行期でも膵 β 細胞容量が大きく、血清インスリンレベルが維持されていた。その機構として、桑葉投与による代償期での膵 β 細胞増殖の促進、移行期における膵 β 細胞

のアポトーシス細胞死の抑制および小胞体ストレスの軽減を明らかにした。これらは、桑葉の経口投与によって少なくとも部分的には膵臓での小胞体ストレスの抑制によってインスリンレベルと膵β細胞量が維持されることを示唆している。次に、桑葉の経口投与による膵臓での小胞体ストレス軽減機構を検討し、桑葉投与による膵β細胞の保護効果は、MAPK および Akt 経路の活性化を介した膵β細胞のアポトーシス細胞死の抑制によることを明らかにした。一方、桑葉の経口投与には膵臓での炎症を抑制する効果は認められないことも明らかにした。

続いて、活性化された膵臓マクロファージは膵島の炎症と β 細胞の機能不全を引き起こすことが知られている。一方、桑葉には膵臓での炎症抑制効果が認められなかったことから、膵臓での炎症抑制を目的とした検討を行った。プロスタグランジン E2 は EP4 受容体シングナル伝達を介してマクロファージの炎症誘発性 M1 マクロファージへの活性化を抑制することが示唆されていることから、EP4 選択的アゴニストによる膵臓での炎症抑制効果を肥満・2 型糖尿病モデルマウスおよびマウス膵β細胞由来 MIN6 細胞を用いて解析した。その結果、EP4 アゴニストは、糖尿病性膵臓の炎症性マクロファージを M1 から抗炎症性 M2 に変化させることにより、膵島の炎症を抑制し、膵β細胞の機能を保護する可能性を見出した。

以上の研究は、異なるメカニズムによる膵β細胞保護効果、すなわち桑葉による膵β細胞の増殖促進および ER ストレス軽減を介した膵β細胞死の抑制、および ER4 選択的アゴニストによる炎症抑制による膵β細胞の機能保持を明らかにしたものである。これらは、2 型糖尿病の進行に伴う膵β細胞の機能不全の抑制を標的とした新たな肥満 2 型糖尿病治療薬の開発につながる可能性のある意義のある成果である。これまでに膵β細胞の保護を標的とした糖尿病治療薬は開発されておらず、独創性および新規性の高い研究成果でもある。

本論文の内容は、査読制のある国際科学雑誌にすでに発表済みの下記の 2 編の論文を基礎としている。

1. Administration of mulberry leaves maintains pancreatic β-cell mass in obese/ type 2 diabetes mellitus mouse model. Patlada Suthamwong, Manabu Minami, Toshiaki Okada, Nonomi Shiwaku, Mai Uesugi, Masayuki Yokode and Kaeko Kamei, BMC Complementary Medicine and Therapies (2020) 20:136. doi:10.1186/s12906-020-02933-4
2. EP4 signalling is essential for controlling islet inflammation by causing a shift in macrophage polarization in obesity/type 2 diabetes. Mika Yasui-Kato, Suthomwong Patlada, Masayuki Yokode, Kaeko Kamei and Manabu Minami. Diabetes & Vascular Disease Research. July-August 2020: 1-5. doi: 10.1177/1479164120945675