

論 文 内 容 要 旨

題目 The protective effect of epigallocatechin 3-gallate on mouse pancreatic islets via the Nrf2 pathway

(Epigallocatechin 3-gallate の Nrf2 経路を介したマウス膵島細胞保護作用に関する検討)

著者 Wada Y*, Takata A*, Ikemoto T, Morine Y, Imura S, Iwahashi S, Saito Y, Yamada S, Yoshimoto T, Ohta S, Iwahashi S and Shimada M
(*の著者らは筆頭著者として当研究に等しく寄与している)

平成 31 年 2 月 7 日発行 Surgery Today 第 6 巻第 49 号
536 ページから 545 ページに発表済

内容要旨

膵島移植は 1 型糖尿病の根治的治療法であるが、移植成績は未だ満足できるものではない。当移植の成績向上には膵臓から膵島への分離精製時に生じる酸化ストレスや小胞体ストレスによる細胞ダメージの回避が急務であり、分離細胞へ精製後の pre-conditioning による細部の脆弱性の改善がその方策の一つと考えられる。NF-E2 related factor2 (Nrf2)-Keap1 制御系は種々の抗酸化酵素群の発現を上昇させることにより生体内ストレス防御を統一的に制御する経路と報告されており、一方で緑茶成分の Epigallocatechin-3 Gallate (EGCG)に関して、我々はこれまでにラット肝切除後モデルにおいて EGCG が抗酸化、抗炎症作用を介して肝傷害の軽減や肝再生に寄与することを報告してきた。今回、膵島分離精製時に EGCG を用いた pre-conditioning を行うことで Nrf2-Keap1 経路を介した酸化ストレス制御により、膵島細胞保護作用が得られると考え、in vitro および in vivo の検討を行った。

8 週齢 C57BL/6 マウス膵島を Collagenase 法で分離精製し、islet culture medium(RPMI1640RPMI+10%FBS+ 1% glutamine + 1% Penicillin/Streptomycin)群 (control 群), islet culture medium + EGCG100 μ M 添加群 (EGCG 群)の 2 群に分け、経時的 (0, 6, 24 時間後)に膵島の viability, Nrf2 発現について Propidium Iodide 核染色、Nrf2 蛍光免疫染色にて検討した。また酸化ストレスマーカーである細胞内 ROS、抗酸化ストレスマーカーである heme oxygenase-1(HO-1)の mRNA を測定した。さらに islet culture medium と islet culture medium+EGCG 100 μ M 添加

様式(8)

で分離後 12 時間培養した 500IEQ の膵島細胞を各々 streptozotocin 誘導糖尿病マウスの腎被膜下に移植し、経時的な血糖改善効果について比較検討した。得られた結果は以下のごとくである。

- 1) EGCG 群において膵島細胞数($P<0.05$)、cell viability($P<0.01$)、インスリン分泌能($P<0.01$)が control 群に比して良好であった。
- 2) EGCG 群では Nrf2 の膵島核内移行が促進され、蛍光免疫染色で定量すると Nrf2 核内移行細胞数が増加していた($P<0.01$)。
- 3) EGCG 群では膵島の HO-1 mRNA レベルが上昇していた($P<0.05$)。
- 4) EGCG 群において 24 時間後の ROS 産生が低下していた($P<0.01$)。
- 5) 糖尿病モデルマウスへの腎被膜下移植実験において Control 群では高血糖が持続し改善が得られなかったが、EGCG 群では 14 日目まで持続的な血中グルコース値の改善が得られた。この効果は担膵島腎を摘出すると打ち消された。

以上より、膵島細胞において移植前の EGCG による pre-conditioning が ROS 産生を減少させることで膵島細胞保護効果を有することが明らかとなった。その機序として EGCG による Nrf2 の膵島内発現増加、核内移行促進を介した抗酸化ストレスマーカーの誘導が考えられた。

論文審査の結果の要旨

| | | | |
|------|---------------------------------|----|-------|
| 報告番号 | 甲医第 1434 号 | 氏名 | 高田 厚史 |
| 審査委員 | 主査 丹黒 章 副査 松久 宗英 副査 常山 幸一 | | |

題目 The protective effect of epigallocatechin 3-gallate on mouse pancreatic islets via the Nrf2 pathway
(Epigallocatechin 3-gallate の Nrf2 経路を介したマウス膵島細胞保護作用に関する検討)

著者 Yuma Wada*, Atsushi Takata*, Tetsuya Ikemoto, Yuji Morine, Satoru Imura, Shuichi Iwahashi, Yu Saito, Mitsuo Shimada
(*の著者らは筆頭著者として当研究に等しく寄与している)
平成 31 年 2 月 7 日発行 Surgery Today 第 6 巻第 49 号
536 ページから 545 ページに発表済
(主任教授 島田 光生)

要旨 膵島移植は 1 型糖尿病の根治的治療法であるが成績は未だ満足できるものではなく、成績向上には膵島分離精製時に生じる細胞ダメージの回避が急務である。申請者らは、緑茶成分の epigallocatechin-3 gallate (EGCG) が抗酸化・炎症作用を介して肝切除後ラットモデルにおける肝傷害軽減や肝再生に寄与することを報告してきた。膵島分離精製時に EGCG を用いた pre-conditioning を行うことで酸化ストレス制御による膵島細胞保護作用が得られると考え、in vitro および in vivo の検討を行った。8 週齢 C57BL/6 マウス膵島をコラゲナーゼ法で分離精製し、islet culture medium 群 (control 群) と islet culture medium + EGCG 100 μ M 添加群 (EGCG 群) の 2 群に分け、膵島の viability と Nrf2 発現を経時的に測定した。また、酸化ストレスマーカーである細胞内 ROS、細胞保護効果を有する heme oxygenase-1 (HO-1) の mRNA を測定した。さらに 500IEQ の膵島細胞を各々 streptozotocin 誘導糖尿病マウスの腎被膜下に移植し、経時的な血糖改善効果について比較した。

得られた結果は以下のごとくである。

- 1) EGCG 群は control 群に比し、膵島細胞数、cell viability、インスリン分泌能が有意に良好であった。
- 2) EGCG 群では Nrf2 の膵島 β 細胞における核内移行が促進され、Nrf2 核内移行細胞数が有意に増加していた。
- 3) EGCG 群では膵島の HO-1 mRNA レベルが有意に上昇した。
- 4) EGCG 群において 24 時間後の ROS 産生が有意に低下していた。
- 5) 糖尿病モデルマウスへの control medium の腎被膜下移植では高血糖が持続し改善が得られなかったが、EGCG 添加 medium では 14 日目まで持続的な血中グルコース値の改善が得られ、効果は膵島を移植した腎の摘出により打ち消された。

以上より、膵島分離精製時の EGCG による pre-conditioning が Nrf2 の発現増加・核内移行促進を介した抗酸化ストレスタンパクの誘導により細胞内 ROS 産生を減少させることで膵島細胞保護効果を発揮する可能性が明らかとなった。本研究は、膵島移植における細胞傷害のメカニズム解明と治療法開発に有益な示唆を与えており、その臨床的意義は大きく学位授与に値すると判定した。