

最終試験  
の結果の要旨  
学力の確認

審査区分 ①・論	第 513 号	氏 名	岡本 光弘
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	橋本 久司 	
	副査氏名	泉 達也 	
	副査氏名	三股 浩光 	
<p>学位申請者は本論文の公开发表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 内因性硫化水素 (H<sub>2</sub>S) は、cysteine、cystathionineのいずれから主に生合成されるのか。</li> <li>2. Cystathionine β-synthase (CBS) がH<sub>2</sub>S生合成の責任酵素として関与するならば、cystathionineは2個の-COOHを含有している。この-COOHには酸化作用があり、どのように代謝されるか。H<sub>2</sub>Sとの関係はどのようになっているのか。</li> <li>3. 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST) もH<sub>2</sub>Sの生合成に関与しているとの認識があるにもかかわらず、この実験系に2-mercaptoethanol、抗酸化剤、を使用している理由。実験系への影響を使用しない時と対比して検討したのか。</li> <li>4. インスリンの分泌能や感受性の変化を血清インスリンや膵島beta細胞のインスリン免疫染色で検討しているが適切なのか。</li> <li>5. 血清の測定では生物学的に不活性のC-peptideの測定がよいのではないのか。ロイシンなどのインスリン分泌刺激試験や膵島からのインスリン抽出測定を行って検討したのか。</li> <li>6. 免疫染色に使用したインスリン抗体は、特性についての記載がないが、マウスに特異的で十分に反応するものか。</li> <li>7. 酸化ストレスに重要なグルタチオン関連酵素の発現に変化はみられなかったのか。</li> <li>8. Propargylglycine (PPG) は膵島やインスリンノーマの細胞株にアポトーシスを誘導しないのか。</li> <li>9. Cystathionine γ-lyase (CSE)とCBSのダブルノックアウトマウスでは通常食で糖尿病を誘発するのか。</li> <li>10. TUNEL法やcaspase活性など、複数の方法でアポトーシスを誘導を確認すべきではないのか。</li> <li>11. これまでの他家の報告と一見逆の結果とも取れるが、その整合性はどうか説明できるか。</li> <li>12. グルコースが作用すると、いかなる活性酸素種が産生され、その過程はどうなっているのか。</li> <li>13. 今回の実験系で作成されたマウスのモデルは、ヒトの2型糖尿病のモデルとして妥当なものか。</li> <li>14. 前問に関連して、このマウスモデルにおいてインスリン感受性が低下していることは確認しているか。</li> <li>15. 今後、本研究をどのように発展させていこうと考えているか。</li> </ol> <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第513号	氏名	岡本 光弘
審査委員会委員	主査氏名	橋本 久司 	
	副査氏名	泉 達郎 	
	副査氏名	三股 浩光 	

論文題目： Endogenous hydrogen sulfide protects pancreatic beta-cells from a high-fat diet-induced glucotoxicity and prevents the development of type 2 diabetes.  
 (内因性硫化水素は糖毒性から膵B細胞を保護することで2型糖尿病の発症を遅延させる)

論文掲載雑誌名： Biochemical and Biophysical Research Communications

論文要旨： 硫化水素 (H<sub>2</sub>S) は、cystathionine γ-lyase (CSE) とcystathionine β-synthase (CBS)、3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST) によってL-システインから産生され、様々なシグナル伝達に関わっている。所属する教室では、CSEが誘導型のH<sub>2</sub>S産生酵素によりグルコースで上昇すること、産生されたH<sub>2</sub>Sが酸化ストレスを抑制して膵B細胞を保護することを報告している。本論文では、H<sub>2</sub>Sの役割を個体レベルで明らかにするため、CSE遺伝子欠損マウスでの解析がなされた。

高齢 (6ヶ月齢) のCSE遺伝子欠損マウスに高脂肪食 (HFD)を8週間負荷し、CSEが耐糖能に及ぼす影響を検討した。HFD負荷時には、各マウスの体重、摂食量、随時血糖の推移を、HFD負荷後は、経口糖負荷試験やインスリン感受性試験、血中インスリン濃度測定で行った。免疫染色法やインスリンの含量測定、アポトーシスの検出により、膵島の機能を評価した。発現が変動した遺伝子はマイクロアレイで探索し、real-time PCRで詳細に解析した。

CSE遺伝子欠損マウスと野生型の間で体重と摂食量は差がなかった。前者は、HFD負荷により随時血糖が上昇し、負荷後の経口糖負荷試験でも高血糖を示した。このマウスは、インスリン感受性に変化はなかったが、血中インスリン値が低下していた。この結果は、CSE遺伝子欠損マウスでは膵B細胞からのインスリン分泌が障害されているため、耐糖能異常が生じることを示している。免疫染色法より、膵島が小型化し、インスリン陽性面積の減少がみられた。さらに、このマウスの膵島ではインスリン含量の低下とDNA断片化の亢進がみられた。マイクロアレイより、CSE遺伝子欠損マウスではthioredoxin binding protein-2 (TBP-2) 遺伝子の発現が上昇していた。TBP-2は、チオレドキシンと結合して酸化ストレスを促進するタンパク質で、糖尿病の発症に関わっている。単離膵島を用いたreal-time PCRより、グルコースで誘導されたTBP-2の発現が、H<sub>2</sub>SドナーであるNaHSで抑制された。さらに、CSEの阻害薬であるPPGによりTBP-2の発現は促進された。

普通食飼育下ではCSE遺伝子欠損マウスと野生型の耐糖能に差がみられなかったが、これは、普通食でみられる血糖の上昇では、野生型においても膵B細胞のCSEが発現誘導されなかったためである。一方、HFDを負荷したCSE遺伝子欠損マウスは野生型でみられるCSEの発現が誘導できず、結果としてH<sub>2</sub>Sによる膵島保護機構が破綻していた。そのため、インスリン分泌量が低下し、耐糖能異常を示したと考えられる。本研究では、H<sub>2</sub>Sの新たなターゲット分子としてTBP-2を見いだされた。NaHSとPPGを用いた実験結果は、CSEによって産生されたH<sub>2</sub>SがTBP-2を介した酸化ストレスを軽減することで膵B細胞を保護し、耐糖能を改善することを示している。

本研究は、学術上のみならず、临床上においても意義あるものと考えられ、審査委員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 岡本 光弘

## 論 文 題 目

Endogenous hydrogen sulfide protects pancreatic beta-cells from a high-fat diet-induced glucotoxicity and prevents the development of type 2 diabetes

(内因性硫化水素は糖毒性から膵 B 細胞を保護することで 2 型糖尿病の発症を遅延させる)

## 要 旨

【緒言】硫化水素 ( $H_2S$ ) は有毒ガスとして知られているが、その一方で生体内でも産生され、様々なシグナル伝達に関わっている。シグナル分子としての  $H_2S$  は、cystathionine  $\gamma$ -lyase (CSE) と cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS)、3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST) によって L-システインから産生される。薬理学教室では、CSE がグルコースで発現が上昇する誘導型の  $H_2S$  産生酵素であることを明らかにした (FEBS Lett. 2009)。さらに、産生された  $H_2S$  が酸化ストレスを抑制することで膵 B 細胞を保護することを報告した (FEBS Lett. 2009、Br.J.Pharmacol. 2011)。本論文では、 $H_2S$  の役割を個体レベルで明らかにするために、CSE 遺伝子欠損マウスの解析を行った。

【研究対象及び方法】高齢 (6 ヶ月齢) の CSE 遺伝子欠損マウス (C57BL/6) に高脂肪食 (HFD) を 8 週間負荷し、CSE が耐糖能に及ぼす影響を検討した。HFD 負荷時には、各マウスの体重、摂食量、随時血糖の推移を調べた。HFD 負荷後は、経口糖負荷試験やインスリン感受性試験、血中インスリン濃度測定を行った。膵島の機能に及ぼす影響は、免疫染色法やインスリンの含量測定、ア

ポトシスの検出により評価した。発現が変動した遺伝子はマイクロアレイで探索し、Real-Time PCRで詳細に解析した。

**【結果】**体重と摂食量は、CSE 遺伝子欠損マウスと野生型の間で変化がなかった。CSE 遺伝子欠損マウスは、HFD 負荷により随時血糖が上昇し、負荷後の経口糖負荷試験でも高血糖を示した。このマウスは、インスリン感受性に変化はなかったが、血中インスリン値が低下していた。この結果は、CSE 遺伝子欠損マウスが耐糖能異常をおこすこと、その原因として膵 B 細胞からのインスリン分泌が障害されていることを示している。免疫染色法より、このマウスでは膵島が小型化し、インスリン陽性面積の減少がみられた。さらに、このマウスの膵島ではインスリン含量の低下と DNA 断片化の亢進がみられた。マイクロアレイの結果より、CSE 遺伝子欠損マウスでは Thioredoxin binding protein-2 (TBP-2) 遺伝子の発現が上昇していた。TBP-2 は、チオレドキシシンと結合して酸化ストレスを促進するタンパク質で、糖尿病の発症に関わっている。単離膵島を用いた Real-Time PCR より、グルコースで誘導された TBP-2 の発現が、 $H_2S$  ドナーである NaHS で抑制された。さらに、CSE の阻害薬である PPG が、TBP-2 の発現を促進することを明らかにした。

**【考察】**普通食飼育下では、CSE 遺伝子欠損マウスと野生型の耐糖能に差がみられなかった。これは、普通食でみられる血糖の上昇では、野生型においても膵 B 細胞の CSE が発現誘導されなかったためである。一方、HFD を負荷した CSE 遺伝子欠損マウスは野生型でみられる CSE の発現が誘導できず、結果として  $H_2S$  による膵島保護機構が破綻していた。そのため、インスリン分泌量が低下し、耐糖能異常を示したと考えられる。本研究では、 $H_2S$  の新たなターゲット分子として TBP-2 を見いだした。NaHS と PPG を用いた実験結果は、CSE によって産生された  $H_2S$  が TBP-2 を介した酸化ストレスを軽減することで膵 B 細胞を保護し、耐糖能を改善することを示している。

**【結語】**内因性の  $H_2S$  は、TBP-2 の発現を負に制御することで酸化ストレスの進行を抑制し、膵 B 細胞を保護することが明らかになった。