

称号及び氏名	博士（獣医学）	加藤 祐樹
学位授与の日付	平成30年8月31日	
論文名	Toxicological Pathology of Chemically Induced Injuries and Tumors in Rat Islets Based on Global Gene Expression Analysis (網羅的遺伝子発現解析に基づいたラット膵島における薬剤誘発性傷害及び腫瘍の毒性病理学的研究)	
論文審査委員	主査	山手 丈至
	副査	小森 雅之
	副査	嶋田 照雅

論文要旨

諸言

膵島は、 α 細胞、 β 細胞、 δ 細胞などによって構成される内分泌組織であり、それぞれの細胞から特異的な生理活性物質が分泌される。インスリンは β 細胞から血糖応答性に分泌され、血糖降下作用を発揮する。同作用を有するホルモンはインスリンのみであるため、 β 細胞は糖代謝の恒常性維持に重要である。

Alloxan (ALX) と **Streptozotocin (STZ)** は代表的な β 細胞傷害性物質であり、薬剤誘発性糖尿病モデル動物の作製に頻用される。両化合物は異なる作用機序によって β 細胞を傷害することが知られているが、その際の膵島における遺伝子発現を調べた研究は少ない。

ヒトの膵島腫瘍はまれな神経内分泌系腫瘍である。ヒトでは腫瘍細胞の増殖活性と生物学的悪性度が相関することが報告されている。また、網羅的遺伝子発現解析により、ヒト膵島腫瘍において、**PI3K/AKT/mTOR**経路が活性化していることが知られている。一方、**SD**ラットに自然発生する膵島腫瘍の多くは β 細胞由来であるが、生物学的悪性度と相関する病理学的指標は明らかとなっておらず、さらには、分子生物学的知見は皆無である。

レーザーマイクロダイセクション (**LCM**) を用いた膵島単離法は、良質な膵

島を効率よく回収できることが報告されている。本研究においては、第 1 章では、まず、ラットの **ALX** 及び **STZ** 誘発の傷害膵島の病理学的解析に加え、**LCM** により単離した膵島を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、毒性病理学的観点から膵島の病態を詳細に解析した。さらに、第 2 章では、ラットの **STZ** 誘発性膵島腫瘍を用いて、生物学的悪性度と関連する病理学的指標を追究するとともに、**LCM** を用いて、病理学的に分類した膵島腫瘍の網羅的遺伝子発現解析を行い、その分子プロファイルを探索した。また、第 3 章では、第 1 章及び第 2 章で得られたラットにおける膵島傷害あるいは膵島腫瘍の毒性病理学的特徴を、ヒトの I 型糖尿病及び膵内分泌腫瘍のそれとそれぞれ比較解析し、類似点と相違点を考察した。

第 1 章 ラットにおける **ALX** 及び **STZ** 誘発性膵島傷害の病態解析

6 週齢の **SD** 雄ラットに、**ALX (40 mg/kg)** 及び **STZ (50, 100 mg/kg)** を静脈内投与し、投与 24 時間後の膵島について病理学的解析及び網羅的遺伝子発現解析を行った。

第 1 節 病理学的解析

いずれの投与群においても、投与 24 時間後の血糖値は対照群と比較して有意に上昇した。**ALX** 投与群の膵島では、 β 細胞の軽度な空胞変性・壊死が認められた。**STZ** 投与群では軽度から中等度の β 細胞の空胞変性・壊死及び膵島中央部へのマクロファージ浸潤、並びに膵島萎縮が認められ、これらの変化は用量増加に伴い増悪した。

第 2 節 遺伝子発現解析

上記ラットの解剖時に、膵臓の一部から凍結切片を作製し、**LCM** により膵島を単離し、**Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix)** を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。**ALX** 投与群では 500 以上の遺伝子が、**STZ** 投与群では、低用量群及び高用量群いずれにおいても、1,000 以上の遺伝子が、有意な発現上昇あるいは発現低下を示した。**ALX** 及び **STZ** 投与群において共通で発現変動した遺伝子を対象に **Gene Ontology (GO)** 解析 (機能解析) を行ったところ、発現上昇した遺伝子は免疫系及び炎症に関連する機能を有し、発現低下した遺伝子はインスリン分泌に関連する機能を有していた。いずれの投与群においても **p53** シグナル経路に関連する遺伝子の発現変動が認められたが、**ALX** 投与群では **CyclinB1 (Ccnb1)** の発現低下が、**STZ** 投与群では **CyclinD2 (Ccnd2)** の発現低下が顕著に認められた。また、クラスタリング解析により、**heat shock 70 kD protein 1A (Hspa1a)** 及び **Hsp90ab1** といった遺伝子が **ALX** 投与群で特異的に発現上昇していた。

以上より、**ALX** あるいは **STZ** による膵島傷害がそれぞれ **G1** あるいは **G2** 期の細胞周期停止に起因し、**ALX** による膵島傷害に小胞体ストレスが関与することが明らかとなった。膵島毒性の研究において、**LCM** を用いた膵島の単離とマ

イクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を組み合わせた手法は非常に有用な研究ツールである。

第2章 ラットにおける STZ/Nicotinamide (NA)誘発性膵島腫瘍の病態解析

STZ (50, 75 mg/kg, i.v.) 及び NA (350 mg/kg, p.o.) を実験初日に投与し、投与 37 週～45 週後に順次解剖を行い、形成された膵島腫瘍の病理学的解析及び網羅的遺伝子発現解析を行った。

第1節 病理学的解析

STZ 低用量群の 70%、STZ 高用量投与群の 43%に膵島腫瘍が誘発された。誘発された膵島腫瘍の 75%が膵島細胞腺腫で、残りの 25%が膵島細胞癌であった。膵島細胞腺腫には被膜形成を伴う症例があった。ほとんどの膵島細胞癌は周囲組織への浸潤像によって悪性と判断されたが、構成する腫瘍細胞は高分化であり、増殖活性も乏しかった。また、遠隔転移は認められなかった。すべての膵島腫瘍は抗インスリン抗体に強陽性を示したが、機能性 (高インスリン血症・低血糖) と判断された腫瘍はごく少数であった。

第2節 遺伝子発現解析

病理学的に分類した膵島病変 (対照群の正常部及び過形成、並びに STZ/NA 投与群の正常部、過形成、被膜形成のない腺腫、被膜形成のある腺腫、癌) を LCM により単離し、網羅的遺伝子発現解析を実施した。その結果、STZ/NA 投与群の膵島過形成、膵島細胞腺腫及び膵島細胞癌が類似した発現変動パターンを示した。これらの増殖性病変では、細胞周期及び p53 シグナル経路に関連する遺伝子が共通して発現上昇を示した。細胞周期関連の遺伝子は被膜形成のある膵島細胞腺腫及び膵島細胞癌において、より強い発現上昇を示し、両者の細胞増殖活性が高いことが示唆された。対照群の膵島過形成と STZ/NA 投与群の膵島過形成では遺伝子発現パターンが異なっていた。膵島細胞腺腫を被膜形成の有無で比較した場合、被膜形成のある膵島細胞腺腫において特異的に **Amphiregulin (Areg)** 及び **Stanniocalcin 1 (Stc1)** の発現が上昇した。また、膵島細胞癌では血管形成に関連する遺伝子の発現が特異的に低下し、血管リモデリングに関わる **Angiopoietin 2 (Angpt2)** が特異的に発現上昇していた。

以上より、ラット STZ/NA 誘発性膵島腫瘍の生物学的悪性度は低く、ほとんどが非機能性であることが示された。膵島の増殖性病変は、膵島過形成、被膜形成のない膵島細胞腺腫、被膜形成のある膵島細胞腺腫、膵島細胞癌の順に進行することが推察され、**Areg**、**Stc1** 及び **Angpt2** が膵島腫瘍の被膜形成や悪性化に関わる可能性が示された。

第3章 ラット及びヒトにおける膵島傷害及び膵内分泌腫瘍の病理学的特徴の比較

第1節 ラット薬剤誘発性膵島傷害とヒトI型糖尿病の病理学的特徴の比較

第1章で得た **ALX** あるいは **STZ** 誘発性膵島傷害モデルとヒトI型糖尿病には、低インスリン性の高血糖及び多尿といった類似性があるものの、病態発生(自己免疫活性化の有無)や病理組織学的特徴(**T**リンパ球浸潤の有無)に相違点があった。I型糖尿病関連遺伝子について、**ALX** あるいは **STZ** 傷害性ラット膵島の遺伝子発現データを用いて、階層的クラスタリングを実施したが、自己抗原関連遺伝子や **T**リンパ球活性化関連遺伝子の発現変動は認められなかった。

第2節 ラット薬剤誘発性膵島腫瘍とヒト膵内分泌腫瘍の病理学的特徴の比較

ヒト膵内分泌腫瘍の一つであるインスリノーマと **STZ/NA** 誘発性ラット膵島腫瘍は、 β 細胞由来であり、生物学的悪性度が低い点が類似していた。また、ヒト膵内分泌腫瘍では **PI3K/AKT/mTOR** 経路が活性化していることが報告されており、**STZ/NA** 誘発性ラット膵島腫瘍においても、本経路に関連する **Areg** や **Stc1** の発現上昇が認められた。**STZ/NA** 誘発性ラット膵島腫瘍とヒト膵内分泌腫瘍の遺伝子発現データ (**GEO ID: GSE73338**) を用い、種間階層的クラスタリング解析を実施したところ、ヒトのインスリノーマと **STZ/NA** 誘発性ラット膵島腫瘍は近接したクラスターに分類され、両者の類似性が示唆された。一方で、**STZ/NA** 誘発性膵島腫瘍に機能性腫瘍が少ない点や、ヒト悪性膵内分泌腫瘍で発現上昇が認められる **Angpt2** が **STZ/NA** 誘発性ラット膵島腫瘍においても発現上昇している点など、相違点も認められた。

以上より、薬剤誘発性ラット膵島傷害及び膵島腫瘍とヒトI型糖尿病及び膵内分泌腫瘍の病理学的特徴における類似点あるいは相違点が明らかになった。これらの特徴を理解したうえで、薬理学的実験の考察や毒性試験におけるヒトのリスク評価を行う必要がある。

総括

本研究では、代表的な膵島傷害物質である **ALX** 及び **STZ** を用いて、膵島傷害あるいは膵島腫瘍の病理学的解析及び網羅的遺伝子発現解析を実施し、以下の結論を得た。

1. **ALX** 投与による膵島傷害に酸化ストレスが関与することや **ALX** あるいは **STZ** による膵島傷害がそれぞれ **G1** あるいは **G2** 期の細胞周期停止に起因することなど、**ALX** 及び **STZ** の膵島への異なる急性毒性メカニズムを明らかにした。
2. ラット **STZ/NA** 誘発性膵島腫瘍は生物学的悪性度が低い非機能性腫瘍であり、膵島過形成、被膜形成のない膵島細胞腺腫、被膜形成のある膵島細胞腺腫、膵島細胞癌の順に進行し、**Areg**、**Stc1** 及び **Angpt2** が被膜形成や悪性転化に重要な役割を果たすことを示した。
3. ラット膵島傷害あるいは膵島腫瘍モデルとヒトの膵島疾患の病態を比較し、類似点と相違点を明らかにした。

以上、この研究で得られた成績は、膵島毒性機序及び膵島腫瘍発生機序の基礎となる情報を提供するとともに、薬剤誘発性ラット膵島傷害あるいは膵島腫瘍モデルの有用性を示している。

審査結果の要旨

膵島β細胞は、血糖降下作用を有する唯一のホルモンであるインスリンを分泌し、糖代謝の恒常性維持に重要な働きを担う。**Alloxan (ALX)** 及び **streptozotocin (STZ)** は代表的なβ細胞傷害性物質であり、薬剤誘発性糖尿病モデル動物の作製に頻用される。両化合物は異なる作用機序によってβ細胞を傷害することが知られているが、傷害時の膵島における遺伝子発現変化に関する研究報告は少ない。ヒトの膵島腫瘍は稀な神経内分泌系腫瘍であり、腫瘍細胞の増殖活性と生物学的悪性度が相関することが報告されている。また、網羅的遺伝子発現解析により、**PI3K/AKT/mTOR**経路などが活性化していることが知られている。一方、**SD**ラットに自然発生する膵島腫瘍の多くはβ細胞由来であるが、生物学的悪性度と相関する病理学的指標は明らかにされておらず、さらには、分子生物学的知見は皆無である。

この一連の研究では、**SD**ラットを用いて、薬剤誘発性に膵島傷害あるいは膵島腫瘍を誘発し、罹患膵島をレーザーマイクロダイセクションで単離し網羅的遺伝子発現解析を行い、病理組織学的所見との関連性を追究することで、膵島傷害あるいは膵島腫瘍の毒性病理学的特徴に関する新たな知見を提示している。

第1章では、ラットに**ALX**及び**STZ**を静脈内投与し、投与**24**時間後の膵島について病理学的解析及び網羅的遺伝子発現解析を行い、膵島傷害の特性を解析している。その結果、**ALX**及び**STZ**投与群の罹患膵島では、β細胞に空胞変性・壊死が惹起され、多数の遺伝子が有意に発現変動していることが分かった。両投与群で共通して発現上昇した遺伝子は免疫系及び炎症に関連する機能を、一方発現低下した遺伝子はインスリン分泌に関連する機能を有していた。**ALX**投与群では**Cyclin B1**の、**STZ**投与群では**Cyclin D2**の発現低下が顕著に認められ、**Hspa1a**及び**Hsp90ab1**といった遺伝子が**ALX**投与群で特異的に発現上昇していた。この結果は、**ALX**あるいは**STZ**による膵島傷害がそれぞれ**G1**期あるいは**G2**期の細胞周期停止に起因し、かつ**ALX**による膵島傷害には小胞体ストレスが関与することを示している。これらの所見は、**ALX**あるいは**STZ**を用いた糖尿病モデル動物の病態を解明する上での有用な知見であるとともに、薬剤性膵島毒性の発現機序を考察する上で参照となる基礎情報を提示している。

第2章では、**STZ**と**nicotinamide (NA)**の併用投与によって誘発したラット膵島腫瘍を用いて、病理学的解析及び網羅的遺伝子発現解析を行い、ラット膵島腫瘍の特性を詳細に解析している。病理学的解析の結果、ラット**STZ/NA**誘発性膵島腫瘍の生物学的悪性度は低く、そのほとんどが非機能性であった。また、膵島の増殖性病変を病理学的に分類し、その遺伝子発現パターンを比較することにより、膵島過形成、被膜形成のない膵島細胞腺腫、被膜形成のある膵島細胞腺腫、膵島細胞癌の順に進行することを明らかにしている。膵島細胞腺腫を被膜形成の有無で比較すると被膜形成のある膵島細胞腺腫において**Areg**及び**Stc1**の発現が特徴的に上昇しており、膵島細胞癌では**Angpt2**が特異的に発現上昇していた。これらの結果は、ラット膵島腫瘍において、**Areg**及び**Stc1**、並びに**Angpt2**が、それぞれ、膵島腫瘍の被膜形成や悪性化に関わる可能性を示唆し、腫瘍マーカーあるいは抗腫瘍薬の創薬標的となる可能性を示している。

第3章では、ラットの膵島傷害あるいは膵島腫瘍モデルとヒトの膵島疾患の病態を比較し、類似点と相違点を解析している。**ALX**あるいは**STZ**誘発性膵島傷害モデルとヒトI型糖尿病には、低インスリン性の高血糖及び多尿といった類似性があるものの、病態発生（自己免疫活性化の有無）や病理組織学的特徴（**T**リンパ球浸潤の有無）に相違点があった。**STZ/NA**誘発性ラット膵島腫瘍とヒト膵内分泌腫瘍の一つであるインスリノーマは、**β**細胞由来であること、生物学的悪性度が低いこと、**PI3K/AKT/mTOR**経路に関連する遺伝子が発現変動していることが共通しており、種間階層的クラスタリング解析においても両腫瘍の類似性が示された。しかし、ヒトのインスリノーマは機能性であるのに対し、ラット誘発膵島腫瘍は非機能性であり、機能性の有無には相違点があった。これらの結果は、ラットを用いた膵島に影響を与える薬剤の薬効薬理学的あるいは毒性学的評価のヒトへの外挿性を考察する上で重要な知見を提示している。

本研究は、膵島毒性発現機序及び膵島腫瘍発生機序に関する基礎的な情報を提供するとともに、比較病理学的な観点から薬剤誘発性ラット膵島傷害あるいは膵島腫瘍モデルの有用性を提示している。この研究成果は、獣医学・医学、特に毒性病理学・実験動物学の研究分野の新たな展開に資するものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。