

論文内容要旨

論文題目

高グルコースおよび高インスリン培養条件下におけるヒト正常膵管上皮細胞由来株についての分子生物学的検討

責任分野： 内科学第二講座 氏名： 伊藤美保

【緒言】

膵癌は本邦および欧米諸国において年々増加しており、各種画像診断法の進歩および治療法の開発にもかかわらず、未だに予後はきわめて不良である。糖尿病は膵癌に合併する疾患の中で最も頻度が高く、これまでも糖尿病が膵癌の危険因子であるという報告が散見されている。一方、オステオポンチン（以下 OPN）は、糖尿病や肥満において発現の亢進を認め様々な病態に関与することが明らかにされてきているが、膵臓での発現や機能については明らかにされていない。またこれまでに、高血糖や高インスリン血症がヒトの膵管上皮に与える影響を細胞レベルで報告した論文はなく、今回私は高グルコースおよび高インスリン培養条件がヒト正常膵管上皮細胞由来株へ与える影響を検討すると共に、同条件におけるオステオポンチンとヒト正常膵管上皮細胞由来株との関連についても検討することを実験の目的とした。

【材料と方法】

ヒト正常膵管上皮細胞に由来する細胞株である HPDE-6 を使用し、通常培地のグルコース培養条件（6mM）、および高グルコース培養条件（30mM、60mM）、さらに高インスリン培養条件（0.1nM、1nM）を組み合わせて培養した。細胞増殖能の評価、mRNA の定量、蛋白の発現解析、酸化ストレスの評価および細胞障害性の評価を行った。

【結果】

6mM グルコース培養条件での HPDE-6 の細胞増殖能に比較して、高グルコース培養条件の細胞増殖能は有意に亢進しており、高インスリン培養条件ではさらに顕著であった。また同様に OPN mRNA 発現も有意に増加していた。ウェスタンブロット法でも OPN 蛋白発現の増加が確認された。OPN-siRNA を用いた遺伝子抑制実験により、6mM および 30mM グルコース培養条件で OPN 遺伝子抑制細胞の細胞増殖能の抑制を認め、OPN が HPDE-6 の細胞増殖に関わっている可能性が示唆された。6mM グルコース培養条件に比較して、高グルコース培養条件の DNA 試料中 8-OHdG 量、SOD2 mRNA 発現量および培養上清中 LDH 活性は有意に増加していた。

【結論】

高グルコースおよび高インスリン培養条件において、HPDE-6 の細胞増殖能は亢進し、同時に OPN 発現の増加を認める。さらに、高グルコース培養条件において、HPDE-6 の酸化ストレスが亢進し、細胞障害性の増加が認められる。

平成 24年 1月 12日


山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書


申請者氏名：伊藤美保

論文題目：高グルコースおよび高インスリン培養条件下におけるヒト正常膵管上皮細胞由来株についての分子生物学的検討


審査委員：主審査委員

本郷 誠治 

副審査委員

後藤 薫 

副審査委員

上野 壽 

審査終了日：平成 24年 1月 12日

【 論文審査結果要旨 】

膵癌は本邦および欧米諸国において年々増加しており、各種画像診断法の進歩および治療法の開発にもかかわらず、未だに予後はきわめて不良である。糖尿病は膵癌に合併する疾患の中で最も頻度が高く、これまでも糖尿病が膵癌の危険因子であるという報告が散見されている。一方、オステオポンチン(以下 OPN)は、糖尿病や肥満において発現の亢進を認め様々な病態に関与することが明らかにされてきているが、膵臓での発現や機能については明らかにされていない。またこれまでに、高血糖や高インスリン血症がヒトの膵管上皮に与える影響を細胞レベルで報告した論文はなく、本学位論文によって初めて高グルコースおよび高インスリン培養条件がヒト正常膵管上皮細胞に由来する細胞株に与える影響が検討された。また同条件におけるオステオポンチンとヒト正常膵管上皮細胞由来株との関連についても検討された。

細胞は、ヒト正常膵管上皮細胞に由来する細胞株 HPDE-6 を使用し、通常培地のグルコース培養条件(6mM)、および高グルコース培養条件(30mM、60mM)、さらに高インスリン培養条件(0.1nM、1nM)を組み合わせて培養した。各々の条件において、細胞増殖能の評価、mRNA の定量、蛋白の発現解析、酸化ストレスの評価および細胞障害性の評価を行った。

6mM グルコース培養条件での HPDE-6 細胞の増殖能に比較して、高グルコース培養条件の細胞増殖能は有意に亢進しており、高インスリン培養条件ではさらに顕著であった。また同様に OPN mRNA 発現も有意に増加していた。ウェスタンブロット法でも OPN 蛋白発現の増加が確認された。OPN-siRNA を用いた遺伝子抑制実験により、6mM および 30mM グルコース培養条件で OPN 抑制細胞の増殖能の低下を認め、OPN が HPDE-6 細胞の増殖に関わっている可能性が示唆された。6mM グルコース培養条件と比べ高グルコース培養条件下で、酸化ストレスのマーカーである 8-OHdG 量と SOD2 mRNA 発現量の増加が認められ、さらに細胞膜の障害によって細胞内から培養上清中に逸脱したと推測される酵素 LDH の活性が有意に増加した。

以上の成績から、高グルコースおよび高インスリン培養条件が、ヒト膵管上皮細胞由来株 HPDE-6 の細胞増殖能を亢進させ、同時に OPN 発現を増加させることが明らかになった。さらに、高グルコース培養条件が HPDE-6 細胞の酸化ストレスを亢進させ、細胞障害性も増加させることが示唆された。

上記の研究成果より本審査委員会では、本申請者が博士(医学)を受けるに値すると判断した。