

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2009
課題番号：19590413
研究課題名 (和文) メタボリックシンドロームにおけるペルオキシレドキシナーレドックス機構の役割
研究課題名 (英文) Role of Peroxiredoxin on Metabolic Syndrome
研究代表者
笹栗 靖之 (SASAGURI YASUYUKI)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号：60140646

研究成果の概要

- 1 PRDX 過剰発現マウス (PRDX4-Tg mice) と PRDX4 過剰発現/apoE 欠損マウス (PRDX4-Tg/apoE mice) を作製した。
- 2 PRDX4-Tg mice では PRDX4 発現は膵臓に強く、メタボリック症群の重要要素である糖尿病モデルを streptozotocin (SHDS) 投与により作製し、PRDX4 の防禦作用を検討した。その結果 PRDX4 派は SHDS-induced type 1 糖尿病の進行を抑制した。
- 3 PRDX4-Tg/apoE mice は動脈壁、マクロファージに PRDX の発現を示した。コレステロール負荷による粥腫形成は優位に PRDX 4 過剰発現により抑性され、PRDX 4 は動脈硬化を予防する。

研究成果の概要 (英文) :

- 1 We generated human PRDX4 (hPRDX4) transgenic (Tg) mice, displaying a high level of hPRDX4 expression in the pancreatic islets, and then focused on the functions of PRDX4 in a type 1 diabetes mellitus (T1DM) model using a single high dose of streptozotocin (SHDS). After SHDS-injection, Tg mice showed significantly less hyperglycemia and hypoinsulinemia and a much faster response on glucose tolerance test than wild type (WT) mice. Upon comparison between these two mouse models, β -cell apoptosis was also repressed, and reversely, β -cell proliferation was enhanced in Tg mice. Real-time RT-PCR demonstrated that the expression of many inflammatory-related molecules and their receptors and transcription factors were significantly down-regulated in Tg mice. These data indicate that PRDX4 can protect pancreatic islet β -cells against injury caused by SHDS-induced insulinitis, which strongly suggests that oxidative stress plays an essential role in SHDS-induced diabetes.
- 2 To define the role of PRDX4 in atherosclerosis, we generated PRDX4-Tg and apoE knockout mice (hPRDX4-Tg/apoE^{-/-} mice). En-face quantitative and sectinal analysis of aortas demonstrated that atherosclerosis in hPRDX4-Tg/apoE^{-/-} mice fed a 1.25% cholesterol diet for 12 wk were decreased up-to 40-50% compared with apoE^{-/-}. These indicate that PRDX4 may be a suppressive factor for the progression of atherosclerosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：疾患モデル動物

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病の基盤病態は血管障害にある。長期にわたる炎症刺激の結果であると考えられている動脈硬化症を中心とする血管障害の分子病態解明と有効な治療法の開発は、高齢化社会の観点からも重要である。最近、この動脈硬化症および糖尿病はメタボリック症候群のひとつの最終的な表現型とする考えが一般化しつつある。メタボリック症候群は内臓脂肪の蓄積による肥満、耐糖能異常、高脂血症、高血圧等を主症状とする。こうした病態を基盤として発症するとされる動脈硬化症のメカニズムに関してはいまだ不明な点も多いが、アディポサイトカイン分泌異常に加えて、酸化ストレスが重要視されている。生体内では酸化的ストレス傷害を予防する抗酸化酵素が多数知られている中で、ペルオキシレドキシンの発見は比較的新しく（これをペルオキシレドキシニン・レドックス機構とする。）、既知の抗酸化酵素の狭間で具体的な疾病での研究に乏しい。

2. 研究の目的

本研究はメタボリック症候群類似の最も重要な表現型は糖尿病と動脈硬化症である。メタボリック症候群や動脈硬化の一つの原因と

して酸化ストレスが考えられており、糖尿病においても、酸化ストレスの関与が示唆されている。従来より、過酸化水素を消去する酵素としてカタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼが知られていたが、最近チオレドキシニン依存性ペルオキシダーゼが次々に同定され、これらの酵素に対してペルオキシレドキシニンという総称が与えられた。動脈硬化や糖尿病モデルでのPRDX4の働きを解析し、メタボリック症候群の異なる表現型への酸化ストレスの関与をより明確にする。メタボリック症候群におけるペルオキシレドキシニン・レドックス機構の意義を示すことは、動脈硬化の治療法のみならず、酸化的ストレスにより傷害をうける生命活動の防御法の確立に広く寄与するものである。

抗酸化ストレス酵素の大半は非分泌型であるが、ペルオキシレドキシニンでは、4型のみが分泌型として知られている。ウサギで作製したペプチド抗体でペルオキシレドキシニンタンパク質の発現を検討した結果、主としてマクロファージに陽性所見が認められることを確認した。したがって、動脈硬化への関与が期待された。最終的な期待される結果として、動脈硬化の各タイプにおけるメタボリ

ック症候群の表現型のペルオキシレドキシシン-レドックス機構への予防的関与を明確にする。これにより、予防および治療効果における動脈硬化、糖尿病というメタボリック症候群の表現型とペルオキシレドキシシン-レドックス機構の重要度の相関を示す。この結果のさらなる意義は、内外酸化ストレスの因子は薬剤、放射線、紫外線、農薬、ダイオキシン、高温、低温、低酸素状態や種々の炎症状態等、生体のいたる場所で増加する酸化ストレスにより傷害をうける生命活動早期からの防御法確立に寄与するものである。

3. 研究の方法

(1) ペルオキシレドキシシン4のトランスジェニックマウスの作製(PRDX4-Tg mice) : PRDX4のトランスジェニックマウスの作成成功したが、このマウスのPRDX4-Tgは膵臓、睾丸に発現が強かった。そこで、糖尿病はメタボリック症候群の腫瘍要素であるから、実験的糖尿病においてPRDX4は防禦的に働くか否かについて検討した。

PRDX4-Tg mice に streptozotocin (SHDS) 投与後、


- ①経時的血中グルコース、インスリン測定
- ②形態的ラ氏島、 β -cells の観察
- ③形態的アポトーシスの観察.
- ④real time RT-PCR による MMPs 遺伝子発現の観察
- ⑤ real time RT-PCR による炎症性因子遺伝子発現の観察

(2) ペルオキシレドキシシン4のトランスジェニックマウスと apoE-KO mice の作製(PRDX4-Tg/apoE^{-/-}mice) に成功した。このマウスを使いヒトと同様の動脈硬化モデルを作製し、ペルオキシレドキシシン-レドックス機構の相関を(1)と同様に検討する。

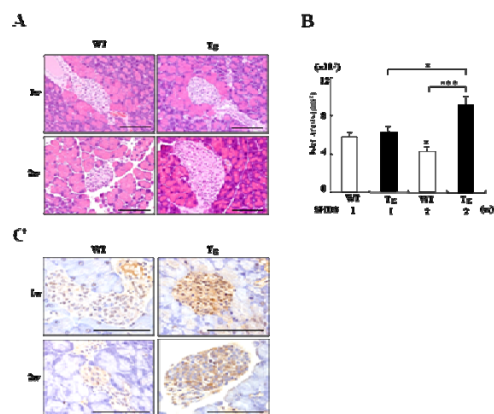
これにより、粥状硬化症における、ペルオキシレドキシシン-レドックス機構の防御機能を証明する。

- ①頸動脈結紮実験
- ②大腿動脈 cuff injury 実験
- ③高コレステロール負荷実験後
- ④ *ex-face*, sectional quantitative analysis による病理組織学的に病変の評価

4 研究成果

(1) PRDX4-Tg mice 作製に成功した。streptozotocin (SHDS)-injection は特異的に膵ラ氏島の β -cell を傷害する。PRDX4の過剰発現は β -cell の傷害を抑え、細胞の複製、血中インスリンの低下、グルコースのレベルの上昇を抑制、炎症因子 (IL1, TNF, NFkB, TNFR,  Quantitative analysis of islet areas and β -cells

Islet area after SHDS injection for 2 weeks



TLR3, TLR4, STAT1) の発現上昇を抑制した。以上より、PRDX4 が酸化ストレスによる β -cells の傷害、ラ氏島における炎症を予防することにより、糖尿病の進展を抑制することが判明した。

(2) PRDX4-Tg/apoE^{-/-}miceの作製に成功した。

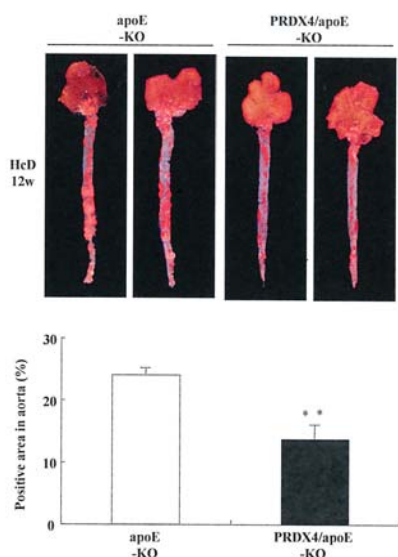
本マウスは

①頸動脈結紮実験

② 大腿動脈 cuff injury の両実験ではコントロールと差を認めなかった。

③高コレステロール食負荷により、大動脈、マクロファージにおいて PRDX の発現が亢進すること見出し、本マウスを使用し、粥状硬化症の形成と進展にたいする PRDX の防禦効果を検証した結果、1.25% 高コレステロール食負 2 wk 投与による大動脈の全体

図 EN-face quantitative analysis of atherosclerosis



粥腫の形成とその進展はコントロールに比較して 40-50% の抑制が認められた。炎症因子 (IL1, TNF, NFkB, TNFR, TLR3, TLR4, STAT1) の低下が認められ、マトリックス分解酵素 (MMPs) の産生も抑制された。これにより血中 PRDX が動脈硬化の形成と進展を抑制することが判明した。

(3) 結論: PRDX 4 はメタボリックシンドロームを予防する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

①OVEREXPRESSION OF PEROXIREDOXIN4 PROTECTS AGAINST HIGH-DOSE STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES BY SUPPRESSING OXIDATIVE STRESS AND CYTOKINES IN TRANSGENIC MICE

YAN DING,¹ SOHSUKE YAMADA,¹ KE-YONG WANG,¹ SHOHEI SHIMAJIRI,¹ XIN GUO,¹ AKIHIDE TANIMOTO,^{2,1} SHUJI KITAJIMA,³ TERUO WATANABE,⁴ HIROTO IZUMI,⁵ KIMITOSHI KOHNO,⁵ and YASUYUKI SASAGURI^{1*} Antioxidants & Redox Signaling in press 査読有,2010

[学会発表] (計 1 件)

①The role of Peroxiredoxin IV in Diabetes Mellitus, 丁 妍, 第 98 回日本病理学会、2009.5.3、国立京都国際会館

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹栗 靖之 (SASAGURI YASUYUKI)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：60140646

(2) 研究分担者

河野 公俊 (KOHNO KIMITOSHI)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：00153479