

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591060

研究課題名（和文）

含硫アミノ酸 L-システインによる膵 B 細胞保護とその作用機序の解明

研究課題名（英文）

Protection of pancreatic B-cell by the sulphur-containing amino acid L-cysteine and investigation of its underlying mechanisms.

研究代表者

仁木 一郎（NIKI ICHIRO）

大分大学・医学部・教授

研究者番号：10262908

研究成果の概要：

グルコースが高い状態ではインスリンを分泌する膵 B 細胞が細胞死を起こす。この現象は糖尿病の悪化の一因であるが、今回の研究で私たちは、含硫アミノ酸である L-システインが膵 B 細胞の細胞死を防いでいること、さらにこの作用が硫化水素（H<sub>2</sub>S）の産生によることを明らかにした。H<sub>2</sub>S といえば中毒や自殺など物騒な話題で世間を騒がせているが、このガスは膵 B 細胞内でも作られており、侵襲からこの細胞を守っていることがわかった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：糖尿病、L-システイン、膵 B 細胞、インスリン分泌、細胞死、硫化水素、グルタチオン

## 1. 研究開始当初の背景

膵B細胞を標的とした2型糖尿病の治療は、従来スルホニル尿素やグリニド系といったATP感受性K<sup>+</sup>チャネル（K<sub>ATP</sub>）を閉鎖してインスリン分泌を刺激する薬物が主に使われてきた。ところがこの薬物の一部が膵B細胞死を招くことが実験的に示され、

インスリン分泌刺激を指標とするこれまでの2型糖尿病の治療戦略は、方向性の転換を迎えることとなった。このような状況から、膵B細胞の分化・増殖を促進する、あるいは様々な侵襲による膵B細胞死を抑制し膵B細胞を保護する治療法が試行・開

発されている。膵B細胞のターンオーバーは予想外に早く、様々な病態において膵B細胞量は増減しうる。中でも2型糖尿病ではアポトーシスによる膵B細胞量の減少が顕著である。このような背景から、膵B細胞量の調節機構の解明は、糖尿病の病態の理解および膵B細胞を標的とする新たな糖尿病治療の開発に重要と考えられる。

本研究に着手した時点では、私たちはL-システインが膵B細胞からのインスリン分泌を抑えること、その抑制がL-システインの代謝産物であるH<sub>2</sub>Sに由来することを報告していた(Kaneko et al, Diabetes 55, 1391-1397, 2006)。これまでH<sub>2</sub>Sは、主に細胞の代謝および興奮性を抑える作用について様々な細胞・組織で検討されてきた。インスリン分泌の抑制作用もそのような研究の流れに立脚した成果であった。私たちはこの発見をさらに発展させ、L-システインあるいはその代謝産物であるH<sub>2</sub>Sが膵B細胞を保護するのではないか、との着想のもとに研究を進めた。

## 2. 研究の目的

本研究では、含硫アミノ酸 L-システインと代謝産物であるガス性シグナル分子 H<sub>2</sub>Sが、膵B細胞死に与える影響とその機序の解明を目的とした。興味深いことに、H<sub>2</sub>Sの細胞死に対する影響については、細胞の種類によって細胞死惹起と抑制という全く相反する結果が報告されている。そこで本研究では、高グルコースによる膵B細胞死に及ぼすL-システインの作用と、その機序を検討した。

## 3. 研究の方法

### 1) H<sub>2</sub>S 産生酵素の発現

L-システインから H<sub>2</sub>S を産生する cystathionine-β-synthase (CBS) および

cystathionine-γ-lyase (CSE)の膵島における mRNA 発現を、RT-PCR および定量的 real-time PCR で調べた。さらにこれらの酵素に対するペプチド抗体を作製し、免疫染色およびウェスタンブロット法を用いてタンパク質レベルでの発現を検討した。

### 2) H<sub>2</sub>S 測定

培養膵 B 細胞である MIN6 の H<sub>2</sub>S 含量を、HPLC を用いて検討した。

### 3) 膵島細胞死の定量

高グルコースによる膵島細胞死に対するL-システインおよびその関連物質の影響を調べた。アポトーシスによる細胞死は抗ヒストン抗体と抗DNA抗体を用いたサンドイッチ法で定量した。

### 4) 細胞内グルタチオン含量の測定

MIN6細胞をL-システインおよびNaHSとインキュベートし、その総グルタチン量を市販のキットを用いて測定した。

膵島を高グルコース、L-システインおよびNaHSとインキュベートし、発現遺伝子のチップ解析を行った。

### 6) インスリン分泌実験

膵島を18時間高グルコース条件で前処置し、その後のグルコースに対するインスリン分泌を測定した。この前処置にL-システイン及び関連物質を加え、分泌能への影響を調べた。

### 7) 糖尿病モデル動物を用いた血中 L-システイン測定

糖尿病モデル動物である膵B細胞特異的カルモジュリン過剰発現マウスの末梢血中L-システイン値を測定した。

## 4. 研究成果

私たちは、マウス膵島におけるH<sub>2</sub>S産生酵素の発現を調べ、CBSが恒常的に発現されて

いるのに対し、CSE の発現は高濃度のグルコースにより誘導されることを見いだした。また、マウス膵B細胞由来の培養細胞株であるMIN6を用いた実験から、高濃度のグルコースにより H<sub>2</sub>S 産生が増加することを明らかにした。高グルコースによる培養を続けると膵島細胞では細胞死が起きるが、L-システインおよび H<sub>2</sub>S ドナーである NaHS は、この細胞死を抑制した。L-システインの細胞保護作用は CSE 阻害薬である DL-propargylglycine によって消失した。また、抗酸化物質であるグルタチオン産生の亢進が L-システインおよび NaHS の保護作用の一因であることがわかった。さらに膵島を L-システイン存在下で培養することにより、培養後のインスリン分泌が増強されることを明らかにした。L-システインおよび NaHS で処理した膵島における遺伝子発現変化の網羅的解析では、細胞死に直接関連する分子候補は得られなかった。また、糖尿病動物モデルである膵B細胞特異的カルモジュリン過剰発現マウスの血中 L-システイン濃度を正常と比較検討したが、有意の差はなかった。この結果については更なる検討が必要である。

これらの結果から、L-システインの代謝による内因性 H<sub>2</sub>S 産生は、細胞に加わる障害を回避するために膵B細胞に備わっている「自己防御機構（内因性のブレーキ；intrinsic brake）」であることが示唆された。これまでの私たちの検討では、この保護作用は主に酸化ストレスの軽減や細胞内 Ca<sup>2+</sup>の低下によってもたらされるものと考えられる。私たちは、H<sub>2</sub>S 産生の意義のひとつが、2型糖尿病の高血糖状態における膵B細胞量減少に歯止めをかけることであると考えている。この膵B細胞保護機構は糖尿病の病態解明に貢献し、膵B細胞量の保護をターゲットとする新しい糖

尿病治療に応用しうるものと期待している。

#### 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 7件)

1. Kaneko Y, Kimura T, Taniguchi S, Souma M, Kojima Y, Kimura Y, Kimura H, Niki I (2009) Glucose-induced production of hydrogen sulfide may protect the pancreatic beta-cells from apoptotic cell death by high glucose. FEBS Lett. 583, 377-82 査読有
2. Kimura T, Kaneko Y, Yamada S, Ishihara H, Senda T, Iwamatsu A, Niki I (2008) The GDP-dependent Rab27a effector coronin 3 controls endocytosis of secretory membrane in insulin-secreting cell lines. J Cell Sci. 121(Pt18):3092-3098. 査読有
3. Matsumura K, Niki I, Tian H, Takuma M, Hongo N, Matsumoto S, Mori M (2008) Radioimmunoscintigraphy of pancreatic cancer in tumor-bearing athymic nude mice using <sup>99m</sup>Tc-technetium-labeled anti-KL-6/MUC1 antibody. Radiation Medicine 26, 133-139. 査読有
4. Yuzawa Y, Niki I, Kosugi T, Maruyama S, Yoshida F, Takeda M, Tagawa Y, Kaneko Y, Kimura T, Kato N, Yamamoto J, Sato W, Nakagawa T, Matsuo M (2008) Diabetic nephropathy in transgenic mice overexpressing beta cell calmodulin. J Am Soc Nephrol 19, 1701-1711. 査読有

5. Tsunekawa S, Yamamoto N, Tsukamoto K, Itoh Y, Kaneko Y, Kimura T, Ariyoshi Y, Miura Y, Oiso Y, Niki I (2007) Protection of pancreatic beta-cells by exendin-4 may involve the reduction of endoplasmic reticulum stress; in vivo and in vitro studies. J Endocrinol. 193 : 65-74. 査読有
6. 仁木一郎 (2008) 「膵β細胞のグルコース認識と分泌経路」新時代の糖尿病学 (1) 日本臨床 66巻 増刊号3、日本臨床社、145-149. 査読なし
7. 金子雪子、木村俊秀、仁木一郎 (2007) 硫化水素とインスリン分泌 内分泌・糖尿病科 25(3)、科学評論社、245-249. 査読なし

[学会発表] (計 20 件)

1. 木村俊秀、谷口繁生、東家一雄、仁木一郎 (2009年3月18日) GDP型Rab27a結合タンパク質coronin 3によるアクチン細胞骨格制御とインスリン顆粒膜のリサイクリング. 第82回日本薬理学会 (横浜)
2. 谷口繁生、金子雪子、木村俊秀、仁木一郎 (2009年3月17日) マウス膵島における硫化水素の細胞保護作用. 第82回日本薬理学会 (横浜)
3. 木村俊秀、山田将護、谷口繁生、仁木一郎 (2008年12月9日) GDP型Rab27aはcoronin3と結合しインスリン顆粒膜のエンドサイトーシスを制御する. 第31回日本分子生物学会年会 (神戸)
4. 谷口繁生、金子雪子、木村俊秀、仁木一郎 (2008年11月28日) 膵ランゲルハンス氏島における硫化水素産生酵素CSEの発現. 第60回日本薬理学会西南部会. (米子)
5. 谷口繁生、金子雪子、木村俊秀、仁木一郎 (2008年5月23日) 膵B細胞におけるL-システイン代謝酵素の発現誘導を介した硫化水素産生調節. 第51回日本糖尿病学会年次学術集会 (東京)
6. 木村俊秀、岩松明彦、仁木一郎 (2008年5月23日) GDP型Rab27aはcoronin 3と結合しインスリン顆粒膜のエンドサイトーシスを制御する. 第51回日本糖尿病学会年次学術集会 (東京)
7. 仁木一郎、恒川 新、木村俊秀、大磯ユタカ (2008年4月19日) インクレチンの小胞体ストレス抑制作用による膵B細胞庇護. 第2回インクレチン研究会 (大阪)
8. 仁木一郎、金子雪子 (2008年3月19日) 硫化水素 (H<sub>2</sub>S)は膵B細胞を糖毒性から保護する. 第81回日本薬理学会 (横浜) シンポジウム
9. 木村俊秀、山田将護、岩松明彦、仁木一郎 (2008年3月18日) GDP型Rab27a結合タンパク質coronin 3によるインスリン顆粒膜のリサイクリング機構の解明. 第81回日本薬理学会 (横浜)
10. 木村俊秀、岩松明彦、仁木一郎 (2007年11月22日) GDP型Rab27a結合タンパク質の同定と機能解析. 第59回日本薬理学会西南部会. (宮崎)
11. 仁木一郎、金子雪子、木村俊秀 (2007年11月22日) 硫化水素産生酵素CSEの膵B細胞における発現調節とその意義. 第59回日本薬理学会西南部会. (宮崎)
12. Yuzawa Y, Kosugi T, Kato T, Yoshida T, Tagawa Y, Takeda M, Sato W, Nakagawa T, Matsuo S, Niki I (Nov14-19 2006) 「Possible involvement of a VEGF receptor

- subtype-dependent mechanism in the pathogenesis of diabetic nephropathy in the beta cell-specific calmodulin overexpressing mice .39th ASN Annual Renal Week Meeting in Renal Week 2006、 San Diego Convention Center 、 San Diego, California, USA
13. Yuzawa Y, Kosugi T, Hayashi H, Maruyama S, Yoshida F, Tagawa Y, Takeda M, Matsuo S, Niki I (Sept 15, 2006) Possible involvement of a VEGF receptor subtype-dependent mechanism in the pathogenesis of diabetic nephropathy in the beta cell-specific calmodulin overexpressing mice. 42<sup>nd</sup> Annual meeting of European Association for the Study of Diabetes, Copenhagen, Denmark.
14. Kaneko Y, Kimura T, Kimura H, Niki I (Sept 2006) L-Cysteine inhibits insulin release through the metabolic production of hydrogen sulfide, a novel gasotransmitter. 42nd Annual meeting of European Association for the Study of Diabetes, Copenhagen, Denmark.
15. Niki I (Sept 2006) L-Cysteine metabolism and production of hydrogen sulfide, an inhibitory messenger for insulin release. Seminar at Peninsula Medical School, Plymouth, England.
16. 木村俊秀, 金子雪子, 仁木一郎 (2007年5月25日) 低分子量Gタンパク質 Rab27aの膵B細胞における新規標的タ

ンパク質の同定. 第50回日本糖尿病学会年次学術集会 (仙台)

17. 金子雪子, 木村俊秀, 木村英雄, 仁木一郎 (2007年5月25日) CSE発現を介した細胞内H<sub>2</sub>S産生は膵β細胞を保護する. 第50回日本糖尿病学会年次学術集会 (仙台)
18. 仁木一郎 (2007年8月18日) 「硫化水素による細胞庇護; 膵B細胞に内蔵された自己防衛機構」第4回九州先進糖尿病研究会 (福岡)
19. 仁木一郎 (2007年7月28日) 「ガス性シグナル分子硫化水素; 膵B細胞に内在するブレーキ」第7回Islet Biology研究会 (東京)
20. 仁木一郎 (2007年4月13日) 「働かせる」から「いたわる」へ・・・インスリン分泌研究の変遷. 第1回福岡 Islet Biology研究会 (福岡)

[図書] (計 1件)

1. 仁木一郎 (2007) インスリン分泌とプロテインキナーゼ. 『糖尿病学』 (門脇孝、石橋 俊、佐倉 宏、野田光彦、戸辺一之 編) 西村書店、93-100.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページで研究内容・研究実績を公開  
<http://www.med.oita-u.ac.jp/pharmacology/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

仁木 一郎 (NIKI ICHIRO)  
大分大学・医学部・教授  
研究者番号：10262908

### (2) 研究分担者

金子 雪子 (KANEKO YUKIKO)  
大分大学・医学部・助教  
研究者番号：00381038

木村 俊秀 (KIMURA TOSHIHIDE)  
大分大学・医学部・助教  
研究者番号：60404373  
(平成 19 年度のみ)

### (3) 連携研究者

木村 俊秀 (KIMURA TOSHIHIDE)  
大分大学・医学部・助教  
研究者番号：60404373  
(平成 20 年度のみ)

谷口 繁生 (TANIGUCHI SHIGEKI)  
大分大学・医学部・助教  
研究者番号：90392406  
(平成 20 年度のみ)