

機関番号：23803
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590085
 研究課題名 (和文) 膵β細胞のCa依存性アポトーシスに関わる分子間ネットワークの解析と治療標的の探索
 研究課題名 (英文) Intermolecular network involved in calcium-dependent apoptosis of pancreatic beta-cells and possible targets for diabetes treatment
 研究代表者
 石川 智久 (ISHIKAWA TOMOHISA)
 静岡県立大学・薬学部・教授
 研究者番号：10201914

研究成果の概要 (和文)：2型糖尿病におけるインスリン分泌不全の原因となるβ細胞アポトーシスの誘導機序について検討した。高血糖時の酸化ストレスを模する過酸化水素でβ細胞を処置すると、1時間以内に終息するIP₃受容体を介した小胞体からのCa²⁺遊離が惹起され、これがトリガーシグナルとなって、持続性のミトコンドリア内Ca²⁺濃度上昇が導かれ、ミトコンドリアからシトクロムcが遊離されて、β細胞のアポトーシスが誘導されることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：We investigated mechanisms for apoptosis induction in pancreatic beta-cells, which can be responsible for impairment of insulin secretion in type 2 diabetes. The treatment of beta-cell line INS-1 with H₂O₂, which resembled diabetic oxidative stress, induced a transient intracellular Ca²⁺ elevation. The response was mediated by Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum through IP₃ receptors and terminated within one hour. This seemed to become a trigger signal for beta-cell apoptosis induction; the transient cytosolic Ca²⁺ elevation led to prolonged elevation of mitochondrial Ca²⁺ concentration, thereby inducing cytochrome c release from mitochondria and beta-cell apoptosis.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2009年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：薬理学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：膵β細胞、アポトーシス、カルシウム、ミトコンドリア、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

自己免疫機序による β 細胞の破壊によって発症する1型糖尿病は、 β 細胞アポトーシスが主因と考えられており、その発生機序等、詳細な検討が行われている。一方、インスリン分泌不全とインスリン抵抗性によって発症する2型糖尿病においても、患者の β 細胞量が健常者の半分以下に減少していることや、その減少が主に β 細胞のアポトーシスによって生じることが証明された。すなわち、アポトーシスによる β 細胞量の減少が2型糖尿病におけるインスリン分泌不全の一因と考えられ、2型糖尿病治療においても β 細胞のアポトーシス制御が注目を集めている。ただし、1型糖尿病と2型糖尿病における β 細胞アポトーシスには、類似点はあるものの、多くの相違点が示されている。よって、1型糖尿病研究での情報を2型糖尿病にそのまま転用することは難しい。そこで、 Ca^{2+} 依存性を2型糖尿病における β 細胞アポトーシスの特徴のひとつと捉えることとした。慢性高血糖によるインスリン分泌不全の原因のひとつに酸化ストレスが挙げられ、 H_2O_2 刺激により β 細胞アポトーシスが誘導されることが知られていた。このアポトーシスの少なくとも一部は Ca^{2+} 依存性の機序により誘導されることも示唆されていた。しかし、 β 細胞における Ca^{2+} 依存性アポトーシスのメカニズムを詳細に検討した報告はない。

2. 研究の目的

2型糖尿病におけるインスリン分泌不全の原因の一つである β 細胞アポトーシスに着目し、高濃度グルコースや酸化ストレスにより誘導される Ca^{2+} 依存性アポトーシスにターゲットを絞って、その誘導機序に関わる分子を同定する。さらに、これら分子間の相互

作用について、濃度および時間軸を意識した解析を行うことにより、2型糖尿病における β 細胞アポトーシスに関わる分子間ネットワークの解明を目指す。

3. 研究の方法

β 細胞株 INS-1 に酸化ストレス刺激(H_2O_2)によりアポトーシスを誘導した。アポトーシスは、Annexin V-FLUOS Staining Kit を利用したフローサイトメーターによる定量的方法、アポトーシスによる DNA 断片化の DNA ラダーによる検出、およびシトクロム c のミトコンドリアからの遊離の検出により評価した。また、 Ca^{2+} 蛍光試薬 fura-PE3、dihydro rhod-2 を負荷した細胞を用いて、それぞれ細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)、ミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度($[\text{Ca}^{2+}]_{mt}$)を解析した。 H_2O_2 刺激によるアポトーシス誘導および $[\text{Ca}^{2+}]_i$ や $[\text{Ca}^{2+}]_{mt}$ の変化に対する各種特異的阻害薬の効果を調べ、 H_2O_2 刺激によるアポトーシスに関与するイオンチャネルやトランスポーター分子の同定、および相互作用を解析した。

4. 研究成果

(1) 低濃度 H_2O_2 による IP_3 受容体を介した小胞体からの Ca^{2+} 遊離が β 細胞アポトーシス誘導のトリガーシグナルとなる

様々な濃度や作用時間での検討を行った結果、 β 細胞株 INS-1 を $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 で 18 時間処置することにより誘導されるアポトーシスが、細胞質 Ca^{2+} キレート剤 BAPTA/AM により完全に抑制されることを確認した。そこでこの条件を用いて、 Ca^{2+} 依存性アポトーシスの誘導メカニズムを検討した。その結果、 Ca^{2+} 依存性アポトーシスは、小胞体膜 IP_3 作動性 Ca^{2+} チャネルおよび細胞膜カチオンチャネルを阻害する 2-APB、および IP_3 作動性 Ca^{2+}

チャンネル阻害薬 xestospongin D により完全に抑制された。しかし、カチオンチャンネル阻害薬 SKF-96365 や Gd^{3+} はアポトーシスを部分的に抑制するに留まった。興味深いことに、 H_2O_2 処置 30 分後から BAPTA/AM や 2-APB を作用させても、アポトーシスは抑制されなかった。また、 H_2O_2 により、処置後約 30 分で終息する一過性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と、約 30 分後から徐々に上昇する持続性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の 2 相性の反応が惹起されることを確認した。この第一相目の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、 IP_3 受容体を介した小胞体からの Ca^{2+} 遊離とそれに伴って生じるストア作動性 Ca^{2+} 流入に起因することを証明した。以上より、膵 β 細胞株 INS-1 において、 H_2O_2 により IP_3 受容体を介した Ca^{2+} 遊離が惹起され、それにより誘発されるストア作動性 Ca^{2+} 流入とともに、一過性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こし、そしてこの 30 分以内に終息する $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が 18 時間後に観察されるアポトーシスのトリガーシグナルとして作用することが示唆された。

(2) β 細胞における Ca^{2+} 依存性アポトーシスには $[Ca^{2+}]_{mt}$ 上昇により誘発されるミトコンドリアからのシトクロム c 遊離が関与する

H_2O_2 (100 μM) 1 時間処置により、一過性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と、緩徐に上昇する持続性の $[Ca^{2+}]_{mt}$ 上昇が惹起された。いずれの反応も 2-APB により有意に抑制された。また、 H_2O_2 (100 μM) 1 時間処置により、細胞質中のシトクロム c 量が上昇することを確認した。以上より、 H_2O_2 による IP_3 受容体からの Ca^{2+} 遊離を介した一過性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が持続的な $[Ca^{2+}]_{mt}$ 上昇を導き、ミトコンドリアからのシトクロム c 遊離を促進して、アポトーシスを誘導することが示唆された。

(3) 生理的濃度範囲の NO はストア作動性

Ca^{2+} 流入を抑制することにより Ca^{2+} 依存性アポトーシスを抑制する

我々は以前、生理的濃度範囲の NO が膵 β 細胞における $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応を抑制することを報告した (Kaneko et al., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2003; 284: C1215-C1222)。そこで、NO が酸化ストレスによる β 細胞アポトーシスに及ぼす影響を調べた。NO 供与薬 DETA/NO は、100 μM 以下の濃度で H_2O_2 誘導アポトーシスに対して抑制作用を示した。また、10 μM DETA/NO は H_2O_2 により惹起される $[Ca^{2+}]_i$ 上昇およびストア作動性 Ca^{2+} 流入を抑制した。以上の結果から、生理的濃度範囲の NO は、ストア作動性 Ca^{2+} 流入を抑制することにより、酸化ストレス誘導アポトーシスに対して抑制効果を示すことが示唆された。

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 11 件)

- ① Takada M, Noguchi A, Sayama Y, Kaneko Y, Ishikawa T. IP_3 receptor-mediated initial Ca^{2+} mobilization constitutes a triggering signal for H_2O_2 -induced apoptosis in INS-1 β -cells. *Biol. Pharm. Bull.* (2011) in press 査読有
- ② Kaneko Y, Kimura T, Taniguchi S, Souma M, Kojima Y, Kimura Y, Kimura H, Niki I. Glucose-induced production of hydrogen sulfide may protect the pancreatic β -cells from apoptotic cell death by high glucose. *FEBS Lett.* 583, 377-82 (2009) 査読有
- ③ Noguchi A, Takada M, Nakayama K, Ishikawa T. cGMP-independent anti-apoptotic effect of nitric oxide on thapsigargin-induced apoptosis in the

pancreatic β -cell line INS-1. Life Sci. 83, 865-870 (2008) 査読有

[学会発表] (計 32 件)

- ① Sayama Y, Noguchi A, Takada M, Kaneko Y, Ishikawa T. Ca^{2+} -dependent mechanism for hydrogen peroxide-induced apoptosis in pancreatic β -cells. 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology (Copenhagen Denmark). Basic Clin. Pharmacol. Toxicol., 107 (Suppl. 1): p.564、2010 年 7 月 20 日
- ② 石川智久、野口亜希子、高田正弘. 膵 β 細胞株 INS-1 における低濃度 NO のアポトーシス抑制作用. 第 9 回日本 NO 学会 学術集会 (静岡)、抄録集、p.104、2009 年 5 月 8 日
- ③ Noguchi A, Takada M, Ishikawa T. A role of Ca^{2+} in hydrogen peroxide-induced apoptosis of pancreatic β -cells. 第 82 回日本薬理学会年会 (横浜)、J. Pharmacol. Sci., 109 (Supl. I), 100P、2009 年 3 月 18 日

[図書] (計 1 件)

- ① Nakayama K, Obara K, Ishikawa T, Nishizawa S. Mechanosensitivity in Cells and Tissues 3. pp. 453-481 (2010) Springer, Dordrecht

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/pharmaco/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

石川 智久 (ISHIKAWA TOMOHISA)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：10201914

(2)研究分担者

金子 雪子 (KANEKO YUKIKO)

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：00381038