

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590993

研究課題名（和文）2型糖尿病の発症に果たす膵ラ氏島内マクロファージ浸潤の役割とその分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of involved mechanisms for macrophage infiltration into pancreatic islets and of its role on the occurrence of type 2 diabetes.

研究代表者

石田 均 (ISHIDA HITOSHI)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：80212893

研究成果の概要（和文）：2型糖尿病状態下では、膵β細胞と脂肪細胞において共通の機序として、少なくとも一部は JNK ならびに IκB-dependent pathway を介して、膵ラ氏島や脂肪組織へのマクロファージ浸潤を促進する MCP-1 放出が増大していると考えられる。さらに MCP-1 放出を抑制することで、これらの細胞に対し保護的に作動する機構について脂肪細胞を用いて予備的な検索を進めたところ、ミトコンドリア内への metabolic uncoupling の導入による AMP-activated protein kinase の活性化や、温熱（41℃）処理による内因性 heat shock protein 72 発現の増強が重要な役割を果たす可能性が推測された。

研究成果の概要（英文）：The JNK and IκB-dependent pathways were deduced, at least in part, as common mechanisms for the increased release of MCP-1 from pancreatic MIN6β cells and 3T3L1 adipocytes under diabetic conditions, leading to the enhancement of macrophage infiltration into pancreatic islets and adipose tissues, respectively. In addition, we explored the cytoprotective mechanism to reduce MCP-1 release from 3T3L1 adipocytes, and it was found that the induction of metabolic uncoupling in mitochondria to activate the AMP-activated protein kinase and also of heat shock protein 72 at 41℃ could be important in these cells for the reduction of MCP-1 release.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：2型糖尿病、膵ラ氏島、マクロファージ、サイトカイン、熱ショック蛋白

1. 研究開始当初の背景

日本人の2型糖尿病の発症機構において重要な役割を果たしているグルコース刺激に対する選択的なインスリン分泌障害の成

因を解明することは、インスリン分泌機構を研究している国内外の研究者の長年の夢である。この分野において私共は、2型糖尿病動物や長時間高グルコース存在下に培養し

た膵β細胞内での糖代謝機構の機能異常や、細胞内Ca²⁺動態の異常、さらにはSNARE蛋白群のなかのsyntaxin1AやSNAP-25の発現異常に関する一連の報告を世界に先駆けて行ってきた。一方、酸化ストレスと膵β細胞機能障害との関連については、従来より1型糖尿病でのラ氏島炎にともなう膵β細胞死との関連が述べられていたが、2型糖尿病にみられるグルコース刺激に対するインスリン分泌不全の成因との関連については注目がなされていなかった。私共も約15年前に膵β細胞において酸化ストレスが糖代謝機構を障害してグルコース刺激に対するインスリン分泌を抑制すること、そしてその効果は可逆的であることを観察していたが、その後膵β細胞にNO合成酵素が発現していることならびに2型糖尿病動物の膵β細胞で内因性の酸化ストレスが増大していることを確認するに至り、2型糖尿病のインスリン分泌不全の成因に関する酸化ストレスの作用機序を検討することとした。興味深いことに最近になり、2型糖尿病モデル動物の膵ラ氏島にマクロファージが浸潤し、局所での炎症反応や酸化ストレスの増大に関与する可能性が報告されている。私共は予備的検討ながら、代表的なケモカインであり、臓器へのマクロファージの浸潤を促進する因子のmonocyte chemoattractant protein (MCP)-1や、血管新生因子のvascular endothelial growth factor (VEGF)が膵β細胞に多く発現し、さらに糖尿病状態下にそれらの発現と分泌がともに増大する事実を観察しており、酸化ストレス下でのインスリン分泌不全がグルコース刺激に対し選択的であることを考え合わせると、2型糖尿病の発症機転に関与する浸潤マクロファージの役割と、その分子機構の中の責任分子を同定することは、新たな視点からの2型糖尿病の病因の解明とともに、その原因療法の構築に直接つながると考えられる。

2. 研究の目的

日本人の2型糖尿病の特徴であるグルコース刺激に対する選択的なインスリン分泌不全の成因を明らかにするために研究を進め、糖尿病状態下の膵β細胞では細胞内での糖代謝機構に障害が生じ、その結果の1つとしてATP感受性K⁺チャネル(K_{ATP}チャネル)の閉鎖不全が生じること、また代謝シグナルと細胞内Ca²⁺上昇を感知するセンサー機構を内在したインスリン分泌顆粒放出系を形成する重要な分子であるSNARE蛋白群のsyntaxin AやSNAP 25の発現低下と機能異常の存在、さらには膵β細胞の糖代謝機構の障害に酸化ストレスが介在している事実を明らかにしてきた。しかしながら糖尿病状態下の膵β細胞内の酸化ストレス増大の機

序や、細胞内情報伝達系さらにはインスリン分泌顆粒放出系に対する影響についてはいまだ不明な点が多く残されている。そこでまず本研究では、2型糖尿病にみられる膵ラ氏島内での局所的炎症や酸化ストレス生成に重要な役割を担っていると考えられるマクロファージの浸潤の機序と、それに関与する細胞内情報伝達系の同定を図ることとした。また最近になり脂肪細胞においても高血糖状態下に内因性の酸化ストレスの生成が増大し、2型糖尿病の病態の1つであるインスリン抵抗性の成因としての酸化ストレスの重要性が指摘されている。さらにこの酸化ストレスの増大は、脂肪組織に浸潤したマクロファージから放出された種々のサイトカインに依存することも明らかにされている。今回の検討ではまず第一に、この膵β細胞と脂肪細胞に共通したマクロファージの浸潤に関する分子基盤と、その変化に関与する細胞内情報伝達系について両細胞系で合わせて検討を加えることで、2型糖尿病の成因に重要な役割を果たすことが良く知られているインスリン分泌不全とインスリン抵抗性の双方に対し、共通して深く関与する分子機構の存在について探究することとした。そして第二に、サイトカイン放出を抑制することで細胞保護的に作動する生体内メカニズムを模索する目的で、MCP-1放出に対する抑制機構に焦点を当て、その機序を含めた検討を新たに進めた。

3. 研究の方法

(1)膵β細胞株のMIN6細胞を高濃度グルコース(25mM)ならびに高濃度パルミチン酸(0.3mM)存在下に長時間培養し、MCP-1ならびにVEGF放出量の増大をimmunoblotting法により定量化し検討する。そしてその機構を明らかにする目的で、酸化剤のN-acetyl cysteinならびに種々の細胞内情報伝達系のインヒビター処理により蛋白分泌量の変動を、同様にimmunoblotting法により検討する。なかでもAkt、ERK、JNK、p38MAPKのリン酸化状態の変化については、抗リン酸化アミノ酸抗体を用いたimmunoblotting法による検討を加える。

(2)分化誘導した3T3L1細胞を高濃度パルミチン酸(0.3mM)存在下に長時間培養し、人為的に肥大化を導入する。そしてMCP-1ならびにVEGF放出量の増大を、(1)と同様にimmunoblotting法にて検討する。またその機構についても(1)と同様にN-acetyl cysteinや種々の細胞内情報伝達系のインヒビター処理により検討するとともに、Akt、ERK、JNK、p38MAPKのリン酸化状態の変化につ

いても定量化により比較検討を加える。

4. 研究成果

(1) 膵β細胞株のMIN6細胞を用いて、高濃度グルコース(25mM)ならびに高濃度パルミチン酸(0.3mM)存在下に長時間培養の後、MCP-1の発現と培養液中への放出の変化を検討したところ、明らかな増加が認められた。またこの増大は抗酸化剤のひとつであるN-acetyl cysteinの同時投与により有意に抑制されたが、さらにIκB phosphorylation inhibitorの同時投与にても同様に有意に抑制された(図1)。したがって2型糖尿病状態下のglucolipototoxicityの存在により膵β細胞からのMCP-1放出が増加し、その結果マクロファージの浸潤が促進されること、そしてその機序の少なくとも1つに内因性酸化ストレスの増大と、その下流のシグナルとしてのIκB-dependent pathwayが重要な役割を果たしている可能性が考えられた。さらに、浸潤したマクロファージから放出されることが知られているサイトカインの一つであるTNF-αにより、MIN6細胞からのMCP-1放出の明らかな増強を認めた(図2)ことから、2型糖尿病状態下の膵ラ氏島ではマクロファージの浸潤がその病態の進行とともにさらに増大する事実が推測された。

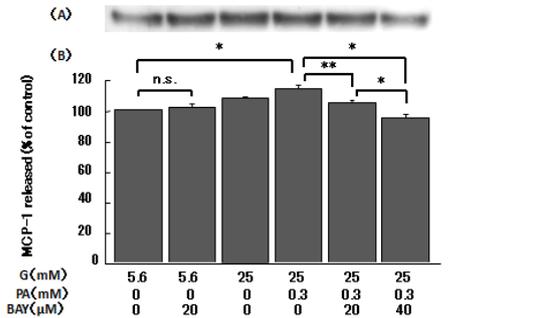


図1: 2型糖尿病状態下の膵β細胞でのMCP-1放出増大に対する阻害薬の効果

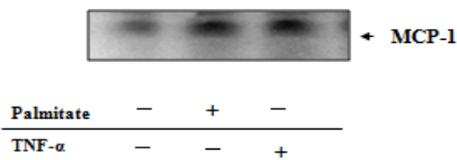


図2: 膵β細胞からのMCP-1放出へのTNF-αの増強効果

(2) 2型糖尿病の成因として、膵β細胞からのインスリン分泌不全とともに、重要な役割を果たしている脂肪細胞でのインスリン抵抗性の分子機構においても、同様に内因性酸化ストレスの増大が関与していること、さらに脂肪組織へのマクロファージの浸潤が観察されることが報告されている。これらの所見

は2型糖尿病の膵ラ氏島と類似していることから、分化誘導した3T3L1脂肪細胞を用いて以下の検討を行った。すなわち、高濃度パルミチン酸(0.3mM)存在下に細胞を長時間培養したところ、MCP-1ならびに脂肪組織での血管新生とそのadipogenesisに関与するVEGFの発現ならびに放出の増加が認められた。また同時に細胞での内因性酸化ストレスの増大も認められた。そこでその下流の細胞内情報伝達系の関与について検討を進めたところ、脂肪細胞におけるMCP-1の放出増大にP38MAPKやJNKならびにIκB経路の活性化の関与が、一方でVEGFの放出増大には低酸素非依存的なPI3K経路の活性化がそれぞれ関与していることが示された(図3)。またMCP-1とVEGFの間の相互作用は認められず(図4)、これらのサイトカインはお互いに独立して病態の形成に関与している事実が示唆された。そこで以降の検討については、まずMCP-1の調節機構に焦点を当てて進めて行くこととした。

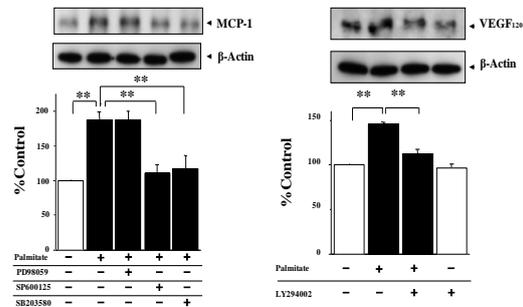


図3: 高濃度パルミチン酸による脂肪細胞からのMCP-1放出増大(左)とVEGF放出増大(右)に対する阻害薬の効果

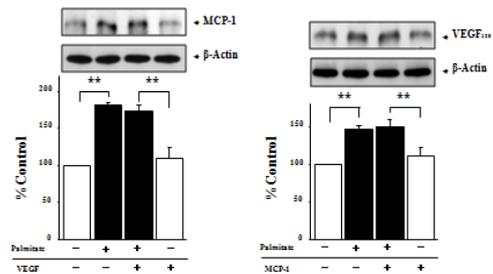


図4: 同条件によるMCP-1放出増大に対するVEGFの効果(左)とVEGF放出増大に対するMCP-1の効果(右)

(3) 細胞からのMCP-1放出を抑制する手段を検索する目的で、膵β細胞と同程度に強くMCP-1を発現している脂肪細胞を用いて、以下の予備的な検討を加えた。分化誘導した3T3L1脂肪細胞に、ミトコンドリア内の酸化的リン酸化反応に対するuncouplerのdinitrophenol(DNP)により、人為的にmetabolic uncouplingを導入したところ、細胞からのMCP-1放出の有意な抑制が認めら

れた (図 5 左)。なおこの条件下では内因性の酸化ストレスの増大は生じなかったものの、一方で小胞体ストレスの増大 (図 5 右) と AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性化が認められた。さらに脂肪細胞での AMPK 活性化を介して MCP-1 放出が抑制されること、そしてこの機序の少なくとも一部には JNK 活性化の抑制が関与している事実が示された (図 6)。したがって、同様の機構が膵β細胞においても作動している可能性が考えられることから、とくに AMPK 活性化が MCP-1 放出抑制に果たす機序や、他の炎症性サイトカイン放出への影響とその機序の詳細について、今回の脂肪細胞と同様に今後検討する必要がある。

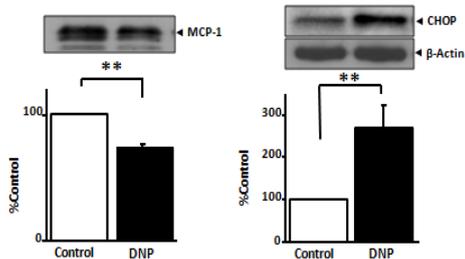


図 5: DNP による脂肪細胞からの MCP-1 放出の抑制 (左) と小胞体ストレスの増大 (右)

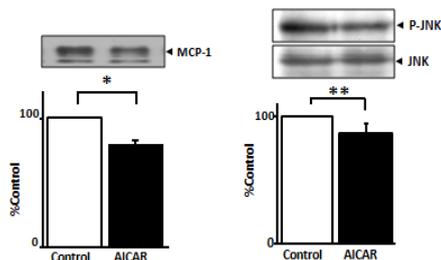


図 6: AMPK 活性化による脂肪細胞からの MCP-1 放出の抑制 (左) と JNK 活性化の抑制 (右)

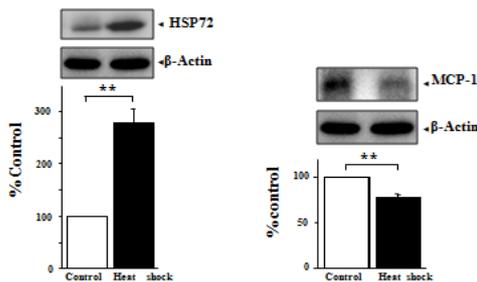


図 7: 温熱 (41°C) 処理による脂肪細胞での HSP72 の増加 (左) と MCP-1 放出の抑制 (右)

(4)最近になり、私達は浸潤マクロファージ由来と想定される IL-1β 刺激により、脂肪細胞での熱ショック蛋白 (HSP) 72 の発現が減少することを見出した。また肥満状態下の脂肪組織では、HSP72 発現が減少することが報告されている。そこで今回、3T3L1 脂肪細胞を *in vitro* の系で温熱処理することで内因

性の HSP72 発現を増大させ、MCP-1 の分泌動態について解析を行った。温熱処理のために細胞を 41°C の条件下で 24 時間培養したところ、細胞内の HSP72 含量が非処理の対照群の 2.8 倍へと有意に増加するとともに、細胞からの MCP-1 分泌量が対照群に比し有意に減少した (図 7)。以上の成績より、同様の内因性機序が膵β細胞においても、(3)のミトコンドリア内における metabolic uncoupling に加えて作動している可能性が考えられることから、MIN6 細胞や単離膵ラ氏島を用いて検討するとともに、HSP72 の 2 型糖尿病状態下での膵βならびに脂肪細胞保護機構に果たす役割を明らかにし、さらにこれらの機構に関与している細胞内情報伝達系の詳細についても、今後新たに探索を進めて行く予定である。

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 6 件)

- ① K. Takahashi, K. Miyokawa-Gorin, K. Handa, A. Kitahara, R. Moriya, H. Onuma, Y. Sumitani, T. Tanaka, H. Katsuta, S. Nishida, K. Yoshimoto, H. Ohno and H. Ishida. Endogenous oxidative stress, but not ER stress, induces hypoxia-independent VEGF120 release through PI3K-dependent pathways in 3T3-L1 adipocytes. Obesity, in press
- ② K. Miyokawa-Gorin*, K. Takahashi*, K. Handa, A. Kitahara, Y. Sumitani, H. Katsuta, T. Tanaka, S. Nishida, K. Yoshimoto, H. Ohno, and H. Ishida. (*equally contributed) Induction of mitochondrial uncoupling enhances VEGF120 but reduces MCP-1 release in mature 3T3-L1 adipocytes: possible regulatory mechanism through endogenous ER stress and AMPK-related pathways. Biochem Biophys Res Commun 419:200-205 2012.
- ③ J. Ogasawara, T. Sakurai, T. Kizaki, Y. Ishibashi, T. Izawa, Y. Sumitani, H. Ishida, Z. Radak, S. Haga, and H. Ohno. Higher levels of ATGL are associated with exercise-induced enhancement of lipolysis in rat epididymal adipocytes. PLoS ONE 7(7): e40876 2012.

- ④ J. Ogasawara, S. Nomura, N. Rahman, T. Sakurai, T. Kizaki, T. Izawa, H. Ishida, S. Haga and H. Ohno. Hormone-sensitive lipase is critical mediators of acute exercise-induced regulation of lipolysis in rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 400: 134-139 2010.
- ⑤ J. Ogasawara, K. Kitadate, H. Nishioka, H. Fujii, T. Sakurai, T. Kizaki, T. Izawa, H. Ishida, H. Tanno, and H. Ohno. Oligonol, an oligomerized lychee fruit-derived polyphenol, activates the Ras/Raf-1/MEK1/2 cascade independent of the IL-6 signaling pathway in rat primary adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 402: 554-559 2010.
- ⑥ T. Sakurai, S. Endo, D. Hatano, J. Ogasawara, T. Kizaki, S. Oh-ishi, T. Izawa, H. Ishida, and H. Ohno. Effect of exercise training on adipogenesis of stromal-vascular fraction cells in rat epididymal white adipose tissue. *Acta Physiol* 200: 325-338 2010.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 高橋和人, 北原敦子, 森谷理恵, 五林可織, 半田桂子, 小沼裕寿, 炭谷由計, 田中利明, 勝田秀紀, 西田進, 犬飼浩一, 石田均: 脂肪細胞からの炎症関連アディポカイン分泌における温熱処理の影響とその意義. 第33回日本肥満学会, 京都, 平成24年10月11日-12日.
- ② 高橋和人, 北原敦子, 五林可織, 半田桂子, 森谷理恵, 小沼裕寿, 炭谷由計, 田中利明, 勝田秀紀, 西田進, 吉元勝彦, 石田均: 温熱処理によるHSP72発現の増強と脂肪細胞由来炎症関連アディポカインの分泌動態の変化について. 第55回日本糖尿病学会年次学術集会, 横浜, 平成24年5月17日-19日.
- ③ 五林可織, 高橋和人, 半田桂子, 北原敦子, 炭谷由計, 田中利明, 勝田秀紀, 西田進, 吉元勝彦, 板垣英二, 石田均: 脂肪細胞からのアディポネクチン分泌に及ぼすmitochondrial uncouplingの影響とその制御機構に関わる細胞内情報伝達系の検討. 第54回日本糖尿病学会年次学術集会, 札幌, 平成23年5月19日-21日.

- ④ 三代川可織, 高橋和人, 半田桂子, 黒川三知子, 森谷理恵, 下山達宏, 田中利明, 勝田秀紀, 山口真哉, 吉元勝彦, 石田均: 脂肪細胞のミトコンドリア内での metabolic couplingが細胞機能に果たす役割について. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会, 岡山, 平成22年5月27日-29日.

[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

石田 均 (ISHIDA HITOSHI)
杏林大学・医学部・教授
研究者番号: 80212893

(2) 研究分担者

永松 信哉 (NAGAMATSU SHINYA)
杏林大学・医学部・教授
研究者番号: 80231489

吉元 勝彦 (YOSHIMOTO KATSUHIKO)
杏林大学・医学部・講師
研究者番号: 20271257

犬飼 浩一 (INUKAI KOUICHI)
杏林大学・医学部・准教授
研究者番号: 20333007