

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24年 3月16日現在

機関番号：17501
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22790255
 研究課題名（和文）硫化水素はインスリン分泌細胞を保護する-その作用と分子機序の解明-
 研究課題名（英文）Hydrogen sulfide protects insulin-secreting cells from cell damage-
 Characterization of the cytoprotective effects and the molecular mechanisms-
 研究代表者
 谷口 繁生（TANIGUCHI SHIGEKI）
 大分大学・医学部・助教
 研究者番号：90392406

研究成果の概要（和文）：本研究は、ガス性メッセンジャーである硫化水素が持つインスリン分泌細胞に対する保護作用の特性、およびその分子的な作用機序の解明を目的とした。研究の結果、硫化水素が、その産生酵素の発現調節を介して細胞内で誘導性に作られ、細胞内還元物質の産生増加、活性酸素種の産生抑制などにより酸化ストレスを抑制して、糖尿病状態において誘発されるさまざまな細胞障害から、インスリン分泌細胞を保護することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to characterize the cytoprotective effects of a gas transmitter hydrogen sulfide (H₂S) and to elucidate its molecular mechanism on insulin-secreting cells. H₂S, which is endogenously produced in an inducible manner by H₂S-producing enzyme CSE, protects insulin-secreting cells against oxidative stress (occur under diabetic condition) via an anti-oxidative mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：生理活性物質、細胞保護作用、膵B細胞、薬理学、糖尿病、硫化水素、ガス性メッセンジャー

1. 研究開始当初の背景

糖尿病では、長期にわたり血中グルコースおよび遊離脂肪酸濃度の高い状態が続き、細胞障害性サイトカイン、持続的な細胞内 Ca²⁺濃度の上昇、酸化ストレス、小胞体ストレスの誘発が起こる。インスリンを分泌する膵B細胞は、これらの原因により機能の低下あるいは量の減少をきたす。硫化水素は、有毒ガスとして知られる一方で、生物の細胞内でも L-システインを基質とし

て cystathionine-γ-lyase (CSE) と cystathionine-β-synthase (CBS)により産生される。産生された硫化水素は、アポトーシスおよび炎症反応の抑制、神経伝達の調節など、細胞の生存やシグナル伝達に重要な働きを有することが明らかになり、一酸化窒素(NO)、一酸化炭素(CO)に次ぐ第3のガス性メッセンジャーと呼ばれるようになった。私たちは、世界に先駆けて、硫化水素が高濃度グルコースにより誘発された膵B細胞死

を抑制すること、膵 B 細胞の主要な硫化水素産生酵素 CSE の発現が高濃度グルコースにより誘導されることを報告した(Kaneko et al., FEBS Lett., 2009)。そこで、今回、硫化水素がどのような細胞障害から、どのような機序で膵 B 細胞を保護するのか、また、CSE を介する誘導性の硫化水素産生の意義は何かを明らかにする研究を思いついた。

2. 研究の目的

ガス性メッセンジャーである硫化水素を持つ膵 B 細胞保護作用の特性を検討し、その分子的な作用機序を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)細胞に障害を与えた際の膵 B 細胞死に対する硫化水素の作用の検討
遊離脂肪酸(パルミチン酸)、細胞障害性サイトカイン(TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β の混液)、酸化ストレス誘発物質(過酸化水素)、小胞体ストレス誘発物質(サブシナルジンおよびツニカマイシン)を用いて誘導した細胞死に対する硫化水素の作用を調べる。単離マウス膵島およびマウスインスリノーマ MIN6 細胞を、遊離脂肪酸、サイトカイン、酸化ストレス誘発物質または小胞体ストレス誘発物質を含む培養液中で培養する。この条件における硫化水素ドナー NaHS の影響を調べる。

- ① 細胞死を、DNA 断片化および caspase 活性の測定により検出する。
- ② マウス膵島の凍結切片を作製し、どの細胞(A、B、D、PP 細胞)の細胞死が抑制されるのかを、TUNEL 染色により検出する。
- ③ 活性酸素種の産生を、蛍光指示薬を用いて検出する。
- ④ アポトーシス抑制分子である Akt の活性化を、リン酸化抗体を用いて検出する。

(2)マウス膵 B 細胞における CSE 発現調節機序の解析

阻害薬を用いた薬理学的実験、siRNA を用いた遺伝子ノックダウン実験、ルシフェラーゼレポーターシステムを用いたプロモーターアッセイにより、マウス膵島および MIN6 細胞における CSE 発現調節機序を調べる。

- ① CSE 発現の増加または抑制条件を調べ、発現調節に必要なシグナルを探索する。
- ② 阻害薬(プロテインキナーゼ阻害薬)を用いたシグナル経路の遮断、または、プロテインキナーゼおよび転写因子の siRNA による遺伝子ノックダウンを行い、CSE 発現調節シグナル経路および転写因子を同定する。
- ③ ルシフェラーゼレポーターシステムを用いたプロモーターアッセイにより、予想した転写因子による CSE 発現誘導を確認する。
- ④ CSE 発現の誘導条件および抑制条件、さ

らに活性を阻害した条件で培養し、硫化水素の産生が CSE 発現および活性依存的に調節されていることを調べる。

(3)硫化水素産生酵素 CSE 遺伝子欠損マウスの表現型解析

CSE 遺伝子欠損マウスについて、耐糖能と膵島機能の解析を行う。CSE 遺伝子欠損マウスは、慶應義塾大学 石井功準教授より譲与いただいた。

- ① 普通食を与えて飼育したマウス(CSE ホモ欠損、CSE ヘテロ欠損、野生型マウス)に経口糖負荷を行い、負荷前と負荷後 30、60、90 分の血糖値を測定する。
- ② 通常飼育状態で耐糖能異常が見られない場合は、8 週齢から 2 週間高脂肪食を与え、その後経口糖負荷試験を行う。
- ③ 若齢(8 週齢)マウスへの高脂肪食負荷で耐糖能異常が見られない場合は、6 ヶ月齢以上のマウスに高脂肪食負荷を行い、経口糖負荷試験により耐糖能を調べる。
- ④ 耐糖能に差の見られた実験群について、経口糖負荷を行い、負荷前と負荷 30、60 分後の血中インスリン値を測定する。

4. 研究成果

(1)硫化水素による酸化ストレス抑制と膵 B 細胞死抑制機序

硫化水素の膵 B 細胞死に対する影響については、ラットインスリノーマ INS-1E を用いた実験で、硫化水素が小胞体ストレスを増強して細胞死を誘発するという報告がある(Yang et al., J. Biol. Chem., 2007)。これに対し、私たちは、硫化水素が、高濃度グルコースが原因となるマウス膵島の細胞死を抑制することを見出した(Kaneko et al., FEBS Lett., 2009)。さらに本研究から、硫化水素が、パルミチン酸、細胞障害性サイトカインで増加したマウス膵島、MIN6 細胞の DNA 断片化を抑制することも明らかになった(図 1)(Taniguchi et al., Br. J. Pharmacol., 2011)。このように 2 つの研究グループ間で異なる結果が得られた原因は、いくつか考えられる。私たちが、マウスから単離した正常膵島を、10%血清を含む培養液を用いて培養したのに対し、もう一方のグループでは、ラット膵 B 細胞由来のがん細胞 INS-1E を、一度血清なしで培養後、血清を含む培養液に切り換えて硫化水素処理を行っていた。つまり、用いた細胞の動物種および硫化水素の影響を調べる実験条件に、違いが見られた。私たちは、正常膵島を用い、常に血清を含む培養液(血清なしでは細胞が弱ってしまう)中で培養している点で、硫化水素の影響を評価するにあたり、より生体に近い、適切な実験系を用いていると考える。

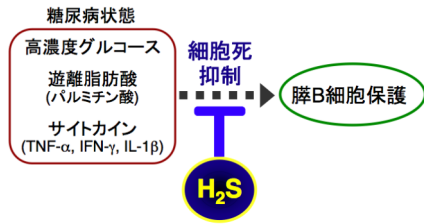


図1. 糖尿病状態におけるβ細胞死の硫化水素による抑制
 硫化水素(H₂S)は、糖尿病状態(血中グルコース、遊離脂肪酸、細胞障害性サイトカインの増加)で誘発されるβ細胞死を抑制する。

次に、高濃度グルコース、遊離脂肪酸、サイトカインにより誘発される細胞死は酸化ストレスおよび小胞体ストレスなどが原因となるので、硫化水素がどのような要因に対して抑制作用を示すのかを調べた。その結果、硫化水素が、酸化ストレスを抑制していることがわかった(図2)。さらに、TUNEL染色による細胞死検出の結果、硫化水素がβ細胞を特異的に保護することが明らかになった。そこで、硫化水素が、どのような機序によりβ細胞を保護しているのかを調べた。硫化水素は、caspase 3/7の活性化および活性酸素種の産生を抑制し、また、細胞内還元物質グルタチオンの産生およびAktのリン酸化を増加させてβ細胞死を抑制していることがわかった(Taniguchi et al., Br. J. Pharmacol., 2011)。

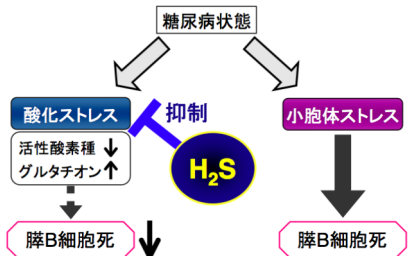


図2. 硫化水素H₂Sによる酸化ストレスの抑制
 硫化水素は、糖尿病状態において生じる酸化ストレスを抑制して、β細胞を保護する。

(2) CSE 発現調節を介した誘導性硫化水素産生機序

マウス膵島の CSE 発現は、グルコースと同様にインスリン分泌を増加させるスルホニル尿素薬によっても増加した。これに対し、インスリン分泌を抑制する電位依存性カルシウムチャンネルブロッカー(ニトレンジピン)、ATP 感受性カリウムチャンネルオープナー(ジアゾキシド)、解糖系律速酵素 glucokinase 阻害薬(マンノヘプツロース)により、CSE 発現は減少した。上記、いずれの条件においても、CSE の発現に有意な変化は見られなかった。このような結果から、私たちは、インスリン分泌に重要なカルシウムが CSE 発現に関与していると予想し、カルシウムによる遺伝子発現調節に関わるシグナル伝達経路につい

て検討を行った。プロテインキナーゼ阻害薬および Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ(CaMK)IIの siRNAによるノックダウンにより、マウス膵島、MIN6 細胞の CSE 発現調節に CaMKII および MAP kinase カスケードのうちの MEK-ERK 経路が関わることを見出した。さらに、ERK1/2によりリン酸化される転写因子 Sp1、Elk1について、siRNAによるノックダウンおよびレポーターアッセイを行った。その結果、両転写因子とも、CSEの発現調節に関与することが明らかとなり、さらに、Sp1はCSE発現調節領域に直接結合することがわかった(図3)(Taniguchi et al., Mol. Cell. Endocrinol., 2012)。また、MIN6細胞を用いて硫化水素産生を調べたところ、CSE発現を誘導する条件では硫化水素の産生量が増え、MEK-ERK阻害薬およびCSE活性阻害薬により産生量が減少した。したがって、β細胞において硫化水素は、CSEの発現を介して誘導性の産生調節を受けていることが明らかになった。

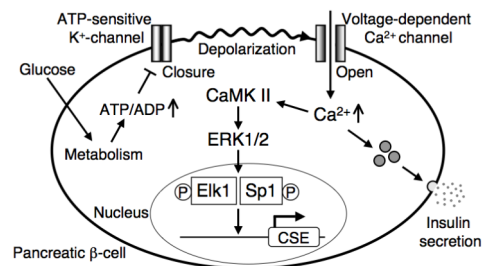


図3. マウス膵β細胞のグルコースによるCSE発現誘導機序
 CSEの発現誘導には、CaMKIIの下流にあるMAP Kinaseカスケード(MEK-ERK)によるSp1、Elk1のリン酸化が必要である。

以上、(1)、(2)の研究結果から、高濃度グルコース状態において、上記機序を介して発現誘導を受けた CSE により産生される硫化水素が、酸化ストレスを抑制してβ細胞を保護することが明らかになった(図4)。このような現象を見出した私たちは、硫化水素がβ細胞に備わった内因性のブレーキ「intrinsic brake」であるという説を世界に向けて提唱した(Taniguchi et al., J. Pharmacol. Sci., 2011)。

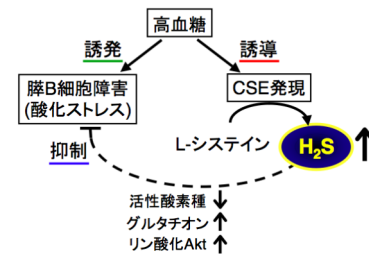


図4. 糖尿病状態における硫化水素産生とβ細胞保護
 高血糖状態に陥ると、インスリンを分泌するβ細胞が障害を受けるが、このとき、CSE発現誘導を介して硫化水素(H₂S)の産生が増加し、β細胞を酸化ストレス障害から保護する。

(3) CSE 遺伝子欠損マウスの耐糖能解析
CSE 遺伝子欠損マウスは、通常の飼育状態では、30 週齢を過ぎても耐糖能異常にはならなかった。次に、8 週齢マウスに 2 週間高脂肪食を与えた後、経口糖負荷試験を行った。しかし、若齢マウスに対する高脂肪食負荷では、野生型と CSE 遺伝子欠損マウスの間に、大きな血糖値の違いが見られなかった。そこで、6 ヶ月齢以上のマウスに 2 週間高脂肪食を与えて、経口糖負荷試験を行った。その結果、CSE 遺伝子欠損マウスに、明らかな耐糖能異常が見られた。さらに、経口糖負荷後の血中インスリン濃度を測定したところ、CSE 欠損マウスは野生型マウスに比べて低い値となった。

以上の研究成果から、CSE 遺伝子欠損マウスは、遺伝的背景に加齢、食生活といった環境的要因が加わって発症するヒトの 2 型糖尿病のモデルとして、非常に有用であると考えられた。

今後は、本研究により明らかになった硫化水素の細胞保護作用が、糖尿病状態における膵 B 細胞の機能的、量的な低下に対する防御機構として応用できないかを検討するとともに、CSE 遺伝子欠損マウスが耐糖能異常を呈する原因を究明し、将来的には、ヒト糖尿病の発症、進展機序の解明、新規治療法の開発へとつなげたい。

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 著者名:Shigeki Taniguchi, Toshihide, Kimura, Tatsuhito Umeki, 省略 7 名, 論文標題:Protein phosphorylation involved in the gene expression of the hydrogen sulphide producing enzyme cystathionine γ -lyase in the pancreatic β -cell, 雑誌名:Molecular and Cellular Endocrinology, 巻:350, 掲載ページ:31 - 38, 発行年:2012 (査読有り)

② 著者名:Shigeki Taniguchi, Ichiro Niki, 論文標題:Significance of hydrogen sulfide production in the pancreatic β -cell, 雑誌名:Journal of Pharmacological Sciences, 巻:116, 掲載ページ:1 - 5, 発行年:2011 (査読有り)

③ 著者名:Shigeki Taniguchi, Lin Kang, Toshihide Kimura, 省略 1 名, 論文標題:Hydrogen sulphide protects mouse pancreatic β -cells from cell death induced by oxidative stress, but not by endoplasmic reticulum stress, 雑誌名:British Journal of Pharmacology, 巻:162, 掲載ページ:1171 -

1178, 発行年:2011 (査読有り)

[学会発表] (計 15 件)

① 発表者名:谷口 繁生, 発表標題:マウス膵 β 細胞における硫化水素産生酵素のカルシウム依存性発現調節, 学会名:第 85 回日本薬理学会, 発表年月日:2012 年 3 月 15 日, 発表場所:京都府京都市

② 発表者名:谷口 繁生, 発表標題:膵島における硫化水素産生酵素の発現調節の種差について, 学会名:第 64 回日本薬理学会西南部会, 発表年月日:2011 年 11 月 20 日, 発表場所:福岡県福岡市

③ 発表者名:谷口 繁生, 発表標題:硫化水素が膵 B 細胞を保護する分子機序の検討, 学会名:第 54 回日本糖尿病学会, 発表年月日:2011 年 5 月 20 日, 発表場所:北海道札幌市

④ 発表者名:谷口 繁生, 発表標題:酸化ストレス抑制により硫化水素はマウス膵 β 細胞を保護する, 学会名:第 84 回日本薬理学会, 発表年月日:2011 年 3 月 22 日, 発表場所:神奈川県横浜市

⑤ 発表者名:谷口 繁生, 発表標題:硫化水素によるマウス膵 β 細胞保護作用の特性について, 学会名:第 53 回日本糖尿病学会, 発表年月日:2010 年 5 月 28 日, 発表場所:岡山県岡山市

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 繁生 (TANIGUCHI SHIGEKI)

大分大学・医学部・助教

研究者番号: 90392406

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: