

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790864

研究課題名(和文) 鉄制御を標的とした抗糖尿病作用の分子機序の解明と新規治療因子の探索

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of iron action against anti-diabetes and search for a new therapeutic target of diabetes

研究代表 池田 康将 (IKEDA YASUMASA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：60432754

研究成果の概要(和文)：生体内鉄量は内蔵脂肪量や糖尿病発症リスクと関連がある。肥満2型糖尿病マウスを用いた鉄除去の効果を検討した。鉄除去によって1)白色脂肪組織の重量低下と脂肪細胞径の減少、2)マクロファージ浸潤の軽減、3)酸化ストレスと炎症性サイトカインの抑制、4)Akt-IRS経路の亢進、を認めた。肥満、糖尿病において鉄除去は脂肪組織における酸化ストレス制御を介して脂肪細胞肥大進展を抑制して耐糖能の改善につながる事が示唆された

研究成果の概要(英文)：It has been shown that the amount of visceral fat is related to body iron content, and body iron storage is a risk factor of the development of diabetes. We examined the effect of iron deprivation in fat tissue. Iron deprivation contributed to 1) decrease of fat weight and adipocyte size, 2) reduction of macrophage invasion in fat, 3) suppression of oxidative stress and inflammatory cytokine, 4) improvement of Akt-IRS pathway. These results suggest that iron chelation improve the development of adipocyte hypertrophy via suppression of oxidative stress, leading to the amelioration of glucose tolerance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：鉄、肥満、糖尿病、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

(1)鉄は生体にとって必須微量元素であり、正常な状態において細胞内鉄量は適切な状態に制御されている。一方で過剰な鉄はFenton/Haber-Weiss反応を介したヒドロキシラジカルの産生を触媒して酸化ストレスの原因ともなる。

(2)近年、さまざまな疾患において生体内鉄蓄積が病態に関与していることが示されている。C型肝炎、神経変成疾患、癌などにおいて鉄蓄積が病態に関与していることが示されている。我々は血管内皮細胞におけるAngiotensin II刺激は細胞内鉄量を増加させてヒドロキシラジカル産生を亢進させる

ことを明らかにした (Tajima S, et al. Hypertension Res 2010)。またマウス下肢虚血モデルでの鉄キレート剤投与は血管新生のみならず酸化ストレスを低下させてアポトーシスを抑制することを見出しいる (Ikeda Y, et al. Atherosclerosis 2011)。

2. 研究の目的

(1) 肥満は耐糖能障害やインスリン抵抗性を引き起こし、結果として2型糖尿病発症の原因となるが、生体内鉄量の肥満および糖尿病との関連も示唆されている。血清フェリチン値は生体内鉄量の有用な指標であるが、そのフェリチン値と内臓脂肪蓄積が正相関することが示されている (Iwasaki T, et al. Diabetes Care. 2005)。2型糖尿病患者において血清フェリチン値は高値であり、血清フェリチン高値は男女とも2型糖尿病発症リスクと関連することが報告されている (Sun L, et al. J Clin Endocrinol Metab 2008, Jiang R, et al. JAMA 2004)。よって生体内鉄量は肥満や糖尿病の増悪因子として病態に関与していることが示唆される。

(2) 酸化ストレス制御は各種病態において重要な治療標的であり、肥満、糖尿病においても例外ではない。前述のように鉄は Fenton/Haber-Weiss 反応により酸化ストレスの触媒となる、よって鉄除去は酸化ストレスを軽減して肥満や糖尿病の改善に有用である可能性が示唆されるが、脂肪肥大における鉄除去の効果については良く分かっていない。本研究では2型糖尿病モデルマウスの脂肪組織肥大における鉄除去の効果について検討した。

3. 研究の方法

2型糖尿病モデルマウスである雄性 KKAy^{Ta/Jc1} を用いて検討を行った。8週齢より鉄キレ-

ト剤である Deferoxamine (DFO) を 100mg/kg/day を2週間腹腔内投与した群と Vehicle 投与群の2群間で比較した。

(1) 耐糖能・インスリン感受性の評価
それぞれグルコース (2g/kg)、インスリン (1 u/kg) 腹腔内投与による IPGTT, IPITT にて評価した。

(2) 生体内鉄量評価
血清フェリチンは ELISA 法で、脂肪組織鉄量は原子吸光度法にて測定した。

(3) 病理学的検討
精巣上体脂肪を用いて、脂肪細胞径は HE 染色にて評価した。マクロファージ浸潤は F4/80 の免疫組織化学にて評価した。

(4) 酸化ストレスならびに炎症性サイトカインの評価
尿中 8-OHdG 排泄量は ELISA 法にて評価した。脂肪組織は Dihydroethidium (DHE) 染色で評価した。NADPH oxidase components ならびに炎症性サイトカインは定量 RT-PCR 法およびウエスタンブロットにて検討した。なお p22phox 局在評価は免疫組織化学にて行った。

(5) Akt-IRS シグナルの評価
ウエスタンブロット法ならびに免疫沈降法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) DFO による鉄除去によって有意差はないもののヘモグロビン値は軽度低下し、体重についても若干減少したが有意差は認められなかった。血清フェリチン値、脂肪組織鉄量は有意に低下した (表 1)。

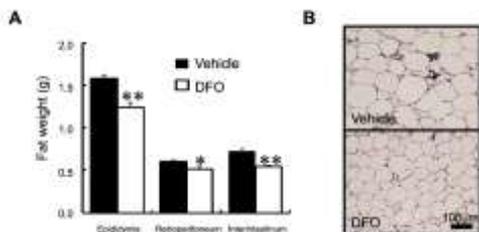
(表 1)

Age:	KKAy Mice	
	4 wk	10 wk
Plasma ferritin level, ng/ml	117.6 ± 11.8	164.3 ± 6.2**
Iron concentration in fat, µg/g tissue wt	1.0 ± 0.5	4.9 ± 0.6*

(2) 空腹時血糖値については2群間で差を認めなかったが、DFO 群でインスリン値は有意に低下し、同様に HOMA-IR (Homeostasis model

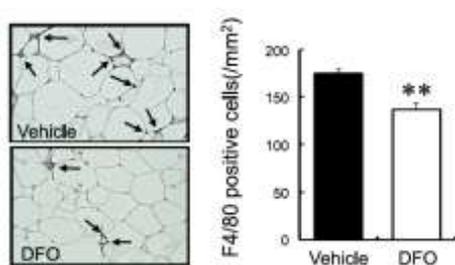
assessment-Insulin Resistance)も低下した。IPGTT ならびに IPITT による耐糖能とインスリン感受性の評価では DFO 群にて改善した。(3) 脂肪組織重量ならびに脂肪組織径は DFO 群で有意に減少が認められた (図 1)。

(図 1) 脂肪重量と脂肪組織標本



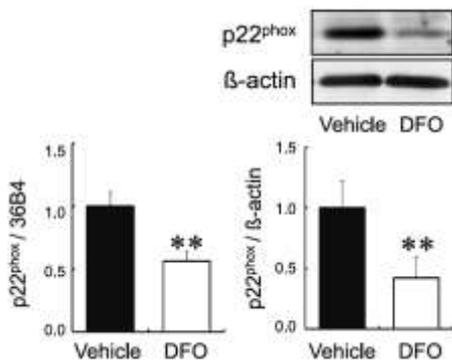
また脂肪組織マクロファージ浸潤も DFO 群では減少した (図 2)。

(図 2) F4/80 染色によるマクロファージ浸潤評価

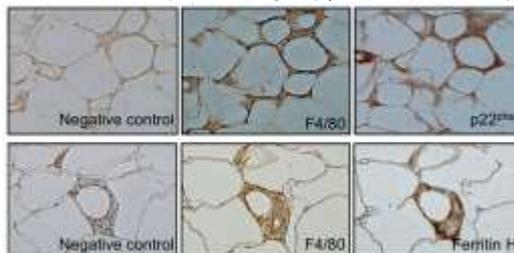


(4) 尿中 8-OHdG 排泄量は DFO 投与にて低下し、同様に DHE 染色による脂肪組織スーパーオキシド産生も DFO にて減少した。DFO 群では NADPH oxidase 活性も抑制された。定量 PCR による NADPH oxidase components については、DFO 投与で p22^{phox} のみ発現が低下し、蛋白でも同様であった (図 3)。

(図 3) p22^{phox} の mRNA ならびに蛋白発現



(5) 脂肪組織における p22^{phox} の発現はマクロファージ発現部位と一致し、またフェリチンとマクロファージ発現部位も一致した (図



4)。

(図 4) 連続組織切片による局在評価

(6) 炎症性サイトカイン TNF- α , IL-6, IL-1 β ならびに MCP-1 発現は DFO 群において減少した。

(7) 脂肪組織における Akt と IRS のリン酸化は、DFO 群にて亢進を認めた。

(8) 脂肪組織の鉄量と血清フェリチン値は、非肥満マウス (C57BL6/J マウス, KK マウス) だが、肥満 KKAy マウスよりも高値であった。

3. 考察ならびに今後の展望

肥満・糖尿病において鉄除去は、脂肪肥大を改善することが明らかとなり、その機序として酸化ストレス抑制作用が考えられた。また脂肪における Akt-IRS 経路の回復も認められ、鉄除去による糖尿病の病態改善効果は、脂肪組織を含めた全身の糖取り込みならびにインスリン感受性の改善が示唆される。またマクロファージと p22^{phox} ならびにフェリチン発現部位が一致していたことから、マクロファージが肥大脂肪における鉄供給ならびに酸化ストレスのソースの可能性があり、鉄制御が活性化マクロファージ抑制につながる。よって鉄は肥満・糖尿病において治療標的となり得ると考えられ、それはマクロファージや p22^{phox} を標的であると示唆された。今回、肥満マウスよりも非肥満マウスの脂肪組織鉄量は高値であり、マウス系統により生体内鉄代謝が異なる可能性がある。今後、同一系統

マウスを用いた高カロリー食餌負荷による肥満誘発モデルを作成して、肥満と鉄代謝について更なる検討が必要である。

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 20 件)

主な論文

1. Tajima S*, Ikeda Y*, Sawada K, Yamano N, Horinouchi Y, Kihira Y, Ishizawa K, Izawa-Ishizawa Y, Kawazoe K, Tomita S, Minakuchi K, Tsuchiya K, Tamaki T. Iron reduction by deferoxamine leads to amelioration of adiposity via the regulation of oxidative stress and inflammation in obese and type 2 diabetes KKAY mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012;302:E77-86 *equally contribution,、 査読有 DOI:10.1152/ajpendo.00033.2011
2. Tomita S, Kihira Y, Imanishi M, Fukuhara Y, Imamura Y, Ishizawa K, Ikeda Y, Tsuchiya K, Tamaki T. Pathophysiological response to hypoxia - from the molecular mechanisms of malady to drug discovery:Inflammatory responses of hypoxia-inducible factor 1alpha (Hif-1alpha) in T cells observed in development of vascular remodeling. *J Pharmacol Sci.* 2011;115:433-439 査読有 DOI: 10.1254/jphs.10R22FM
3. Kihira Y, Yamano N, Izawa-Ishizawa Y, Ishizawa K, Ikeda Y, Tsuchiya K, Tamaki T, Tomita S. Basic fibroblast growth factor regulates glucose metabolism through glucose transporter 1 induced by hypoxia-inducible factor-1alpha in adipocytes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011 査読有 DOI: 10.1016/j.biocel.2011.07.009
4. Ishizawa K, Yoshizumi M, Kawai Y, Terao J, Kihira Y, Ikeda Y, Tomita S, Minakuchi K, Tsuchiya K, Tamaki T. Pharmacology in health food: Metabolism of quercetin in vivo and its protective effect against arteriosclerosis. *J Pharmacol Sci.* 2011;115:466-470 査読有 DOI: 10.1254/jphs.10R38FM
5. 池田康将、田島宗一郎、山野範子、土屋浩一郎、玉置俊晃 総説：循環器疾患と糖尿病における生体内鉄の意義。血管。2011. VOL.34(2):75-85. 査読無 http://jscr21.medic.mie-u.ac.jp/system/online_det.php?no=144&ps1=16
6. Ikeda Y, Tajima S, Yoshida S, Yamano N, Kihira Y, Ishizawa K, Aihara K, Tomita S, Tsuchiya K, Tamaki T. Deferoxamine promotes angiogenesis via the activation of vascular endothelial cell function. *Atherosclerosis.* 2011;215:339-347 査読有 DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.01.009
7. Tajima S, Tsuchiya K, Horinouchi Y, Ishizawa K, Ikeda Y, Kihira Y, Shono M, Kawazoe K, Tomita S, Tamaki T. Effect of angiotensin II on iron-transporting protein expression and subsequent intracellular labile iron concentration in human glomerular endothelial cells. *Hypertens Res.* 2010;33:713-721 査読有 DOI: 10.1038/hr.2010.63
8. Sumitomo-Ueda Y, Aihara K, Ise T, Yoshida S, Ikeda Y, Uemoto R, Yagi S, Iwase T, Ishikawa K, Hirata Y, Akaike M, Sata M, Kato S, Matsumoto T. Heparin cofactor ii protects against angiotensin II-induced cardiac remodeling via attenuation of oxidative stress in mice. *Hypertension.* 2010;56:430-436 査読有

DOI:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.152207

9. Mihara M, Aihara K, Ikeda Y, Yoshida S, Kinouchi M, Kurahashi K, Fujinaka Y, Akaike M, Matsumoto T. Inhibition of thrombin action ameliorates insulin resistance in type 2 diabetic db/db mice. *Endocrinology*. 2010;151:513-519 査読有 DOI: 10.1210/en.2009-0661
10. Ishizawa K, Izawa-Ishizawa Y, Dorjsuren N, Miki E, Kihira Y, Ikeda Y, Hamano S, Kawazoe K, Minakuchi K, Tomita S, Tsuchiya K, Tamaki T. Angiotensin ii receptor blocker attenuates PDGF-induced mesangial cell migration in a receptor-independent manner. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25:364-372 査読有 DOI: 10.1093/ndt/gfp520
11. Ikeda Y, Aihara K, Akaike M, Sato T, Ishikawa K, Ise T, Yagi S, Iwase T, Ueda Y, Yoshida S, Azuma H, Walsh K, Tamaki T, Kato S, Matsumoto T. Androgen receptor counteracts doxorubicin-induced cardiotoxicity in male mice. *Mol Endocrinol*. 2010;24:1338-1348 査読有 DOI: 10.1210/me.2009-0402
12. Aihara K, Ikeda Y, Yagi S, Akaike M, Matsumoto T. Transforming growth factor-beta1 as a common target molecule for development of cardiovascular diseases, renal insufficiency and metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract*. 2010;2011:175381 査読有 DOI: 10.4061/2011/175381

[学会発表] (計 16 件)

主な発表

1. Yasumasa Ikeda, Soichiro Tajima, Yuki Izawa-Ishizawa, Yoshitaka Kihira, Keisuke

Ishizawa, Shuhei Tomita, Koichiro Tsuchiya, Toshiaki Tamaki. Bovine Lactoferrin Promotes Angiogenesis Via Akt-eNOS Dependent Pathway in Vascular Endothelial Cells 第76回日本循環器学会学術集会 福岡国際会議場 福岡 2012.3-16-18

2. Yasumasa Ikeda, Hideaki Enomoto, Soichiro Tajima, Yuki Izawa-Ishizawa, Yoshitaka Kihira, Keisuke Ishizawa, Shuhei Tomita, Koichiro Tsuchiya, Toshiaki Tamaki. Iron restriction prevents progression of diabetic nephropathy. KEYSTONE SYMPOSIA 40th ANNIVERSARY 1972-2012. Park & Plaza Hotel, Boston, Massachusetts, USA 2012.3.11-16
3. Yasumasa Ikeda, Ken-ichi Aihara, Sumiko Yoshida, Yoshitaka Kihira, Keisuke Ishizawa, Yuki Izawa-Ishizawa, Shuhei Tomita, Masataka Sata, Masashi Akaike, Shigeki Kato, Toshio Matsumoto, Toshiaki Tamaki. Heparin Cofactor II Promotes Angiogenesis via an AMPK-eNOS Signaling Pathway. High Blood Pressure Research Scientific Sessions 2011 Scientific Sessions. Dolphin Hotel, Orlando, Florida 2011.9.20-24
4. Yasumasa Ikeda, Soichiro Tajima, Noriko Yamano, Yoshitaka Kihira, Keisuke Ishizawa, Shuhei Tomita, Koichiro Tsuchiya, Toshiaki Tamaki. Iron elimination ameliorated glucose tolerance through suppression of oxidative stress and inflammation on fat in diabetic mice. 第75回日本循環器学会総会・学術集会 パシフィコ横浜、横浜 2011.8.3-4
5. Yasumasa Ikeda, Soichiro Tajima, Noriko Yamano, Yoshitaka Kihira, Keisuke Ishizawa, Shuhei Tomita, Koichiro Tsuchiya, Toshiaki

Tamaki. Estrogen action on iron metabolism. The Endocrine Society Annual Meeting 2011. Boston Convention & Exhibition Center, Boston, USA 2011.6.4-7

6. 池田康将、栗飯原賢一、吉田守美子、佐藤隆史、赤池雅史、玉置俊晃、加藤茂明、松本俊夫 心血管リモデリングにおける男性ホルモンの作用。第84回日本内分泌学会学術集会 シンポジウム 神戸国際会議場、神戸 2011.4.21-23
7. 池田康将、田島壮一郎、吉田守美子、山野範子、木平孝高、石澤啓介、栗飯原賢一、富田修平、土屋浩一郎、玉置俊晃 Deferoxamine, an iron chelator, promotes revascularization via endothelial cells activation. パシフィコ横浜、第84回日本薬理学会年会 横浜（震災のため開催中止）
8. 池田康将、田島壮一郎、吉田守美子、山野範子、木平孝高、石澤啓介、栗飯原賢一、富田修平、土屋浩一郎、玉置俊晃。マウス下肢虚血モデルにおいて鉄キレート剤 Deferoxamine は酸化ストレスとアポトーシスを抑制する。第40回日本心臓血管作動物質学会 かがわ国際会議場、高松 2011.2.11-12
9. 池田康将、田島壮一郎、吉田守美子、山野範子、木平孝高、石澤啓介、栗飯原賢一、富田修平、土屋浩一郎、玉置俊晃。Deferoxamine, an iron chelator, enhances angiogenesis through Akt-eNOS-dependent pathway in endothelial cells. 第18回日本血管生物医学会学術集会 梅田スカイビル 大阪 2010.12.1-2
10. Yasumasa Ikeda, Yoshitaka Kihira, Keisuke Ishizawa, Shuhei Tomita, Koichiro Tsuchiya, Toshiaki Tamaki. Deferoxamine, an iron

chelator, promotes angiogenesis after ischemic hind limb through Akt-eNOS-dependent pathway. XX World Congress ISHR 2010 Kyoto International Conference Center Kyoto 2010.5.13-16

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：マクロファージの浸潤抑制によるインスリン抵抗性改善剤
発明者：徳島大学
権利者：玉置俊晃、池田康将、土屋浩一郎
種類：特許申請
番号：特願 2011-174001
出願年月日：2011年7月25日
国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ

<http://150.59.76.31/university/servlet/index?&level=4&reference=0/10001/3/30005/20012>

6. 研究組織

(1) 研究代表者 池田 康将

(IKEDA YASUMASA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教

研究者番号：60432754