

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月10日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658259

研究課題名（和文） 糖尿病の猫が発現する抗酸化蛋白質を主眼とする糖尿病合併症予防法の確立

研究課題名（英文） Prevention studies for diabetic complications based on antioxidative proteins specifically expressed in cats with Diabetes.

研究代表者

松木 直章 (MATSUKI NAOAKI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：40251417

研究成果の概要（和文）：糖尿病はヒト、犬、猫のいずれでもよくみられる内分泌・代謝性疾患である。そして猫では、ヒトや犬と比較して白内障、血管障害、神経障害などの糖尿病合併症がきわめて軽微であることもよく知られている。この理由を解明するために、猫の内因性抗酸化物質に着目して以下の研究を遂行した。糖尿病に罹患した猫 17 頭と、年齢ならびに体重をマッチさせた猫の血漿について、ヒドロキシルラジカル消去能をスピントラップ電子スピン共鳴法（ESR）で測定したところ、糖尿病罹患猫は健康猫と比較して有意に高い消去能を示した。糖尿病症例（n=3）および健康猫（n=3）血漿を透析カラムで分画すると、ヒドロキシルラジカル消去能は分子量 10kDa 以上の分画に含まれた。血清蛋白電気泳動ならびに質量分析（TOF-MS）によって糖尿病罹患猫で特異的に増加する蛋白質を絞り込んだところ、ハプトグロビンがヒドロキシルラジカル消去能を発揮する候補物質として同定され、糖尿病の猫ではハプトグロビンが抗酸化物質として機能している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Diabetes mellitus (DM) is an well described endocrine/metabolic disease. In cats, it is also well known that diabetic complications including cataract, vasculopathy and neuropathy are very mild compared to those in humans and dogs. To elucidate the reason for the mild diabetic complications in cats, endogenous antioxidative activities were examined. Blood plasma from DM cats (n=17) possessed higher hydroxyl radical-scavenging activities than those from age- and body weight-matched healthy controls (n=16). When the blood plasma from DM cats (n=3) and controls (n=3) were fractionated with dialysis columns, the hydroxyl radical-scavenging activity was found in the MW > 10kDa fraction. Differential plasma protein electrophoresis and mass spectrometry (TOF-MS) revealed haptoglobin as a candidate of hydroxyl radical-scavenger. Moreover, plasma haptoglobin concentrations and hydroxyl radical-scavenging activities showed positive correlation. Hence, haptoglobin may work as an antioxidant in DM cats, which may preventive to diabetic complications in part.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：動物生命科学・獣医学

キーワード：猫、糖尿病合併症、抗酸化物質、ハプトグロビン

1. 研究開始当初の背景

糖尿病はインスリンの絶対的、あるいは相対的不足により持続的な高血糖や特徴的な代謝異常が引き起こされる内分泌疾患であり、ヒト、犬、猫のいずれでもよくみられる。ヒトでは糖尿病が進行すると神経障害、網膜症、血管障害などの糖尿病合併症が発生し、犬でもヒトと同様に糖尿病性白内障、腎不全が発生することが多い。一方、糖尿病の猫では一部の症例で末梢神経障害がみられるが、腎症や血管障害といった重篤な合併症が発生することはきわめて稀である。

ヒトでは、糖尿病合併症の発生要因の一つとして活性酸素の増加や抗酸化能の低下による酸化ストレスが挙げられている。糖尿病患者では血中の抗酸化能が低下することが知られており、ビタミンE、ポリフェノール類、 α リポ酸など抗酸化活性を有する物質を補充することが糖尿病合併症の軽減に役立つことが示唆されてきた。そこで、猫では何らかの内因性抗酸化物質が糖尿病合併症の軽減に関与しているという仮説が得られた。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目標は、猫において糖尿病合併症が軽微である理由を明らかにし、ヒトや犬の糖尿病合併症を効果的に予防する糸口を得ることである。より具体的には、糖尿病に罹患した猫について内因性の抗酸化能を検討し、その抗酸化能に最も深く関与する物質を同定・検証することを目的とした。本研究では、活性酸素種 (reactive oxygen species) の中で最も酸化力の高いヒドロキシルラジカルに対する消去能を指標として、抗酸化物質の同定を進めた。

3. 研究の方法

(1) 動物および血漿検体採取

東京大学動物医療センターに来院し、血液化学検査ならびに尿検査により糖尿病と診断された猫17頭(品種: Japanese domestic cat (JDC) 14頭、ソマリ1頭、オシキャット1頭、スコティッシュ・フォールド1頭 年齢: 5歳1ヶ月-17歳9ヶ月 性別: 雄2頭、去勢雄7頭、雌1頭、避妊雌7頭 体重: 2.95-6.50kg)、および日本獣医生命科学大学ならびに東京大学動物医療センターで飼育されている臨床的に健康な猫16頭(品種: JDC16頭 年齢: 4歳6ヶ月-13歳1ヶ月 性別: 雄4頭、去勢雄5頭、雌3頭、避妊雌4頭 体重: 3.50-7.00kg)を実験に用いた。糖尿病罹患猫(DM)と健康猫(Controls)は年齢ならびに体重がマッチするように選択した。これらの猫から空腹時に頸静脈より採血し、ヘパリンチューブ(富士フィルムメディカル、東京)で2,000×gにて2分間遠心した後、血

漿のみを分離して-30°Cで保存した。

(2) スピントラップ電子スピン共鳴法によるヒドロキシルラジカル消去能の測定

血漿のヒドロキシルラジカル消去能の測定には、スピントラップ電子共鳴法を用いた。すなわち、10% 5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO: Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA)を20 μ l、0.2mM FeSO₄·7H₂O (Wako, Tokyo)を76 μ l、血漿を60 μ l、1mM H₂O₂ (Wako, Tokyo)を150 μ l、UPWを74 μ lを順に加えて室温で3分間静置した。この混和液を石英フラットセルに入れ、電子スピン共鳴装置 JES-FA100 (日本電子, 東京)のキャビティに挿入し、室温でESRスペクトルを記録した。測定条件は磁場強度 335.070 \pm 5mT、掃引時間 30秒、磁場変調周波数 100kHz、磁場変調幅 0.16mT、検出器感度 1.0 \times 100、レコーダー時定数 0.03秒、マイクロ波周波数 9414.680MHz、マイクロ波出力 0.998mWとした。最も低磁場側にある第1シグナル強度と内部標準試料であるマンガンのシグナル強度の比をヒドロキシルラジカル生成量とした。各血漿のシグナル強度は、前述の血漿60 μ lの代わりにUPWを60 μ l加えた場合の強度を1とし、さらに1mM H₂O₂の代わりにUPWを用いた場合の強度を0として、相対値で算出した。

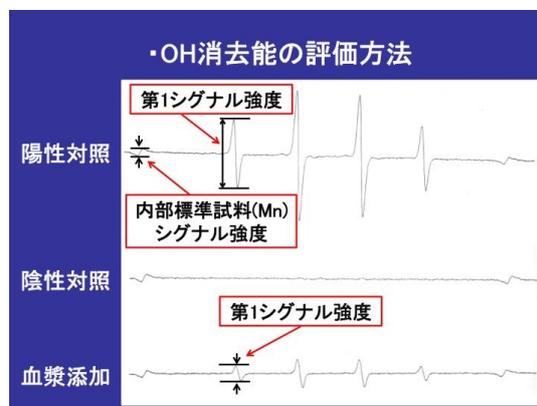


図: スピントラップ ESR を用いたヒドロキシルラジカル消去能の算定方法

(3) 血漿分画後のヒドロキシルラジカル消去能の測定

猫の血漿に含まれる抗酸化物質の性質を明らかにするため、猫の血漿成分を10kDa未満の低分子画分と10kDa以上のタンパク質とに分離した。すなわち、糖尿病罹患猫および健康猫より無作為に選んだ各3頭の血漿それぞれ40 μ lにUPW 160 μ lを加え、透析カラム

(MICROCON YM-10, MILLIPORE, Billerica, USA)に入れて4°C、14,000×g、10分間遠心した。さらに、透析膜を通過した容量だけUPW

を加えて同条件の遠心を4回繰り返した。透析膜を通過した10kDa未満の低分子画分は、回収して800 μ lに調製した。透析膜を通過しなかった10kDa以上のタンパク質は、UPWを加えて400 μ lに調製した。得られた画分について上記と同様にヒドロキシルラジカル消去能を測定した。

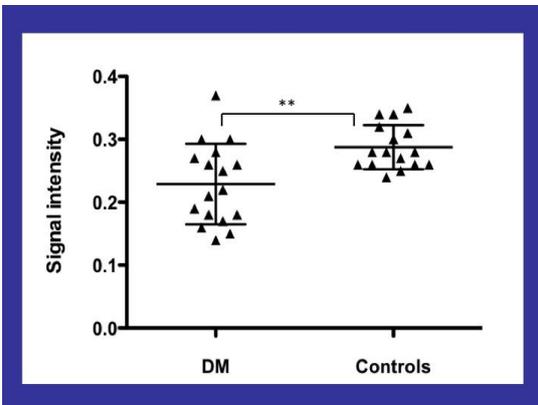
(4) 血漿中の10kDa以上のタンパク質の SDS-PAGE

前述の通りに調製した血漿中の10kDa以上のタンパク質について、10%ポリアクリルアミド電気泳動を用いて分離した後、Coomassie brilliant blueで染色した。糖尿病罹患猫で特異的に増加しているタンパク質バンドは、さらに常法に従った2次元電気泳動で分離し、得られたスポットを質量分析(TOF-MS)で同定した。

4. 研究成果

(1) 血漿ヒドロキシルラジカル消去能の比較

糖尿病罹患猫および健康猫の血漿を用いた ESR スペクトルのシグナル強度に関して、糖尿病罹患猫では健康猫に対してシグナル強度は有意に小さく(P<0.01)、すなわち糖尿病罹患猫のヒドロキシルラジカル消去能は健康猫よりも高いことが示された。

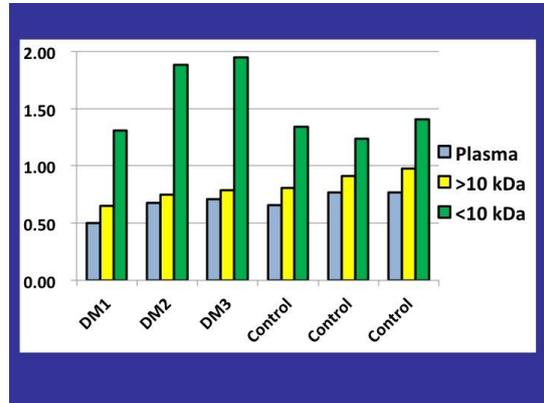


図：糖尿病罹患猫 (DM) および健康猫 (Controls) の血漿を用いた ESR スペクトルのシグナル強度 (**; P<0.01)

(2) 血漿分画後のヒドロキシルラジカル消去能の測定

糖尿病罹患猫および健康猫より選んだ各3頭の血漿、10kDa以上のタンパク質および10kDa未満の低分子画分におけるヒドロキシルラジカル消去能を比較したところ、10kDa以上のタンパク質を含む画分ではヒドロキシルラジカル消去能が保存されていたが、10kDa未満の低分子画分では抗酸化能が著しく失われた。特に糖尿病罹患猫ではヒドロキ

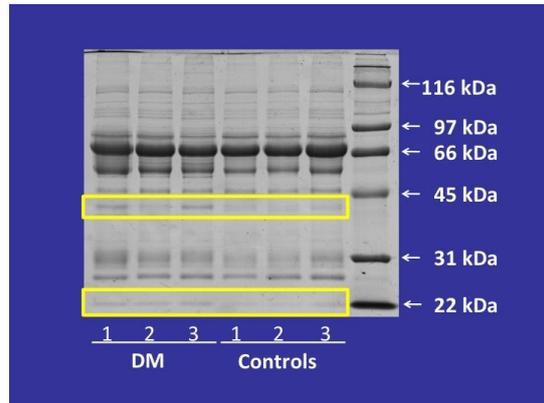
シルラジカル消去能が著しく失われる傾向がみられた。このことから、糖尿病罹患猫において10kDa以上のタンパク質が増強されたヒドロキシルラジカル消去能を担っていると考えられた。



図：糖尿病罹患猫 (DM) および健康猫 (Controls) 各3頭の血漿 (Plasma) と10kDa以上のタンパク質 (>10kDa) ならびに10kDa未満の低分子画分 (<10kDa) を用いた ESR スペクトルのシグナル強度

(3) ヒドロキシルラジカル消去能を有するタンパク質の同定

そこで糖尿病罹患猫の血漿中で増加し、ヒドロキシルラジカル消去能を有する10kDa以上のタンパク質を同定するため、猫血漿タンパク質の SDS-PAGE を行ったところ、糖尿病罹患猫では健康猫に比べて40kDaおよび20kDa付近に明瞭なバンドが観察された。これらのタンパク質をあらためて2次元ゲル電気泳動で分離した後に質量分析したところ、これらのタンパク質はいずれもハプトグロビンのサブユニットであると同定された。



図：糖尿病罹患猫 (DM) および健康猫 (Controls) の血漿中の10kDa以上のタンパク質に対する SDS-PAGE。約20kDaならびに約

40kDa に糖尿病罹患猫に特異的なバンドが検出され、2次元ゲル電気泳動ならびに質量分析でいずれもハプトグロビンであると同定された。

(4) 考察と展望

ハプトグロビンは主に肝臓で産生されるヘモグロビン結合タンパク質で、ヘモグロビンが血中に遊離すると迅速に結合し、細網内皮系細胞のレセプターを介して速やかに取り込まれて分解処理される。また、ハプトグロビンは急性期タンパクとして働いていることが多く報告されている。さらに、ハプトグロビンは抗酸化作用を持つということも既に報告されている。最近の研究では、ヒトの1型糖尿病患者では血清中のハプトグロビンが有意に減少し、2型糖尿病患者でも尿中ハプトグロビンが有意に減少していることが分かっている。また、ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットでは健康群に比べて血中ハプトグロビンβ鎖が有意に増加しており、糖尿病罹患マウスではハプトグロビンの遺伝子型によって生存期間が影響を受けることも分かっている。このように、ハプトグロビンがヒト、犬、猫その他のほ乳類における糖尿病のコントロール及び糖尿病合併症に深く関わっている可能性は強い。

本研究で得られた糖尿病罹患猫における増強された抗酸化能を担う物質の一つがハプトグロビンによるものであることが示されれば、猫の血中ハプトグロビンの動態を解析することで、ヒト、犬、猫を含めたほ乳類の糖尿病合併症の予防、軽減に対する研究や治療が進展すると期待される。

本研究を検査、治療の両面から臨床応用しようとする過程でさらなる知見が得られたが、現在特許出願の準備中であり、公開できない。

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0件)

[学会発表] (計0件)

[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

松木 直章 (MATSUKI NAOAKI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：40251417

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：