

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 29 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460654

研究課題名(和文) インクレチンの血液網膜関門保護への直接的介入 - 糖尿病網膜症発症・進展抑制機能 -

研究課題名(英文) Direct intervention of incretin to protect the blood-retinal barrier - Suppression on onset and progression of diabetic retinopathy -

研究代表者

足立 哲夫 (ADACHI, TETSUO)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40137063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Exendin-4は糖尿病治療薬として利用されているGLP-1アナログである。エピジェネティクスとはDNAメチル化やヒストンアセチル化による遺伝子発現制御機構であり、細胞外型抗酸化酵素(EC-SOD)の発現調節を行っている。報告者らは、exendin-4が肺基底上皮がんA549細胞並びにヒト網膜血管内皮細胞において、メチル化DNAの脱メチル化並びにヒストンH3アセチル化によりEC-SOD発現を亢進していることを明らかにした。また、インクレチン治療を開始した糖尿病患者では血漿中EC-SOD濃度が上昇していた。以上より、インクレチン治療は血管における直接的抗酸化能を亢進させることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Exendin-4 is an analog of the glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and is used in the treatment of type 2 diabetes. Since human GLP-1 receptor has been identified in various cells besides pancreatic cells, exendin-4 is expected to exert extrapancreatic actions. The expression of extracellular-superoxide dismutase (EC-SOD), a major SOD isozyme that is crucially involved in redox homeostasis, is regulated by epigenetic factors. We demonstrated that exendin-4 induced the expression of EC-SOD in A549 human lung adenocarcinoma epithelial cell line and human retinal microvascular endothelial cells through demethylation of some methyl-CpG sites and histone H3 acetylation at the EC-SOD proximal promoter region, respectively. Moreover, plasma EC-SOD concentrations in diabetic patients were elevated by incretin-based therapies. Therefore, incretin-based therapies may exert direct extrapancreatic effects in order to protect blood vessels by enhancing anti-oxidative activity.

研究分野：病態生化学

キーワード：糖尿病 エピジェネティクス ストレス インクレチン 抗酸化酵素

## 1. 研究開発当初の背景

糖尿病網膜症は患者の activities of daily living (ADL) を大きく損なう重篤な糖尿病合併症として知られており、本邦では中途失明原因第2位の疾患である。網膜血管内皮細胞においては酸化ストレスや小胞体ストレスの増大が向炎症因子の発現亢進やミトコンドリア機能障害を介して血管系の恒常性破綻を引き起こすことが報告されている。これらの報告から、酸化ストレスを抑制することが網膜血管系傷害の抑制に直結すると考えられる。

インクレチンとは腸管由来のインスリン分泌刺激因子である glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 並びに glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) を指し、近年、その関連薬 (GLP-1 アナログやインクレチン不活化酵素阻害剤) が新規糖尿病治療薬として上市された。最近、インクレチンが膵に対するインスリン分泌促進作用とは別に、インスリン抵抗性改善作用、心血管系保護作用、さらには血管系に対する抗炎症作用、抗動脈硬化作用を有することが報告され、一方で、その証拠となる GLP-1 受容体 (GLP-1R) の発現が血管内皮細胞など種々の血管系構成細胞において確認された。

## 2. 研究の目的

インクレチン関連薬である GLP-1 アナログは従来の糖尿病用薬とは作用機序が全く異なる新しいタイプの治療薬として臨床の場で用いられるようになったが、この GLP-1 は膵インスリン分泌促進作用以外に抗動脈硬化作用など多彩な生理機能を有している。申請者は、糖尿病患者においてはインスリン抵抗性の増悪とともに血管系の主な抗酸化酵素である extracellular-superoxide dismutase (EC-SOD) の発現が低下していることを報告しており、このような酸化ストレスに対する抵抗性の減弱が糖尿病の病態悪化に繋がっているものと考えられる。

エピジェネティクスとは塩基配列の変化を伴わない遺伝情報の発現制御機構である。具体的には DNA メチル化やヒストンアセチル化による遺伝子発現制御であり、細胞の分化過程において中心的役割を担うことが知られていたが、がん、生活習慣病、精神神経疾患

など多くの疾患の発症にも関わっていることが報告されてきた。最近、GLP-1 アナログの一つである exendin-4 がエピジェネティクス機構により遺伝子の発現を変化させることが報告された。Exendin-4 は日本では「エキセナチド」という一般名の GLP-1 アナログ製剤であり、糖尿病治療薬として用いられている。

そこで、本研究では、exendin-4 の EC-SOD 発現調節のメカニズムを明らかにし、インクレチン関連薬の血管系に対する直接的抗動脈硬化抑制作用を提言することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 各細胞は、それぞれ至適の培地を用い、至適条件下で培養した。

(2) EC-SOD mRNA レベルは real-time RT-PCR 法により測定した。DNA メチル化は、メチル化部位特異的切断酵素 (McrBC) による DNA 消化法、bisulfite methylation-specific PCR (MSP) 法、並びに bisulfite シークエンス法により解析した。ヒストン H3, H4 のアセチル化はヒストン抽出を行った後、western blot 法により検出した。EC-SOD プロモーター部位のヒストンアセチル化は、クロマチン免疫沈降法にて検出した。

(3) 臨床研究は、岐阜大学大学院医学系研究科医学研究等倫理審査委員会ならびに岐阜薬科大学生命倫理委員会の承認を得て実施した。岐阜大学医学部附属病院の糖尿病患者へのインクレチン関連薬治療開始前と開始後の外来通院時に採血し、得られた血漿中の EC-SOD 濃度を ELISA にて測定した。

## 4. 研究成果

### (1) Exendin-4 による EC-SOD 発現亢進作用 (A549 細胞)

正常肺上皮細胞においては EC-SOD の発現が高いにも関わらず肺胞基底上皮がん細胞である A549 細胞における発現は非常に低い。Exendin-4 は DNA 脱メチル化剤である 5-azacytidine と同様に A549 細胞における EC-SOD の発現を有意に亢進することが明らかとなった (図1)。A549 細胞においては EC-SOD プロモーター領域が高度なメチル化により転写抑制されており、これが原因で本細胞では EC-SOD 発現が低いことが判明した。

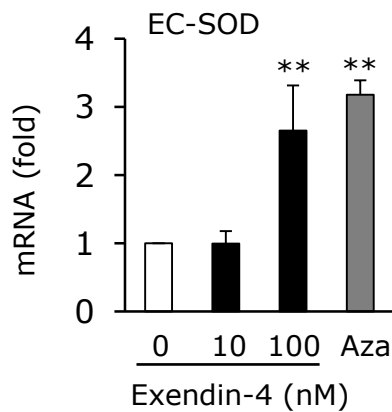


図1 EC-SOD 発現に対する exendin-4 の影響

Exendin-4 負荷後の変化をメチル化感受性制限酵素を用いた PCR 法, methylation specific PCR 法 (MSP 法), 並びに bisulfite-sequence 法にて解析した結果, *EC-SOD* プロモーター領域のうち-149 と-93 CpG サイトが exendin-4 により脱メチル化誘導されることが判明した. また, この exendin-4 の作用は, GLP-1 受容体アンタゴニストである exendin-(9-39)の添加により有意に抑制された結果から, GLP-1 受容体への結合によることが明らかになった. さらに, exendin-4 は DNA methyltransferase (DNMT) の発現量には影響を及ぼさないものの, その活性を阻害することで脱メチル化を誘導することが判明した (図2).

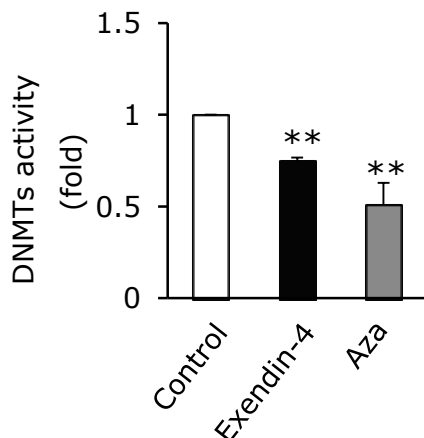


図2 DNMT 活性に対する exendin-4 の影響

## (2) Exendin-4 による EC-SOD 発現亢進作用 (網膜血管内皮細胞)

報告者は, すでに糖尿病網膜症病態下では網膜血管内皮細胞において酸化ストレスが増

大し, 結果的に血管透過性が亢進することにより血中タンパクが硝子体中に逸脱して炎症病態を呈することを見出している. 研究成果 (1)に示すように, exendin-4 が A549 細胞での EC-SOD 発現を亢進することが確認されたため, exendin-4 が網膜血管系においても同様に EC-SOD 発現を亢進することで酸化ストレスに対する抵抗性を高め結果的に糖尿病性網膜症の進展抑制に働いている可能性について検討した. その結果, exendin-4 は網膜血管内皮細胞 (human retinal microvascular endothelial cells: HREC) での EC-SOD 発現を亢進することが判明した. また, GLP-1 受容体アンタゴニストである exendin-(9-39)の添加により有意に抑制された結果から, GLP-1 受容体への結合によることが明らかになった. しかし, A549 細胞の場合とは異なり, HREC では, *EC-SOD*プロモーター領域の CpG サイトが高度にメチル化されているにも関わらず, 5-azacytidine にて処理しても EC-SOD の発現に変化はみられず, HREC での exendin-4 による EC-SOD 発現亢進が DNA 脱メチル化によるものではないことが判明した. 一方, HREC をヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である trichostatin A にて処理したところ EC-SOD 発現の亢進が認められた. HREC における EC-SOD 発現はヒストンのアセチル化によって制御されていると考え, exendin-4 によるヒストンアセチル化レベルの変化を検討した結果, ヒストン H3, H4 のアセチル化レベルの亢進が認められた. また, クロマチン免疫沈降法により *EC-SOD* プロモーター部位でのヒストン H3 アセチル化が確認された. さらに, exendin-4 は HREC において, histone deacetylase (HDAC)活性を低下させ, ヒストンアセチル化を促進することで EC-SOD 発現を亢進していることが判明した.

## (3)インクレチン治療による血中 EC-SOD 濃度の変化

臨床研究として, GLP-1 アナログあるいは DPP-4 阻害剤による治療を開始した糖尿病患者 12 名 (男性 6 名, 女性 6 名, 42~83 歳) の投与開始前後の血漿中 EC-SOD 濃度を測定した結果, インクレチン治療開始により, 血中 EC-SOD 濃度が有意に上昇し, LDL-コレス

テロールの低下を伴っていた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 11 件)

1. Yasuda H, Mizukami K, Hayashi M, Kamiya T, Hara H, Adachi T: Exendin-4 promotes extracellular-superoxide dismutase expression in A549 cells through DNA demethylation. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **58**, 34-39, 2016 (査読有) DOI: 10.3164/jcfn.15-16
2. Makino J, Asai R, Hashimoto M, Kamiya T, Hara H, Nimomiya M, Koketsu M, Adachi T: Suppression of EC-SOD by oxLDL During Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. *J. Cell. Biochem.* in press. (査読有) DOI: 10.1002/jcb.25542
3. Kamiya T, Goto A, Kurokawa E, Hara H, Adachi T: Cross-talk mechanism among EMT, ROS, and histone acetylation in phorbol ester-treated human breast cancer MCF-7 cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2016 ID1284372, 2016. (査読有) DOI: 10.1155/2016/1284372
4. Makino J, Ogasawara R, Kamiya T, Hara H, Mitsugi Y, Yamaguchi E, Itoh A, Adachi T: Royal jelly constituents increase the expression of extracellular superoxide dismutase through histone acetylation in monocytic THP-1 Cells. *J. Natl. Prod.*, **79**, 1137-1143, 2016. (査読有) DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00037
5. Makino J, Nii M, Kamiya T, Hara H, Adachi T: Oxidized low-density lipoprotein accelerates the destabilization of extracellular-superoxide dismutase mRNA during foam cell formation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **575**, 54-60, 2015. (査読有) DOI: 10.1016/j.abb.2015.04.001
6. Adachi T, Kaminaga T, Yasuda H, Kamiya T, Hara H: The involvement of endoplasmic reticulum stress in bile acid-induced hepatocellular injury. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **54**, 129-135, 2014. (査読有) DOI: 10.3164/jcfn.13-46
7. Kamezaki F, Tsutsui M, Takahashi M, Sonoda S, Kubo T, Fujino Y, Adachi T, Abe H, Takeuchi M, Mayumi T, Otsuji Y: Plasma levels of nitric oxide metabolites are markedly reduced in normotensive men with electrocardiographically determined left ventricular hypertrophy. *Hypertension*, **64**, 516-522, 2014. (査読有) DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03287
8. Kamiya T, Hara H, Adachi T: Effect of ER stress inducer thapsigargin on the expression of extracellular-superoxide dismutase in mouse 3T3-L1 adipocytes. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **52**, 101-105, 2013. (査読有) DOI: 10.3164/jcfn.12-46
9. Uto-Kondo H, Ayaori M, Kishimoto Y, Adachi T, Takiguchi S, Yakushiji E, Sasaki M, Komatsu T, Kondo K, Ikewaki K: Consumption of polyphenol-rich juar tea increases endothelium-bound extracellular superoxide dismutase levels in men with metabolic syndrome: link to LDL oxidizability. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **64**, 407-14, 2013. (査読有) DOI: 10.3109/09637486.2012.759185.
10. Oyama M, Nakashima K, Kamiya T, Haba M, Ito T, Murata H, Tanaka T, Adachi T, Inuma M, Kinoshita T: Flavonoids isolated from the leaves of *Melicope triphylla* and their extracellular-superoxide dismutase-inducing activity. *Phytochemistry Lett.*, **6**, 215-218, 2013. (査読有) DOI: 10.1016/j.phytol.2013.01.007
11. Kamiya T, Machiura M, Makino J, Hara H, Hozumi I, Adachi T: Epigenetic regulation of extracellular-superoxide dismutase in human monocytes. *Free Rad. Biol. Med.*, **61**, 197-205, 2013. (査読有) DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.013

〔学会発表〕 (計 25 件)

1. 森沢惇平, 安田浩之, 神谷哲朗, 原宏和, 足立哲夫: TNF $\alpha$ による DNA メチル化機構を介した EC-SOD 発現調節, 日本薬学会第 136 年会, 横浜 (2016, 3/26-29)
2. 小笠原理恵, 牧野純也, 神谷哲朗, 原宏

- 租, 満木友加里, 山口英士, 伊藤彰近, 足立哲夫: ローヤルゼリー成分による EC-SOD 発現変動とエピジェネティクスとの関連性, 第 6 回岐阜薬科大学機能性健康食品(蜂産品)研究講演会, 岐阜 (2015, 12/5)
3. 大橋敦子, 安田浩之, 神谷哲朗, 原 宏和, 足立哲夫: Caffeic acid phenethyl ester のエピジェネティック作用を介する EC-SOD 発現調節機構, 第 6 回岐阜薬科大学機能性健康食品(蜂産品)研究講演会, 岐阜 (2015, 12/5)
  4. 牧野純也, 小笠原理恵, 神谷哲朗, 原 宏和, 満木友加里, 山口英士, 伊藤彰近, 足立哲夫: ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞におけるローヤルゼリー成分による EC-SOD 発現変動とエピジェネティクスの関与, 第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会合同大会, 神戸 (2015, 12/1-4)
  5. Yasuda H, Morisawa S, Kamiya T, Hara H, Adachi T: TNF $\alpha$  suppresses EC-SOD expression through epigenetic regulation in fibroblasts, 22nd Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine, Bostone (USA) (2015, 11/18-22)
  6. Makino J, Asai R, Kamiya T, Hara H, Adachi T: EC-SOD expression is suppressed by treatment with oxLDL in vascular smooth muscle cells, 22nd Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine, Bostone (USA) (2015, 11/18-22)
  7. Kamiya T, Nakahara R, Hara H, Adachi T: Ten-eleven translocation 1 regulates SOD3 expression by its direct binding to human SOD3 promoter region, 22nd Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine, Bostone (USA) (2015, 11/18-22)
  8. 大橋敦子, 安田浩之, 神谷哲朗, 原 宏和, 足立哲夫: Caffeic acid phenethyl ester によるエピジェネティクス制御機構を介した抗酸化酵素の発現変動, 第 127 回日本薬理学会近畿支部会, 岐阜 (2015, 6/26)
  9. 神谷哲朗, 仲原理沙, 原 宏和, 足立哲夫: Ten-eleven translocation 1 を介した EC-SOD 遺伝子の DNA 脱メチル化機構, 第 68 回日本酸化ストレス学会学術集会, 鹿児島 (2015, 6/11-12)
  10. 浅井玲衣, 牧野純也, 神谷哲朗, 原 宏和, 足立哲夫: 血管平滑筋細胞への酸化 LDL 曝露による EC-SOD 発現低下に対する luteolin の抑制効果, 日本生化学会中部支部例会・シンポジウム, 松本 (2015, 5/23)
  11. 安田浩之, 林 睦菜, 神谷哲朗, 原 宏和, 足立哲夫: エピジェネティクス制御機構を介した exendin-4 によるヒト網膜血管内皮細胞 EC-SOD の発現調節, 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会, 下関 (2015, 5/21-24)
  12. 小笠原理恵, 牧野純也, 神谷哲朗, 原 宏和, 足立哲夫: ローヤルゼリー成分によるエピジェネティクス制御機構が EC-SOD 発現に与える影響, 日本薬学会第 135 年会, 神戸 (2015, 3/25-28)
  13. 神谷哲朗, 竹内康佑, 原 宏和, 足立哲夫: THP-1 細胞分化時の EC-SOD 発現制御機構における細胞内銅イオンの役割, 日本酸化ストレス学会東海支部 第 3 回学術集会, 名古屋 (2015, 2/7)
  14. Makino J, Nii M, Kamiya T, Hara H, Adachi T: Oxidized low-density lipoprotein accelerates the degradation of EC-SOD mRNA during foam cell formation in THP-1 macrophages, 21<sup>st</sup> Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine, Seattle (USA) (2014, 11/19-23)
  15. 牧野純也, 二井美佑紀, 神谷哲朗, 原 宏和, 足立哲夫: THP-1 細胞由来マクロファージへの酸化 LDL 曝露による mRNA 安定性低下が EC-SOD mRNA 発現に与える影響, 第 87 回日本生化学会大会, 京都 (2014, 10/15-18)
  16. 安田浩之, 林 睦菜, 神谷哲朗, 原 宏和, 足立哲夫: インクレチンの DNA 脱メチル化機能による EC-SOD 発現調節, 第 26 回腎とフリーラジカル研究会, 名古屋 (2014, 9/20)
  17. 安田浩之, 水上康治, 神谷哲朗, 原 宏和, 足立哲夫: Exendin-4 の DNA メチル化制御による EC-SOD 発現調節, 第 60

回日本薬学会東海支部大会, 鈴鹿 (2014, 7/5)

18. 足立哲夫: コーヒー含有ポリフェノールのエピジェネティクス制御能, 全日本コーヒー協会第 17 回研究助成報告会, 東京 (2014, 6/20)
19. 服部脩平, 神谷哲朗, 原 宏和, 足立哲夫: 低酸素状態下の COS7 細胞における EC-SOD 発現調節機構としてのエピジェネティクス, 日本生化学会中部支部例会・シンポジウム, 名古屋 (2014, 5/24)
20. 二井美佑紀, 牧野純也, 神谷哲朗, 原 宏和, 足立哲夫: 酸化 LDL 曝露によるヒト単球系細胞の泡沫化過程における EC-SOD 発現調節機構解明, 日本薬学会第 134 年会, 熊本 (2014, 3/27-30)
21. 安田浩之, 水上康治, 林 睦菜, 神谷哲朗, 原 宏和, 足立哲夫: エピジェネティクス制御機構を介した Exendin-4 による EC-SOD 発現調節, 日本酸化ストレス学会東海支部 第 2 回学術集会, 岐阜 (2014, 2/8)
22. 鎌村麻由, 寺町真由美, 神谷哲朗, 原 宏和, 足立哲夫: ストレスに起因する網膜血管内皮細胞層透過性亢進に対するステロイド剤の抑制作用, 日本酸化ストレス学会東海支部 第 2 回学術集会, 岐阜 (2014, 2/8)
23. Adachi T, Kamamura M, Yasuda H, Teramachi M, Kamiya T, Hara H: Signaling pathways related to endoplasmic reticulum stress-induced retinal endothelial permeability, Biennial Meeting of Society for Free Radical Research Asia 2013, Tao-Yuan, (Taiwan) (2013, 10/13-19)
24. 牧野純也, 二井美佑紀, 神谷哲朗, 原 宏和, 足立哲夫: 単球由来マクロファージの酸化 LDL 曝露による泡沫化過程における酸化ストレス防御酵素 EC-SOD 発現変動とその調節機構, 第 86 回日本生化学会大会, 横浜 (2013, 9/11-13)
25. 神谷哲朗, 町浦雅量, 牧野純也, 原 宏和, 足立哲夫: ヒト単球系細胞株における EC-SOD 遺伝子の DNA メチル化制御機構, 第 66 回日本酸化ストレス学会, 名古屋 (2013, 6/13-14)

#### 〔図書〕 (計 2 件)

1. 神谷哲朗, 服部脩平, 原 宏和, 山田晴生, 足立哲夫: 低酸素状態下の COS7 細胞における EC-SOD 発現調節機構としてのエピジェネティクス, 腎とフリーラジカル 第 12 集 (富野康日己, 稲垣昌博) (総頁数 130), 東京医学社, 100-103, 2014
2. 神谷哲朗, 小原 彩, 和泉美里, 原 宏和, 山田晴生, 足立哲夫: カドミウム曝露下の COS-7 細胞における extracellular-superoxide dismutase 発現変動, 腎とフリーラジカル 第 11 集 (佐中 孜, 玉置利晃) (総頁数 175), 東京医学社, 63-66, 2013

#### 〔その他〕

ホームページ

<http://www.gifu-pu.ac.jp/lab/rinyaku/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

足立 哲夫 (ADACHI Tetsuo)  
岐阜薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号: 40137063

##### (2) 研究分担者

原 宏和 (HARA Hirokazu)  
岐阜薬科大学・薬学部・准教授  
研究者番号: 30305495

神谷 哲朗 (KAMIYA Tetsuro)  
岐阜薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号: 60453057

##### (3) 連携研究者

池田 恒彦 (IKEDA Tsunehiko)  
大阪医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 70222891

##### (4) 研究協力者

安田 浩之 (YASUDA Hiroyuki)  
牧野 純也 (MAKINO Junya)