

平成22年5月26日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19591065  
 研究課題名（和文）2型糖尿病のインスリン分泌不全に対する酸化ストレスとマクロファージの関与の解明

研究課題名（英文）Elucidation of involved mechanisms impaired for insulin secretion due to oxidative stress and macrophages in pancreatic islets 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型糖尿病状態下に膵β細胞株のMIN6からのMCP-1放出が増加し、その結果膵ラ氏島へのマクロファージの浸潤が促進されること、そしてその機序として内因性酸化ストレスの増大が関与している可能性が考えられた。また同様に脂肪細胞株の3T3L1からのMCP-1ならびにVEGF放出の増大を認めた。これらの機序にも内因性酸化ストレスの増大が関与するとともに、特にMCP-1分泌の増大については両細胞系ともに共通して、その下流のシグナルとして少なくとも一部にIκB-dependent pathwayが重要な役割を果たしているものと推測された。

研究成果の概要（英文）：The increased release of MCP-1 was observed from pancreatic MIN6 β cells under diabetic conditions, leading to the enhancement of macrophage infiltration into pancreatic islets. And increased endogenous oxidative stress in β cells could be related to its underlying mechanism. In addition, the release of MCP-1 and VEGF was also found to be increased from 3T3L1 adipocytes. The enhancement of endogenous oxidative stress was similarly speculated to be the pathogenic mechanism of their increased secretion, and in terms of released MCP-1, we deduce that the IκB-dependent pathway is, at least in part, important as a common distal signaling in both pancreatic β cells and adipocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009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、インスリン分泌、酸化ストレス、マクロファージ

## 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り、また同時に今後の重要な課題となっている。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Ca<sup>2+</sup>動態の異常、さらにはSNARE蛋白質群のなかの 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10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、酸化ストレス下でのインスリン分泌不全はグルコース刺激に対し選択的であることを観察しており、この障害機序の探求と責任分子の同定は、膵β細胞の特殊性の1つであるグルコースに対する分泌顆粒放出機構の本質に関わる重要な命題を提示するとともに、2型糖尿病の主要な病態であるグルコース刺激に対するインスリン分泌不全の病因の解明に直接つながる。

## 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<sup>+</sup>チャネル(K<sub>ATP</sub>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Ca<sup>2+</sup>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蛋白質群の 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での膵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。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を、今回の研究の目的とする。

## 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、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)発現ならびに放出の増大をimmunoblotting法により定量し検討する。そしてその機構を明らかにする目的で、抗酸化剤のN-acetylcystein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)分子誘導した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vascular endothelial growth factor (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、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、マ クロファージの浸潤を促す chemokine の 1 つ である monocyte chemoattractant protein-1 (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 される (図 1) とともに、I<sub>κ</sub>B phosphorylation inhibitor の BAY11-7085 の 同時投与にても同様に有意に抑制された (図 2)。したがって 2 型糖尿病状態下の glucolipotoxicity 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 の増大が関与し、さらにその下流のシグナル として I<sub>κ</sub>B-dependent pathway が重要な役割 を果たしている可能性が考えられた。

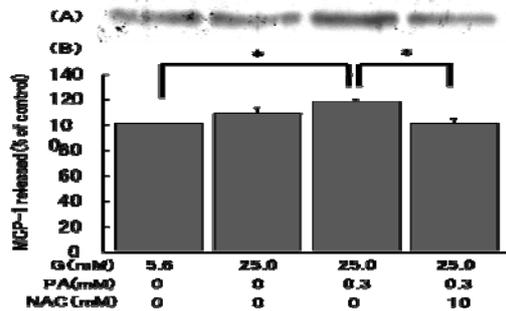


図 1：膵β細胞での MCP-1 放出増大に対する N-acetyl cystein の効果

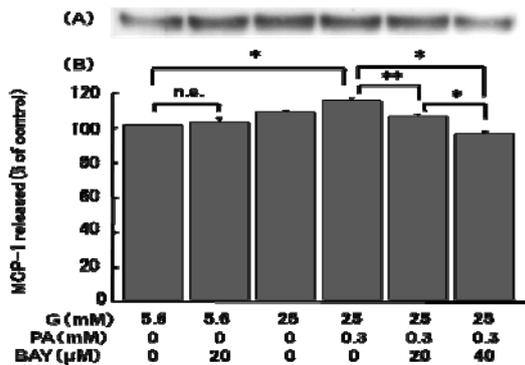


図 2：膵β細胞での MCP-1 放出増大に対する BAY 11-7085 の効果

(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、脂肪細胞においても膵β細胞と同程度 に強く発現していることが知られている MCP-1 放出の変化と、これに関与する細胞内 情報伝達系の同定を目的として、以下の検討 を加えた。分子誘導した 3T3L1 脂肪細胞を 0.3mM PA 存在下に長時間培養したところ、脂 肪細胞の肥大化にともなって MCP-1 発現と放 出の増大を認めた。この細胞の肥大化には内 因性の酸化ストレスの増大がともない、一方 で抗酸化薬の 1 つである N-acetyl cystein の同時投与により、細胞からの MCP-1 放出の 増大が有意に抑制された (図 3)。さらに JNK 阻害薬 (SP600125 や JIP-1 peptide、(図 4)) ならびに I<sub>κ</sub>B リン酸化阻害薬 (BAY 11-7085 や BMS-345541、(図 5)) の同時投与にても同 様に有意な放出の抑制が認められた。しがた った 2 型糖尿病の存在下での脂肪細胞の肥大 化により MCP-1 放出が増加し、その結果脂肪 組織への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一部に は内因性酸化ストレスの増大が関与し、その 下流のシグナルとして JNK や I<sub>κ</sub>B シグナリ ングが重要な役割を果たすものと考えられた。

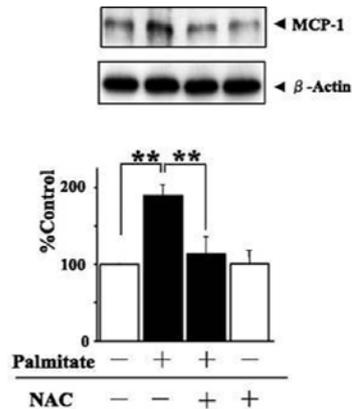


図 3：脂肪細胞での MCP-1 放出増大に対する N-acetyl cystein の効果

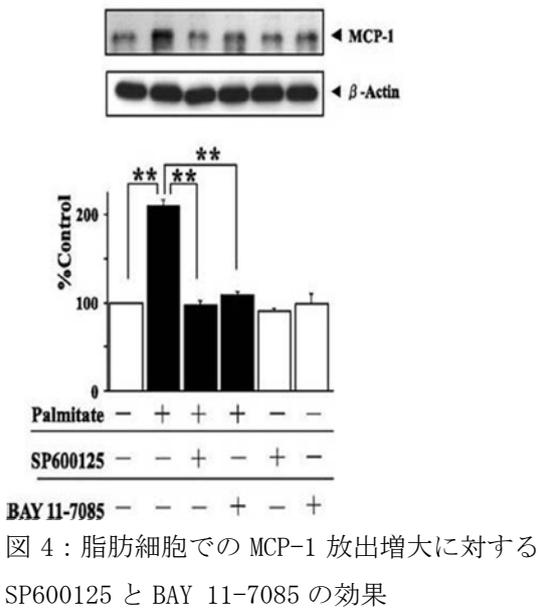


図 4：脂肪細胞での MCP-1 放出増大に対する SP600125 と BAY 11-7085 の効果

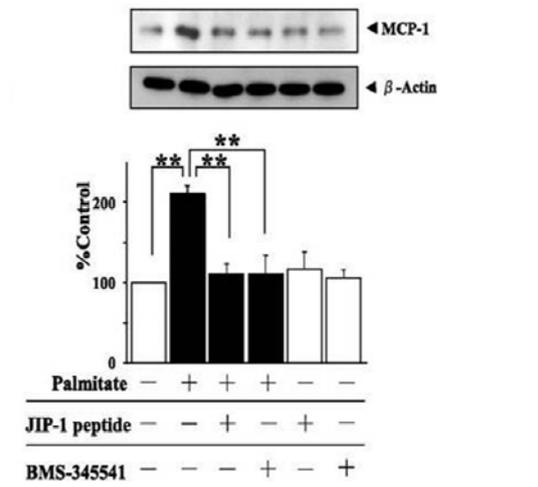


図 5：脂肪細胞での MCP-1 放出増大に対する JIP-1 peptide と BMS-345541 の効果

(3)さらに(2)の脂肪細胞からの MCP-1 放出に加えて、血管新生と adipogenesis に関与するとともに、MCP-1 と同様に臍β細胞からも多量に分泌されることが報告されている vascular endothelial growth factor (VEGF) の培養液中への放出の変化を比較検討した。分化誘導した 3T3L1 脂肪細胞を用いて、高濃度パルミチン酸 (0.3mM) 存在下に長時間培養し、人為的な肥大化を誘導したところ、MCP-1 ならびに VEGF とともに放出の増大が認められた。また VEGF の増大は、(2)で示した MCP-1 と同様に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 (図 6)。一方で、MCP-1 放出の増大が JNK inhibitor の SP600125 や p38MAPK inhibitor の SB203580 の同時投与にて抑制された (図 7) のに対し、VEGF 放出の増大は

PI3K inhibitor の LY294002 の同時投与により抑制された (図 8)。したがって脂肪細胞の肥大化によりもたらされる内因性酸化ストレスの増大が、① JNK、p38MAPK の活性化を介して MCP-1 放出を増大させマクロファージの浸潤を促すとともに、②PI3K の活性化を介して VEGF 放出を増加させ新たな adipogenesis を促進して脂肪組織の肥大化 (すなわち肥満) を生じ、これらの結果 インスリン抵抗性のさらなる増悪を生じる可能性が考えられた。

(4)以上の成績より、2 型糖尿病の臍ラ氏島と脂肪組織に同様に認められるマクロファージ浸潤の分子基盤の 1 つである MCP-1 放出の増加について、臍β細胞と脂肪細胞のそれぞれに共通して内因性酸化ストレスの増大が関与し、さらにその下流のシグナルとして、少なくとも一部に I<sub>κ</sub>B-dependent pathway が重要な役割を有する可能性が考えられた。また脂肪組織の肥大化に関連すると考えられている VEGF については、MCP-1 とは異なりその脂肪細胞からの放出増加に PI3K の活性化

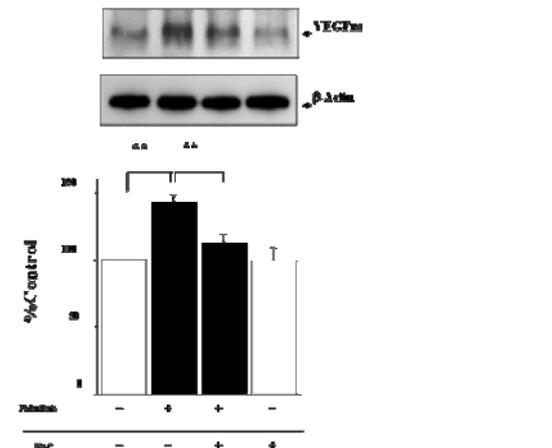


図 6：脂肪細胞での VEGF 放出増大に対する N-acetyl cystein の効果

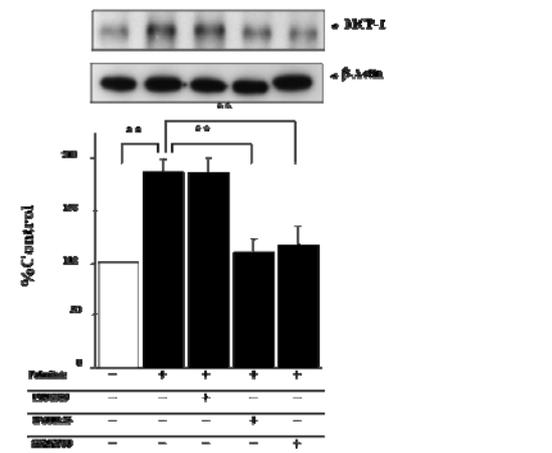


図 7 : 脂肪細胞での MCP-1 放出増大に対する SP600125 と SB203580 の効果

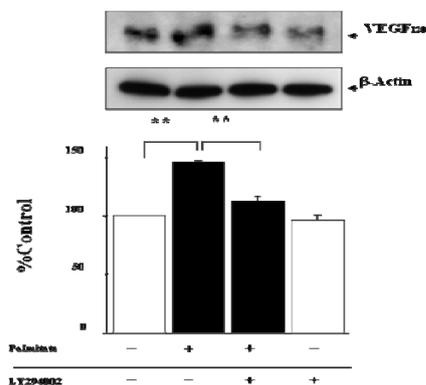


図 8 : 脂肪細胞での VEGF 放出増大に対する LY294002 の効果

が関与しているものと推測された。2 型糖尿病の膝ラ氏島についてもインスリン抵抗性の存在下に肥大化する事実が知られており、今後の検討課題として、この機構に果たす膵β細胞由来の VEGF の役割を明らかにするとともに、脂肪細胞と共通して放出増大に関与する細胞内情報伝達系の同定を進める必要がある。

#### 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 7 件)

① T. Sakurai, K. Kitadate, H. Nishioka, H. Fujii, T. Kizaki, Y. Kondoh, T. Izawa, H. Ishida, Z. Radak and H. Ohno. Oligomerized grape seed polyphenols attenuate inflammatory changes due to antioxidative properties in co-culture of adipocytes and macrophages. *J Nutr Biochem* 23: 1626-1633 2010.

② J. Ogasawara, K. Kitadate, H. Nishioka, H. Fujii, T. Sakurai, T. Kizaki, T. Izawa, H. Ishida and H. Ohno. Oligonol, a new lychee fruit-derived low-molecular form of polyphenol, enhances lipolysis in primary rat adipocytes through activation of the ERK1/2 pathway. *Phytotherapy Res* 21: 47-54 2009.

③ T. Sakurai, T. Izawa, T. Kizaki, J. Ogasawara, K. Shirato, K. Imaizumi, K. Takahashi, H. Ishida and H. Ohno. Exercise training decreases expression of inflammation-related adipokines through reduction of oxidative stress in rat white

adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 379: 605-609 2009.

④ H. Seki, K. Takahashi, K. Miyokawa, K. Handa, H. Katsuta, S. Yamaguchi, K. Yoshimoto, E. Itagaki, S. Nagamatsu and H. Ishida. Enhanced release of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by high glucose and free fatty acid and its underlying mechanism in MIN6 β cells. *J Kyorin Med Soc* 39: 31-36 2008.

⑤ T. Kishino, K. Watanabe, T. Urata, M. Takano, T. Uemura, K. Nishikawa, Y. Mine, M. Matsumoto, K. Ohtsuka, H. Ohnishi, H. Mori, S. Takahashi, H. Ishida and T. Watanabe. Visceral fat thickness in overweight men correlates with alterations in serum fatty acid composition. *Clin Chim Acta* 398: 57-62 2008.

⑥ M. Takizawa, K. Suzuki, T. Matsubayashi, M. Kikuyama, H. Suzuki, K. Takahashi, H. Katsuta, J. Mitsuhashi, S. Nishida, S. Yamaguchi, K. Yoshimoto, E. Itagaki and H. Ishida. Increased bone resorption may play a crucial role in the occurrence of osteopenia in patients with type 2 diabetes: possible involvement of accelerated polyol pathway in its pathogenesis. *Diabetes Res Clin Pract* 82: 119-126 2008.

⑦ K. Takahashi, S. Yamaguchi, T. Shimoyama, H. Seki, K. Miyokawa, H. Katsuta, T. Tanaka, K. Yoshimoto, H. Ohno, S. Nagamatsu and H. Ishida. JNK- and IκB-dependent pathways regulate MCP-1, but not adiponectin, release from artificially hypertrophied 3T3-L1 adipocytes preloaded with palmitate in vitro. *Am J Physiol* 294:E898-E909 2008.

[学会発表] (計 4 件)

① K. Takahashi, S. Yamaguchi, T. Shimoyama, T. Tanaka, K. Miyokawa, K. Handa, H. Katsuta, S. Nishida, K. Yoshimoto, and H. Ishida. Hypoxia-independent VEGF<sub>120</sub> secretion is stimulated by increase of endogenous oxidative stress through PI3K-dependent pathways in artificially hypertrophied 3T3-L1 adipocytes: The regulation by distinct mechanism from MCP-1 via JNK and p38 MAPK pathways. 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology, March 26-30, 2010, Kyoto.

② 高橋和人, 山口真哉, 下山達宏, 田中利

明, 三代川可織, 半田桂子, 勝田秀紀, 西田進, 吉元勝彦, 永松信哉, 石田 均: 肥大化脂肪細胞における VEGF<sub>120</sub> 分泌の制御機構について—MCP-1 分泌機構との相違—. 第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会, 平成 21 年 5 月 21 日-24 日, 大阪.

③ 関 博之, 高橋和人, 三代川可織, 半田桂子, 勝田秀紀, 下山達宏, 田中利明, 山口真哉, 吉元勝彦, 板垣英二, 永松信哉, 石田均: Glucolipototoxicity による膵β細胞からの MCP-1 分泌の増加と細胞内情報伝達系の関与. 第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会, 平成 20 年 5 月 22 日-24 日, 東京.

④ 関 博之, 高橋和人, 伊藤英介, 勝田秀紀, 田中利明, 下山達宏, 山口真哉, 吉元勝彦, 永松信哉, 石田 均: 膵β細胞からの MCP-1 分泌に及ぼす高濃度グルコースおよび脂肪酸の影響について. 第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会, 平成 19 年 5 月 24 日-26 日, 仙台.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石田 均 ( ISHIDA HIYOSHI )  
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  
(H19→H20: 連携研究者)  
吉元 勝彦 ( YOSHIMOTO KATSUHIKO )  
杏林大学・医学部・講師  
研究者番号: 20271257  
(H19→H20: 連携研究者)