

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790654  
 研究課題名（和文） DDAH2 過剰発現マウスの膵 NO、インスリン分泌上昇による糖尿病改善効果の検討  
 研究課題名（英文） DDAH2 enhances insulin secretion in pancreatic islet by local NO production.  
 研究代表者  
 長谷川 一宏（HASGAWA KAZUHIRO）  
 慶應義塾大学・医学部・助教  
 研究者番号：30424162

## 研究成果の概要（和文）：

DDAH2 過剰発現マウスは、内因性 NOS 阻害物質の ADMA を代謝し局所活性酸素低下作用を有するが、膵局所でも局所酸化ストレスの低下を認めるかを検討したところ、膵局所酸化ストレスの低下を認めた。また、WT（コントロール）マウスに高脂肪食を給餌し、膵島を単離し解析したところ、膵局所の ADMA が上昇し、DDAH2 過剰発現マウスにおいては膵局所 ADMA の低下を認め、膵臓局所 NO の産生亢進、酸化ストレス低下をもたらした。以上の機序から DDAH2 過剰発現マウスは糖尿病発症時の膵インスリン分泌亢進を認めた。

## 研究成果の概要（英文）：

Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) degrades asymmetric dimethylarginine (ADMA), an endogenous nitric oxide (NO) synthase inhibitor, and comprises 2 isoforms, DDAH1 and DDAH2. To investigate the in vivo role of DDAH2, we generated transgenic mice overexpressing DDAH2. The transgenic mice manifested reductions in plasma ADMA and elevations in NO levels. In addition, TG mice also showed that DDAH2 induced pancreatic insulin secretion through increasing local NO production and reducing ROS levels in diabetic condition.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：過剰発現マウス、糖尿病、インスリン

## 1. 研究開始当初の背景

NO 合成酵素 (NOS) の内因性阻害物質として ADMA (asymmetrical dimethylarginine) が存在する。ADMA の代謝酵素 DDAH, Dimethylarginine dimethylaminohydrolase には2つのアイソフォーム DDAH1, 2 が存在する。これまでに DDAH2 の in vitro (ATVB. 2006) の新規作用、in vivo (Circ Res. 2007) の新規作用を報告したが、今回は DDAH2 全身過剰発現マウスに糖尿病発症モデルの高脂肪食・streptozotocin の同時投与を行ない、DDAH2 の生体における糖尿病発症抑制効果を検討する事を目的にして、以下の研究計画を立案、施行した。

## 2. 研究の目的

血中 ADMA は糖尿病患者で高値であり、その機序は高血糖による酸化ストレスが DDAH 酵素活性部位を S - ニトロソ化し、活性低下させる。DDAH2 過剰発現マウスは、以前の検討でアンジオテンシンが誘導する組織活性酸素産生・病変を抑制した。アンジオテンシンの活性酸素産生源は主に NADPH oxidase であり、高血糖による活性酸素産生源も同様である。従って、DDAH2 過剰発現の局所活性酸素低下作用は、糖尿病発症も抑制すると考え、効果を検討する事を目的とした。

そこで、今回、DDAH2 全身過剰発現マウスに糖尿病発症モデルである高脂肪食、streptozotocin 投与を行ない、DDAH2 の生体における糖尿病発症抑制効果を検討した。

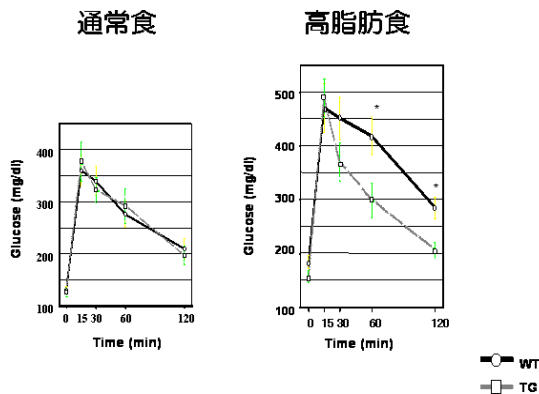
## 3. 研究の方法

DDAH2TG マウスのインスリン分泌亢進効果を検討した。高脂肪食・STZ 投与マウスの解析として、4 週齢 TG 群と WT 群(両者とも C57BL/6J)を高脂肪食(全カロリー中60%の脂質含有)3 週間給餌後、STZ(100mg/kg 体重)を腹腔内投与し、さらに高脂肪食を3 週間給餌した。その間、体重・食物摂取は1 週間毎測定した。10 週齢で IGTT、IITT、採血(血糖・インスリン値・脂質値等)、脂肪組織所見、CT による脂肪組織面積を測定した。更に、膵臓単離・TG マウスのインスリン分泌亢進の確認として、10 週齢 TG マウスのインスリン分泌亢進を確認した上で、膵臓を単離した。単離した膵臓の凍結切片作成後、膵島サイズを測定し、更に同検体にインスリン抗体・グルカゴン抗体を使用した膵免疫組織染色を施行し、インスリン陽性細胞(細胞)、グルカゴン陽性細胞(細胞)数を計測した。以上の結果から、膵臓細胞数増加や膵島肥大化によるインスリン分泌亢進ではなく、各細胞での機能的なインスリン分泌亢進を確認後、膵臓を更にコラゲナーゼ処理し、膵島を単離した。単離した膵島を GSIS(glucose stimulated insulin secretion)法、すなわち、異なる濃度の血糖を含む培養液中に膵島を入れ、一定時間に分泌されたインスリン量を測定した。以前当 TG マウスで臓器局所 NO 濃度高値、組織酸化ストレス低下を報告したが、膵臓の局所効果の寄与を検討するため、単離膵局所 NO 定量(ELISA)、活性酸素測定(ジヒドロエチジウム染色・ルシゲニン発光定量法)を施行した。

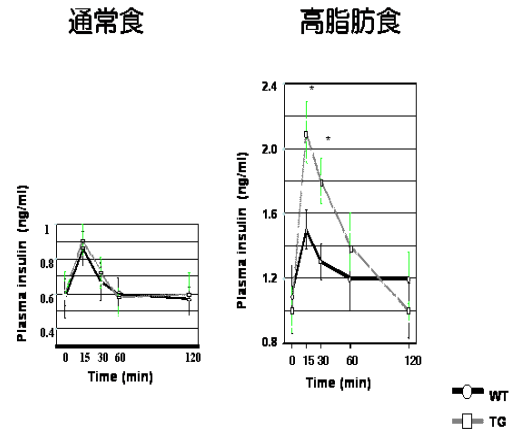
#### 4. 研究成果

TG 群と野生型 (WT 群) を通常食および高脂肪食給餌下で飼育後、体重、IGTT (腹腔内ブドウ糖負荷)、IITT (腹腔内インスリン負荷) 採血 (血糖・インスリン値・脂質値等)、脂肪組織所見、CT による脂肪組織面積を測定した。結果は通常食給餌下で両群に差を認めず、高脂肪食給餌下で TG 群は WT 群に比べ空腹時血糖値低値、IGTT 上糖負荷後 60 分・120 分後の血糖低値、15 分・30 分後でインスリン分泌上昇を認めた。IITT の血糖値、体重、血中脂質値、脂肪組織所見に両群間に差はなかった。(下図) 以上の結果、DDAH2 過剰発現はインスリン抵抗性に影響を与えず、インスリン分泌を亢進した。高血糖による酸化ストレスは膵臓 細胞インスリン分泌低下を来たす事、インスリン分泌に重要な膵 Glucokinase (GK) は NOS と共在し、NO は GK を活性化し、インスリン分泌を亢進する事が知られている。応募者はすでに DDAH2TG マウスで臓器局所 NO 濃度高値、組織酸化ストレス低下を報告した(Hasegawa K. *Circulation Research* 2007)が、膵臓におけるこれらの効果がインスリン分泌亢進に寄与したと考えている。

#### IGTT (血糖値)



#### IGTT (インスリン値)



血中 ADMA は糖尿病患者で高値であり、その機序は高血糖による酸化ストレスが DDAH 酵素活性部位を S - ニトロソ化し、活性低下させる事が示唆されている。逆に、DDAH2 過剰発現マウスは、ADMA を代謝し局所活性酸素低下作用を有するが、膵局所でも局所酸化ストレスの低下を認めるかを検討したところ、膵局所酸化ストレスの低下を認めた。また、WT (コントロール) マウスに高脂肪食を給餌し、膵島を単離し解析したところ、膵局所の ADMA が上昇し、DDAH2 過剰発現マウスにおいては膵臓膵局所 ADMA の低下を認め、膵臓局所 NO の産生亢進をもたらした。

膵局所 NO 産生亢進と膵局所の酸化ストレスの低下により、DDAH2 過剰発現マウスは糖尿病発症時の膵インスリン分泌亢進を認めた。

#### 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 1 件)

Kazuhiro Hasegawa, Kidney-Specific

Overexpression of Sirt1 Protects against Acute Kidney Injury

by Retaining Peroxisome Function.

J Biol Chem. 2010. in press. 査読有り

〔学会発表〕(計2件)

長谷川一宏

DDAH2TG マウスの膵インスリン分泌亢進作用  
第22回 国際高血圧学会  
ドイツ、ベルリン、2008年6月16日

長谷川一宏

DDAH2の膵インスリン分泌亢進作用  
第81回 日本内分泌学会学術総会  
青森、2008年5月16日

〔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

長谷川 一宏 (HASEGAWA KAZUHIRO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30424162

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし