

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 17日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500767

研究課題名（和文）糖尿病におけるストレス応答性 UCP2 発現低下による活性酸素産生亢進と対策法の確立

研究課題名（英文） The control strategy of stress-induced UCP2 expression and ROS generation in diabetes mellitus

研究代表者

南山 幸子（MINAMIYAMA YUKIKO）

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：00362989

研究成果の概要（和文）：糖尿病病態ではミトコンドリア機能不全による酸化ストレスの亢進およびそれに適応するためのミトコンドリアからの活性酸素を負に制御する UCP2 が過剰発現していることが判明した。その際、食事制限は糖尿病病態を改善し、UCP2 の過剰発現も正常化した。

さらに、糖尿病病態が鉄代謝異常による鉄沈着とその結果起こる酸化ストレスが病態の進展に関わっていることを明らかにし、除鉄療法が糖尿病治療に有効であることを明らかとした。これより、現在、慢性C型肝炎治療で行われている瀉血治療が糖尿病にも応用されることで、特に後進国での有効な治療法として期待できることが示唆された。また、抗酸化物質も有効であり、特にニンニクの熟成成分であるS-アリルシステインの糖代謝および脂質代謝に関する機序を解明した。

研究成果の概要（英文）：It was found that the enhancement of oxidative stress by mitochondrial dysfunction and over-expression of UCP2 that negatively regulates reactive oxygen species (ROS) from mitochondria in diabetes mellitus. Calorie restrictions improved the diabetic complications.

Furthermore, we found that iron deposition due to abnormal iron metabolism in diabetic tissues. It has been clear that the removal of iron therapy is effective in the treatment of diabetes. Thus, phlebotomy treatments currently being conducted in chronic hepatitis C treatment can be expected as an effective treatment as an application to diabetes, in developing countries, particularly. In addition, antioxidants are also effective. S-allyl cysteine that is an antioxidant component of the aged garlic could improve diabetic condition by controlling the mechanisms related to lipid metabolism and glucose metabolism.

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	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：生活習慣病、ミトコンドリア機能、低鉄、抗酸化物質、食事制限、UCP2

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病患者は、2025年には全世界で3億人を超えと言われ、その遺伝子背景は急激に変化しないので、生活習慣、インスリン抵抗性などが関わって発症する患者が増えていると思われる。また、その増加はWHOの報告ではインドや中国など医療体制が整備されていない地域が多く、糖尿病は失明、腎不全、足切断の原因となっている。よって、生活習慣改善によって予防効果が期待され、健康寿命の延長と糖尿病による虚血性心疾患および脳血管障害など様々なリスクファクターを減少しようと考えられる。これまで、糖尿病は高血糖によるさまざまなシグナル伝達異常を来し、活性酸素(ROS)を介する酸化ストレス亢進状態であることが広く受け入れられているが、その分子機構については明確になっていない。このような酸化ストレスの背景分子候補として、肥満や糖尿病に関係しているミトコンドリア内膜に存在する脱共役タンパク2 (Uncoupling protein 2; UCP2)に着目した。UCP2は膵β細胞におけるインスリン分泌を抑制するものとして報告(Polonsky, K.S. et al.: Cell, 2001)されたが、他の臓器細胞にも発現して多機能である可能性が示唆されている。その中でも重要な機能の一つにミトコンドリアからの活性酸素(ROS)の生成を負に制御するタンパク(Negre-Salvayre, A. et al.: FASEB J, 1997)としての役割がある。近年、UCP2は非常に注目され、膵臓や脂肪細胞のUCP2とアディポサイトカインの遺伝子発現の関連性など新たな機能が報告されつつあるが、糖尿病モデル動物や糖尿病患者における心血管系のUCP2動態については全く不明であり、本タンパクの動態を明確にし、制御法を見出すことは、虚血性心疾患や脳血管障害などの糖尿病リスク因子の回避のみならず種々のミトコンドリア病における新たな治療戦略になる画期的な研究であると考えた。さらに、ストレス応答によるUCP2正常化発現に導く機能を持つ薬剤や食品成分または制限する成分を検索することにより、普段の(食)生活の中でそれらを取り入れることにより積極的にメタボリックシンドロームを改善し、二次的合併症リスクも制御できるのではないかと考え、ひいては経済効果も期待できるものと思われる。

(2) ヘモクロマトーシス(鉄沈着)と糖尿病が密接に関係している(Fernandez-Real JM et al.: Diabetes 51, 2002)

よって、鉄制限食が糖尿病治療とUCP2制御に関連する可能性も示唆されるが、そのような報告はまだない。鉄制限の有効性が明確になれば、特に、糖尿病人口が医療後進国で増加していることを鑑みると現在C型肝炎の治

療に除鉄療法や鉄制限食が有効であるのと同様に治療に用いることが可能であり、高度な医療技術がなくとも簡単に安価な治療法となることはまちがいない。

2. 研究の目的

近年、糖尿病患者が激増しその対策は急務である。糖尿病は酸化ストレス亢進による肝、膵、心血管系など様々な臓器のミトコンドリア機能障害が起こっている。このため、糖尿病病態のいくつかの組織では生成した活性酸素(ROS)を負に制御する機能を持ち、ミトコンドリア内膜に存在する脱共役タンパク2 (Uncoupling protein 2; UCP2)が強発現しているが、炎症や手術などの二次的なストレスがかかってもストレス応答性のUCP2の発現が起こらないためにさらなるミトコンドリア機能不全になることを我々は見出している。そこで、食品成分や食事成分制限によるUCP2発現の正常化を検討し、糖尿病を基礎疾患に持つ人のストレス応答性のUCP2発現誘導制御により、糖尿病およびその合併症リスクファクターを予防する解決法の提示を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 自然発症糖尿病ラット(OLETFラット)における心血管系酸化ストレスとUCP2の関連
2型糖尿病における心血管系のUCP2の変動については我々の報告がはじめてである(Free Radic Res 2008;42:261)。この報告を基盤にさらに解析した。OLETFラット(大塚製薬供与)およびその対照であるLETOラットを飼育し、糖尿病進展に伴う血液生化学的パラメーターの経時変化(HbA1c, glucose, 中性脂肪, 遊離脂肪酸, コレステロール, アルブミンなど)および心臓, 大動脈, (腎臓, 肝臓)臓器重量や動脈硬化評価のための組織学的検索および各種免疫染色, 酸化ストレスの指標として脂質過酸化修飾タンパクや活性酸素関連酵素(SOD, Catalase, GPxなど)およびNO関連酵素(eNOSなど)とその代謝物質(nitrotyrosine), グルタチオンなどの抗酸化物質の量を解析。OLETFラットは25週齢以降で発症するのでその後上記パラメータをチェックし、治療実験は29週令以降で行った。今回の目的である心血管系UCP2量はウェスタンブロット法により定量し、ミトコンドリア量はチトクロームオキシダーゼIIの量で評価した。

ミトコンドリアからのROS産生は凍結切片におけるMitoTrackerによるin situ detection法および単離心ミトコンドリア, 大動脈片による化学発光法により解析。その他, 変化のあったタンパクおよびreal time RT-PCR法による遺伝子発現の状況も検討。

(2) OLETF ラットにおける鉄制限食および瀉血療法による糖尿病治療効果の検討

OLETF ラット 1 5 週齢より低鉄食または 2 8 週齢から週に 1 回 4 ml 瀉血する治療を行い、4 2 週齢で犠牲死させ糖尿病の改善作用について検討する。検討項目については(1)に準ずる。

(3) OLETF ラットにおける抗酸化物質による UCP2 量の変化および治療効果の検討。

OLETF ラットは 25 週を過ぎてほぼ 100% 糖尿病が発症するので発症後 29 週齢から 3 ヶ月抗酸化物質の投与を行い糖尿病が抑制されるかどうかを検討。標準抗酸化物質としてビタミン E 添加食(0.05%混餌飼料)、対照食および SAC 添加食(0.045%)の 4 群について血液、心臓、血管、肝臓を採取し、血糖値、UCP2 量および活性酸素関連酵素など(1)の項目について解析し、ビタミン E および SAC の糖尿病病態改善効果を検討した。検討項目は同じとする。SAC は他の病態モデルでも我々が効果をj確認して特許申請しているものである(公開番号 P2007-7716)。変化のあったタンパクから仮定できるシグナル伝達系に関して ABI-7700 を用いて real time RT-PCR 法(例えば脂肪酸代謝系にかかわる PPAR 遺伝子群など)を行い遺伝子発現の状況も検討。

4. 研究成果

(1) 糖尿病における心血管系 UCP2 発現と ROS 産生

糖尿病病態ではミトコンドリア由来 ROS 生成は加齢とともに増加し、いずれの週齢の心血管においても OLETF 群では LETO 群より著明に増強していた。OLETF 群は LETO 群に比し心および大動脈中の UCP2 が多く発現していた。大動脈の eNOS 発現は OLETF 群で LETO 群の 2 倍であったが、リン酸化 VASP は 1/4 であり明らかに NO/cGMP シグナルの機能不全が見られた。心組織内還元型チオール量には有意な差がなかった。脂質過酸化修飾タンパクおよびニトロチロシンは OLETF 群で有意に高かった。以上の知見より、糖尿病ラットにおける UCP2 の発現増加はミトコンドリアからの酸化ストレスを負に制御するための適応機構ではないかと考えられた。しかしながら、高血糖病態は生体制御を超越した酸化ストレスおよびニトロ化ストレスが加わった病態と考えられ、本病態予防が重要な課題である。食事制限はこの糖尿病病態を改善し、UCP2 の過剰発現も改善した。

(2) 鉄制限食による病態改善作用

糖尿病病態は肝、腎、膵などに鉄が沈着し、フェリチンも高値であった。体重および摂食量は OLETF ラット、対照の LETO ラットそれぞれ

において有意な変化はなかった。低鉄食群および瀉血群の血漿フェリチン濃度は有意に低下した。肝、腎、膵などへの組織内鉄沈着は鉄制限の両群で低下していた。OLETF ラットにおいて血糖値および HbA1c は週齢とともに増加傾向にあるが鉄制限群はそれらを有意に低下させた。その推移と並行して血漿および膵のインスリン量や線維化なども正常化した。低鉄食群では中性脂肪、LDL、PAI-1 なども低下したが、瀉血だけではこれらを改善しなかった。血漿、肝、膵の脂質過酸化物質は OLETF ラットで高値であり、鉄制限の両群ではその上昇を抑制した。鉄代謝異常によるとその結果起こる酸化ストレスが病態の進展に関わっていることを明らかにし、除鉄療法が糖尿病治療に有効であることを明らかとした。これより、現在、慢性 C 型肝炎治療で行われている瀉血治療が糖尿病にも応用されることで、特に後進国での有効な治療法として期待できることが示唆された。

(3) 抗酸化物質による糖尿病病態改善作用

① α トコフェロール(VE)

VE を 0.5 g/kg 混餌飼料動脈硬化および糖尿病進展の指標である血中 plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 量を有意に低下させた。さらに、本ラットの心臓、腎臓、大動脈で O_2^- の in situ detection を行ったところ、ミトコンドリア由来の活性酸素生成が亢進し、VE はそれを低下させることが判明した。大動脈の eNOS 発現は OLETF 群で LETO 群の 2 倍であったが、リン酸化 vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) は 1/3 であり明らかに NO/cGMP シグナルの機能不全が見られた。VE はさらに OLETF の eNOS 誘導を増強し、VASP のリン酸化も改善、心血管系のグルコーストランスポーター 4 (GLUT4) の減少も抑制した。このことは、VE によるラジカル産生抑制と糖代謝の改善などに有効であることが示唆された。

② ニンニクの熟成成分である SAC の糖代謝および脂質代謝に関する機序について

SAC 投与は、摂食量および体重の推移に影響を与えなかった。糖尿病群の血糖値および HbA1c は週齢とともに上昇したが、SAC 群は投与一ヶ月後より、対照群と同程度まで低下した。糖尿病群は、血漿中の中性脂肪、LDL、PAI-1 が上昇するが、SAC 群では、この上昇が有意に抑制された。41 週齢の糖尿病の膵では、TGF- β 1 が増加、線維化が進行し、膵 β 細胞が減少していたが、SAC 群では TGF- β 1、線維化は抑制され、 β 細胞も有意に多かった。肝の PPAR- α 、PPAR- γ 、PDK4 の mRNA をリアルタイム qRT-PCR で検討したところ、SAC 群は、PPAR- α と PPAR- γ の agonist 効果の正常化および PDK4 上昇の抑制により中性脂肪の減少と TCA サイクルの正常化がおこることが示唆された。また、UCP2 の発現も正常化したことより、過剰な ROS

産生の是正に寄与していると考えられた。PPAR- α /PPAR- γ の dual agonist が抗糖尿病薬、糖尿病合併症の治療に期待されているが、SAC はこれらの条件を満たし、且つ、アミノ酸と同程度の安全性が確認されているため、糖尿病の予防および治療薬として有望である。

(4) 得られた成果と展望

本研究において、糖尿病は酸化ストレス病態であり、抗酸化物質 または鉄を制限することで治療効果が得られることが判明した。これより、今後ますます加速すると予想される糖尿病人口増加に対する有効な治療法となり得る可能性が示唆された。

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 6 件) すべて査読有り

- ① Takemura S, Minamiyama Y, Kodai S, Shinkawa H, Tsukioka T, Okada S, Azuma H, Kubo S. S-allyl cysteine improves nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats via regulation of hepatic lipogenesis and glucose metabolism. *J. Clin. Biol. Nutr.* (in press)
- ② Indo HP, Nakanishi I, Ohkubo K, Hsiu-Chuan Yen, Nyui M, Manda S, Matsumoto K, Fukuhara K, Anzai K, Ikota N, Matsui H, Minamiyama Y, Nakajima A, Ichikawa H, Fukuzumi S, Ozawa T, Mukai C, and Majima HJ. Comparison of in vivo and in vitro antioxidative parameters for eleven food factors. *The Royal Society of Chemistry*, 3:4535–4538 (2013)
- ③ Harusato A, Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, Mizushima K, Hirai Y, Yamada S, Tuji T, Yoriki H, Horie R, Inoue K, Fukumoto K, Handa O, Ishikawa T, Kokura S, Minamiyama Y, Ichikawa H, Muto A, Igarashi K, Yoshikawa T. Suppression of indomethacin-induced apoptosis in the small intestine due to Bach1 deficiency. *Free Radic Res.* 45(6):717-27 (2011)
- ④ Minamiyama Y, Takemura S, Kodai S, Shinkawa H, Tsukioka T, Naito Y, Ichikawa H, Yoshikawa T, Okada S. Iron restriction improves type II diabetes mellitus of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats via inhibition of endogenously reactive oxygen species and the regulation of pancreas peroxisome proliferator-activated receptor-delta (PPAR-delta) and hypoxia inducible factor (HIF)-1alpha. *Am J Physiol* 298(6):E1140-9 (2010)
- ⑤ Nakahira A, Minamiyama Y, Takemura S, Hirai H, Sasaki Y, Okada S, Funae Y, Suehiro S. Coadministration of carvedilol attenuates nitrate tolerance by preventing cytochrome p450 depletion. *Circ J.* Aug;74(8):1711-7

(2010)

- ⑥ Minamiyama Y, Ichikawa H, Takemura S, Kusunoki H, Naito Y, Yoshikawa T. Generation of reactive oxygen species in sperms of rats as an earlier marker for evaluating the toxicity of endocrine-disrupting chemicals. *Free Radic Res.* 44(12):1398-406 (2010)

[学会発表] (計 15 件) 国際学会のみ

- ① Minamiyama Y, Takemura S, Taketani S, Naito Y, Ichikawa H, Takagi T, Okada S, and Yoshikawa T. Effects of Iron Restriction on Hepatic Mitochondrial Iron Metabolism and Oxidative Stress in Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) Rats *Digestive Disease Week 2013* 2013/5/18-22 (Orland, FL)
- ② Takemura S, Minamiyama Y, Kodai S, Shinkawa H, Kubo S. Attenuation of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in type 2 diabetes Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats via regulation of hepatic lipogenesis and glucose metabolism by administration of S-allyl cysteine *Digestive Disease Week 2013* 2013/5/18-22 (Orland, FL)
- ③ Ichikawa H, Minamiyama Y, Takagi T, Handa O, Naito Y, Yoshikawa T. Generation of Reactive Oxygen Species from the Rat Sperm Mitochondria is an Excellent Marker for the Biological Toxicity of Endocrine-Disrupting Chemicals *16th Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research (International SFRR 2012)* 2012/9/6-9(London, UK)
- ④ Minamiyama Y, Takemura S, Taketani S, Naito Y, Ichikawa H, Misumi K, Okada S, and Yoshikawa T. Iron Metabolism of Hepatic Mitochondria and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) Rats (Effect of Iron Depletion) *16th Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research (International SFRR 2012)* 2012/9/6-9(London, UK)
- ⑤ Minamiyama Y, Takemura S, Ichikawa H, Okada S, Naito Y and Yoshikawa T. Effects of alpha-tocopherol and gamma-tocopherol on diabetic complications in type II diabetic rats. *International Conference on Food Factors 2011* 2011/11/20-23 (Taipei, Taiwan)
- ⑥ Ichikawa H, Minamiyama Y. The role of histidine on wound healing using cultured rat intestinal epithelial. *International Conference on Food Factors 2011* 2011/11/20-23 (Taipei, Taiwan)

- ⑦ Minamiyama Y, Takemura S, Ichikawa H, Okada S, and Yoshikawa T. Calorie restriction improves diabetic complications via reduction of mitochondrial reactive oxygen species in Type II diabetic rats. *4th INTERNATIONAL SYMPOSIUM NUTRITION, OXYGEN BIOLOGY, AND MEDICINE* 2011/6/15-17 (Paris, France)
- ⑧ Hori K, Ichikawa H, Takagi T, Minamiyama Y, Nakamura M, Doi A, Kawabata Y, Kaneda T, Uchiyama K, Naito Y, Yoshikawa T. The role of histidine on wound healing using cultured rat intestinal epithelial cells. *5th SFRR-ASIA 8th ASMRM11th J-mit* 2011/8/1-9/4 (Kagoshima, Japan)
- ⑨ Matsuo S, Ichikawa H, Minamiyama Y, Takagi T, Fuchiue R, Emoto A, Suetsugu M, Uchiyama K, Naito Y, Yoshikawa T. The histidine affects delayed wound healing induced by indomethacin using cultured rat epithelial cells. *5th SFRR-ASIA 8th ASMRM11th J-mit* 2011/8/1-9/4 (Kagoshima, Japan)
- ⑩ Asai H, Ichikawa H, Minamiyama Y, Takagi T, Wada A, Ozaki Y, Okazaki K, Minami C, Handa O, Naito Y, Yoshikawa T. The effect of Kampo Medicine “Dai-kenchu-to” on wound healing of rat intestinal epithelial cells. *5th SFRR-ASIA 8th ASMRM11th J-mit* 2011/8/1-9/4 (Kagoshima, Japan)
- ⑪ Yamamoto R, Minamiyama Y, Ichikawa H, Takagi T, Ishii A, Sato Y, Miyanishi E, Yasui M, Handa O, Naito Y, Yoshikawa T. Sperm dysfunction from aging is involved in the oxidative stress. *5th SFRR-ASIA 8th ASMRM11th J-mit* 2011/8/1-9/4 (Kagoshima, Japan)
- ⑫ Miyanishi E, Minamiyama Y, Ichikawa H, Takagi T, Ishii A, Handa O, Naito Y, Yoshikawa T. Generation of reactive oxygen species from the sperm mitochondria of rats is an excellent marker for the biological toxicity of endocrine-disrupting chemicals. *5th SFRR-ASIA 8th ASMRM11th J-mit* 2011/8/1-9/4 (Kagoshima, Japan)
- ⑬ Handa O, Naito Y, Fukui A, Qin Y, Uehara Y, Tsuji T, Yoriki H, Horie R, Katada K, Kamada K, Uchiyama K, Ishikawa T, Takagi T, Minamiyama Y, Konishi H, Yagi N, Kokura S, Ichikawa H, Yoshikawa T. Protective effect of polaprezinc on acetylsalicylic acid-induced apoptosis of rat intestinal epithelial cells - involvement of heat shock protein 70 and reactive oxygen species. *5th SFRR-ASIA 8th ASMRM11th J-mit* 2011/8/1-9/4 (Kagoshima, Japan)
- ⑭ Minamiyama Y, Ichikawa H, Takemura S, Kawagishi T, Wakahara A, Minami C, Yasui M, Yamamoto R, Naito Y, Yoshikawa T. Effects of aging on sperm function and oxidative stress. *15th Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research (International SFRR 2010)* 2010/11/17-21 (Orland, FL)
- ⑮ Minamiyama Y, Ichikawa H, Takemura S, Naito Y, Yoshikawa T. Generation of reactive oxygen species from the sperm mitochondria of rats is an excellent marker for the biological toxicity of endocrine-disrupting chemicals. *7th conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM) and 10th conference of Japanese Society for Mitochondrial Research and Medicine (J-mit)* 2010/12/16-18 (Fukuoka, Japan)

〔図書〕 (計 1 件)

- 岡田茂, 南山幸子, マイクロ出版, 酸化ストレスとAOB 第2版, (2011) 105 頁

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南山 幸子 (MINAMIYAMA YUKIKO)
 京都府立大学・生命環境科学研究科・教授
 研究者番号：00362989

(2) 研究分担者

市川 寛 (ICHIKAWA HIROSHI)
 同志社大学・生命医科学部・教授
 研究者番号：60336732

研究分担者

竹村 茂一 (TAKEMURA SHIGEKAZU)
 大阪市立大学・医学研究科・講師
 研究者番号：00322363

