

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18700606  
 研究課題名 (和文) 糖尿病由来の感染症や合併症を予防する食品因子の探索と作用機序の解明  
 研究課題名 (英文) Functional analyses of neutrophil-like differentiated cell lines under a hyperglycemic condition.  
 研究代表者  
 伊藤 友子 (大矢 友子) (ITO TOMOKO, OYA TOMOKO)  
 京都府立医科大学・医学部・准教授 (寄附講座)  
 研究者番号：80329648

研究成果の概要：ヒト急性骨髄性白血病細胞株由来の分化誘導後の好中球様細胞において高血糖状態によって活性酸素の過剰産生や貪食能の異常が認められた。糖尿病など高血糖によるストレス状態下での活性酸素産生能や殺菌作用の異常亢進は、傷害性因子が標的分子だけでなく周辺の組織へ傷害を生じ、重要臓器の機能障害や炎症性疾患を惹起する可能性が考えられた。また、各種茶粗抽出物や抗酸化物質が過剰に活性化された好中球様細胞に対して正常化効果を発揮し、炎症性疾患の防御に寄与するものと期待された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,900,000	0	1,900,000
2007 年度	900,000	0	900,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	210,000	3,710,000

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：糖尿病、感染症、活性酸素、殺菌、好中球、スーパーオキシド、貪食、抗酸化物質

## 1. 研究開始当初の背景

厚生労働省「平成 14 年糖尿病実態調査」によると、糖尿病が強く疑われる人は約 740 万人、糖尿病の可能性を否定できない人を合わせると約 1,620 万人、つまり成人の 6 人に 1 人は糖尿病かその予備軍である。5 年間で約 250 万人増加した。受診患者のうち合併症(血管障害)に罹っている割合はのべ 67%以上を占め、合併症への進行はもはや命に関わる。現時点では糖尿病の完治は殆ど望めない

されており、合併症の予防が不可欠となる。従来の研究では糖尿病患者が感染症に罹りやすい原因として免疫能の低下、つまり高血糖持続による好中球の機能不全が考えられてきた。しかし、我々の研究から機能不全よりもむしろ活性の異常亢進による周辺細胞への毒性が主な原因であると考えられた。

## 2. 研究の目的

独自に開発した合併症発症に関与するマ

カーを指標としてこれまで多くの機能性を見出した食品成分中より糖尿病由来の感染症発症を防御する因子を探索し、さらにその因子の作用機序を明らかとする。

### 3. 研究の方法

ヒト好中球のモデル系としてオールトランスレチノイン酸 (ATRA) や顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) でヒト急性骨髄性白血病細胞株 3 種、HL-60、NB-4、THP-1 を分化誘導した好中球様細胞を用いて、簡便なスクリーニング評価系とメカニズム解析のための方法を確立した。分化誘導状態を蛍光標識 CD11b, CD14, CD15 抗体を用いて FACS により観察した。好中球の働きとして、生体異物の侵入など刺激によって活性化された際の接着性や貪食能の亢進、タンパク質分解酵素の放出、活性酸素の産生などが挙げられる。そこで、高濃度グルコース (35 mM) 及び低濃度 MG (10  $\mu$ M) それぞれの暴露により活性酸素産生能、ミエロペルオキシダーゼ活性、細胞内活性酸素量、還元型グルタチオン量、生細胞数を検討した。比較対照として等量のマンニトール存在下での培養を行った。また、健康人の血糖値を考慮してグルコースを含まない培地に 5.5 mM グルコースを添加した条件下での培養を行った。生存率はトリパンブルー染色法により、凝集性・空胞形成・脆弱性については Diff-Quik (Dade Behring Limited, Tokyo, Japan) 染色後に顕微鏡観察により求めた。貪食能は酵母の取り込み率で求めた。PMA 刺激によるスーパーオキシド産生能は NBT 法で測定した。さらに、これらの影響に対する食品成分の保護効果を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 研究の主な成果

好中球様細胞に分化誘導した 3 種類の細胞 (dHL-60, dTHP-1, dNB-4) を高血糖モデル系で培養し、それぞれの細胞の機能変化を検討した。好中球様細胞の高濃度グルコース培養は、PMA 刺激による活性酸素産生能の亢進、ミエロペルオキシダーゼ酵素活性の増大、アポトーシスの遅延を誘導した。MG で細胞を処理すると PMA 刺激による活性酸素産生能が亢進した。また、全細胞数が減少した。さらに好中球の殺菌作用に重要な役割を果たすミエロペルオキシダーゼの活性が MG 処理によって増大した。エロペルオキシダーゼの活性化に伴い生成する次亜塩素酸は特異性が高くないため、周囲の組織や細胞を攻撃する。高濃度グルコース存在下で培養した好中球様分化誘導細胞において、PMA 刺激が trigger となり活性酸素産生の機能が異常亢進した。活性酸素は PMA 刺激が引き金となり産生されたことから、高濃度グルコースは直接的な活性

化刺激因子 (trigger) ではなく、好中球様細胞の刺激に対する感受性の増大 (priming) 効果を有するものと推察された。このことから、高濃度グルコース培養が直接の活性化刺激因子ではなく刺激に対して細胞を過剰反応しやすいストレス状態に導く可能性が示唆された。また、高濃度グルコース培養は標的分子に対する貪食能を低下させた。これまでに得られた結果と合わせ、高血糖によるストレス状態下での活性酸素産生能や殺菌作用の異常亢進は、傷害性因子が標的分子だけでなく周辺の組織へ傷害を生じ、重要臓器の機能障害や炎症性疾患を惹起する可能性が考えられた。

また、高血糖モデル系で培養した好中球様細胞に各種茶粗抽出物や茶成分、 $\alpha$ -リポ酸等を 30 分間処理し、NBT 法を利用して活性酸素産生亢進作用に対する影響を検討した。その結果、緑茶、ウーロン茶、アッサム茶、プアル茶の抽出物 (100  $\mu$ g/ml) および緑茶成分の EGCG, EGC, ECG, EC (100  $\mu$ g/ml) の 4 種のカテキン類を添加した場合、高濃度グルコース存在下で培養した細胞の PMA 刺激後のスーパーオキシド産生の亢進に対して抑制効果が認められた。また、 $\alpha$ -リポ酸を添加した場合にもほぼ同様な抑制効果が見られた。

#### (2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

各種茶粗抽出物や茶成分、 $\alpha$ -リポ酸等は、高濃度グルコースで培養した好中球様 HL-60 細胞の PMA 刺激による活性酸素過剰産生に対して抑制効果を示した。得られた結果より、各種茶粗抽出物や茶成分など植物成分や抗酸化物質が生体における多形核白血球 (好中球) の過剰な酸化ストレス状態を緩和する効果を発揮し、炎症性疾患の防御に寄与するものと期待される。

#### (3) 今後の展望

確立した系を指標に、未だ解明されていない個体レベルでの感染症予防の分子メカニズムの解析へも発展出来る。今後、重要臓器の対象として消化器に着目し、難治性消化管疾患やがん発症の原因となり得る活性酸素や高血糖の影響を検討する。

### 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] (7 件)

- ① Oya-Ito T, Naitou H, Masuda S, Kinai N, Ohashi N. Functional analyses of neutrophil-like differentiated cell lines under a hyperglycemic condition. *Molecular Nutrition and Food Research.* (2008) 52:360-369. 査読有

- ② Nagaraj RH, Biswas A, Miller A, Oya-Ito T, Bhat M. The other side of the Maillard reaction. *Ann NY Acad Sci.* (2008) 1126:107-112. 査読有
- ③ Oya-Ito T, Liu BF, Nagaraj RH. Effect of methylglyoxal modification and phosphorylation on the chaperone and anti-apoptotic properties of heat shock protein 27. *J Cell Biochem.* (2006) 99:279-291. 査読有
- ④ Biswas A, Miller A, Oya-Ito T, Santhoshkumar P, Bhat M, Nagaraj RH. Effect of site-directed mutagenesis of methylglyoxal-modifiable arginine residues on the structure and chaperone function of human alphaA-crystallin. *Biochemistry.* (2006) 45:4569-4577. 査読有
- ⑤ Puttaiah S, Zhang Y, Pilch HA, Pfahler C, Oya-Ito T, Sayre LM, Nagaraj RH. Detection of dideoxyosone intermediates of glycation using a monoclonal antibody: characterization of major epitope structures. *Arch Biochem Biophys.* (2006) 446:186-196. 査読有
- ⑥ 伊藤 友子 (大矢 友子)、感染症を含む糖尿病合併症のバイオマーカー探索およびバイオマーカーを指標とした合併症予防因子探索、静岡県立大学大学院生活健康科学研究科 21 世紀 COE プログラム「先導的健康長寿学術研究推進拠点」研究報告集(2006) p25 査読有
- ⑦ 伊藤 (大矢) 友子、内藤 博敬、増田 修一、大橋 典男、木苗 直秀、高血糖モデルにおける好中球様分化誘導細胞の機能解析、US フォーラム (静岡県立大学学術フォーラム V) (2006) p51 査読無
- [学会発表] (計 13 件)
- ① 大矢友子、内藤裕二、岡田ひとみ、濱野洋子、内山和彦、高木智久、半田 修、八木信明、古倉 聡、吉川敏一：Hsp27 タンパク質のメチルグリオキザールによる翻訳後修飾の解析とその細胞生物学的意義。第 18 回消化器とフリーラジカル研究会 2009. 3. 28. 京都
- ② Oya-Ito, T., Naito, Y., Takagi, T., Handa, O., Fujiwake, H., Yamada, M., Shima, K., Yoshikawa, T. Methylglyoxal Modification of Heat Shock Protein 27 in Intestinal Epithelium. 18th Japan Maillard Reaction Symposium. 2008. 11. 28. Kawasaki
- ③ 平田育大、内藤裕二、高木智久、大矢友子、岡田ひとみ、鈴木隆裕、水島かつら、赤桐里美、尾松達司、岡山哲也、足立聡子、半田 修、古倉 聡、市川 寛、吉川敏一。糖尿病における胃潰瘍治癒遅延に酸化修飾蛋白が関与する。消化管の炎症を考える会 2008. 10. 25. 東京
- ④ Oya-Ito, T., Naito, Y., Takagi, T., Handa, O., Fujiwake, H., Yamada, M., Shima, K., Yoshikawa, T. Proteomic Analysis of Acrolein Modification of Acetic Acid-induced Gastric Ulcer in Diabetic Mice. The International Symposium on Lipid Peroxidation 2008. 2008.10. 17. Karuizawa
- ⑤ Oya-Ito, T., Naito, Y., Takagi, T., Handa, O., Matsui, H., Yoshikawa, T. Identification of Hsp 27 as Methylglyoxal Target in Colon Mucosa of Ulcerative Colitis. 7th Annual World Congress Human Proteome Organisation (HUPO) 2008. 2008. 8. 17. Amsterdam
- ⑥ 大矢友子、内藤裕二、高木智久、半田修、松井裕史、吉川敏一：糖化反応生成物をマーカーとした消化器疾患のプロテオミクス解析。第 6 1 回日本酸化ストレス学会学術集会 2008. 6. 19. 京都
- ⑦ Oya-Ito, T., Naito, Y., Takagi, T., Handa, O., Matsui, H., Yoshikawa, T. Identification of heat shock protein 27 (hsp27) as methylglyoxal target in colon mucosa of ulcerative colitis. 17th Japan Maillard Meeting. 2007. 12. 1. Kobe
- ⑧ Oya-Ito T., Naitou, H., Ohashi, N., and Kinae, N. Effect of methylglyoxal to neutrophil-like differentiated human myeloid leukemia cell lines. 9th International Symposium on the Maillard Reaction. 2007. 9. 3. Munich
- ⑨ 大矢友子、内藤博敬、増田修一、大橋典男、半田 修、高木智久、内藤裕二、吉川敏一、木苗直秀：高濃度グルコース培養による好中球様分化誘導細胞の機能異常亢進作用と茶カテキン類を含む抗酸化物質による機能制御。第 4 回日本カテキン学会総会 2007. 8. 23. 静岡
- ⑩ 木苗直秀、大村聖子、大矢友子、田家亜由美、内藤博敬、増田修一、永井竜児、大橋典男：好中球様分化誘導 THP-1 の活性酸素産生に対する AGEs の影響。第 16 回日本メイラード反応研究会 2006. 11. 24. 東京
- ⑪ 大矢友子、内藤博敬、増田修一、大橋典男、木苗直秀：メチルグリオキザールによるヒト好中球様分化誘導細胞の機能変化。第 16 回日本メイラード反応研究会 2006. 11. 24. 東京

- ⑫ Oya-Ito, T., Naitou, H., Masuda, S., Ohashi, N., and Kinai, N. Analysis of functional changes of neutrophil-like differentiated cell lines and effect of tea extracts on cell abnormality using a hyperglycemia model. The Kadota Fund International Forum 2006, 2006. 11. 21. Inuyama
- ⑬ Oya-Ito, T., Naitou, H., Masuda, S., Kinai, N., and Ohashi, N. Functional changes of neutrophil-like differentiated human myeloid leukemia cell lines by carbonyl stress. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006. 6. 20. Kyoto

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 友子 (大矢 友子) (ITO TOMOKO, OYA TOMOKO)

京都府立医科大学・医学部・准教授 (寄附講座)

研究者番号 : 80329648