

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06970

研究課題名(和文) 2型糖尿病膵 細胞機能不全における脱ニトロソ化酵素の役割解明と新たな治療薬の探索

研究課題名(英文) Elucidation of the role of denitrosylation enzyme in type 2 diabetes pancreatic beta cell dysfunction and search for new therapeutic agents

研究代表者

谷岡 利裕 (Tanioka, Toshihiro)

昭和大学・薬学部・准教授

研究者番号：80360585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) の膵 細胞における新たな役割を解明する目的で、INS-1 832細胞のGSNOR過剰発現およびGSNOR KOマウスを用いて解析した。GSNOR過剰発現細胞では、一酸化窒素の産生を減少させることで抗炎症に作用することを見出した。また、糖尿病モデルマウスを用いた解析では、GSNOR KOマウスが血糖値を上昇させ、PDX-1の発現減少やアポトーシスの増強を介して糖尿病症状を悪化させる可能性が示唆された。また、医薬品として抗凝固薬のリバーロキサバンがGSNOR活性化を介して抗糖尿病作用を有している可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

わが国ではインスリン抵抗性は軽度であり、インスリン分泌低下を主体として2型糖尿病を発症することが多い。現在の糖尿病の薬物治療はインスリン注射やインスリン抵抗性改善薬などの治療薬が選択可能であるが、膵 細胞機能不全の進行を予防・治療する薬剤は存在しない。このようにわが国の2型糖尿病の原因治療のためには、膵 細胞機能不全を予防・治療する薬剤の開発が必要であり、今回の研究結果は、膵 細胞機能不全におけるGSNOR活性化の重要性を示唆するものであり、糖尿病治療の新たな候補分子になるのではないかと考えている。

研究成果の概要(英文)：S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) is an enzyme involved intracellular nitric oxide (NO) metabolism. In order to elucidate the novel role of GSNOR in pancreatic beta cells, we analyzed GSNOR overexpression in rat insulinoma cells and GSNOR KO mice. As the results, we found GSNOR overexpression cells have an anti-inflammatory effect by reducing a large amount of NO production. Using STZ-induced diabetic mouse model, we also found that blood glucose level in diabetic GSNOR KO mice was higher than diabetic WT mice. These mice exhibited increased apoptosis along with decreased expression of master regulator of pancreatic beta cells such as PDX-1. In addition, our study identified the anticoagulant rivaroxaban may have an antidiabetic effects through GSNOR activation in beta cells. Our results provide GSNOR might acts as a protective molecule in diabetic patients.

研究分野：細胞生化学

キーワード：GSNOR iNOS inflammation anticoagulant

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

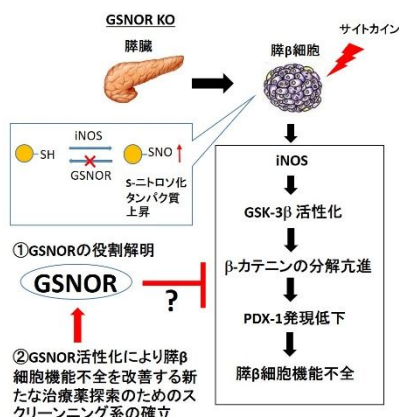
1. 研究開始当初の背景

現在、2型糖尿病患者数は生活習慣や社会環境の変化に伴って急速に増加し、医療費を増大させている重大疾患として位置づけられており、2型糖尿病の予防および治療は重要な国民的課題となっている。2型糖尿病は肝臓や筋肉などのインスリン抵抗性(インスリン作用が低下)に加え、β細胞機能不全により正常血糖値の維持に必要なインスリン分泌能低下により発症する。欧米と比して、わが国ではインスリン抵抗性は軽度であり、インスリン分泌低下を主体として2型糖尿病を発症することが多い。現在の糖尿病の薬物治療はインスリン注射以外にインスリン抵抗性改善薬やインクレチン製剤、SGLT2 阻害剤といった治療薬が選択可能であるが、膵β細胞機能不全の進行を予防・治療する薬剤は存在しない。このようにわが国の2型糖尿病の原因治療のためには、膵β細胞機能不全を予防・治療する薬剤の開発が必要である。

炎症反応等により生成した NO がシステインのチオール基を直接 S-ニトロソ化する翻訳後修飾が存在することが明らかとなり、この S-ニトロソ化が様々なタンパク質の機能を制御していると考えられている。一方で、GSNOR は細胞内 S-nitrosoglutathione (GSNO)を還元することにより NO を分解する酵素であり、その結果として S-ニトロソ化を消去することで生体防衛的に作用している分子である。実際に、GSNOR 心臓特異的過剰発現マウスにおいて LPS 投与による敗血症誘発心機能障害を改善することを明らかにされている。(Ships PY et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 2013)。また、iNOS による S-ニトロソ化修飾が膵β細胞機能不全に至る重要な因子であることは明らかになりつつある一方で、GSNOR に関しては未踏領域であり、GSNOR が S-ニトロソ化タンパク質を脱ニトロソ化することにより膵β細胞機能不全に至る過程を防ぐ重要な分子である可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

現在、膵β細胞機能不全において関与する分子群が報告されており(Liu Y et al. *Diabetologia.*, 2010)、インスリン受容体基質(IRS)-2 やβ細胞の機能・分化・増殖に必須な転写因子である PDX-1(PDX-1; pancreatic and duodenal homeobox-1)の発現低下、グリコーゲン合成酵素キナーゼ(GSK-3β)の活性化が重要であると考えられている。これまで申請者は炎症性サイトカインである IL-1β を刺激した膵β細胞において iNOS の発現誘導を介して GSK-3βが活性化され、その結果としてプロテアソーム依存的に IRS-2 が分解され発現低下することを報告した。また、ヒト2型糖尿病患者の膵ランゲルハンス島で iNOS の発現が増加していること、さらに、「iNOS 発現上昇 GSK3β 活性化 βカテニン発現低下 PDX-1 発現減少」という iNOS を起点とした新しいメカニズムが膵β細胞機能不全を惹き起こす重要な経路であることを明らかにしてきた。しかしながら、膵β細胞機能不全における GSNOR の役割に関する研究報告はないことから「脱ニトロソ化制御による糖尿病治療」というこれまでと異なる視点から解明していくことを目的とした。



3. 研究の方法

(1) GSNOR 過剰発現細胞を用いた解析

GSNOR 過剰発現細胞の解析には、ラットインスリノーマ INS-1 832 細胞を用い、遺伝子導入はリポフェクション法により行った。細胞は炎症性刺激として 10 ng/mL IL-1 刺激することにより炎症を惹起させた。これらのサンプルに関して、ウエスタンブロット法あるいはリアルタイム PCR 法により各種解析を行った。

(2) GSNOR 活性測定法

GSNOR 活性測定は、200 μ M GSNOR を基質として用い、NADPH の NAD⁺ への変換を利用した系を用い、反応後の 340nm の吸光度を測定することにより算出した。

(3) GSNORKO マウス由来膵 細胞の炎症における役割解明

野生型マウスと GSNOR 遺伝子欠損マウス(それぞれ 8 週令、)の膵臓はコラゲナーゼ溶液を用いた常法により単離した。単離した islet は 5 ng/ml IL-1 で刺激し上記(1)と同様に解析した。

(4) GSNOR KO マウス糖尿病モデルマウスにおける解析

野生型マウスと GSNOR 遺伝子欠損マウス(それぞれ 8 週令、)に Streptozotocin(STZ)を 40 mg/kg BW の濃度で腹腔内投与し、3,7,10,14,21 日後の血糖値を測定した。また、(3)と同様の操作で単離した islet のアポトーシスの程度は、Annexin V を用いた蛍光免疫染色法に手定量した。その他の解析は(1)に記載した方法により行った。

4. 研究成果

(1) 膵 細胞 INS-1 832 細胞を用いた解析

膵 細胞 INS-1 832 GSNOR 過剰発現細胞を用いて、膵 細胞における GSNOR の意義を解析した。GSNOR 過剰発現細胞を炎症性サイトカインである IL-1 刺激で炎症反応を惹起させた結果、コントロール細胞では IL-1 刺激 24 時間後に TNF- α 遺伝子発現が顕著に上昇した。一方で、GSNOR 過剰発現細胞においては TNF- α 遺伝子発現は顕著に抑制された。また、培養上清中の Nitrite 量はコントロール細胞において IL-1 刺激に反応して上昇したが、GSNOR 過剰発現細胞では、その産生が抑制された。さらに、膵 細胞の生命維持に重要なマスターレギュレーターとして知られる PDX-1(Pancreatic and duodenal homeobox factor-1)の発現は、コントロール細胞では炎症刺激による発現減少したが、GSNOR 過剰発現細胞においては減少の程度が抑えられた。

INS-1 832 細胞を用いた GSNOR 活性剤の分子スクリーニングにおいて、抗凝固薬であるリバーロキサバンが GSNOR 活性を上昇させることを見出した。リバーロキサバンは血管内の凝固系の Factor Xa 因子に作用する医薬品である。今回、Factor Xa/glucose 処理し、病的な状況を模した反応において、リバーロキサバンを介した GSNOR 活性制御が抗糖尿病になるのではないかと考えて解析を行った。Factor Xa/glucose 処理した INS-1 細胞では、インスリン遺伝子の顕著な低下が認められたが、リバーロキサバン前処理はこの減少を抑えた。また、リバーロキサバンは炎症性分子である NF- κ B や MAP キナーゼのリン酸化による活性化も抑制した。このことは、糖尿病患者が手術などにより出血した場合には、リバーロキサバンなどの DOAC 使用を推奨する根拠になると同時に、膵 GSNOR 活性化が糖尿病治療の標的となる可能性を示唆している。

(2) GSNOR KO マウス用いた解析

野生型マウスと GSNOR 遺伝子欠損マウス(それぞれ 8 週令、)から islet を単離し、炎症反応に及ぼす影響を解析した。その結果、WT 由来の islet では IL-1 刺激による PDX-1 の発現の低下が認められ、GSNORKO マウス由来の islet では PDX-1 発現減少が WT よりも顕著に増加し

た。これらの結果から、GSNORは膵細胞において炎症を抑制している可能性が示唆された。また、WTおよびGSNOR KOマウスのisletをNOドナーであるGSNORを200 μ Mで処理し、細胞のアポトーシスの程度を検討した。その結果、PDX-1発現減少に相関して、KOマウス由来isletのアポトーシスの程度は、WTに比べて顕著に亢進していた。

野生型マウスとGSNOR遺伝子欠損マウス(それぞれ8週令、)のそれぞれにSTZ誘発糖尿病モデルマウスの系で解析を行った。まず、血糖値の変動を解析した結果、STZ投与前の定常状態での血糖値はGSNORKOマウスの方が上昇する傾向が認められた。また、STZ投与後の血糖値はWTマウスと比べてGSNORKOマウスの方で顕著に上昇することが認められ、STZ投与後21日目の血糖値はおよそ2.5倍高い値を示した。また、STZ投与したGSNORKOマウスではWTマウスに比べてPDX-1発現減少が認められた。

以上の結果は、GSNORは膵細胞において心保護作用に働いていると考えられ、GSNORは糖尿病などの疾患において生体内で産生される多量のNOを除去することにより糖尿病作用改善効果を示す可能性を示唆している。また、抗凝固薬のリバーロキサバンがGSNOR活性化を介して抗糖尿病作用を示す可能性が考えられ、今後はこれらの知見を考慮した上でより詳細な検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maeda T, Tanioka T, Iwamoto S.	4. 巻 32
2. 論文標題 Regulatory Effect of IL-4 on Early Th17 Differentiation from Naive T Cells into Stem Cell Memory Th17 Precursors via Modulation of CD31 and CCR6 Expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Showa Univ J Med Sci.	6. 最初と最後の頁 135-145
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi R, Iwamoto S, Tanioka T, Maeda K.	4. 巻 in press
2. 論文標題 A profile of pro-inflammatory cytokine expression in human delta-1-induced monocyte-derived langerhans cell-like cells after stimulation with toll like receptor ligans	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Showa Univ J Med Sci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanioka T, Maeda K, Takahashi R, Iwamoto S.	4. 巻 in press
2. 論文標題 The AngIII/AT2R pathway enhances glucose uptake by improving GLUT1 expression in 3T3-L1 adipocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi Masayuki, Kasamatsu Shingo, Shinozaki Shohei, Yasuhara Shingo, Kaneki Masao	4. 巻 320
2. 論文標題 Myostatin deficiency not only prevents muscle wasting but also improves survival in septic mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism	6. 最初と最後の頁 E150 ~ E159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpendo.00161.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakazawa Harumasa, Ikeda Kazuhiro, Shinozaki Shohei, Yasuhara Shingo, Yu Yong Ming, Martyn J.A. Jeevendra, Tompkins Ronald G., Yoroza Tomoko, Inoue Satoshi, Kaneki Masao	4. 巻 9
2. 論文標題 Coenzyme Q10 protects against burn induced mitochondrial dysfunction and impaired insulin signaling in mouse skeletal muscle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 348 ~ 363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12580	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maeda Maeda, Tanioka Toshihiro, Iwamoto Sanju	4. 巻 32
2. 論文標題 Regulatory Effect of IL-4 on Early Th17 Differentiation from Naive T Cells into Stem Cell Memory Th17 Precursors via Modulation of CD31 and CCR6 Expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Showa Univ. J. Med. Sci.	6. 最初と最後の頁 135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 巖本三壽、前田耕平、高橋玲、谷岡利裕、渡辺秀晃、末木博彦
2. 発表標題 乾癬における病的なTh17サブセットの遺伝子発現の特異性
3. 学会等名 第35回日本乾癬学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kohei Maeda, Toshihiro Tanioka, Hirohiko Sueki, Hideaki Watanabe, Shinichi Hashimoto, Sanju Iwamoto.
2. 発表標題 Pathogenic MCAM+CD161- Th17 Subset Increased a CD8-T-Cell-Activator Membranous CD83 Expression in Psoriasis.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋 玲、巖本 三壽、谷岡 利裕、前田 耕平
2. 発表標題 単球由来ランゲルハンス細胞様樹状細胞の形質と機能解析
3. 学会等名 第140回日本薬学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toshihiro Tanioka
2. 発表標題 Role of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) on inflammation
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Iwamoto Sanju
2. 発表標題 Pathogenesis of Psoriasis with human Th17 and Tc17 Differentiation
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	篠崎 昇平 (SHINOZAKI SHOHEI) (40622626)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師 (12602)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	金木 正夫 (KANEKI MASAO) (10769615)	東京医科歯科大学・医歯（薬）総合研究科・非常勤講師 (12602)	
連携研究者	長谷場 健 (HASEBA TAKESHI) (50156329)	神奈川歯科大学・歯学部・特任教授 (32703)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関