

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24年6月15日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790535

研究課題名（和文）糖尿病マーカーとしての IL-18 の有用性評価と新規バイオマーカーの探索

研究課題名（英文） Role of IL-18 in diabetes mellitus.

研究代表者

江口 裕伸（EGUCHI HIRONOBU）

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：60351798

研究成果の概要（和文）：本研究では糖尿病における新規のバイオマーカーの探索を目的として、サイトカインと酸化ストレスとの関連性に着目して検討を行った。糖尿病で生じる活性酸素が、サイトカインであるインターフェロンβの発現を亢進させ、このインターフェロンβにより一酸化窒素合成酵素の遺伝子が活性化されて一酸化窒素の大量産生を導き、酸化ストレス状態を引き起こすことを明らかにできた。この機序は糖尿病においてみられる酸化ストレスにも関与しているものと考えられる。また酸化ストレスにより一部構造の変化した IL-18 が認められた。この構造変化した IL-18 がマーカーになる可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to investigate the relationship between oxidative stress and cytokines in diabetes mellitus and find the disease-specific marker. It was revealed that the reactive oxygen species (ROS), including hydrogen peroxide, nitric oxide and peroxynitrite, enhanced the nitric oxide production via the expression of interferon beta. This mechanism may be involved in the development of diabetes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床化学・糖尿病

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病は年々増加し、糖尿病予備群を含め約1,870万人が糖尿病に罹患していると言われている。糖尿病では早期発見および早期治療の開始が重要であり、発症機序の解明や早期診断法の開発は急務となっている。特に前糖尿病状態での早期診断が重要であり、

現在では早朝空腹時血糖値と糖化ヘモグロビンが診断の指標となっている。糖化ヘモグロビンも早朝空腹時血糖に左右されることから、これらの指標はどちらも空腹時血糖に主軸が置かれており、空腹時血糖によらない新たな診断法の開発はより正確な診断に有用であると考えられる。

(2) 糖尿病では活性酸素による酸化ストレス状態になる。糖尿病での酸化ストレスの一例としては、非酵素的にタンパク質が糖化される糖化反応が起こり、終末代謝産物 (AGE) が生じるが、この途中で生じる中間代謝物 (AGE 中間代謝産物) による酸化ストレスがあげられる。これまでの予備研究により活性酸素がサイトカインの発現に影響を与えていることを示唆するデータを得ていた。したがって、糖尿病でのサイトカインの働きには活性酸素が関与していることが考えられた。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、以下の 2 つに大別される。

①インターロイキン 18 (IL-18) をはじめとするサイトカインが糖尿病患者で増加していることなどから、サイトカインが糖尿病の発症に関与している可能性が高い。そこで糖尿病発症機序の解明のため、どのような因子がサイトカインを誘導するかを同定し、その機序を検討した。また、糖尿病では酸化ストレスが亢進し、組織障害を引き起こしていると考えられる。そこで、酸化ストレスとサイトカインとの関連も検討した。

②疫学的研究から血清中の IL-18 の増加と糖尿病性腎症の発症との相関が報告され、IL-18 は糖尿病の合併症の発症にも関与していることが示唆された。つまり、IL-18 の量が多いと合併症へ進展しやすい可能性がある。しかし、IL-18 を大量入手するのは困難であったため、本研究では酸化ストレスにおける IL-18 の機能変化について解析するためにリコンビナント IL-18 を合成し、酸化ストレスとの関連性を解析した。

(2) 本研究はサイトカインを主眼においたマーカーの検索であり、本研究成果は疾患特異的で食事による影響を受けにくく、かつ糖尿病性腎症などの合併症に進展する可能性を予知できるような、予後を予測できるマーカーの開発が期待された。足掛かりとして酸化ストレスとサイトカインに注目し、疾患特異的マーカーの確立に繋げたい。

3. 研究の方法

今回の課題では、主に培養細胞を用い、電気泳動法や PCR 法などの生化学的手法によって解析を行った。

(1) 糖尿病で見られる酸化ストレスによるサイトカイン発現と酸化ストレス状態の変化の解析

①培養細胞を用いて種々の活性酸素処理を行い、どのようなサイトカインが発現誘導されるかを検討した。また、活性酸素種としては、過酸化水素、一酸化窒素 (NO) などを用いた。

②発現されたサイトカインにより酸化ストレス状態がどのように変化するかを解析した。

③発現されたサイトカインのシグナル伝達経路をウエスタンブロッティング法などにより解析した。

(2) リコンビナント IL-18 の合成

①マウス IL-18 を大腸菌発現用ベクターにクローニングし、リコンビナント IL-18 を合成した。ベクターにはヒスチジンタグを付加し、ニッケルカラムに結合させ、イミダーゼールにより溶出して精製した。

②精製した IL-18 の活性は細胞からのインターフェロンの産生により評価した。

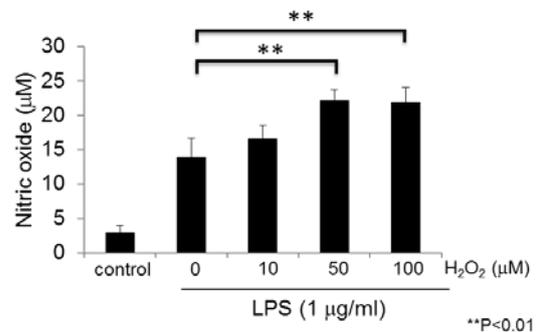
③活性酸素処理によるリコンビナント IL-18 の構造変化の解析を電気泳動法を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 酸化ストレスによるサイトカイン発現と酸化ストレス状態の変化の解析

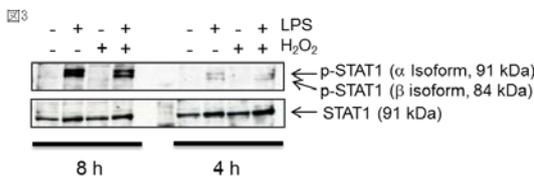
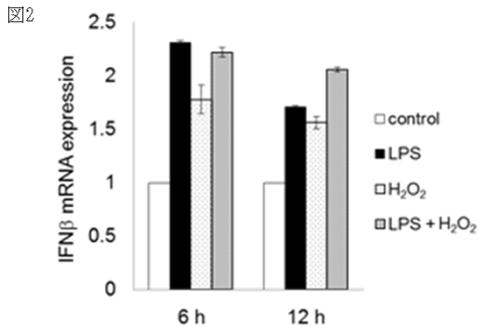
マクロファージ様の特徴を持つ培養細胞 BV-2 を用いて検討した。BV-2 をリポ多糖 (LPS) で処理すると NO が産生されるが、その産生作用は活性酸素である過酸化水素により増強された (図 1)。

図 1



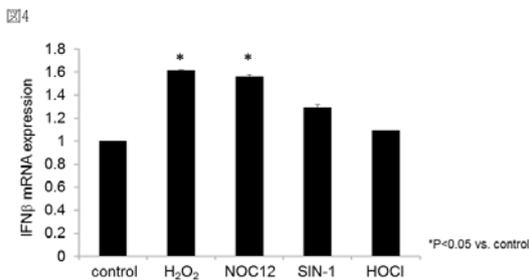
この増強作用の機序を検討したところ、図 2 に示すように過酸化水素によりサイトカインであるインターフェロン β の産生が増強

されたことによるものであることを明らかにした。しかし、過酸化水素単独では NO の産生は生じなかった。このシグナル伝達機序として、STAT-1 のリン酸化が過酸化水素のみではおこらないことを明らかにした(図 3)。



過酸化水素および NO はともに糖尿病で産生が増加している活性酸素であり、これら活性酸素によりサイトカインが誘導され、さらに誘導されたサイトカインが酸化ストレスを増強する機序を明らかにできた。この酸化ストレス状態が憎悪される機序は、糖尿病で認められる酸化ストレス状態に関与しているものであると考えられた。

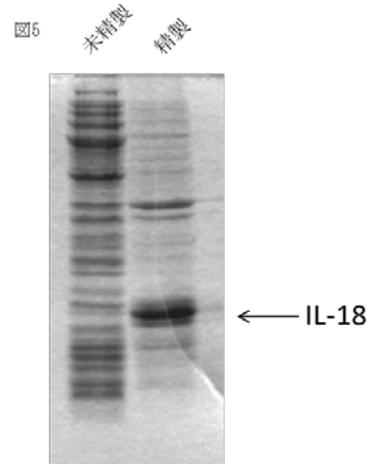
さらに他の活性酸素種でのサイトカインの発現を検討したところ、過酸化水素だけでなく NO (NOC12) やペルオキシ亜硝酸イオン (SIN-1) でも誘導されることを見出した(図 4)。これらの結果は糖尿病で見られる酸化ストレス状態におけるサイトカインの誘導機序を明らかにし、治療薬の開発などに結びつく解析結果と考えられた。



(2) リコンビナント IL-18 の合成および AGE 中間代謝物による IL-18 の構造変化の解析

マウス IL-18 は特異的プライマーを用いてク

ローニングした。当初は高コピー数のベクターを用いていたが、発現した IL-18 はほぼ全てインクルージョンボディと思われる不溶性画分に存在しており、活性を保持したまま精製するのは非常に困難であった。そこでベクターを低温誘導用のベクターに変更し、低温化で緩やかに発現誘導したところ、可溶性画分に発現させることができた(図 5)



発現させたリコンビナント IL-18 はインターフェロン γ を誘導したことから、活性を保持していることが認められた。

活性酸素で精製したリコンビナント IL-18 を処理すると、構造の一部が変化した IL-18 と考えられるタンパク質が認められた。今後、この構造を詳細に解析し、マーカーとなるか検討を重ねたい。

(3) まとめ

①本課題において過酸化水素、NO およびペルオキシ亜硝酸イオンがインターフェロン β を誘導することを明らかにし、さらに一酸化窒素合成酵素の発現誘導を介して NO の過剰産生を生じさせ、酸化ストレス状態を増悪することを明らかにし、論文として報告することができた。この機序は糖尿病においてみられる酸化ストレスにも関与しているものと考えられる。当初はこのインターフェロン β がマーカーになると考えて検討したが、このサイトカインは糖尿病での酸化ストレスの憎悪因子としての役割はあるが、糖尿病特異的なものではないため、疾患特異的なマーカーには不適と考えられた。

②糖尿病で産生される多くのサイトカインは非特異的であるが、IL-18 は感染症以外では著明な増加をしないことから疾患特異的なマーカーになることが期待できる。今回検討中ではあるが、酸化ストレスにより一部構造の変化した IL-18 が認められた。この構造変化した IL-18 がマーカーになる可能性が考

えられ、現在詳細な検討を行っている。

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1件)

- ① Hironobu Eguchi、Noriko Fujiwara、Haruhiko Sakiyama、Daisaku Yoshihara、Keiichiro Suzuki、Hydrogen peroxide enhances LPS-induced nitric oxide production via the expression of interferon beta in BV-2 microglial cells、Neuroscience letters、査読有、Vol.494、No.1、2011、pp.29-33、DOI: [10.1016/j.neulet.2011.02.047](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.02.047)

[学会発表] (計3件)

- ① Hironobu Eguchi、Accelerated production of nitric oxide by LPS and hydrogen peroxide in BV-2 microglial cells、5th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia (SFRR-Asia)、2011.9.3、Kagoshima
- ② 江口裕伸、過酸化水素はIFN- β の発現を介してLPSによるNO産生を増強する、第58回日本生化学会近畿支部例会、2011.5.21、大阪
- ③ 江口裕伸、過酸化水素はLPSによるNO産生を増強する、第83回日本生化学会学術集会、2010.12.8、神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江口 裕伸 (EGUCHI HIRONOBU)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：60351798