

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590160

研究課題名(和文) 糖尿病合併症におけるジヒドロピラジン誘発性遺伝子障害の関与とその機構の解析

研究課題名(英文) The involvement of dihydropyrazine-induced gene damage in diabetic complication

研究代表者

石田 卓巳 (ISHIDA, TAKUMI)

崇城大学・薬学部・准教授

研究者番号：10301342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ジヒドロピラジン類(DHPs)の生体影響を明らかにするため、HepG2細胞を用いて検討を行った。メチル化DHPを曝露した結果、HepG2細胞に細胞障害が惹起された。また、影響が強かった3-hydro-2,2,5,6-tetramethylpyrazine(DHP-3)曝露により酸化ストレス応答性タンパク質のmRNA量が顕著に増加することが明らかとなった。一方、糖尿病患者の血中では、健常者の血中に比べDHPの濃度が上昇していた。以上の結果から、DHP類は、生体内に普遍的に分布しており、酸化ストレスを介して影響を及ぼしている可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Dihydropyrazines (DHPs), formed by nonenzymatic glycation, are known to exert various effects in vitro and in vivo. In this study, we investigated the effects of DHP on human hepatoma HepG2 cells using 2,3-dihydro-5,6-dimethylpyrazine (DHP-1), 2,3-dihydro-2,5,6-trimethylpyrazine (DHP-2), and 3-hydro-2,2,5,6-tetramethylpyrazine (DHP-3) as model compounds. All of the tested compounds exerted cytotoxic activity against HepG2 cells, and significantly so at the highest concentration. DHP-3 was the most cytotoxic drug. Additionally, DHP-3 exposure showed the significant increase of heme oxygenase-1 and glutamate cysteine ligase catalytic subunit mRNA after exposure. The serum concentration of DHPs in diabetic patient showed significant increase compared with that in non-diabetic patient. Therefore, These results suggested that the Nrf2-ARE signal pathway activated by oxidative stress is in part involved in the effect of DHP on mammalian cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：環境系薬学

キーワード：ジヒドロピラジン 糖化反応 毒性 酸化ストレス 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

近年の世界的な都市化とライフスタイルの変化は、発展途上国においてすら劇的な生活環境の変化を生み出している。特に食生活に関して、高タンパク質・高脂肪食への移行が進んでおり、これを原因とした様々な疾病の拡大が危惧されている。血糖値が病的に上昇する糖尿病は、その発症機構により大きく2種類(1型糖尿病と2型糖尿病)に分類される。食生活などの環境因子が原因と考えられる2型糖尿病は、上に述べたライフスタイルの変化と相俟って、世界規模での患者数の増加を示している。糖尿病のほとんどは無症状、もしくはのどの渇きや尿排泄量の増加といった軽微な症状を呈する。このため、治療を施さないうまま長期間放置され、結果として慢性化する場合も多い。糖尿病の慢性化に伴い様々な合併症が引き起こされることは、広く認識されている。この合併症の発症機構に関する研究報告はこれまでもなされており、最近では酸化ストレスの関与などが予想されている(1,2)。しかしながら、糖尿病合併症の症状は複雑であり、その全貌の解明に至っておらず、有効な対処法も構築されていない。近年、その発症機構として、終末糖化産物(Advanced glycation endproducts, AGEs)と呼ばれる低分子化合物の関与が注目されている。AGEsは、グルコースなどの還元糖とアミノ基を有するタンパク質などが非酵素的反応(メイラード反応)によって縮合した化合物の総称であり、生体内に数十種類存在すると言われている。最近、その一部がアルツハイマー病などの神経変性疾患や悪性腫瘍の増殖、転移、浸潤などに関与している可能性が示された。このため、その生体影響の解明は、喫緊の課題となっている。

2. 研究の目的

我々はこれまで、AGEsの一つであるジヒドロピラジン類(dihydropyrazines, DHP類)が生体に及ぼす影響に注目し研究を行ってきた。DHP類は、グルコサミン2分子の脱水縮合反応によって生じるAGEsの一つである。我々の研究成果から、DHP類が、plasmid DNAに対してDNA鎖切断活性を有すること、さらに、この作用が、銅イオンの存在下において増強されることを明らかにした(3)。DHP類がDNA鎖切断活性を引き起こす機構については不明な点が多い。しかしながら、DHP類が銅イオンの存在下において酸化ストレスを発生し、さらにDHP類自身がcarbon-centered radicalとして他の生体成分に反応することが、我々の検討より示唆されている(4,5)。従って、DHP類による生体影響に、酸化ストレスが大きく関与していることが予想される。一方、DHP類は不安定な構造であるため、生体内における動態をモニタリングすることは困難である。しかしながら、DHP類の代謝物と予想されるピラジン類が、健康者の尿中から検出されており、かつ糖尿病患者の血中や尿中で増加することが明らかとなっている(6)。このように、DHP類は、生体内に普遍的に分布し、さらに生体に対し影響を及ぼす可能性が高いと考えられている。しかしながら、その詳細については不明な点が多い。そこで、我々は、DHP類の生体への影響を分子生物学的、および細胞生物学的手法により明らかにすることを目的として検討を行った。また、*In vivo*におけるDHP類発生の実証を得るため、DHP類の検出法の開発並びにその検証も合わせて行った。

3. 研究の方法

本研究では、代表的なDHP類としてメチル化DHP(DHP-1: 5,6-dimethyldihydropyrazine; DHP-2: 2,5,6-trimethyldi-

hydropyrazine; DHP-3: 2,2,5,6-tetra-methylidihydropyrazine)を使用した。これら DHP は、当研究室において山口らの方法に従い合成した(3)。ヒト肝ガン細胞である HepG2 細胞に DHP を曝露したのち、細胞障害性を Cell count kit WST-8 (Dojindo Lab., Kumamoto, Japan) を用いて観察した。また、細胞障害が引き起こされた際の細胞内酸化型/還元型グルタチオン含量を GSSG/GSH Quantification Kit (Dojindo Lab., Kumamoto, Japan) を用いて定量した。次に、DHP 曝露 HepG2 細胞より genome DNA を抽出したのち、8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)含量を HPLC を用いて定量した。さらに、DHP 曝露 HepG2 細胞において発現変動を示す遺伝子の検出を行うため、DHP-3 を曝露した HepG2 細胞より RNeasy Mini Kit (QIAGEN, GmbH, Hilden, Germany) を用いて RNA を抽出したのち、高感度 DNA チップを用いたマイクロアレイを行った。発現変動が顕著であった遺伝子に関しては、同様の方法で抽出した RNA から逆転写酵素(ReverTraAce[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover, Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan)を用いて cDNA を調製したのち、THUNDERBIRD[™] SYBR[®] qPCR Mix (Toyobo Co., Ltd.) および特異的 primer を用いて real-time PCR を行った(反応条件: 95 °C, 60 sec - (95 °C, 15 sec - 60 °C, 60 sec) x 45 [-actin] or 50 [others] cycles)。なお、特異的 primer は、以下のものを Life technologies に委託合成し使用した。

Homo sapiens -actin (BACT):

Forward :

5'-CCTGGCACCCAGCACAAT-3'

Reverse :

5'-GGGCCGGACTCGTCATACT-3'

Product size : 144 bp

Homo sapiens heme oxygenase-1 (HO-1):

Forward :

5'-TTCTCCGATGGGTCCTTACACT-3'

Reverse :

5'-GGCATAAAGCCCTACAGCAACT-3'

Product size : 62 bp

Homo sapiens glutamate cysteine ligase catalytic subunit (GCLC):

Forward :

5'-CTGTTGCAGGAAGGCATTGAT-3'

Reverse :

5'-TTCAAACAGTGTCACTGGGTCTCT-3'

Product size : 81 bp

4. 研究成果

HepG2 細胞に DHP-1, DHP-2 および DHP-3 を 24 時間曝露した結果、いずれも

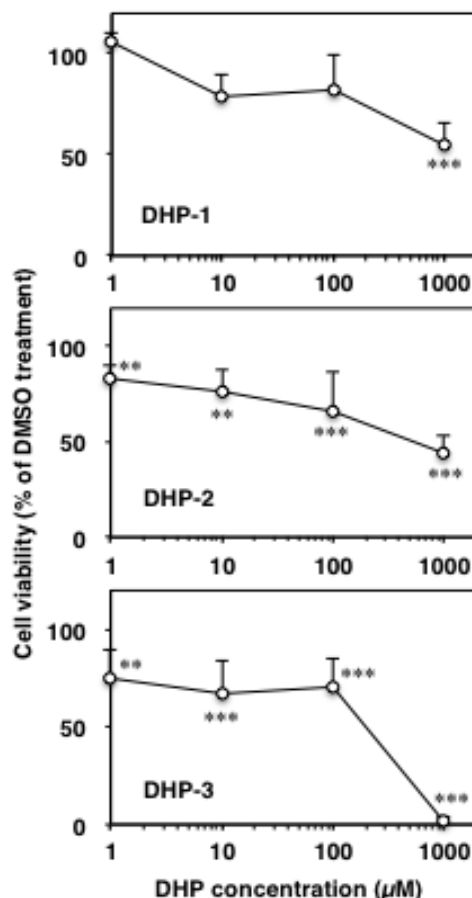


図 1. HepG2 細胞に対する DHP 誘発性細胞障害の用量依存性. 各値とも 8 ~ 9 検体の平均吸光値の百分率 ± S.D. で表記。有意差: **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

10 μ M - 1 mM の濃度範囲において細胞障害性が認められた (図 1)。また、DHP-3 による影響が最も強く、1 mM, 24 時間の曝露によりほとんどの細胞が障害を受けることが明らかとなった (estimated LD₅₀, DHP-1: 1,163 \pm 151 μ M; DHP-2: 738 \pm 216 μ M; DHP-3: 299 \pm 75 μ M)。また、DHP-3 曝露 HepG2 細胞において酸化型グルタチオン濃度の上昇が見られたことから、DHP による細胞障害にグルタチオンバランスの崩壊が関与する可能性が示唆された。次に、DHP による細胞障害機構を明らかにするため、特に影響の強かった DHP-3 をモデル化合物として HepG2 細胞に曝露したのち、遺伝子障害の指標の一つである 8-OHdG 量を測定した。しかしながら、DHP-3 曝露による顕著な変化は認められなかった (データ未掲載)。そこで、DHP-3 曝露時における細胞応答を解析するため、高感度 DNA チップを用いたマイクロアレイを行った。その結果、DHP-3 曝露時において、501 種の遺伝子の発現増加および 61 種の遺伝子の発現低下が引き起こされていることが明らかとなった。発現増加が引き起こされた遺伝子の中に酸化ストレスに関する遺伝子が認められたため、それらの遺伝子に対して real-time PCR を行った。その結果、DHP-3 曝露初期 (~ 6 時間) において、酸化ストレス応答性のタンパク質である heme oxygenase-1 (HO-1) および glutamate cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) の mRNA 量が有意に増加することが明らかとなった (図 2)。HO-1 mRNA の増加は、曝露初期に顕著であり、曝露後期 (~ 24 時間) にかけてコントロールレベルまで低下した。これに対し、GCLC mRNA の発現レベルは、曝露初期から後期にかけてコントロールの 2 ~ 3 倍を維持していた。最後に、生体内における DHP の分布を明らかにするため、DHP 化ヒト血清アルブミンを固相

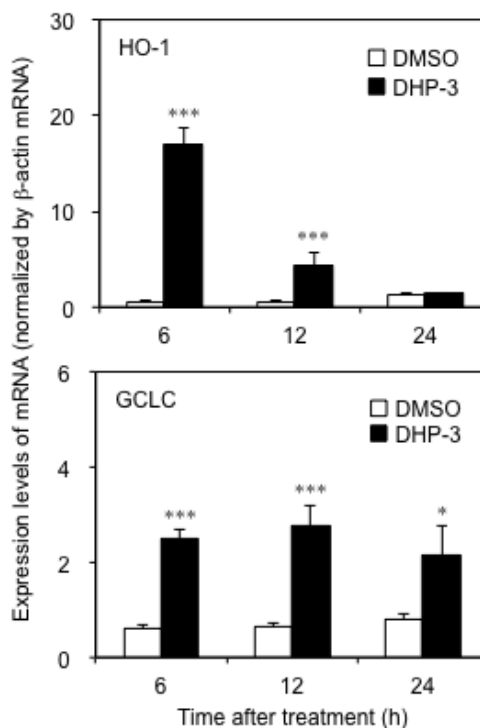


図 2. DHP 曝露による HO-1 および GCLC mRNA 発現レベルの時間依存的変化. コントロールは、0.1% DMSO を含む培地とし、それぞれの発現量は、 β -actin mRNA の発現量をもとに標準化されている。各値とも 4 検体の平均値 \pm S.D. で表記。有意差：*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$ 。

化抗原として作成した抗 DHP ウサギポリクローナル抗体を用いて競合的 ELISA 法を行い、健常者および糖尿病患者の血清サンプル中における DHP 量の差を検証した。その結果、コントロール群である空腹時健常者の血清では平均約 2 μ g DHP/mL であったのに対し、糖尿病患者群では平均約 4 μ g/mL と有意な増加を示した。以上の結果から、DHP 類は、健常者中に存在しており、糖尿病に罹患することで生体内濃度が上昇すること、DHP は、生体に対し細胞障害などの影響を及ぼす可能性があること、そして DHP による生体影響に酸化ストレスが関与していることが明らかとなった。今回の検討で DHP による遺伝子への影響を明らかにすることができなかったが、検出感度を上げることで今後解析可能であると考えられる。また、今回の検討で用い

た DHP 1 mM が、生体内の組織における実際の濃度と比べ適切であったか否かについては議論の余地が残っているため、今後も解析を続ける必要があると考えられる。

1. Kaneto, H., et al., Diabetes, 44: 733-738 (1995).
2. Kaneto, H., et al., Diabetes, 48: 2398-2406 (1999).
3. Yamaguchi, T., et al., Biol. Pharm. Bull., 19: 1261-1265 (1996).
4. Yamaguchi, T., et al., Biol. Pharm. Bull., 28: 419-423 (2005).
5. Yamaguchi, T., et al., Chem. Pharm. Bull., 60: 639-646 (2012).
6. Ziatkis, A., et al., Anal. Chem., 45: 763-767 (1973).

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 Takumi Ishida, Shinji Takechi and Tadatoshi Yamaguchi, Possible involvement of glutathione balance disruption in dihydropyrazine-induced cytotoxicity on human hepatoma HepG2 cells. J. Toxicol. Sci., 37, 2012, 1065-1069. [査読有]
https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jts/37/5/_contents/-char/ja/

[学会発表](計 4 件)

- ① 瀬戸理光, 石田卓巳, 武知進士, Dihydropyrazine 類による Nrf2-ARE 経路の活性化, 日本薬学会第 134 年会 (2014 年 3 月 27 日~30 日, 熊本)
- ② 國武ゆい, 仲悠, 石田卓巳, 武知進士, Dihydropyrazine 類曝露による遺伝子発現

変動, 第 30 回日本薬学会九州支部大会 (2013 年 12 月 7 日~8 日, 長崎)

- ③ 松岡美里, 石田卓巳, 武知進士, 糖化反応中間体 dihydropyrazine 類による毒性発現機構の解析, 第 29 回日本薬学会九州支部大会(2012 年 12 月 8 日~9 日, 熊本)
- ④ 石田卓巳, 山口忠敏, 武知進士, 糖化反応中間体 dihydropyrazine による glutathione balance への影響, フォーラム 2012: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2012 年 10 月 25 日~26 日, 名古屋)

[図書](計 0 件)

特記事項なし

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

特記事項なし

取得状況 (計 0 件)

特記事項なし

[その他]

ホームページ等

特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 卓巳 (ISHIDA, Takumi)
崇城大学・薬学部・准教授
研究者番号: 10301342

(2) 研究分担者

武知 進士 (TAKECHI, Shinji)
崇城大学・薬学部・教授
研究者番号: 10222100

山口 忠敏 (YAMAGUCHI, Tadatoshi)
崇城大学・薬学部・教授
研究者番号: 80037598