

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590192

研究課題名(和文)末梢体内時計と膵細胞NO-cGMP系とのクロストークの糖尿病発症における役割

研究課題名(英文)Role of crosstalk between peripheral circadian clock and NO-cGMP system of pancreatic beta-cells in the pathogenesis of diabetes

研究代表者

石川 智久(Ishikawa, Tomohisa)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：10201914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：膵細胞における内因性NO合成酵素阻害物質ADMAによるNO産生調節機構と末梢体内時計との関係、およびその糖尿病病態への関与を調べた。まず、細胞におけるADMA代謝酵素DDAH2の発現が高血糖条件下で低下することを見出し、糖尿病病態下ではADMA蓄積によりNO産生が抑制されていることが示唆された。しかし、細胞におけるNO-cGMP系と末梢体内時計との関係は検出されなかった。一方で、食事により腸管から分泌されるGLP-1存在下において体内時計同調因子であるメラトニンがインスリン分泌を抑制することが示唆され、細胞機能調節において食事と体内時計が関連している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to investigate the relation between the regulation of NO-cGMP system by the endogenous NO synthase inhibitor ADMA and peripheral circadian clock in pancreatic beta-cells and the involvement of these systems in the pathogenesis of diabetes. We found that the expression of the ADMA metabolic enzyme DDAH2 in beta-cells is suppressed by high glucose, suggesting that the NO-cGMP system is down-regulated by the accumulation of ADMA in diabetes. Unfortunately, we could not obtain any evidence for a relation between the NO-cGMP system and peripheral circadian clock in beta-cells. On the other hand, melatonin, a circadian synchronizer, was suggested to inhibit insulin secretion from beta-cells in the presence of GLP-1 secreted from the gastrointestinal mucosa in response to a meal. Thus, the possibility is raised that some relation between food intake and circadian rhythm exists in the regulation of beta-cell functions.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：糖尿病 シグナル伝達 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

著者らを含む複数のグループにより、膵細胞に構成型 NO 合成酵素 (cNOS) である NOS1 (nNOS) および NOS3 (eNOS) が存在することや、グルコース濃度の上昇に応じて cNOS が活性化され NO が産生されることが報告されている。NO のインスリン分泌に対する効果については、促進と抑制の両方の報告が為されており、一定の見解が得られていなかったが、著者らは NO が生理的濃度領域で濃度に依存した 2 面性の作用を示すことを証明した。すなわち、NO は 50 nM よりも低い濃度では cGMP 産生を介してグルコース誘発インスリン分泌を促進するが、それを超える濃度では逆に直接作用によりインスリン分泌を抑制する。さらに著者らは、NO が cGMP 非依存的に、小胞体ストレスや酸化ストレスにより誘導される 細胞アポトーシスを低濃度では抑制するのに対し、高濃度ではアポトーシス誘導を起こすことを示した。以上の結果から、NO が濃度により 細胞に対して真逆の作用を示すことが明らかとなり、NO 産生調節の異常が 細胞機能に影響を及ぼす可能性が示された。これまでに誘導型 NOS (iNOS) 由来の高濃度 NO が 細胞傷害を介して 1 型糖尿病発症に関与することは示唆されているものの、cNOS と糖尿病、特に 2 型糖尿病との関係については殆ど報告されていない。

最近、細胞特異的に時計遺伝子 *Clock* あるいは *Bmal1* の機能欠損ミュータントを導入した膵島において、耐糖能異常やインスリン分泌不全が認められることが示され、末梢体内時計がインスリン分泌調節に関与することが示唆された。また、体内時計の同調因子であるメラトニンの膵 細胞機能に対する作用も報告されている。しかし、メラトニンがインスリン分泌を抑制するという報告もあれば、メラトニンが細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を上昇させるというインスリン分

泌促進作用を示唆する報告もあり、未だ統一した見解は得られていない。一方、他の細胞では、メラトニンが NO に対して抑制的に作用することや、NO が時計遺伝子 *Per2* の発現を上昇させることなどが報告されており、細胞における末梢体内時計による機能調節にも NO が関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

cNOS は、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化やリン酸化による活性調節を受けるが、さらに最近では、内因性 NOS 阻害物質である非対称性ジメチルアルギニン (ADMA) による cNOS 活性調節の存在も報告されている。しかし、その詳細は不明な点が多く、細胞における ADMA 産生を介した cNOS 活性制御に関する報告はまだない。ADMA はメチル基転移酵素 PRMT により産生され、加水分解酵素 DDAH により代謝される。そこで、細胞における ADMA を介した NOS 活性調節機構の存在を明らかにするために、細胞における PRMT および DDAH の各アイソフォームの発現や ADMA の産生について検討する。さらに、糖尿病状態がこの機構に及ぼす影響を調べる。

一方、末梢時計遺伝子に関しては、まず細胞株を用いて時計遺伝子発現の概日リズムを評価できる実験系を確立し、その概日リズムに NO が及ぼす影響を調べる。また、体内時計同調因子であるメラトニンの 細胞に対する作用の詳細を明らかにし、その作用への NO の関与を調べる。以上より、細胞における末梢体内時計と NO との間のクロストークの存在を検証する。

3. 研究の方法

細胞株である INS-1 細胞や MIN6 細胞、および Wistar 系雄性ラットや C57BL/6J 雄性マウスから単離した膵島を用いて、ADMA 産生酵素である PRMT および代謝酵素である DDAH の各アイソフォームの発現および糖

尿病病態を模した各種条件下でのそれらの変化を RT-PCR やリアルタイム PCR により調べた。また、2 型糖尿病モデル動物である高脂肪食負荷 (HFD) マウス (C57BL/6J 雄性マウスに高脂肪食を 16 週間摂餌させて作製) から単離した膵島を用いてこれら酵素の発現を調べた。

細胞におけるメラトニンの解析には、INS-1 細胞、MIN6 細胞、および単離膵島を用いた。メラトニン受容体の発現解析を RT-PCR およびウェスタンブロットにより行った。また、インスリン分泌の指標となる細胞の $[Ca^{2+}]_i$ に対するメラトニンの作用を Ca^{2+} 蛍光試薬 Fura-PE3 を負荷した INS-1 細胞を用いて画像解析により検討した。

細胞における時計遺伝子の解析は、INS-1 細胞を用いて行った。各種条件下で培養した INS-1 細胞を時間を追って回収し、時計遺伝子の発現変化をリアルタイム PCR を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) ADMA を介した NOS 活性調節に糖尿病病態が及ぼす影響

マウス膵島および INS-1 細胞において、PRMT と DDAH の mRNA およびタンパク質の発現が確認された。すなわち、膵細胞においても ADMA が産生・代謝されており、cNOS 活性を調節していることが示唆された。高濃度グルコース (20 mM) で 3 日間処置した INS-1 細胞では、PRMT と DDAH の各アイソフォームの中で PRMT4 の発現増加と DDAH2 の発現減少が認められた。しかし、過酸化水素 (100 μ M) 24 時間処置では、INS-1 細胞における DDAH2 および PRMT4 の発現に変化は認められなかった。また、HFD マウスの膵島において、DDAH2 の mRNA 発現の減少が認められた。以上の結果から、糖尿病病態下では、細胞における ADMA の産生系の亢進と代謝系の抑制によって ADMA の

細胞内濃度が上昇し、その結果 cNOS が抑制されている可能性が示された。

(2) 細胞の状態に依存したメラトニンの作用

INS-1 細胞、MIN6 細胞、および単離膵島を用いた検討により、細胞における MT_1 および MT_2 の両メラトニン受容体サブタイプの発現が mRNA およびタンパク質レベルで確認された。また、INS-1 細胞およびラット単離細胞を用いた検討により、メラトニンが 2.8mM グルコース存在下での $[Ca^{2+}]_i$ に対しては何の作用も示さないが、インスリン分泌刺激濃度である 11.1mM グルコース存在下では、メラトニンによりグルコース誘発 $[Ca^{2+}]_i$ オシレーションが抑制される細胞と、逆に増強される細胞が存在することが示された。こうした細胞により異なる反応が生じる原因として、グルコースによる細胞内 cAMP レベルの変化が関係しているのではないかと考えた。 MT_1 受容体は Gq あるいは G_i と共役していることが示されている。そのため、グルコースにより cAMP が上昇する細胞では、メラトニンは G_i を介して cAMP を低下させ $[Ca^{2+}]_i$ 反応を抑制するのに対し、グルコースにより cAMP が上昇しない細胞では、Gq を介して $[Ca^{2+}]_i$ 上昇させたのではないかと考えた。そこで、GLP-1 により cAMP を上昇させた条件下で、メラトニンの作用を再度検討した。11.1 mM グルコース存在下で GLP-1 を作用させると、 $[Ca^{2+}]_i$ オシレーションの頻度が上昇した。この状態にメラトニンを作用させると、全ての細胞で $[Ca^{2+}]_i$ オシレーションが抑制された。以上より、食事により腸管から分泌される GLP-1 存在下において体内時計同調因子であるメラトニンがインスリン分泌を抑制することが示唆され、細胞機能調節において食事と体内時計が関連している可能性が示された。

(3) 時計遺伝子発現の概日リズムに対する NO の作用

まず、時計遺伝子発現の概日リズムを細胞株で評価できる実験系の検討を行った。INS-1 細胞における時計遺伝子 *Clock*, *Bmal1*, *Per1* および *Per2* の発現変動を各種培養条件で測定した結果、50%馬血清で 2 時間処置することにより、少なくとも *Bmal1* と *Per1* の概日リズムが確認できた。現在、これら時計遺伝子の概日リズムに対する NO ドナーおよび NOS 阻害薬の効果を検討しているが、これまでのところ NO が概日リズムに関与することを示唆する結果は得られていない。

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 8 件)

Kaneko YK, Ishikawa T. Dual role of nitric oxide in pancreatic β -cells. *J Pharmacol Sci* 2013; 123: 295-300. 査読有

Kaneko YK, Kobayashi Y, Motoki K, Nakata K, Miyagawa S, Yamamoto M, Hayashi D, Shirai Y, Sakane F, Ishikawa T. Depression of type I diacylglycerol kinases in pancreatic β -cells from male mice results in impaired insulin secretion. *Endocrinology* 2013; 154: 4089-4098. 査読有

Takada M, Noguchi A, Sayama Y, Kaneko Y, Ishikawa T. IP_3 receptor-mediated initial Ca^{2+} mobilization constitutes a triggering signal for H_2O_2 -induced apoptosis in INS-1 β -cells. *Biol Pharm Bull* 2011; 34: 954-958. 査読有

[学会発表](計 36 件)

野尻雅人、金子雪子、笠原七帆子、石川智久：膵細胞における

DDAH/ADMA/NOS 経路を介した NO 産生調節機構の解析．第 58 回日本薬学会東海支部総会・大会 (静岡)、2012 年 7 月 7 日

金子雪子、野尻雅人、笠原七帆子、石川智久：膵細胞における構成型 NO 合成酵素 (cNOS) 活性調節に対する高血糖の影響．第 126 回日本薬理学会関東部会 (東京)、2012 年 7 月 14 日

石川智久、金子雪子：糖尿病病態における構成型 NOS 由来 NO により膵細胞機能調節の変化．病態生理シンポジウム II「糖代謝の病態生理学」第 22 回日本病態生理学会 (大分)、2012 年 8 月 4 日

[図書](計 1 件)

Nakayama K, Tanabe Y, Obara K, Ishikawa T: Mechanosensitivity of Pancreatic β -cells, Adipocytes, and Skeletal Muscle Cells: The Therapeutic Targets of Metabolic Syndrome. Mechanically Gated Channels and their Regulation. Springer pp.379-404 (2012)

[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

<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/pharmaco/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

石川 智久 (ISHIKAWA TOMOHISA)
静岡県立大学・薬学部・教授
研究者番号：10201914

(2)研究分担者

金子 雪子 (KANEKO YUKIKO)

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：00381038