

平成 27 年 4 月 27 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590169

研究課題名(和文)糖化反応物による生活習慣病発症機構解明と高感度診断法構築のための基盤的研究

研究課題名(英文) Pathogenic mechanism of metabolic syndrome by glycation intermediates, and its sensitive diagnostic method

研究代表者

武知 進士 (TAKECHI, Shinji)

崇城大学・薬学部・教授

研究者番号：10222100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖化反応中間体であるジヒドロピラジン(DHP)類は、糖尿病患者の血中や尿中で酸化により増加するピラジン類に変化するが、これまでDHP類による細胞毒性の報告はなく有効な測定法もない。そこで、DHP曝露したヒト肝由来細胞を用い、酸化ストレスを中心に検討した。DHP曝露後、細胞内の酸化型グルタチオン濃度の顕著な増加が認められ、抗酸化ストレス遺伝子が誘導された。さらに、細胞骨格の減少、細胞接着能の低下、細胞周期の停止、細胞死の誘導が観察された。加えて、細胞骨格の脱重合、細胞接着能の低下、細胞周期の停止、細胞死を誘導する機構が明らかになり、DHP毒性測定の基盤となる新たな知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Dihydropyrazines (DHPs), formed by nonenzymatic glycation, are intermediates of the glycation reaction. Since many pyrazine derivatives, which are deduced metabolites of DHPs, have been found in human urine, especially diabetes. In spite of all the available data, the biological effects of DHPs and the effective methods of detection for DHPs in mammalian cells remain elusive. To address this issue, we studied the effects of DHPs on human hepatoma HepG2 cells using DHPs, focusing on oxidative stress by DHPs. DHP-exposed HepG2 cells showed a significant decrease in the ratio of intracellular reduced and oxidized glutathione (GSH/GSSG). In addition, DHP-exposed cells displayed that a number of anti-oxidative stress response genes were distinctively up-regulated. Moreover, DHP-exposed cells also showed the depolymerization of actin, the cell cycle arrest at G2/M phase, and the induction of apoptosis. These findings become a standard for the detection of DHPs in mammalian cells.

研究分野：衛生学、分子生物学、生化学

キーワード：酸化ストレス 糖化反応 糖尿病 細胞毒性

1. 研究開始当初の背景

生活習慣が要因となって発生する生活習慣病は、現代社会において克服すべき重大疾病である。特に食生活においては、食の欧米化により高カロリー・高脂肪食に移行しており、これを原因とした糖尿病、高脂血症、高血圧症など様々な生活習慣病が拡大・蔓延している。これらのうち血糖値が病的に上昇する糖尿病は、その発症機構により2種類に分類される。中でも、食生活などの環境因子が要因と考えられるⅡ型糖尿病は、上述の生活習慣の変化と相俟って、世界規模で患者数の増加傾向を示している。糖尿病は、その原因と重症度にもよるが、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、治療を施さないまま長期間放置され、結果として慢性化する場合が多い。さらに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が広く認識されている。糖尿病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、最近では酸化的ストレスの関与などが予想されている。しかし、その症状の複雑さからその全貌は未だ解明されておらず、特に有効な診断マーカーが不足しているため充分な対処法の構築に至っていない。近年糖尿病による合併症の発症機構として、AGEs と呼ばれる低分子化合物の存在が注目されてきた。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。従って、AGEs は、生体内の糖濃度上昇時における疾病と何らかの関わりをもっていると推測されている。申請者らが注目する DHP 類もグルコサミン2分子の脱水縮合反応によって生じる AGEs の一つである。DHP 類は、遺伝子や機能性タンパク質に影響を及ぼしていることが示唆されているが、その詳細はほとんど解明されていない。従って、DHP 類が神経細胞の損傷や癌化に関与するとの学説も存在していない。

糖尿病における合併症としては、網膜症、腎障害、および神経障害のいわゆる3大合併症がよく知られている。一方、疫学調査から、糖尿病患者では健康人に比べ特定の部位における癌の発生率が上昇するとの報告がなされている。申請者らはこれまで、AGEs の一つである DHP 類が生体に及ぼす影響に注目し研究を行ってきた。その結果、DHP 類が DNA 鎖切断作用をもつことを明らかにした。また、この作用が、銅イオンの存在下において増強されることも明らかにしている。さらに、DHP 類は *in vivo* において中枢神経細胞へ蓄積し、アポトーシスを誘発することを突き止めている。この DHP 類は

不安定な構造体であるため、生体内における動態をモニタリングすることは現時点では困難である。しかし、DHP 類の酸化体であるピラジン類が、糖尿病患者の血中や尿中で増加することから、その前駆体である DHP 類の生体内における存在は疑いのない事実である。DHP 類が神経細胞や DNA に対し障害作用をもつことを示したのは、我々が初めてである。これらの発見を基に、申請者らは、糖に由来する DHP 類が糖尿病の合併症に関与する可能性を着想するに至った。

2. 研究の目的

申請者らの研究目標は、糖尿病合併症の発症に DHP 類が関与していることを明らかにすることである。さらに、糖尿病合併症の発症を DHP 類の生成量を指標としてモニタリングする方法を構築することである。そこで、本申請課題では、第1の目標として 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。前述のように、DHP 類は DNA 切断作用を示す。しかし、これは大腸菌を用いて検討した結果であり、哺乳動物細胞の遺伝子に対するような作用を示すのかについては不明な点が多い。DHP 類は、その反応性の高さから、銅イオンなどの存在下で酸化的ストレスを発生すると共に、それ自身 carbon-centered radical として他の生体成分に反応することが示唆されている(図1)。以上のような背景のもと、本申請課題では、DHP 類による遺伝子への影響を酸化的ストレスの発生、並びに DNA やタンパク質など生体内機能性高分子化合物の酸化的修飾を焦点に解析し、さらに、生体内における DHP 類の検出法の構築を行い、*in vivo* における DHP 類の検出、並びにその定量による実際の症例との関連性を明らかにする。

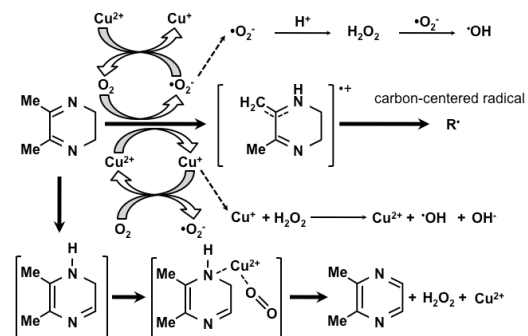


図1. ジヒドロピラジン類によるラジカルの生成

本研究は、糖尿病による合併症の発症が、生体内によって非酵素的に生成される DHP 類の作用に基づくとする全く新しい仮説の実証に取り組む。さらに、生体内において生成される DHP 類の検出法の開発を目指した研究を展開する。これらが達成されれば、未解明な部分が多い糖尿病を起点とした合併症の発症機構の解明につながるのみならず、

糖尿病患者における合併症発症を予測する有効なモニタリング法を提示することが可能となる。糖尿病に伴う神経障害、さらに癌発症率の上昇をグルコサミン由来の DHP 類により説明しようとする試みは、これまでになされておらず非常に斬新な研究であるといえる。さらに、研究対象となる DHP 類は市販されておらず、一般に入手するのは困難であるが、申請者らの研究室では、独自に DHP 類の高収率合成法を確立済みであり、この点においても非常に独創的な研究であるといえる。本研究の成果は、生体内において非酵素的に生成される低分子化合物が、癌の発生や神経細胞のアポトーシスを制御するとする新規学説の理論的根拠を提示することになり、癌研究や神経の発達と制御に関する研究に新たな知見を与えるものである。

4. 研究成果

(1) 3種のDHP(DHP-1: 2,3-Dihydro-5,6-dimethylpyrazine, DHP-2: 2,3-Dihydro-2,5,6-trimethylpyrazine, DHP-3: 3-Hydro-2,2,5,6-tetramethylpyrazine)を、ヒト肝癌細胞HepG2細胞に曝露した結果、いずれのDHPも時間依存的な細胞死を示した。細胞内の還元型グルタチオン濃度を測定した結果、DHPの曝露による変化は認められなかった。これに対し、酸化型グルタチオン濃度は、DHP-3処理においてのみ、曝露12時間後から顕著な増加が認められた。さらに、DHP-1とDHP-2の曝露における還元型/酸化型-グルタチオン比は、コントロールに比べ変化が見られなかったが、DHP-3曝露に伴い顕著な減少が認められた。以上の結果から、DHP-1、DHP-2およびDHP-3は、いずれもHepG2細胞に対して細胞障害性を示すことが明らかとなった。また、その機構は、DHP-1とDHP-2は同じである可能性が考えられるものの、DHP-3は異なることを示している。

(2) DHPを曝露したヒト肝癌細胞HepG2細胞より抽出したRNAを用いて、マイクロアレイ解析を行い、発現変動を示した遺伝子を検出した。このうち発現変動が著しく顕著であった遺伝子群は、抗酸化ストレス遺伝子GCLC、GCLM、HO-1であることが明らかとなった。これら抗酸化ストレス遺伝子は、DHP誘導体、DHP-1、DHP-2、DHP-3(3-Hydro-2,2,5,6-tetramethylpyrazine)のうち、DHP-3が最も強い転写誘導活性を持つことがreal time RT-PCR法により明らかになった。さらにwestern解析の結果、DHP曝露により抗酸化ストレス転写因子Nrf2の細胞内蓄積が抗酸化ストレス遺伝子転写誘導に先んじて起こることが明らかになった。加えて、Nrf2結合配列である酸化ストレス応答配列(ARE)依存的にDHP転写誘導が起こることがルシフェラーゼレポーターアッセイにより明らかになった。これらの結果は、DHPによる酸化ストレスが

Nrf2-ARE経路を活性化したことを示している。

(3) ヒト肝がん由来HepG2細胞に、DHPを曝露した後、rhodamine標識phalloidinによる繊維状アクチンであるF-actin染色、fibronectin-coated plateを用いた細胞接着能、細胞周期の解析、caspase-3活性化の解析により、DHP曝露による細胞増殖阻害について検討を行った。F-actin染色の結果、DHP-3曝露によりF-actinの局在化の変化、特に細胞接着面でのF-actinの減少が観察された。細胞接着能の検討では、DHP-3共存下、fibronectin-coated plateに対する接着低下が観察された。さらに、細胞周期解析の結果、DHP-3曝露細胞ではG2/M期細胞の割合が増加し、caspase-3の活性化が観察された。これらの結果より、DHPによる細胞骨格の変化を介し、細胞接着能の低下、細胞周期のG2/Mアレストならびにcaspase活性化によるapoptosis誘導により、細胞増殖を阻害する機構が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4件)

- ① Ishida T, Yamaguchi T, Takechi S. The effect of dihydropyrazines on human hepatoma HepG2 cells: a comparative study using 2,3-dihydro-5,6-dimethylpyrazine and 3-hydro-2,2,5,6-tetramethylpyrazine. *J. Toxicol. Sci.* 2014;39:601-608. [査読あり] DOI:10.2131/jts.39.601
- ② Tsujimoto S, Ishida T, Takeda T, Ishii Y, Onomura Y, Tsukimori K, Takechi S, Yamaguchi T, Uchi H, Suzuki SO, Yamamoto M, Himeno M, Furue M, Yamada H. Selenium-binding protein 1: Its physiological function, dependence on aryl hydrocarbon receptors, and role in wasting syndrome by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013;1830:3616-3624. [査読あり] DOI:10.1016/j.bbagen.2013.03.008
- ③ Ishida T, Takechi S, Yamaguchi T. Possible involvement of glutathione balance disruption in dihydropyrazine-induced cytotoxicity on human hepatoma HepG2 cells. *J. Toxicol. Sci.* 2012;37:1065-1069. [査読あり] DOI:10.2131/jts.37.1065
- ③ Yamaguchi T, Matsumoto S, Masumizu

T, Takechi S, Ishida T, Takeshita K, Kansui H, Kunieda T. Generation of radical species from dihydropyrazines having DNA strand-breakage activity and other characteristics. Chem. Pharm. Bull. 2012;60: 639-646.

[査読あり]

DOI:10.1248/cpb.60.639

[学会発表] (計 20 件)

- ① 武知進士、石田卓巳、糖化反応中間体 dihydropyrazine による細胞増殖抑制、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 28 日、神戸サンボーホール (兵庫県神戸市)
- ② 石田卓巳、武知進士、2,3-dihydro-2,2,5,6-tetramethylpyrazine による亜鉛輸送タンパク質 ZnT-1 の誘導、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 28 日、神戸サンボーホール (兵庫県神戸市)
- ③ 樫原龍輝、石田卓巳、武知進士、糖化反応中間体による HepG2 細胞増殖阻害、第 31 回 日本薬学会九州支部大会、2014 年 12 月 7 日、第一薬科大学 (福岡県福岡市)
- ④ 武知進士、石田卓巳、糖化反応中間体 dihydropyrazine (DHP) による増殖阻害、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑤ 小林睦美、満留意与、石田卓巳、武知進士、糖化反応中間体 dihydropyrazine による亜鉛輸送蛋白の発現変動、フォーラム 2014 衛生薬学・環境トキシコロジー、2014 年 9 月 19 日、つくば国際会議場 (茨城県つくば市)
- ⑥ 瀬戸理光、石田卓巳、武知進士、Dihydropyrazin 類暴露による Nrf2-ARE 経路の活性化、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 30 日、熊本大学 (熊本県熊本市)
- ⑦ 小野村優子、石井祐次、武田知起、山本緑、石田卓巳、武知進士、姫野勝、山田英之、アセトアミノフェン誘発肝障害における selenium binding protein 1 (SelenBP1) の役割: SelenBP1 欠損マウスを用いた検討、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 28 日、熊本大学 (熊本県熊本市)
- ⑧ 國武ゆい、仲悠、石田卓巳、武知進士、Dihydropyrazine 類暴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、長崎国際大学 (長崎県佐世保市)
- ⑨ 仲悠、國武ゆい、石田卓巳、武知進士、糖化反応中間体による細胞障害に対する亜鉛の影響、第 30 回 日本薬学会九州支部大会、2013 年 12 月 7 日、長崎国際大学 (長崎県佐世保市)
- ⑩ 武知進士、石田卓巳、糖化反応中間体 dihydropyrazine 類による Nrf2-ARE 経路の活性化、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
- ⑪ 北原朋葉、樋口祐佳、石田卓巳、武知進士、ジヒドロピラジン誘発性細胞障害における亜鉛の影響、フォーラム 2013 衛生薬学・環境トキシコロジー、2013 年 9 月 13 日、九州大学 (福岡県福岡市)
- ⑫ 石田卓巳、武知進士、糖化反応中間体 dihydropyrazine 類による遺伝子変動の解析、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑬ 武知進士、石田卓巳、山口忠敏、Maillard 反応中間体 dihydropyrazine (DHP) 類によるタンパク質付加体の解析、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑭ 深谷睦、神内伸也、岩田直洋、岡崎真理、武知進士、山口忠敏、秋山靖子、日比野康英、Dihydropyrazine 誘導体によるクロマチン構造変換を介した mdrlb 遺伝子の発現上昇、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 28 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑮ 深谷睦、神内伸也、岩田直洋、岡崎真理、武知進士、山口忠敏、秋山靖子、日比野康英、Dihydropyrazine 誘導体はラット腸管細胞において NF- κ B 制御下での mdrlb 遺伝子発現を増幅する、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 16 日、マリンメッセ福岡 (福岡県福岡市)
- ⑯ 武知進士、石田卓巳、山口忠敏、糖化反応中間体 dihydropyrazine による酸化ストレス、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 14 日、マリンメッセ福岡 (福岡県福岡市)
- ⑰ 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、熊本大学薬学部 (熊本県熊本市)
- ⑱ 荒川麻衣、石田卓巳、武知進士、糖化反

応中間体 dihydropyrazine 類によるタンパク質付加体の解析、第 29 回 日本薬学会九州支部大会、2012 年 12 月 8 日、熊本大学薬学部（熊本県熊本市）

- ⑱ 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、名古屋観光ホテル(愛知県名古屋市)
- ⑳ 武知進士、石田卓巳、山口忠敏、糖化反応中間体によるストレス応答機構の解明、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、名古屋観光ホテル（愛知県名古屋市）

〔その他〕

ホームページ等

崇城大学 薬学部 環境衛生薬学講座 衛生化学研究室

<http://www.ph.sojo-u.ac.jp/~stakechi/HygieneChem090727/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

武知 進士 (TAKECHI, Shinji)

崇城大学・薬学部・教授

研究者番号：10222100

(2)研究分担者

石田 卓巳 (ISHIDA, Takumi)

崇城大学・薬学部・准教授

研究者番号：10301342