

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790569

研究課題名(和文)新規糖尿病マーカーとしてのニトロ化IL-18の評価とELISAの確立

研究課題名(英文)Function of nitrated 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・講師

研究者番号：60351798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、糖尿病において構造変化を生じると考えられるIL-18の機能変化を解析し、糖尿病との関連を明らかにして、疾患マーカーとしての有用性を評価するものである。本研究において、糖尿病で生じるパーオキシナイトライトがIL-18のチロシンをニトロ化し、IL-18の機能であるインスリンシグナル伝達やIFN $\gamma$ の産生誘導活性を抑制することを見出した。さらに、ニトロ化IL-18は糖尿病モデルマウスにおいて検出されたことより、糖尿病の病態との関与が示唆された。ニトロ化IL-18という特殊な構造が糖尿病で増加することから、糖尿病の疾患マーカーとして利用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：IL-18 promotes the production of IFN $\gamma$  and granulocyte-macrophage CSF and inhibits IL-10 production. In humans, IL-18 concentrations are reported to be increased in individuals with type 2 diabetes and in obese individuals. However, detailed functions of IL-18 in diabetes are still unclear.

The purpose of this study was to investigate the effects of oxidative modification on the IL-18 functions, and evaluate as a disease-specific marker. It was found that peroxynitrite nitrated IL-18 at tyrosine residues, resulting the dysfunction of IL-18 such as insulin signal transduction and IFN $\gamma$  inducing ability. Furthermore, nitrated IL-18 was found in db/db mice, animal model of diabetes mellitus. These results suggested that nitrated IL-18 maybe involved in the development of diabetes mellitus. Nitrated IL-18 has the possibility to be a diabetes-specific marker because of its unique structure.

研究分野：生化学

キーワード：糖尿病

## 様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病対策では前糖尿病状態での早期診断が、その後の予防や治療などに影響することから重要視されている。現在、診断法として早朝空腹時血糖と糖化ヘモグロビンが指標となっている。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、患者の状態に影響されない正確な診断法が望まれている。

(2) 糖尿病では酸化ストレスが亢進しており、これらが病態に関与していることが明らかとなっている。また、サイトカインも増加しており、糖尿病性腎症などとの関与が示唆されている。

(3) 申請者は糖尿病で増加する活性酸素とサイトカインの関連性が示唆されるデータを得ており、その中でも IL-18 の機能変化に注目していた。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究は、糖尿病のインスリン抵抗性を引き起こすと考えられる NO と IL-18 との関連を解明し、サイトカインを主眼においたマーカーの確立である。そのため、以下の項目を解明することを目的とした。

糖尿病で過剰産生される NO は、種々のタンパク質などを酸化修飾し、機能変化を引き起こす。本研究では、インターロイキン 18 (IL-18) が NO によりどのような構造変化を受けるかを解析した。

NO により IL-18 の機能がどのように変化し、病態に関与しているかを解析した。

糖尿病のモデル動物において、酸化修飾された IL-18 の量が変化しているかを解析した。

(2) これらの解析結果から、酸化修飾された IL-18 が、糖尿病状態を反映するマーカーになるかを検討した。

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危険性を予測できるマーカーの開発が期待された。また、酸化修飾された IL-18 の機能評価により、糖尿病の症状を確認するのみのマーカーに留まらず、積極的な治療を早期に開始できる新規薬剤のターゲットとなる可能性が考えられた。

### 3. 研究の方法

#### (1) NO による IL-18 の構造変化の解析

NO やペルオキシナイトライトなどによる、IL-18 のニトロ化もしくはニトロソ化などの構造変化を解析した。

変異を導入した IL-18 プラスミドを構築し、大腸菌にて発現させ、IL-18 の構造変化部位の解析をした。

#### (2) IL-18 のニトロ化による機能変化の解析

マウス肝プライマリー細胞を用いて、ニトロ化 IL-18 によるインスリンシグナルの変化を解析した。

腎培養細胞を用いて、終末糖化産物受容体 (RAGE) の発現を解析した。AGE は糖尿病での機能障害に関与する因子として注目されている。

#### (3) 糖尿病モデルマウスでのニトロ化 IL-18 の増加の解析

糖尿病モデルマウスの腎臓より IL-18 を生成し、ニトロ化の程度を解析した。

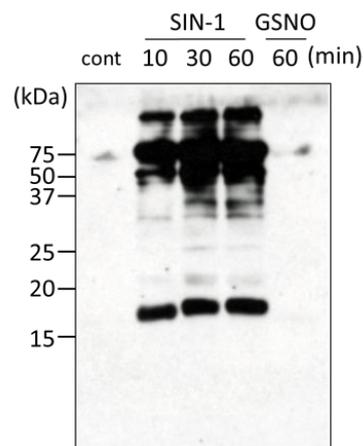
ニトロ化ペプチドを合成し、ウサギに免疫してニトロ化 IL-18 抗体を作製し、検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) NO による IL-18 の構造変化の解析

IL-18 は大腸菌に強制発現させ、精製したものをを用いた。GSNO (NO 発生試薬) または SIN-1 (ONOO<sup>-</sup> 発生試薬) により IL-18 を処理したところ、ONOO<sup>-</sup> により IL-18 のチロシンがニトロ化されていることが認められた。(図 1)

図 1



Blot: anti-Nitrotyrosine

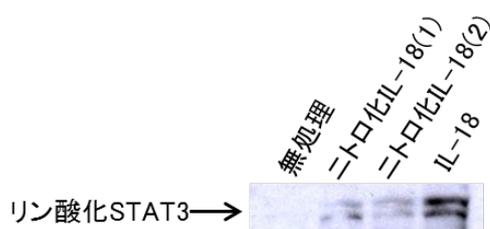
さらに、IL-18 には 3 つチロシンが含まれており、どのチロシンがニトロ化修飾に関与しているかを明らかにするため、それぞれのチロシンをリジンに置換した変異型 IL-18 を作製して解析した。その結果、すべてのチロシンがニトロ化修飾を受けるが、その中でも

特に 51 番目のチロシンがニトロ化を受けやすいことが認められた。

## (2) IL-18 のニトロ化による機能変化の解析

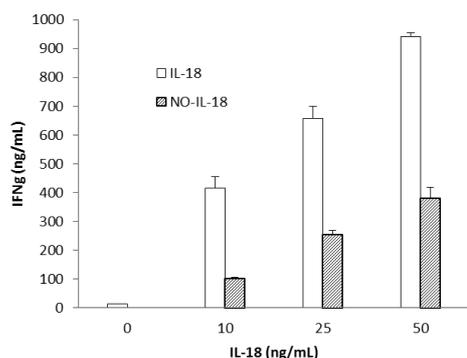
IL-18 はインスリンシグナルに関与していることが報告されており、特に STAT3 のリン酸化を引き起こす。そのため、IL-18 が存在しないと STAT3 のリン酸化が起こらず、インスリンシグナルが伝達されなくなり、糖尿病になると考えられる。そこで、本研究ではニトロ化が IL-18 による STAT3 のリン酸化に及ぼす影響を検討した。その結果、ニトロ化した IL-18 では、STAT3 のリン酸化レベルが著減していることが認められた。(図 2) この結果から、IL-18 のニトロ化がインスリンシグナル伝達を低下させることが示唆された。

図 2



また、IL-18 は感染防御機構として、サイトカインであるインターフェロン (IFN) の産生を誘導する。そこで、ニトロ化により IL-18 の IFN の産生誘導能を解析したところ、ニトロ化 IL-18 は IFN 誘導活性が著しく低下していることが認められた。(図 3)

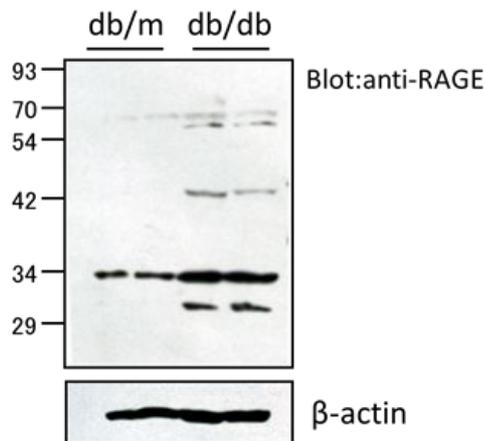
図 3



糖尿病性腎傷害へのニトロ化 IL-18 の関与について検討するため、腎培養細胞を用いて RAGE の発現解析を行った。RAGE は糖尿病で増加することが報告されており、病態の悪化に関与すると考えられている。

ニトロ化 IL-18 は腎培養細胞において、RAGE の発現を促進させた。この RAGE 産生促進は mRNA の発現増加を伴っていることが認められた。(図 4)

図 4



## (3) 糖尿病モデルマウスでのニトロ化 IL-18 の増加の解析

糖尿病モデルマウスである db/db マウスを用いて、ニトロ化した IL-18 の検出を解析するため、ニトロ化 IL-18 ペプチドでウサギを免疫し、抗体作成を行った。いくつかの抗体が得られたが、特異的にニトロ化 IL-18 を認識する抗体は得られなかった。これは、ニトロ化される配列の抗原性が弱く、修飾されていない IL-18 に対する抗体が誘導されやすいためと考えられる。ペプチド配列の変更や動物種の変更など、さらに検討を重ねたい。

そこで、糖尿病マウスでのニトロ化 IL-18 を免疫沈降法にて検出する解析方法を用いた。その結果、糖尿病マウスではコントロールに比べニトロ化されている IL-18 が多く検出された。この結果は実際の生体内でも IL-18 はニトロ化修飾を受けていることを示唆するものである。

## (4) まとめ

本課題において、IL-18 はパーオキシナイトライトによる酸化修飾を受けることが明らかとなった。さらに、その部位は 51 番目のチロシンが特に受けやすいことも認められた。

また、ニトロ化を受けることによって IL-18 の本来の機能は大幅に影響を受け、インスリンシグナル伝達の低下や感染防御に有効な IFN の誘導活性などが低下していた。これらは、糖尿病の病態悪化に関与するだけでなく、感染性の増加につながる原因になると考えられた。さらに、腎臓においてはニトロ化 IL-18 は RAGE の産生を誘導したことから、腎症の原因になることも示唆された。

ニトロ化 IL-18 に対する特異抗体が得られなかったため、患者血清を用いた検討は行えなかったが、糖尿病モデルマウスを用いた検討では、腎臓でニトロ化 IL-18 が検出された。

このことは実際の病態で IL-18 にニトロ化が生じていることを示唆するものであり、大きな発見であると考えられる。

糖尿病で産生される多くのサイトカインは非特異的なものであり、診断に用いることは難しい。しかし、IL-18 は炎症以外では著名な増加をしないことから、疾患特異的なマーカーとなることが期待される。今回の検討結果では、IL-18 の構造変化を明らかとし、さらにその機能変化、病態での検出まで明らかになり、疾患マーカーになる可能性が示唆される結果を得た。今後抗体作成などを検討を重ねて、疾患マーカーとしての検出系の確立を行いたい。

#### 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)

〔学会発表〕(計 7 件)

江口裕伸、崎山晴彦、吉原大作、藤原範子、鈴木敬一郎、活性酸素種による IL-18 の不活性化と糖尿病性腎症への関与の検討、第 87 回日本生化学会大会、2014.10.18、国立京都国際会館(京都府・京都市)

江口裕伸、崎山晴彦、吉原大作、藤原範子、鈴木敬一郎、ペルオキシ亜硝酸イオンによる IL-18 の不活性化と RAGE の発現、第 14 回日本 NO 学会学術集会、2014.5.16~17、ホテルニューオータニ佐賀(佐賀県・佐賀市)

江口裕伸、崎山晴彦、吉原大作、藤原範子、鈴木敬一郎、糖尿病における IL-18 の誘導因子の探索と RAGE の発現、第 23 回日本メイロード学会学術集会、2013.11.29、ナレッジキャピタル・コングレコンベンションセンター(大阪府・大阪市)

江口裕伸、崎山晴彦、吉原大作、藤原範子、鈴木敬一郎、活性酸素種が IL-18 の発現に与える影響、第 86 回日本生化学会大会、2013.9.11、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

江口裕伸、崎山晴彦、吉原大作、藤原範子、鈴木敬一郎、IL-18 における NO の影響の解析、第 13 回日本 NO 学会学術集会、2013.6.28~29、沖縄県医師会館(沖縄県・南風原町)

江口裕伸、藤原範子、崎山晴彦、吉原大作、鈴木敬一郎、活性酸素種による NO 産生増強作用の解析、第 85 回日本生化学会大会、2012.12.16、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

江口裕伸、藤原範子、崎山晴彦、吉原大作、鈴木敬一郎、LPS による NO 産生作用における過酸化水素の影響、第 12 回日本 NO 学会学術

集会 2012.6.29、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

〔図書〕(計 1 件)

Hironobu Eguchi, Haruhiko Sakiyama, Daisaku Yoshihara, Noriko Fujiwara, Keiichiro Suzuki, Springer Berlin Heidelberg, Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants, 2014, 3967-3985

#### 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・講師

研究者番号：60351798