

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461363

研究課題名(和文) 2型糖尿病での膵ラ氏島内マクロファージ浸潤の分子機構の解明とその予防戦略の構築

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms on macrophage infiltration into pancreatic islets in type 2 diabetes and challenging trial to establish its preventive strategy.

研究代表者

石田 均 (Ishida, Hitoshi)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：80212893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病での膵細胞からのインスリン分泌不全の成因について、膵ラ氏島へのマクロファージの浸潤を惹起するMCP-1分泌動態を検討したところ、高濃度のパルミチン酸負荷による増大を認めた。一方で抗酸化物質のアスタキサンチンはこの増大を抑制するとともに、膵細胞内小胞体ストレスも減弱させた。したがって、飽和脂肪酸負荷によって生じる内因性酸化ストレスの増大を抑制することが、膵細胞の機能保護につながる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the influence of antioxidant astaxanthin on monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), a key factor on free fatty acids-induced chronic inflammation, by using mouse insulinoma (MIN6) cells long-term treated with high concentration of palmitate. While palmitate significantly increased endogenous oxidative stress and enhanced MCP-1 secretion in MIN6 cells, astaxanthin as well as SP600125, a JNK-specific inhibitor, clearly reduced this enhanced MCP-1. Furthermore, astaxanthin attenuated JNK phosphorylation, and also diminished endoplasmic reticulum stress enhanced by palmitate. Taken together, astaxanthin can suppress MCP-1 release, which is up-regulated by palmitate, through the inactivity of JNK pathways on MIN6 cells. The results of this study raise the possibility that astaxanthin would become a new preventive tool for the progression of cell dysfunction observed in type 2 diabetes with clinical dyslipidemia.

研究分野：内科学、糖尿病学

キーワード：2型糖尿病 マクロファージ 膵細胞 脂肪細胞 MCP-1 内因性酸化ストレス Astaxanthin JNK経路

1. 研究開始当初の背景

(1)研究代表者らは2型糖尿病のインスリン分泌不全の成因を解明する一連の研究のなかで、膵細胞内でのCa²⁺濃度の動態やpatch-clamp法によるイオンチャネル活性の直接的な測定、インスリンの生合成機構、そして実画像解析法による細胞膜直下のインスリン分泌顆粒の動態の解析に関する実験系を確立してきた。

(2)私達は約20年前に研究の過程で、酸化ストレスが膵細胞内の糖代謝機構に障害を生じグルコース刺激に対するインスリン分泌を抑制し、この変化は可逆的である事実を見出した。但しその際には、この事実の病因論的な意義は不明であった。しかし最近になり、膵細胞にNO合成酵素が発現すること、2型糖尿病の舘ラ氏島ではマクロファージの浸潤を認めるとともに膵細胞での酸化ストレスの増大を認めたことから、2型糖尿病のインスリン分泌不全の成因としてマクロファージの浸潤と酸化ストレスの増大の関与が推測される。

2. 研究の目的

(1)2型糖尿病の成因の解明とともに、その予防手段を確立する目的で、最近明らかにされた舘ラ氏島内へのマクロファージの浸潤が果たす役割を明らかにする。

(2)なかでもその浸潤の分子機構として、糖尿病状態下における膵細胞での内因性酸化ストレスの増大や、結果として生じる細胞内情報伝達系の異常、そしてインスリン分泌顆粒内でのインスリン生合成過程やその分泌機構の障害について、責任分子の同定も含めて総合的に明らかにする。

(3)私共はすでに、代表的なケモカインであり、マクロファージの浸潤を促進する monocyte chemoattractant protein (MCP)-1や、血管新生因子の vascular endothelial growth factor (VEGF)が膵細胞に多く発現し、さらに高濃度グルコースあるいは遊離脂肪酸存在下にそれらの発現と分泌がともに増大する事実を観察しており、2型糖尿病の発症機転に関与するマクロファージ浸潤に関わる分子機構を同定し、さらにその機構の改善を図る。

3. 研究の方法

(1)膵細胞株 MIN6 を代表的な飽和脂肪酸のパルミチン酸 (PA) を 0.3mmol/L の高濃度条件下で 24 時間培養し、細胞からの MCP-1 分泌量、細胞内の小胞体ストレスマーカーである CHOP 発現量をウエスタンブロッティングにて定量化した。細胞内酸化ストレスであるヒドロパーオキシサイトについては、その定量化を Free Radical Evaluator system (Diacron, Grosseto, Italy)にて行なった。

また MIN6 細胞より total RNA を抽出し、Quantitative real-time RT-PCR にて MCP-1 遺伝子発現の定量化を行った。細胞防御系と考えられる細胞内オートファジー機構のマーカーである light chain (LC) 3- の LC3- の変換ならびに p62 発現、そして JNK1/2 のリン酸化についても、それぞれの抗体を用いたウエスタンブロッティングにて定量化を行った。

(2)抗酸化物質として知られている Astaxanthin(Ax)を 10μmol/L の濃度で PA 負荷の 20 分間から前処理した。(1)の条件下でさらに 24 時間培養のうえ、PA 負荷による諸指標への影響に対する Ax の効果を検討した。

4. 研究成果

(1)高濃度 PA の 24 時間負荷により、MIN6 細胞からの MCP-1 分泌は対照の 1.4 倍(同時に検討した ELISA 法でもその 1.3 倍)へと有意に増加した (p<0.05: 図 1A ならびに 1B)。内因性酸化ストレスの細胞内ヒドロパーオキシサイトも、同時に対照の 2.7 倍へと有意な増大を示した (p<0.05)。一方で Ax の前処理は、細胞からの MCP-1 分泌を有意に抑制する (図 1A ならびに 1B) とともに、内因性酸化ストレスも同時に有意に減弱させた (p<0.01)。また MCP-1mRNA 発現に関して、PA 負荷による 1.3 倍の有意な増強 (p<0.01) を、Ax は明らかに抑制した (p<0.01: 図 1C)。さらに細胞内小胞体ストレスについても、細胞内 CHOP 含有量を PA 負荷は対照の 1.5 倍へと明らかに増加 (p<0.05) させたが、Ax により明らかな抑制を認めた (p<0.05)。

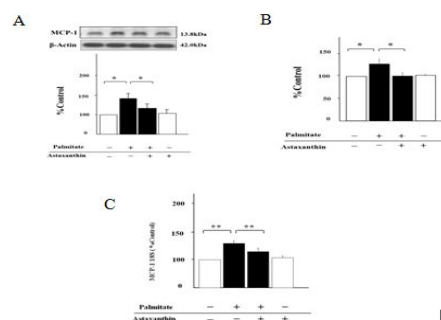


図1

(2)そこで(1)の機序を明らかにするために、JNK 阻害薬 SP600125 (10μmol/L) を加えたところ細胞からの MCP-1 分泌は対照の PA 単独群に比し有意に低下した (p<0.05: 図 2A) さらに JNK のリン酸化についても検討を加えたところ (図 2B) PA 負荷により有意に増強 (p<0.01) された JNK リン酸を、SP600125 は有意に抑制した (p<0.01)。同様に Ax も、この増強された JNK リン酸を有意に抑制した (p<0.01: 図 2C)。

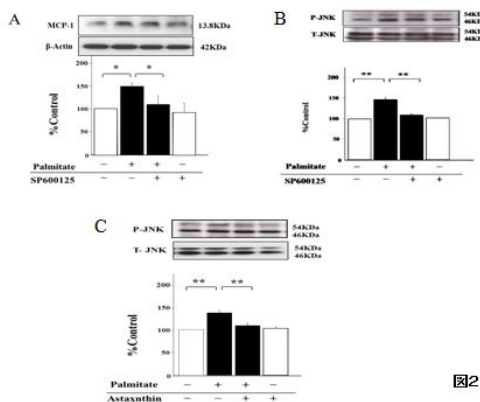


図2

(3) 一方で細胞防御系と考えられる細胞内オートファジー機構に関しては、そのマーカーである LC3- から への変換を、PA 負荷は代償的に増強 ($p < 0.01$) したものの、Ax の前処理によりその有意な抑制を認めている ($p < 0.01$: 図 3A)。同様に重要なマーカーとして知られている p62 についても PA 負荷にて明らかに増強 ($p < 0.05$) を認めたものの、Ax 前処理によるその抑制を確認している ($p < 0.05$: 図 3B)。

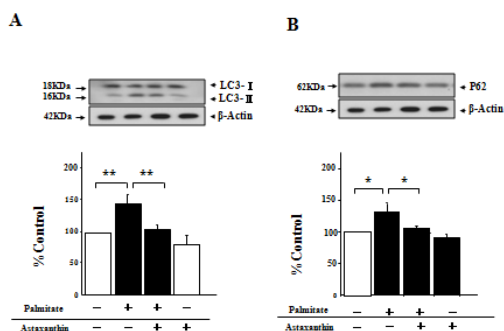


図3

以上により、抗酸化物質の Astaxanthin は、内因性酸化ストレスの減弱により JNK 経路の抑制を介して膵細胞保護作用を発揮する可能性が推察されるものの、一方で、細胞防御系と考えられるオートファジー機構に関しては、その酸化ストレスに対する代償的な増強を、二次的に解除する方向に作用するものと考えられた。

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 9 件)

A.Kitahara, K.Takahashi, R.Moriya 他 7 名 10 番目、 Ghrelin augments the expressions and secretions of proinflammatory adipokines, VEGF120 and MCP-1, in differentiated 3T3-L1 adipocytes., *J Cell Physiol*, 査読有、230、

2015、199-209.

doi: 10.1002/jcp.24699.

J.Ogasawara, T.Izawa, T.Sakurai 他 6 名 7 番目、 Habitual exercise training acts as a physiological stimulator for constant activation of lipolytic enzymes in primary white adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有、464、2015、348-353. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.157.

H.Katsuta, S.Ozawa, K.Suzuki 他 7 名 10 番目、 The association between impaired proinsulin processing and type 2 diabetes mellitus in non-obese Japanese individuals. *Endocr J*, 査読有、62、2015、485-492. doi: 10.1507/endocrj.EJ14-0611.

K.Hirota, H.Keino, M.Inoue, H.Ishida, and A.Hirakata. Comparisons of microRNA expression profiles in vitreous humor between eyes with macular hole and eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 査読有、253、2015、335-342, doi: 10.1007/s00417-014-2692-5.

H.Onuma, K.Inukai, A.Kitahara 他 8 名 11 番目、 The glucagon-like peptide 1 receptor agonist enhances intrinsic peroxisome proliferator-activated receptor activity in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 査読有、451、2014、339-344. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.136.

K.Handa, K.Inukai, H.Onuma 他 11 名 14 番目、 Long-term low carbohydrate diet leads to deleterious metabolic manifestations in diabetic mice. *PLoS One*. 査読有、9(8)、2014、e104948. doi: 10.1371/journal.pone.0104948.

S.Ozawa, H.Katsuta, K.Suzuki 他 6 名 9 番目、 Estimated proinsulin processing activity of prohormone convertase (PC) 1/3 rather than PC2 is decreased in pancreatic β -cells of type 2 diabetic patients. *Endocr J*, 査読有、61(6)、2014、607-614. https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj/61/6/61_EJ13-0506/_article

R.Moriya, K.Takahashi, A.Kitahara 他 9 名 12 番目、 Possible involvement of PI3K-dependent pathways in the increased VEGF120 release from osteoblastic cells preloaded with palmitate. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有、445、2014、275-281. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.120.

K.Takahashi, K.Miyokawa-Gorin, K.Handa
他 10 名 13 番目、Endogenous oxidative
stress, but not ER stress, induces
hypoxia-independent VEGF120 release
through PI3K-dependent pathways in 3T3-L1
adipocytes. Obesity, 査読有、21、2013、
1615-1624.
doi: 10.1002/oby.20206.

〔学会発表〕(計 10 件)

森谷理恵,高橋和人,北原敦子,炭谷由計,
小沼裕寿,田中利明,勝田秀紀,西田進,近
藤琢磨,保坂利男,犬飼浩二,石田均:パル
ミチン酸負荷による骨芽細胞からの
VEGF120 分泌増大には PI3K 依存性の経路
が関与している可能性がある.第 58 回日本
糖尿病学会年次学術集会、2015 年 5 月 21 日
23 日、海峡メッセ下関(下関)

小沼裕寿,犬飼浩二,北原敦子,森谷理恵,
石本麻衣,高橋聡,炭谷由計,高橋和人,勝
田秀紀,田中利明,西田進,保坂利男,石田
均:GLP-1 受容体アゴニストによる PPAR
活性化代謝経路の検討.第 58 回日本糖尿病
学会年次学術集会、2015 年 5 月 21 日 23
日、海峡メッセ下関(下関)

勝田秀紀,近藤琢磨,石本麻衣,森田奈瑠,
村嶋俊隆,小沼裕寿,森谷理恵,高橋和人,
田中利明,鈴木清,保坂利男,犬飼浩二,石
田均:2 型糖尿病治療別に見るプロインス
リンプロセッシング機構の回復.第 58 回日本糖
尿病学会年次学術集会、2015 年 5 月 21 日
23 日、海峡メッセ下関(下関)

北原敦子,近藤琢磨,高橋和人,村嶋俊隆,
森田奈瑠,小沼裕寿,炭谷由計,田中利明,
勝田秀紀,保坂利男,犬飼浩二,石田均:膵
細胞の酸化ストレス下におけるオートフ
ァジー機構の意義とアスタキサンチンの保
護作用の検討.第 58 回日本糖尿病学会年次
学術集会、2015 年 5 月 21 日-23 日、海峡メ
ッセ下関(下関)

Kitahara A, Takahashi K, Moriya R, Onuma
H, Handa K, Sumitani Y, Tanaka T, Katsuta
H, Nishida S, Sakurai T, Inukai K, Ohno H,
Ishida H. Direct action of ghrelin enhance
the secretions of proinflammatory
adipokines from mature 3T3-L1 adipocytes
in vitro. The American Diabetes
Association's 73rd Scientific Sessions,
June 13- 17. 2014. San Francisco (USA)

Moriya R, Takahashi K, Kitahara A, Onuma
H, Handa K, Sumitani Y, Tanaka T, Katsuta
H, Nishida S, Itagaki E, Inukai K, Ishida
H: VEGF₁₂₀ secretion from
palmitate-preloaded osteoblastic cells is

enhanced through the activation of
PI3K-dependent pathways. The American
Diabetes Association's 73rd Scientific
Sessions, June 13- 17. 2014. San Francisco
(USA)

高橋和人,森田理恵,北原敦子,半田桂子,
小沼裕寿,村嶋俊隆,炭谷由計,田中利明,
勝田秀紀,西田進,犬飼浩二,石田均:糖尿
病での骨代謝異常における基盤病態の解明
とそれに対する温熱処理の影響の検討.第 57
回日本糖尿病学会年次学術集会,大阪国際会
議場(大阪),平成 26 年 5 月 22 日-24 日.

北原敦子,高橋和人,森谷理恵,小沼裕寿,
半田桂子,森田奈瑠,石本麻衣,炭谷由計,
田中利明,勝田秀紀,西田進,犬飼浩二,石
田均:膵細胞保護効果に対するアスタキサ
ンチンの細胞内作用機構に関する検討 ケ
モカインの MCP-1 の分泌動態への影響 .第
57 回日本糖尿病学会年次学術集会,大阪国際
会議場(大阪),平成 26 年 5 月 22 日-24 日.

高橋和人,北原敦子,森谷理恵,五林可織,
半田桂子,小沼裕寿,炭谷由計,田中利明,
勝田秀紀,西田進,犬飼浩二,石田均:肥大
化脂肪細胞からの完全分泌型 VEGF₁₂₀ の低酸
素非依存的分泌制御機構の解明.第 56 回日
本糖尿病学会年次学術集会,ホテル日航熊本
(熊本),平成 25 年 5 月 17 日-19 日.

北原敦子,高橋和人,五林可織,半田桂子,
森谷理恵,小沼裕寿,炭谷由計,田中利明,
勝田秀紀,西田進,板垣英二,犬飼浩二,石
田均:グレリンによる脂肪細胞からのアディ
ポカイン分泌制御機構 MCP-1 ならびに
VEGF₁₂₀ 分泌の促進作用とその分子機構の解
明.第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会,
ホテル日航熊本(熊本),平成 25 年 5 月 17
日-19 日.

〔図書〕(計 2 件)

志村二三夫,石田均.人体の構造と機能
及び疾病の成り立ち 1.建帛社、東京、2016.
204p

志村二三夫,石田均.人体の構造と機能
及び疾病の成り立ち 2.建帛社、東京、2015.
283p

〔その他〕

杏林大学医学部第三内科学教室ウェブペ
ージ

[http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/graduate/m
edicine/education/departments/intern-med3
/](http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/graduate/m
edicine/education/departments/intern-med3
/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 均 (ISHIDA, Hitoshi)
杏林大学医学部・教授
研究者番号：80212893

(2) 研究分担者

犬飼 浩一 (INUKAI, Koichi)
杏林大学医学部・准教授
研究者番号：20333007
(平成 27 年 5 月 19 日付削除承認済)