

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293152

研究課題名(和文) アルギナーゼI制御による糖尿病性血管障害及び動脈硬化の予防

研究課題名(英文) Prevention of diabetic vascular injury and atherosclerosis

研究代表者

荻野 景規 (Ogino, Keiki)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：70204104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：肺の慢性炎症である喘息において、実験動物及びヒト疾患のどちらでも血清中のアルギナーゼIが上昇していることを証明し、肺の炎症組織から由来し上昇したアルギナーゼIは、血清中のアミノ酸であるアルギニンを消費低下させる。その結果、気管支を拡張させる為の一酸化窒素合成酵素(NOS)による一酸化窒素(NO)の産生が低下し、喘息病態が悪化する。さらに、健診で、血清アルギナーゼIは、酸化ストレスマーカー(8-OHdG)と正の関連性を有し、アルギニンと負の関連性を有し、血清アルギニン及び血管内皮細胞のNO産生を制御し、動脈硬化に関与していることが判明した。

研究成果の概要(英文)：In asthma, serum arginase I was augmented in human study and experimental mice model. Elevated serum arginase I derived from inflammatory lung reduced L-arginine levels and reduced NO generation in bronchial smooth muscle. Moreover, serum arginase I was positively associated with 8-OHdG, a biomarker of oxidative stress and negatively associated with L-arginine. Therefore, serum arginase I may associated with atherosclerosis by regulating serum L-arginine levels and NO in vascular endothelial cells.

研究分野：分子予防医学

キーワード：アルギナーゼ NO アルギニン 喘息 酸化ストレスマーカー

1. 研究開始当初の背景

動物実験

アルギナーゼは、肝臓に発現する I 型と腎臓のミトコンドリアに発現する II 型があり、尿素回路を形成し、アンモニアを解毒する機能を持っている。この酵素が、実験喘息モデルの肺組織に強発現することが mRNA で示された(Zimmermann N, J Clin Invest, 111:1863, 2003)。我々は、独自開発した喘息モデル(Life Sciences, 78: 987, 2006)を用い、世界で最初にアルギナーゼ I の免疫組織学誘導発現及びアルギナーゼの血清活性上昇を証明し(Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 293: L1419, 2007)、さらにアルギナーゼ阻害剤(nor-NOHA)で喘息病態の改善を認め (Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 299:L17, 2010)、nor-NOHA にステロイドとは異なる炎症抑制作用があることを認めた(Inflammation, 36: 141, 2013)。潰瘍性大腸炎モデルでアルギナーゼ I の誘導と nor-NOHA による炎症抑制作用を検証した(Free Radic Res, 47: 137, 2013)。慢性炎症性疾患においてアルギナーゼ I の発現が NO 合成酵素(NOS)と共通基質である L-arginine を消費し、気管支拡張や血管拡張作用に必要な NO の不足を介して活性酸素種 (O_2^-) を消去する役割の減弱又は L-arginine の低下に伴う NOS の uncoupling (L-arginine が低下すると NOS が 2 量体に coupling できず NO の産生ができなくなり、 O_2^- を産生する状態) を原因とする O_2^- の増加による酸化ストレスの増強が臓器の血管障害や炎症に関与している可能性を証明した。そこで、低レベル持続性炎症として知られている肥満、糖尿病病態におけるアルギナーゼの役割を、高カロリー食により肥満から糖尿病を発症する C57BL/6J マウスで検討した結果、肥満により血糖値が上昇し、アルギナーゼ I の発現が誘導され、L-arginine が消費され、NO 産生が減少し、血管障害が発生する可能性が示唆された。血清アルギナーゼ I の誘導発現部位と L-arginine 制御部位の特定により、糖尿病性血管障害や動脈硬化の予防が可能となる。

一方、肥満、糖尿病で、inflammasome と呼ばれる蛋白質複合体(NLRP3、caspase-1、ASC)の NLRP3 (NOD-like receptors の一種) が形成され、caspase-1 を活性化し、活性化 caspase-1 が pro IL-1 β を活性化型 IL-1 β に分解し、炎症性サイトカイン IL-1 β が分泌され、組織に炎症反応を引き起こすことが知られているが、アルギナーゼ I と NLRP3

inflammasome の関連性は未だ報告がない。

疫学

健康成人を対象にした疫学研究で、市販のアルギナーゼ I の ELISA と我々が新たに開発した ELISA を用い、どちらの ELISA も血清アルギナーゼ I 値が尿中酸化ストレスバイオマーカー(8-OHdG)と正の関連性、血清インスリンと負の関連性を認め、新たに開発したアルギナーゼ I の ELISA の有用性を認めると共に、アルギナーゼ I の発現誘導に酸化ストレスとインスリンが関与し、糖尿病の発症又は病態に関与する可能性を示唆した(Free Radic Res, 45: 147, 2011; Clin Biochem, 2013, 46:1717-1722)。さらに、138 名の健常者の疫学研究で、血清アルギナーゼ I が血清酸化ストレスバイオマーカーであるニトロチロシンと正の関連性、血清 L-arginine と負の関連性を認め、血清アルギナーゼにより血清 L-arginine が低下することにより NO 合成酵素(NOS)から uncoupling により活性酸素種(O_2^-)が産生される可能性を疫学研究で初めて指摘した(Free Radic Res, 2014, 48:137-145)。血清アルギナーゼ I と L-arginine の負の関連性は、223 名の企業従事健康成人、166 名の喘息患者(Free Radic Res, 2016, 50:1165-1172)、205 名の糖尿病患者でも認めている(未発表)。さらに、企業従事健康成人では、アルギナーゼ I は HDL-コレステロールと負の関連性、BMI 及び IL-1 β と **正**の関連性を認めた(Nitric oxide, 投稿中)。IL-1 β 産生を中心とする自然免疫系の機序である NLRP3 inflammasome との関連でアルギナーゼ I が、血管内皮細胞の炎症及び動脈硬化と関連する可能性を認めている。

2. 研究の目的

持続的血糖上昇及び低レベル持続的炎症により誘導上昇するアルギナーゼ I を制御することにより、新しい世界に先駆けた糖尿病性血管障害の予防法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

- 1) 糖尿病発症マウスにおいて、アルギナーゼ I の誘導部位を、分子イメージング技術を用いて特定し、さらに血清アルギナーゼ I による L-arginine 制御部位を特定する。
- 2) 企業従事者及び糖尿病患者を対象とし、血清アルギナーゼ I による L-arginine 消費による NOS の uncoupling 現象を検証し、NOS の uncoupling の測定と糖尿

- 病性血管障害との関連性を検証する。
- 3) 糖負荷によるヒトアルギナーゼ I の誘導機序を NLRP3 inflammasome との関連で検証する。
 - 4) アルギナーゼ I 高発現遺伝子改変マウスを作製し、アルギナーゼ I と血管障害との関係を検証する。
 - 5) 新しいアルギナーゼ阻害剤の開発により糖尿病性血管障害の予防効果を検証する。

4. 研究成果

1) 高脂肪食 12 週摂取肥満マウスにおいて、血糖上昇、血漿におけるインスリン抵抗性、アルギナーゼ活性、血漿アルギナーゼ I の上昇、アルギニンの低下、NO₂-の低下等を認め、アルギナーゼとアルギニンの負の関連性が認められた。さらに、高脂肪食 8 週摂取の軽度肥満マウスにおいて、血糖値に異常がない段階で、血清アルギナーゼ I が上昇し、肝臓、体脂肪、腹膜脂肪、筋肉のアルギナーゼ I に mRNA を解析し、肝臓での発現上昇を認めた。肝臓のアルギナーゼ I の蛋白発現と血清のアルギナーゼ I の量が正の相関を示し、肝臓のアルギナーゼ I 蛋白量と肝臓のアルギニン量とが負の相関を示した。以上より、肥満における血清アルギナーゼ I の上昇は、肝臓から由来し、循環血中でアルギニンを消費し、血清 NO_x の低下を招き、最終的に血管内皮細胞障害から動脈硬化に関与している可能性が示された。

2) 健診による健康成人で、血清中アルギナーゼ I がアルギニンと負の関連性を示すことは、これまで証明してきた。この関連性を喘息患者で検討したところ、喘息患者では、アルギナーゼ I が高値を示し、男性でアルギニンと負の関連性を示し、血清アルギナーゼ I が高くなると血清アルギニンを消費していることが示された。健診受診の企業労働者の仕事ストレス(JCQ)を質問紙で行い、血清アルギナーゼ I との関連性を検討した。その結果、女性の仕事ストレスとアルギナーゼ I は、負の関連性があり、仕事このコントロール及び社会的サポートと正の関連性が求められ、アルギナーゼ I は、女性の仕事ストレス評価の指標となる可能性が認められた。

3) 血清アルギナーゼ I によるアルギニン消費による一酸化窒素合成酵素(NOS)の uncoupling の検証のため、健診者血清を用いアルギナーゼ I、アルギニン、3-ニトロチロシンの関連性を検討し、アルギナーゼ I の上昇によりアルギニンが低下し、酸化ストレスバイオマーカーである 3-ニトロチロシンが上昇する関係が認められ、アルギナーゼ I の上昇は、NOS の uncoupling を引き起こし、酸化ストレスを引き起こすことが証明された。

4) ヒト肝がん由来細胞 HepG2 を用いて、グルコース負荷とアルギナーゼ発現の関連性を検討し、高グルコース負荷 4 8 時間後にアルギナーゼ I が誘導され、同時に MAPK キナーゼの p38 もリン酸化され、p38 阻害剤である SB203580 添加で、アルギナーゼ I の誘導が阻害された。すなわち、肥満による高血糖によりアルギナーゼ I が上昇することには、p38MAPK が関与している可能性が示された。

5) Caeslpina sappan 抽出物をインドネシア大学との共同研究で、精製抽出してアルギナーゼ阻害剤の開発を検討する予定であったが、0.1 mg/ml で抑制率 50~60%であり、有名な阻害剤 nor-NOHA (0.3 µg/ml ; 68%阻害)には及ばないことが判明した。そこで、いろんな野菜や生薬(25 種類)を抽出し、検討した結果、タマネギの果皮にアルギナーゼ活性阻害作用の強いものが存在する可能性が認められた。

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 6 件)

Setiawan H, Nagaoka K, Kubo M, Fujikura Y, Ogino K, Involvement of xanthine oxidoreductase-related oxidative stress in a Dermatophagoides farinae-induced asthma model of NC/Nga mice, Acta Med Okayama, 査読有, 70(3), 2016, 175-82

Ogino K, Obase Y, Ito T, Fujimura M, Eguchi E, Kubo M, Nagaoka K, Nakamura H, Relationship between serum arginase I and l-arginine or exhaled nitric oxide in asthma. Free Radic Res, 査読有, 50(11), 2016, 1165-1172

doi: 10.1080/10715762.2016.1202407

Murakami I, Zhang R, Kubo M, Nagaoka K, Eguchi E, Ogino K, Rebamipide suppresses mite-induced asthmatic responses in NC/Nga mice, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 査読有, 309(8), 2015, L872-8
doi: 10.1152/ajplung.00194.2015

坊垣知佳, 張燃, ヘリセティアワン, 久保正幸, 江口依里, 荻野景規: 野菜摂取による血圧降下作用に関する研究. 日本予防医学会雑誌, 査読有, 10, 2015, 9-17

Zhang R, Kubo M, Murakami I, Setiawan H, Takemoto K, Inoue K, Fujikura Y, Ogino K, L-Arginine administration attenuates airway inflammation by altering l-arginine metabolism in an NC/Nga mouse model of asthma, J Clin Biochem Nutr, 査読有, 56(3), 2015, 201-7

doi: 10.3164/jcbtn.14-140

[学会発表](計 14 件)

保田志音, 長岡憲次郎, 久保正幸, 江口

依里, 荻野景規: 食品及び生薬中に含まれるアルギナーゼ活性阻害成分の探索. 第 14 回日本予防医学会学術総会、2016年6月19日、日本科学未来館、東京

久保正幸, 長岡憲次郎, 舟久保徳美, Heri Setiawan, 岡瑛良, 江口依里, 伊藤達男, 藤倉義久, 荻野景規: 生活習慣病前におけるアルギナーゼとL-アルギニン代謝物のバイオマーカーとしての可能性: 初期肥満マウスでの検討. 第 14 回日本予防医学会学術総会、2016年6月18日、日本科学未来館、東京

久保正幸, 長岡憲次郎, 舟久保徳美, ヘリセティアワン, 岡瑛良, 江口依里, 伊藤達男, 藤倉義久, 荻野景規: 初期肥満マウスでは肝臓アルギナーゼの発現が増加し、血中アルギニン代謝が変化する. 第 86 回日本衛生学会学術総会、2016年5月12日、旭川市民文化会館、北海道 旭川市

村上育郎, 張燃, 久保正幸, 荻野景規: ダニ誘発マウス喘息モデルに対する rebamipide の効果. 第 85 回日本衛生学会学術総会、平成 27 年 3 月 28 日、和歌山県民文化会館、和歌山市

舟久保徳美, ヘリセティアワン, 久保正幸, 竹本圭, 張燃, 長岡憲次郎, 吉田純子, 築山依果, 江口依里, 荻野景規: 肥満におけるアルギナーゼ動態とスタチンの作用について. 第 85 回日本衛生学会学術総会、平成 27 年 3 月 28 日、和歌山県民文化会館、和歌山市

張燃, 久保正幸, 村上育郎, ヘリセティアワン, 竹本圭, 江口依里, 長岡憲次郎, 井上清美, 藤倉義久, 荻野景規: アルギニンによる NC/Nga マウス喘息の軽減作用. 第 85 回日本衛生学会学術総会、平成 27 年 3 月 28 日、ホテルアバローム紀の国、和歌山市

築山依果, 張燃, 舟久保徳美, ヘリセティアワン, 佐藤美恵, 安川純代, 久保正幸, 尾嶋賢次, 荻野景規: 運動負荷によるアルギニン・NO 代謝を介した血圧降下作用. 第 85 回日本衛生学会学術総会、平成 27 年 3 月 27 日、和歌山県民文化会館、和歌山市

築山依果, 荻野景規: 運動習慣が一酸化窒素(NO)を介して血圧に及ぼす影響. 第 73 回日本公衆衛生学会総会、2014年11月6日、宇都宮東武ホテルグランデ、栃木県

坊垣知佳, 張燃, ヘリセティアワン, 井上清美, 久保正幸, 竹本圭, 正富千絵, 荻野景規: 野菜摂取による血圧降下作用に関する研究. 第 12 回日本予防医学会学術総会、2014年6月29日、日本科学未来館 7 階未来館ホール、東京

築山依果, 張燃, 舟久保徳美, ヘリセティアワン, 佐藤美恵, 安川純代, 吉田純子, 鄒宇, 三宅優紀, 久保正幸, 高橋秀和, 井上清美, 荻野景規: ヘルスプロモーションとしての運動による指標づくりの検討. 第 12 回日本予防医学会学術総会、2014年6月29日、日本科学未来館 7 階未来館ホール、東京

Heri Setiawan, 汪達紘, 久保正幸, 閻付林, 高橋秀和, 張燃, 築山依果, 吉田純子, 鄒宇, 荻野景規: 健常労働者における血清アルギナーゼとL-アルギニン、ニトロチロシン、呼気NOの関連性. 第 84 回日本衛生学会学術総会、2014年5月26日、岡山コンベンションセンター、岡山市

村上育郎, 大本安一, 坂東政彦, ヘリセティアワン, 築山依果, 坂野紀子, 高橋秀和, 久保正幸, 汪達紘, 荻野景規: 日本人健常人集団における酸化ストレスバイオマーカーとしての血清 arginase-1 の評価. 第 84 回日本衛生学会学術総会、2014年5月26日、岡山コンベンションセンター、岡山市

舟久保徳美, 張燃, ヘリセティアワン, 汪達紘, 久保正幸, 竹本圭, 三宅優紀, 築山依果, 吉田純子, 井上清美, 坂野紀子, 正富千絵, 荻野景規: 血中のアルギニン、アルギナーゼとの関連性. 第 87 回日本産業衛生学会、2014年5月24日、岡山コンベンションセンター、岡山市

張燃, 竹本圭, 久保正幸, 吉田純子, 村上育郎, 鄒宇, ヘリセティアワン, 汪達紘, 荻野景規: ダニ蛋白誘発喘息モデルマウスにおけるアルギナーゼ阻害剤及びステロイド剤の抗炎症効果. 第 87 回日本産業衛生学会、2014年5月24日、岡山コンベンションセンター、岡山市

〔図書〕(計4件)

Keiki Ogino, Kei Takemoto, Humana Press, Serum arginase in healthy subject and nitric oxide in L-Arginine in Clinical Nutrition, 2016, 175-185

荻野景規他、メジカルレビュー社、THE LUNG perspectives、2015、Vol.23、71

Da-Hong Wang, Keiki Ogino, et al., Springer Reference, Urinary hydrogen peoxide as biomarker in General Methods in Biomarker Research and their applications, 2015, 313-327

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

荻野 景規 (OGINO keiki)
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：70204104

(2)研究分担者

長岡 憲次郎 (NAGAOKA kenjiro)
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：40752374

江口 依里 (EGUCHI eri)
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：60635118

杉山 斉 (SUGIYAMA hitoshi)
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：60325090

久保 正幸 (KUBO masayuki)
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：60420519

竹本 圭 (TAKEMOTO kei)
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：60723252