



誘導型NOS抑制による1型糖尿病の発症予防に関する研究

金, 貞子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2004-03-31

(Date of Publication)

2013-03-28

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2956

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002956>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



誘導型 NOS 抑制による 1 型糖尿病の 発症予防に関する研究

金 貞 子

神戸大学大学院医学系研究科老年内科学
(指導：横野 浩一 教授)

連絡先：金 貞子

神戸大学大学院医学系研究科老年内科学

Tel : (078)-382-5901

Fax : (078)-382-5919

(平成15年11月11日受付)

要 約

1 型糖尿病は、自己免疫反応により膵 β 細胞が破壊され発症に至ると考えられているが、その正確なメカニズムはいまだ不明である。現在 1 型糖尿病の膵 β 細胞傷害機構は (1) T 細胞による perforin-granzyme を介したネクローシスと Fas-FasL (Fas ligand) 経路を介したアポトーシス (2) サイトカインによる NO を介した細胞傷害機構の 2 種類に大別される。特に膵島炎における β 細胞の破壊は種々の活性酸素により引き起こされることが示唆されている。本研究は、新しい iNOS 阻害剤 (ONO-1714) を用いて、NO 産生を介した細胞傷害を抑制することにより自己免疫性膵 β 細胞傷害を抑制できるかどうかについて検討した。NOD マウス由来にインスリン α 細胞 MIN6N9a に 15mM STZ を加え 20 分間 ONO-1714 の存在下で培養を行なった。STZ 処置により NO の有意な増加を誘発したが ONO-1714 は NO 産生を抑制できなかった。一方、MIN6N9a 細胞を ONO-1714 存在下に IL-1 β 、TNF- α と IFN- γ で培養すると NO 産生は約 50% 減少した。1 型糖尿病のモデル動物である STZ 少量頻回投与マウスへの ONO-1714 の皮下注射はコントロール群と比較して、高血糖を抑制し、組織学的にも膵 β 島の破壊を抑制していた。これらの結果は NO 産生を介した細胞傷害が 1 型糖尿病における膵 β 細胞傷害機構の一つであることを示唆し、この経路の抑制が治療への可能性のひとつであることが示された。

緒 言

1 型糖尿病は膵 β 島のインスリンを分泌する β 細胞の自己免疫性破壊の結果と考えられている。(1s, 5s, 6R, 7R) -7-chloro-3-imino-5-methyl-2-azabicyclo-[4.1.0]heptane hydrochloride (ONO-1714) は新しい循環アミジン類似体でもっとも強力な iNOS 阻害剤である。一酸化窒素 (NO) は一酸化窒素合成酵素 (iNOS) により産生され、1 型糖尿病において免疫誘発された破壊のメディエーターとして考えられており、種々の自己免疫疾患の発症機構に NO の関与が報告されている^(1, 2)。膵臓から単離した β 島、あるいは膵 β 細胞は *in vitro* でサイトカイン存在下に iNOS mRNA が発現される⁽³⁾。幾つかの研究では iNOS 阻害剤がサイトカインによるヒト膵 β 島の機能的抑制を阻止することを示唆している^(4, 5, 6)。しかし、これらの研究で用いられたアミノグアニジンなどの阻害剤はヒトに有害であり、臨床応用することはできない。さらに最近の研究では iNOS ノックアウトマウス (iNOS^{-/-} mice) では STZ 少量頻回投与 (MLDS) による糖尿病の発症が阻止され、*in vitro* で (IL)-1 β によるインスリン分泌の抑制も阻止された⁽⁷⁾。一方、サイトカインによる β 細胞傷害は NO 非依存性メカニズムによるものであるとの報告もあり^(8, 9, 10)、実際、げっ歯類動物モデルにおいても iNOS 阻害剤が糖尿病発症に対して効果を示さなかったと報告されている^(11, 12)。本実験で我々はヒトに応用可能である新しい iNOS 阻害剤 ONO-1714 を用い、1 型糖尿病モデルである少量頻回 STZ 投与マウスにおいてその効果を検討した。

キーワード：1 型糖尿病, ONO-1714, ストレプトゾトシン, iNOS

方 法

動物

C57BL/6 マウス(8 週齢, 雄性)は Charles-River (Atsugi) から購入した。またすべての動物は神戸大学医学部附属動物実験棟で飼育した。

MTT assay

NOD マウス由来インスリノーマ細胞 (MIN6N9a) は37°C, 5% CO₂ 存在下で 10% fetal bovine serum を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で培養した。MIN6N9a 細胞は 96-穴培養プレート(5 × 10⁴/well) を用いて 5mM STZ を加え 18 時間, または, tumor necrosis factor- α (TNF- α , ENDOGEN MA USA), interleukin-1 β (IL-1 β , ENDOGEN MA USA) と interferon- γ (IFN- γ , Minneapolis MN USA) を各々 100ng/ml ずつ添加し, 0.1 μ g/ml ~ 10 μ g/ml ONO-1714 の存在下で 72h 培養を行った。それぞれ 18 時間, 72 時間後各々ウエルへ 5mg/ml MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyl tetrazolium bromide SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH) 10 μ l を加え, 4h 培養を行った。次に DMSO (Dimethyl Sulfoxide) 150 μ l ずつ加え, ピペッティングにて暗青色の結晶を完全に溶解させた。マイクロプレートリーダーを用いて, レファレンスとして 630nm を用い, 570 nm の吸光度で測定した。

NO 測定

MIN6N9a 細胞は 0.1 μ g/ml ~ 100 μ g/ml ONO-1714 と共に 15mM STZ 存在下で 20 分, あるいは上記 3 種類のサイトカインを加え 72 時間培養した。80 μ l 上清を採取し, 10 μ l Cofactor と硝酸還元酵素を加え, 室温で 3 時間培養した。3 時間後, 50 μ l の グリース Reagent R1 と R2 を加え, 室温で 10 分放置した。プレート reader を使用して 540nm で吸光度測定し, 標準曲線に基づき一酸化窒素の産生量を計算した。

STZ 少量頻回投与と 1 型糖尿病モデルマウス

Streptozotocin (和光 chemicals USA, Inc) 40mg/kg 体重を 8 週齢の雄性 C57BL/6 マウスに 5 日間連続腹腔内注射した。ONO-1714 は 300 μ g/kg 体重を 34 日間連日皮下注射した。コントロールマウスには Hanks' Balanced Salt Solutions (HBSS⁻) を 200 μ l ずつ注射した。35 日までマウスの空腹時血糖を測定した。35 日目にすべてのマウスの膵臓を採取し, 10% ホルマリン液で固定した。パラフィン包埋後, 5 μ m の組織片を作成し, ヘマトキシリンとエオジン (H&E) で染色した。

統計処理

実験結果は平均値 ± 標準偏差で示し, 群間の有意差検定は Mann-Whitney 検定に従った。P 値 < 0.05 を有意差ありと判定した。

結 果

[ONO-1714 によるサイトカイン誘導インスリノーマ細胞死の抑制]

サイトカインで誘導されたインスリノーマ細胞死に対する ONO-1714 の効果を調べるために, MIN6N9a 細胞を TNF- α (100ng/ml), IL-1 β (100ng/ml) と IFN- γ (100ng/ml) で培養して, MTT 測定法を行なった。ONO-1714 により STZ による細胞死は抑制できなかったが (Fig. 1A), サイトカインによる細胞死は約 50% 抑制された (Fig. 1B)。

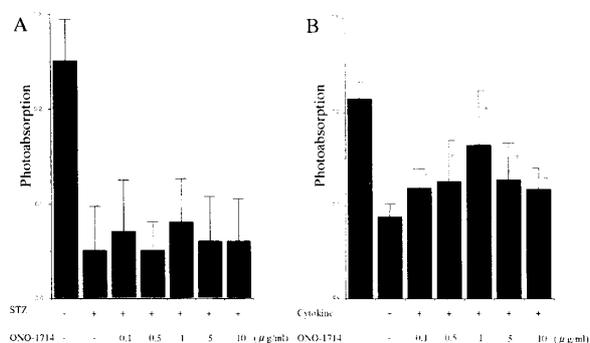


Fig 1: ONO-1714 によるサイトカイン誘導 MIN6N9a 細胞死の抑制: (A) 5 mM STZ と ONO-1714 (0.1-10 μ g/ml) の共培養 (B) 100 ng/ml の IL-1 β + TNF- α + IFN- γ と ONO-1714 (0.1-10 μ g/ml) の共培養 *p < 0.01 VS control. n = 10

[ONO-1714 による NO 産生の抑制]

ONO-1714 による効果を確認するために一酸化窒素の産生量を Greiss 反応で測定した。MIN6N9a 細胞を STZ (15mM) と ONO-1714 共存下 20 分培養した。ONO-1714 は STZ による NO の産生を抑制できなかった (Fig 2A)。一方, ONO-1714 はサイトカインによる NO 産生を濃度依存性に抑制し, その最大効果は 1 μ g/ml で認められた (Fig 2B)。

[STZ 誘発糖尿病における ONO-1714 の抑制効果]

C57BL/6 マウスに ONO-1714 と共に STZ を投与した。STZ 誘発糖尿病発症系では ONO-1714 の投与群でコントロール比較して, 著明な高血糖の抑制が認められた (Fig 3)。

[STZ による膵ラ島の破壊]

STZ を少量頻回投与した C57BL/6 マウスの 35 日後の膵所見では膵ラ島は破壊縮小し, 小さな膵ラ島のみが観察された (Fig 4A)。一方, ONO-1714 投与を行

なったマウスでは比較的大きな膵ラ島が認められ、膵ラ島破壊が抑制されていることが確認された(Fig4B)。

考 察

STZはアルキル化剤として、また H_2O_2 の産生を増加させることにより、 β 細胞のDNAを障害し糖尿病を誘発させると考えられている⁽¹³⁾。一方、STZは構造中にNO基を有しており、STZによる細胞傷害にNOも関与している可能性が考えられている。少量頻回STZ投与糖尿病(MLDS)は直接膵 β 細胞を一部傷害し、続いて局所の炎症と単核細胞の浸潤をもたらす、ついには β 細胞の破壊により糖尿病を発症する1型糖尿病のモデル動物と考えられている。我々の研究では新しいiNOS阻害剤ONO-1714はSTZによるMIN6N9a細胞毒性を抑制できなかったが、サイトカインによる細胞傷害は抑制し得た。これまで1型糖尿病の膵島炎における β 細胞の破壊機構にNOが関与していることが示唆されている^(14, 15)。マクロファージなどの浸潤細胞は膵島炎の局所で活性化され、マクロファージに誘導型NOSが産生されてL-アルギニンからNOが合成される。またIL-1 β などによって β 細胞内にも誘導型NOSが産生されてNOが合成される。生理的に存在している少量のNOはインスリン分泌など重要な働きをしていると考えられているが、サイトカインなどによって誘導されたiNOSは β 細胞内に大量のNOを産生して直接細胞傷害をもたらすことが知られている^(16, 17)。本研究において用いたiNOS阻害剤はインスリン α 細胞からのサイトカインによるNO産生を約50%抑制し細胞傷害性を抑制したことから、後者をONO-1714は有効に抑制することが示唆される。ONO-1714によるマクロファージからのNO産生の抑制は今回の研究では示していないが、同様に抑制していることが示唆される。C57BL/6マウスコントロール群はMLDS投与後高血糖を発生し、糖尿病マウスの膵ラ島破壊像が見られたが、ONO-1714を

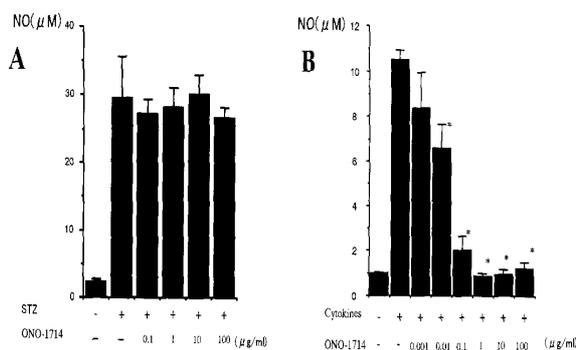


Fig 2: ONO-1714によるサイトカイン誘導MIN6N9a細胞由来NO産生の抑制：(A)15mM STZと0.1-100 μ g/ml ONO-1714の共培養 (B)100ng/mlのIL-1 β +TNF- α +IFN- γ と0.001-100 μ g/ml ONO-1714の共培養。n=10

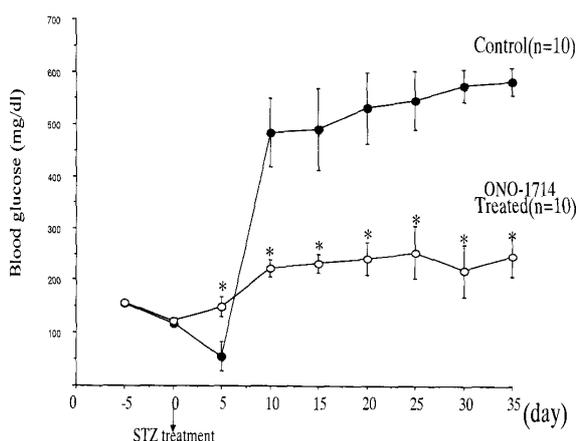


Fig 3: STZ誘発糖尿病におけるONO-1714の抑制効果：*P<0.01VSコントロール。

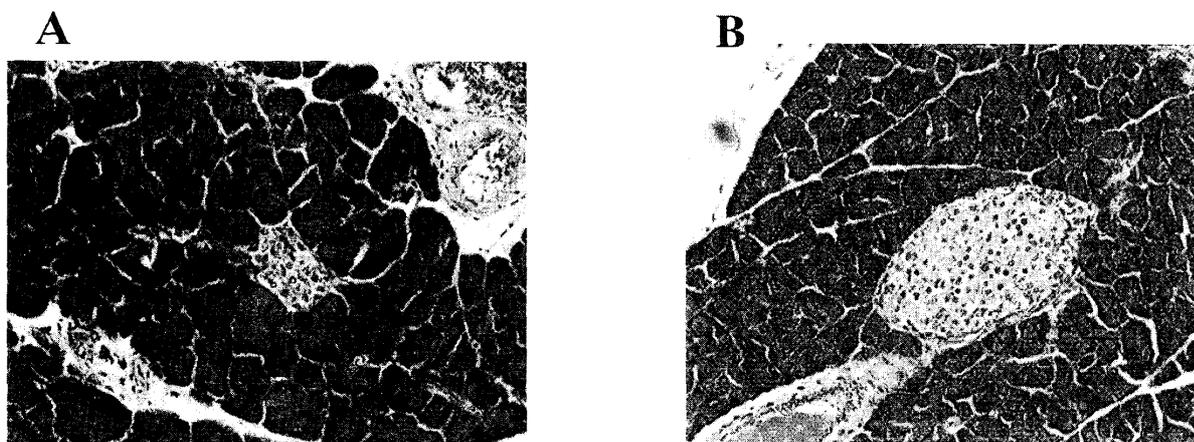


Fig 4: ONO-1714投与による高血糖抑制効果の膵組織学的検討 (HE染色)：(A)HBSS投与群(コントロール) (B) ONO-1714投与群

投与したマウスではコントロール群と比較して有意に血糖上昇が抑制され、正常に近い膵ラ島の残存が認められた。MLDS 誘発糖尿病における NO 抑制剤の保護作用はアミノグアニジン及び L-NMMA によっても報告されている⁽¹⁸⁾。さらに最近の研究は *iNos*^{-/-}マウスから分離されたラ島は STZ による傷害性を持つが、サイトカインによる傷害性を抑制し、少量頻回 STZ 投与後のラ島の β 細胞傷害を抑制することが報告されている⁽¹⁹⁾。また以前の研究でも少量頻回投与 STZ 動物モデルを用い、iNOS blocker 投与にて疾患の発症遅延あるいは予防が報告されている⁽²⁰⁾。しかしながら、アミノグアニジンや L-NMMA は生体には毒性があり、人には応用できない。一方、今回用いた ONO-1714 のような安全な iNOS 阻害剤はヒトに対しても安全であり、ヒトに応用可能である。

以上、本研究により iNOS 阻害剤 ONO-1714 はサイトカインによる NO を介した事故免疫性膵 β 細胞傷害の抑制に有用であり、ヒト 1 型糖尿病発症予防にも応用し得る可能性が示唆された。

謝 辞

今回の研究に際し多大なるご指導いただいた横野浩一博士、永田正男博士、及びご協力をいただいた神戸大学大学院医学系研究科老年内科学の方々に対し、心より深謝申し上げます。

文 献

1. Kroncke, K.-D., Fehsel, K., Kolb-Bachofen, V.: Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide: a small molecule with complex biological activities. *Biol Chem Hoppe-Seyler*. 376 : 327-343, 1995.
2. Cook, H., Cattell, V.: Role of nitric oxide in immune-mediated disease. *Clin Sci*. 91 : 375-384, 1996.
3. Eizirik, D.L., Flodstrom, M., Karlens, A.E., Welsh, N.: The harmony of the spheres: inducible nitric oxide synthase and related genes in pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 39 : 875-890, 1996.
4. Corbett, J.A., Sweetland, M., Wang, J., Lancaster, J.R., McDaniel, M.L.: Nitric Oxide mediates cytokine-induced inhibition of insulin secretion by human islets of Langerhans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90 : 1731-1735, 1993.
5. Scarim, A., Heitmeier, M., Corbett, J.: Irreversible inhibition of metabolic function and islet destruction after a 36-hour exposure to interleukin-1beta. *Endocrinology*. 138: 5301-5307, 1997.
6. Arnush, M., Heitmeyer, M., Scarim, A., Marino, M., Manning, P., Corbett, J.: IL-1 produced and released endogenously within human islets inhibits β -cell function. *J Clin Invest*. 102:516-526, 1998.
7. Flodstrom, M., Tyrberg, B., Eizirik, D.L., Sandler, S.: Reduced sensitivity of inducible nitric oxide synthase-deficient mice to multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes*. 48 : 706-713, 1999.
8. Suarez-Pinzon, W.L., Strynadka, K., Rabinovitch, A.: Destruction of rat pancreatic islet beta-cells by cytokines involves the production of cytotoxic aldehydes. *Endocrinology*. 137 : 5290-5296, 1996.
9. Flodstrom, M., Morris, S.M.L.r., Eizirik, D.L.: Role of the citrulline-nitric oxide cycle in the functional responses of adult human and rodent pancreatic islets to cytokines. *Cytokine*. 8 : 642-650, 1996.
10. Andersen, H.U., Jorgensen, K.H., Egeberg, J., Mandrup-poulsen, T., Nerup, J.: Nicotinamide prevents Interleukin-1 effects on accumulated insulin release and nitric oxide production in rat islets of Langerhans. *Diabetes*. 43 : 770-777, 1994.
11. Papaccio, G., Esposito, V., Latronico, M., Aurelio, Pisanti, F.: Administration of a nitric oxide synthase inhibitor dose not suppress low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Int. J. Pancreatol*. 17 : 63-68, 1995.
12. Bowman, M.A., Simell, O.G., Peck, A.B., Cornelius, J., Luchetta, R., Look, Z., Maclaren, N.K., Atkinson, M.A.: Pharmacokinetics of aminoguanidine administration and effects on the diabetes frequency in non-obese diabetic mice. *J. Pharmacol. Exp Ther*. 279 : 790-794, 1996.
13. LeDoux, S.P., Hall, C.R., Forbes, P.M., Patton, N.J., Wilson, G.L.: Mechanisms of nicotinamide and thymidine protection from alloxan

- and streptozocin toxicity. *Diabetes*. 37(8) : 1015-19,1988.
14. Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W.L., Sorensen, O., Bleackley, R.C.: Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in pancreatic islets of nonobese diabetic mice: identification of iNOS-expressing cells and relationships to cytokines expressed in the islets. *Endocrinology*. 137(5) : 2093-9, 1996.
 15. Suarez-Pinzon, W.L., Mabley, J.G., Strynadka, K., Power, R.F., Szabo, C., Rabinovitch, A.: An inhibitor of inducible nitric oxide synthase and scavenger of peroxynitrite prevents diabetes development in NOD mice. *J.Autoimmun.* 16 (4) : 449-55, 2001.
 16. McDaniel, M.L., Kwon, G., Hill, J.R., Marshall, C.A., Corbett, J.A.: Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med*. 211 (1) : 24-32, 1996.
 17. Tabatabaie, T., Vasquez-Weldon, A., Moore, D.R., Kotake, Y.: Free radicals and the pathogenesis of type 1 diabetes : beta-cell cytokine-mediated free radical generation via cyclooxygenase-2. *Diabetes*. 52 (8) 1994-9, 2003.
 18. Kwon, N.S., Lee, S.H., Choi, C.S., Kho, T., Lee, H.S.: Nitric oxide generation from streptozotocin. *FASEB J*. 8 (8) : 529-33, 1994.
 19. Flodstrom, M., Tyrberg, B., Eizirik, D.L., Sandler, S.: Reduced Sensitivity of Inducible Nitric Oxide Synthase Deficient Mice to Multiple Low-Dose Streptozotocin Induced Diabetes. *Diabetes*. 48 (4) : 706-13, 1999.
 20. Lukic, M.L, Stosic-Grujicic, S., Ostojic, N., Chan, W.L., Liew, F.Y.: Inhibition of nitric oxide generation affects the induction of diabetes by streptozotocin in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 178 : 913-920, 1991.

A study of prevention of Type 1 diabetes by inhibiting iNOS

Zhen Zi Jin

Division of Internal and Geriatric Medicine, Department of Development and Aging
Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, Japan

Abstract

Type 1 diabetes is caused mostly by autoimmune destruction of pancreatic β -cells, whose precise mechanism is still unknown. Two major effector mechanisms have been proposed ; direct cell-mediated and cytokine-mediated cytotoxicities. Cytokine-mediated β -cell destruction is presumed to be caused mainly by nitric oxide (NO) production. This study intended to evaluate whether NO contributes to animal models of type 1 diabetes by using a newly developed iNOS inhibitor (ONO-1714). We exposed MIN6N9a cells to STZ for 20min in the presence of ONO-1714. STZ induced a significant increase of NO production, and ONO-1714 failed to inhibit it. When ONO-1714 was added to insulinoma cells with IL-1 β , TNF- α , and IFN- γ , NO production was mostly inhibited and cytokine-mediated cytotoxicity was reduced by about 50% in vitro. Subcutaneous injection of ONO-1714 to multiple low-dose STZ-treated C57BL/6 mice reduced hyperglycemia and abrogated mononuclear cell infiltration to pancreatic islets. These results suggest that NO-mediated cytotoxicity is one mechanism of the destruction of pancreatic β -cells in type 1 diabetes, which can be effectively inhibited by a new iNOS inhibitor.