



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。



【 106 】

氏 名・(本 籍) 金 貞 子 (中国)
博士の専攻分野の名称 博士 (医学)
学 位 記 番 号 博い第1566号
学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当
学位授与の 日 付 平成16年3月31日

【 学位論文題目 】

A study of prevention of Type1 diabetes by inhibiting
iNOS

(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)

審 査 委 員

主 査 教 授 南 康博
教 授 横山 光宏
教 授 春日 雅人

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 マウス由来のインスリノーマ細胞 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-1β, 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、組織学的にも膵ラ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。

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℃、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-1β(IL-1β, ENDOGEN MA USA) と interferon-γ(IFN-γ, Minneapolis MN USA)を各々100ng/ml ずつ添加し、0.1 μg/ml~10 μg/ml ONO-1714 の存在下で 72h 培養を行った。それぞれ 18時間、72時間後各ウエルへ 5mg/ml MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH) 10 μl を加え、4 h 培養を行った。次に DMSO(Dimethyl

Sulfoxide)150 μ l ずつ加え、ピペ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、570nm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 of 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ン α 細胞死の抑制]

サイトカインで誘導されたインスリン α 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)。

[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(Fig2A)。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(Fig2B)。

[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と比較して、著明な高血糖の抑制が認められた(Fig3)。

[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(Fig4A)。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し、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マウスのコントロール群は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阻害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 を介した自己免疫性膵 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。

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲第 1567 号	氏名	金貞子
論文題目	A study of prevention of Type 1 diabetes by inhibiting iNOS 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		
審査委員	主査 南 康博 副査 北山 光弘 副査 春日 雅人		
審査終了日	平成 16 年 1 月 29 日		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

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。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マウス由来のインスリノーマ細胞MIN6N9aに15 mM 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-1β, 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、組織学的にも膵ラ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。

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、NODマウス由来のインスリノーマ細胞MIN6N9a細胞をTNF-α(100ng/ml), IL-1β(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、サイトカインによる細胞死は約50%抑制された。また、ONO-1714による効果を確認するために一酸化窒素(NO)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分培養したが、ONO-1714はSTZによるNOの産生を抑制できなかった。一方、ONO-1714はサイトカインによるNO産生を濃度依存的に抑制し、その最大効果は1μg/mlで認められた。

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と比較して、著明な高血糖の抑制が認められた。さらに、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。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。

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。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-1β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。本研究において用いたiNOS阻害剤はインスリノーマ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マウスのコントロール群は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。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。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。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を介した自己免疫性膵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。

本研究は、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細胞傷害を抑制出来るか否かについて、生体毒性の低い新しいiNOS阻害剤ONO-1714を用いて細胞・個体レベルで研究を行ったものであるが、従来ほとんど行われなかったiNOS阻害剤ONO-1714の少量頻回STZ投与糖尿病マウスへの効果について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。