



Title	Apoptotic Cell Death Triggered by Nitric Oxide in Pancreatic $\beta$ -cells
Author(s)	金藤, 秀明
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39902">https://hdl.handle.net/11094/39902</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	かね とう ひで あき 金 藤 秀 明
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 3 5 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 8 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	Apoptotic Cell Death Triggered by Nitric Oxide in Pancreatic $\beta$ - cells (一酸化窒素による膵 $\beta$ 細胞のアポトーシス)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 谷 口 直 之  (副査) 教 授 鎌 田 武 信    教 授 辻 本 賀 英

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【背景, 目的】

一酸化窒素 (NO) は活性酸素のひとつであり, 血管系, 免疫系, 神経系などに深く関与しており最近注目を浴びている。インスリン依存性糖尿病 (IDDM) では自己免疫性膵島炎によって膵  $\beta$  細胞が破壊されるが, この過程にも NO が深く関与している。  $\beta$  細胞において少量の 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, 大量の NO は  $\beta$  細胞機能を障害する。膵島炎の際は膵島に浸潤した活性化マクロファージから NO 合成酵素 (NOS) により NO が産生される。また膵島浸潤細胞からは種々のサイトカインが産生され, 特に IL-1  $\beta$  (interleukin-1  $\beta$ ) は NO を介して  $\beta$  細胞障害を引き起こし, 糖尿病発症の一つの機序に NO が関与していると考えられている。一方, 糖尿病誘発剤である STZ (streptozotocin) は構造中に NO 基を有しており, STZ による細胞障害にも NO が関与していると考えられる。本研究の目的は NO による  $\beta$  細胞障害機構を解明することである。

#### 【方法, 成績】

NO ドナーである SNAP (S-nitroso-N-acetylpenicillamine) や SNP (sodium nitroprusside) が, 膵  $\beta$  細胞株 HIT にアポトーシスを引き起こすことがアガロース電気泳動にて認められた。また IL-1  $\beta$  によって膵  $\beta$  細胞に誘導型 NO 合成酵素の mRNA が誘導されることがノーザンブロット法にて確認され, 培地中の  $\text{NO}_2^-$  の増加が Griess 法にて確認された。産生される NO の増加に伴って MTT 法にて cell viability の低下, 電気泳動にて ladder formation が認められた。また組織学的変化としては走査電顕にて微絨毛の消失, アポトーシス小体の出現, 透過電顕にてクロマチンの凝集, 核の断片化などが認められた。TNF- $\alpha$  は単独では NO を産生しないが, IL-1  $\beta$  と併用すると IL-1  $\beta$  による NO 産生が増強され, DNA 損傷もより著明に認められた。NMMA (N $^G$ -monomethyl-L-arginine), アミノグアニジンなどの NO 合成酵素阻害剤や蛋白合成阻害剤を同時に添加すると NO の産生が抑制され, それに伴って DNA 損傷や組織学的変化も抑制された。またさらにラットの総胆管より膵管にコラゲナーゼを注入し消化させた後, Ficoll gradient を利用して膵島を単離し, 同様の検討をした。その結果, 単離膵島も膵  $\beta$  細胞株 HIT と同様, SNAP や IL-1  $\beta$  によってアポトーシスが認められ, また NO 合成酵素阻害剤によって抑制された。このような結果から, NO を介したアポトーシスが膵島炎による  $\beta$  細胞破壊, 糖尿病発症の機序ではないかと考えられた。また糖尿病誘発剤である STZ によっても  $\beta$  細胞にアポトーシスが引き起こされた。  $\beta$  細胞に STZ を添加すると, 培地中の  $\text{NO}_2^-$  が増加し, 産生される NO の増加に伴って MTT 法にて cell viability

の低下、電気泳動にて ladder formation が認められ、またこれは NO 消去剤によって抑制された。このような結果から、STZ による  $\beta$  細胞破壊にも NO を介したアポトーシスが関与するのではないかと考えられた。

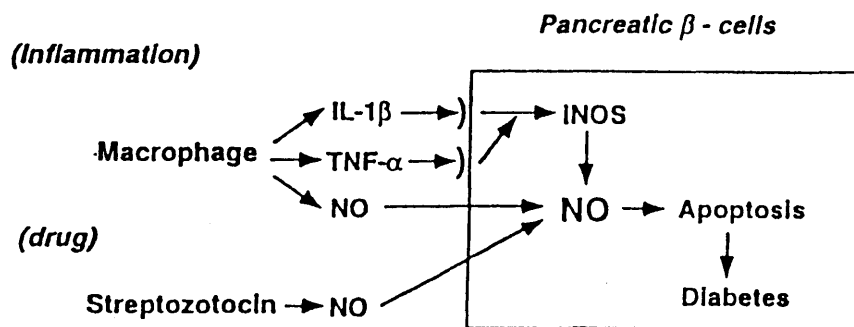
#### 【考察】

自己免疫性膵島炎などにおいて産生される活性酸素、特に NO によって  $\beta$  細胞が破壊され、インスリン依存性糖尿病 (IDDM) が発症すると考えられている。膵島に浸潤した活性化マクロファージから NO 合成酵素 (NOS) により NO が産生され、 $\beta$  細胞にアポトーシスが引き起こされる。また膵島浸潤細胞からは種々のサイトカインが産生されるが、特に IL-1  $\beta$  は  $\beta$  細胞障害性が強く、 $\beta$  細胞の誘導型 NOS の産生を介して NO が産生され、アポトーシスを引き起こす。

さらに NO は  $O_2^-$  と反応して  $ONOO^-$  が形成されるため、これもアポトーシスを引き起こすと考えられる。また NO によって DNA の切断が引き起こされ、これにより poly (ADP-ribose) 合成酵素を活性化させ、そのため基質の NAD が大量に使用されるので、細胞内の NAD が枯渇し細胞障害が引き起こされるとも考えられる。現に poly (ADP-ribose) 合成酵素の阻害剤であるニコチンアミドによる細胞障害の抑制も報告されている。いずれにしても NO を介したアポトーシスが糖尿病発症の契機になるのではないかと考えられる。従って、膵島炎などの際大量に産生される NO を抑制することにより、糖尿病の発症も抑制されるのではないかとと思われる。NMA はすべての NO 合成酵素を阻害してしまうため、インスリン分泌などに重要と考えられている生理的な NO 産生も抑制してしまうが、アミノグアニジンはサイトカインなどで誘導される NO 合成酵素のみを選択的に阻害するため、 $\beta$  細胞障害抑制効果が期待されるのではないかと考えられる。

#### 【総括】

NO を介したアポトーシスが自己免疫性膵島炎やストレプトゾトシンなどによる  $\beta$  細胞破壊、糖尿病発症の機序ではないかと考えられた。



糖尿病発症機構 (仮説)

#### 論文審査の結果の要旨

自己免疫性膵島炎によるインスリン依存性糖尿病 (IDDM) の発症に一酸化窒素 (NO) が関与していると考えられているが、不明な点が多く残されていた。本論文では、まず外因性および内因性の NO によって  $\beta$  細胞株 HIT にアポトーシスが引き起こされることを生化学的、形態学的に明らかにした。またさらにラットにより単離した膵島においても同様の現象が認められた。膵島炎の際は膵島に浸潤した活性化マクロファージから誘導型 NO 合成酵素により NO が産生され、また浸潤細胞から産生されるサイトカインは  $\beta$  細胞自体にも同様に NO 産生を促し、アポトーシスを引き起こす。以上の結果から NO を介したアポトーシスが IDDM 発症の本態である可能性が示唆された。従って、インスリン分泌などに関与する生理的な NO 産生を抑制することなく、膵島炎などの際に大量に産生される NO を抑制することにより、IDDM 発症の抑制も期待される。

以上のように、本論文は治療が非常に困難である IDDM の発症機構を解明しており、これを基に IDDM 発症を抑制できる可能性も有しており、学位の授与に値すると考えられる。