

Title	Overexpression of the Aldose Reductase Gene Induces Apoptosis in Pancreatic $\beta$ -Cells by Causing a Redox Imbalance
Author(s)	濱岡, 理恵子
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41823">https://hdl.handle.net/11094/41823</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏 名	はま おか り え こ 濱 岡 理 恵 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 8 7 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 11 年 6 月 30 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 生理系研究科 医学系専攻
学 位 論 文 名	Overexpression of the aldose reductase gene induces apoptosis in pancreatic $\beta$ -cells by causing a redox imbalance (アルドース還元酵素遺伝子の高発現はレドックスの不均衡による膵 $\beta$ 細胞のアポトーシスを起こす)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 谷 口 直 之 (副査) 教 授 松 澤 佑 次 教 授 高 井 義 美

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目的】

糖尿病合併症の成因としてポリオール代謝産物の蓄積、非酵素的糖化反応（グリケーション）の亢進、ミオイノシドールの減少などの説が提唱されてきた。アルドース還元酵素は NADPH を電子供与体としてグルコースをソルビトールに還元する、ポリオール代謝経路の鍵となる酵素である。ソルビトールは続いてソルビトール脱水素酵素によってフルクトースに変換される。アルドース還元酵素はヘキソキナーゼよりもグルコースに対し高い Km 値を持つため、高血糖下ではその活性が亢進し、その結果蓄積したソルビトールが糖尿病合併症の成因に深く関わっていることが知られている。また近年膵  $\beta$  細胞にもアルドース還元酵素が存在することが明らかとなったため、ポリオール代謝の膵  $\beta$  細胞に与える影響を調べる目的で、アルドース還元酵素遺伝子を導入しその性質を検討した。

### 【方法ならびに結果】

pCMV ベクターに、クローニングした約 1.7 Kb のラットアルドース還元酵素 (AR) cDNA を挿入した。lipofectamine にてハムスター膵  $\beta$  細胞 (HIT) に導入し、Geneticin により陽性クローンを選択した。ノザン法、ウェスタンブロット法により AR 高発現クローンを選別し、2 個陽性クローンを得た。pCMV ベクターのみを導入した細胞をコントロールとして、その性質について比較検討を行った。ガスクロマトグラフィーによるソルビトール測定では、AR 高発現クローンはコントロールに比べ 2-4 倍の活性を示した。

AR 高発現クローンはコントロールに比べ viability の低下が認められたため、アガロースゲル上での DNA ラダーの形成ならびに Tunel 法、電子顕微鏡撮影によってアポトーシスを検出した。コントロールではアポトーシスを起こしている細胞が全体の 0.6% 以下だったのに対し、AR 高発現クローンにおいては 3-5% と増加していた。また HIT 細胞ではインターロイキン  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) によって一酸化窒素合成酵素 (NOS II)、Mn-SOD の誘導が起こるが、AR 高発現細胞では IL- $1\beta$  刺激による NOS II、Mn-SOD の mRNA 誘導能が低下していた。なお IL- $1\beta$  の影響を受けない Cu、Zn-SOD とインスリンの mRNA の発現には変化は見られなかった。NOS II 及び Mn-SOD の mRNA の発現誘導は転写因子 NF- $\kappa$ B によって調節を受けていることより、ゲルシフト法により NF- $\kappa$ B の活性化について検討し

た。AR 高発現細胞では IL-1 $\beta$  刺激による NF- $\kappa$ B の DNA 結合活性が低下していた。NF- $\kappa$ B の活性化はチオレドキシンの還元によるレドックス系により制御されているので、酵素サイクリング法により細胞内 NADPH と NADP<sup>+</sup> の定量を行った。その結果、AR 高発現クローンでは細胞内 NADPH/NADP<sup>+</sup> 比がコントロールに比べ低下していた。

#### 【考察】

細胞内のレドックス調節を担うチオレドキシ還元酵素やグルタチオン還元酵素は、NADPH を補酵素とする。したがって AR 高発現クローンにおいて見られた細胞内 NADPH/NADP<sup>+</sup> 比の低下はレドックス系に不均衡をもたらす、細胞に障害を与える可能性がある。チオレドキシンは活性中心にシステイン残基を有し、細胞増殖やアポトーシスなどの細胞内シグナル伝達に関与している。NF- $\kappa$ B の活性化に必要なシステインの SH 基がチオレドキシンの作用で還元されると活性型となって核内で DNA と結合する。AR 高発現 HIT 細胞では NADPH が減少しているため、還元型チオレドキシンの減少が減少すると考えられる。その結果、NF- $\kappa$ B 活性の低下をもたらす、NF- $\kappa$ B 依存性の遺伝子 NOS II、Mn-SOD の発現低下を引き起こす可能性が示唆された。また最近見いだされた Apoptosis signal regulating kinase-1 (ASK-1) は、還元型チオレドキシが結合することによって活性が抑制されているが、チオレドキシンの酸化によって活性化され、アポトーシスの誘導をもたらす。このことから、AR 高発現細胞で認められたアポトーシスの原因の一つとして、NADPH の減少に伴うチオレドキシンの酸化と、引き続く ASK-1 の活性化が関与している可能性が示唆された。

#### 【結論】

アルドース還元酵素の高発現により膵  $\beta$  細胞の NADPH/NADP<sup>+</sup> 比の低下が認められた。NADPH はチオレドキシ還元酵素によるチオレドキシンの還元には必須であり、その低下はレドックスバランスの不均衡をもたらす、NF- $\kappa$ B の活性化の低下、並びにアポトーシスに関与している可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

アルドース還元酵素 (AR) は糖尿病合併症の発症に関わり、ポリオール代謝経路を構成する酵素である。一方膵  $\beta$  細胞はレドックスバランスに重要なグルタチオン、チオレドキシ、抗酸化酵素などの含量が少ないため、酸化ストレスに弱いことが知られている。本研究は、高血糖下におけるアルドース還元酵素そのものが、膵  $\beta$  細胞のレドックスバランスに影響を与え、酸化ストレスとなり、アポトーシスを起す可能性があるかどうかを、ラットアルドース還元酵素 (AR) cDNA をハムスター膵  $\beta$  培養細胞 (HIT) 細胞に導入し検討した。ノザン法、ウェスタンブロット法、ガスクロマトグラフィーによる生成ソルビトール測定により、AR 高発現クローンを 2 個得た。AR 高発現細胞ではコントロール細胞と比べ、アポトーシスを起こしている細胞が高頻度に確認された。また高発現細胞では IL-1 $\beta$  刺激による NOS II 及び Mn-SOD の mRNA の誘導が減少したが、IL-1 $\beta$  では誘導されない Cu、Zn-SOD とインスリンの発現には変化は見られなかった。ゲルシフト法によりレドックス感受性の転写因子である NF- $\kappa$ B 影響を調べたところ、高発現細胞では活性化の程度が弱く、更に酵素サイクリング法により細胞内の NADPH/NADP<sup>+</sup> を定量したところ、その比の低下を認めた。

以上の結果から、AR 高発現クローンで認められた細胞内 NADPH/NADP<sup>+</sup> 比の低下が、還元型チオレドキシンの減少につながり、NF- $\kappa$ B の活性化の低下となっている可能性が示唆された。また還元型チオレドキシンの減少により Apoptosis signal regulating kinase-1 (ASK-I) が活性化することにより、アポトーシスを起こしていることが考えられた。このように、アルドース還元酵素高発現が膵  $\beta$  細胞においてレドックスバランスの変化をひきおこし、細胞の機能障害をおこしていることを示唆したもので、学位授与に価すると思われる。