

論文内容要旨

【目 的】

I型糖尿病等の自己免疫疾患においては、炎症性細胞から放出されるサイトカインにより誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) が誘導され、生じた NO が細胞を傷害する可能性が示唆されてきた。一方、近年ポリ ADP リボース合成酵素阻害剤であるニコチン酸アミドが、マクロファージにおける iNOS の発現誘導を抑制することが報告された。従来、ニコチン酸アミドはポリ ADP リボース合成酵素阻害により細胞内 NAD^+ 濃度を回復させ、膵ランゲルハンス島 β 細胞死を抑えたとされてきた。そこで、高濃度ニコチン酸アミドを投与した際の膵 β 細胞における iNOS mRNA 発現抑制とその発現抑制機序を明らかにするため、本研究を行った。

【研究内容】

(1) まず、ポリ ADP リボース合成酵素阻害剤の NO 産生に対する効果を調べるため、マウス IL-1 β (15U/ml) とニコチン酸アミド、3-アミノベンズアミド、1,5-ジハイドロキシイソキノリンのいずれかのポリ ADP リボース合成酵素阻害剤、あるいは NO 合成酵素阻害剤である N-モノメチル-L-アルギニン (NMMA) との共存下で単離ラット膵ランゲルハンス島を 12 時間培養し、産生された NO 量を反映する培養上清中の NO_2^- を定量した。IL-1 β 刺激群ではコントロール群に比べ産生された NO_2^- は約 5 倍に上昇した。ニコチン酸アミドは濃度依存的に NO 産生を抑制し、20mM では IL-1 β による NO 産生上昇をほぼ完全に抑制した。一方、他のポリ ADP リボース合成酵素阻害剤には、有意な NO 産生抑制効果が認められず、ニコチン酸アミドの NO 産生抑制作用はポリ ADP リボース合成反応の阻害によるものではないことが示唆された。

(2) ニコチン酸アミドによる NO 産生抑制作用が mRNA のレベルで起こっているのかを明らかにするため、IL-1 β とニコチン酸アミドの共存下で 12 時間培養したランゲルハンス島から RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて iNOS mRNA の定量を行った。その結果、ニコチン酸アミドは、5mM では僅かに、そして 20mM ではほぼ完全に IL-1 β による iNOS mRNA の誘導を抑制することが見出された。

(3) IL-1 β とニコチン酸アミドの共存下で 1 時間培養したランゲルハンス島から RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて iNOS mRNA の発現誘導に必須な転写因子である interferon regulatory factor-1 (IRF-1) mRNA の定量を行った。その結果、20mM ニコチン酸アミドは IL-1 β による IRF-1 mRNA の誘導をほぼ完全に抑制することが見出された。従って、高濃度ニコチン酸アミドは、IRF-1 mRNA の誘導抑制を介して iNOS mRNA の誘導を抑えることが示唆された。

(4) ランゲルハンス島を IL-1 β とニコチン酸アミドの共存下で 18 時間培養後、20mM グルコースで 30 分間刺激し、細胞内 ATP 量を定量した。IL-1 β 刺激群では ATP 量がコントロール群の 50% 以下に低下したが、20mM ニコチン酸アミドと NO 合成酵素阻害剤である NMMA は、それぞれ細胞内 ATP 量を完全に回復させた。

(5) IL-1 β 誘起性インスリン分泌障害に対する、ポリ ADP リボース合成酵素阻害剤の作用を調べるため、ランゲルハンス島をマウス IL-1 β (50U/ml) と、ポリ ADP リボース合成酵素阻害剤あるいは NMMA の共存下で 18 時間培養後、2.7mM または 20mM グルコース存在下で培養し、インスリン分泌量をラジオイムノアッセイを用いて測定した。ニコチン酸アミドは、IL-1 β によるグルコース刺激インスリン分泌の低下を濃度依存的に回復させ、20mM では IL-1 β による分泌抑制をほぼ完全に回復させた。しかし、他のポリ ADP リボース合成酵素阻害剤には、改善効果が認められなかった。また、NMMA はインスリン分泌を完全に回復させた。

以上より高濃度 (20mM) ニコチン酸アミドは、IRF-1 mRNA の誘導抑制を介して iNOS mRNA の誘導と、結果として生じる細胞傷害性 NO の産生を抑え、NO によるミトコンドリア障害を防止する機序によって、IL-1 β 誘起性膵 β 細胞機能障害を回復させることが明らかとなった。

【結 語】

本研究では、高濃度ニコチン酸アミドが、従来考えられてきたポリ ADP リボース合成酵素阻害剤として作用するのみでなく、サイトカインによる IRF-1 mRNA の誘導を抑制することにより細胞障害性 NO の産生そのものを抑える効果を持つことが初めて明らかとなった。現在世界各地で I 型糖尿病の発症予防に対してニコチン酸アミドの臨床試験が行われているが、この新知見は、その作用機構を分子レベルで解明する基礎となるものであり、重要な意味を持つと考えられた。

審査結果の要旨

実験的糖尿病ラットにおいては、アロキサンやストレプトゾトシンから生じたフリーラジカルが膵ランゲルハンス島（膵ラ島） β 細胞において、DNA ストランドブレイクを引き起こし、これを修復しようとしてポリ ADP リボース合成酵素が活性化され、その結果細胞内 NAD⁺濃度が低下し、膵 β 細胞機能の低下が引き起こされること、更にニコチン酸アミドや3-アミノベンズアミドなどのポリ ADP リボース合成酵素阻害剤は細胞内 NAD⁺濃度の低下を抑制することにより、この膵 β 細胞機能障害を防止することが明らかにされてきた。一方、I型糖尿病などの自己免疫疾患においては、炎症性細胞から放出されるサイトカインにより誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) が誘導され、生じた NO が膵 β 細胞を傷害する可能性が近年報告され、その発症過程における NO の関与が示唆されてきた。

本研究では、ポリ ADP リボース合成酵素を阻害する濃度よりも高濃度のニコチン酸アミドが、IL-1 β による iNOS mRNA の誘導及び NO 産生を抑制し、膵 β 細胞のインスリン分泌を回復させること、さらにその機序が転写因子 interferon regulatory factor-1 (IRF-1) の mRNA の誘導抑制を介していることを明らかにした。

ニコチン酸アミドは、IL-1 β による膵ラ島での NO 産生を濃度依存的に抑制したが、3-アミノベンズアミド、1,5-ジハイドロキシイソキノリンといった他のポリ ADP リボース合成酵素阻害剤には、NO 産生抑制効果が認められなかった。次に IL-1 β とニコチン酸アミドの共存下で 12 時間培養した膵ラ島から RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて iNOS mRNA の定量を行った結果、ニコチン酸アミドは、5mM では僅かに、そして 20mM ではほぼ完全に IL-1 β による iNOS mRNA の誘導を抑制することが見出され、NO 産生抑制作用が mRNA のレベルで起こっていることが明らかとなった。iNOS mRNA の発現誘導に必須な転写因子である IRF-1 mRNA の誘導がほぼ完全に抑制されていることが明らかとなった。また、IL-1 β によって誘導された NO は細胞内 ATP 量とグルコース刺激インスリン分泌能を顕著に低下させたのに対し、20mM ニコチン酸アミドはこれらをほぼ完全に回復させた。

以上より高濃度 (20mM) ニコチン酸アミドは、IRF-1 mRNA の誘導抑制を介して iNOS mRNA の誘導と、結果として生じる細胞傷害性 NO の産生を抑え、NO によるミトコンドリア障害を防止する機序によって、IL-1 β 誘起性膵 β 細胞機能障害を回復させると考えられた。

本研究では、高濃度ニコチン酸アミドが、従来考えられてきたポリ ADP リボース合成酵素阻害剤として作用するのみでなく、サイトカインによる IRF-1 mRNA の誘導を抑制することにより細胞傷害性 NO の産生そのものを抑えるという、I型糖尿病発症予防の新たな機序の可能性を示したものである。学位論文に値し、医学的にも価値が高いと考えられる。