

原 著

糖尿病モデルラットの膵臓β細胞のアポトーシスにともなう ガングリオシド GM3 の発現について

山野真利子^{†1}, 城尾恵里奈²

¹大阪府立大学 総合リハビリテーション学部 栄養療法学専攻
583-8555 大阪府羽曳野市はびきの3-7-30

²京都大学 大学院人間・環境学研究科 共生人間学専攻
606-8501 京都府京都市左京区二本松町

受付: 2012年10月2日, 受理: 2012年11月30日

Expression of ganglioside GM3 during apoptosis of pancreatic β cells in diabetic rat model

Mariko YAMANO^{†1} and Erina JOO²

¹Department of Clinical Nutrition, School of Comprehensive Rehabilitation, Osaka Prefecture University, 3-7-30 Habikino, Habikino City, Osaka 583-8555, Japan; ²Laboratory of Sports and Exercise Medicine, Graduate School of Human and Environmental Studies, Kyoto University, Kyoto, 606-8501, Japan

Received 2 October 2012; accepted 30 November 2012

Found on cell membranes, ganglioside GM3 has a simple chain structure composed of glucose, galactose, and sialic acid. We used an animal model of diabetes mellitus (Kob rat) to examine whether GM3 appears on β cells in the islet of Langerhans, and whether GM3 is associated with insulin secretion. On pancreatic β cells, hyperglycemic Kob rats showed substantially reduced insulin immunoreactive (IR) secretory sites, but increased GM3-IR expression. Furthermore, GM3-IR β cells showed apoptotic morphology, namely, nuclear fragmentation and activation of apoptosis marker caspase-3. These findings suggest that ganglioside GM3 mediates apoptosis of pancreatic β cells.

Key words : diabetic rat (糖尿病モデルラット); insulin β cells (インスリン膵臓β細胞); GM3, apoptosis (アポトーシス)

1 はじめに

近年食生活の洋風化の影響で糖尿病は年々増加し、わが国ではその予備軍も含め2000万人に達するといわれている。また放置すれば、心臓疾患、脳卒中、神経疾患等を併発することも多いことより、国家的対策が必要である。特に2型糖尿病は、多食や運動不足など、日常のカロリー過剰の生活習慣により起因する「生活習慣病」といわれ誰にでも起こりうる病気である¹。2型糖尿病はインスリン抵抗性(細胞のインスリンに対する反応性が低下)がおこり、膵臓のインスリン分泌細胞(β細胞)の分泌が異常となり、進行するとβ細胞のアポトーシス²とβ細胞のインスリン分

泌が低下してくる。このインスリン抵抗性の一因として肥満や内臓脂肪の過剰蓄積に伴い、脂肪細胞より炎症性サイトカインTNFαが過剰分泌されるなどがインスリン抵抗性を起こすと考えられている¹。

糖脂質に分類されるスフィンゴ糖脂質は、スフィンゴシン(長鎖塩基)と脂肪酸からなるセラミドに糖鎖を結合したもので、高等動物に多くみられる。この一員であるガングリオシドは、糖鎖部分にシアル酸を含むものの総称であり、ほとんどは細胞膜上に存在する物質であるが、二重膜の外側にのみ存在するため、膜が波打つ構造になり、細胞どうしの接着部や神経系のシナプス部に多いとされる³。GM3は糖鎖部分にグルコース、ガラクトースとシアル酸を一分子含む単純な構造で(Fig. 1)、ラット、マウス、ヒトの種を

[†]連絡著者 E-mail: myamano@rehab.osakafu-u.ac.jp

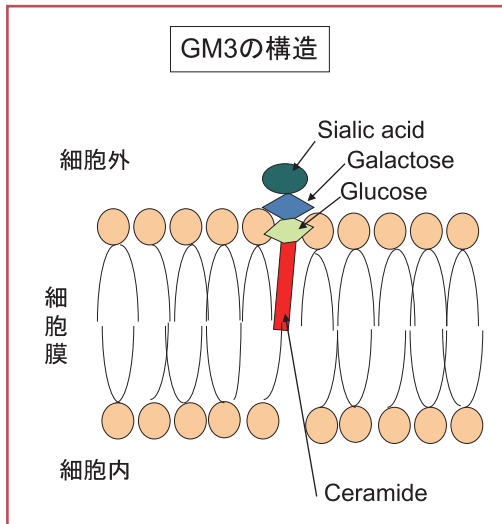


Fig. 1 ガングリオシド GM3 の構造模式図

超えて脂肪組織に多く存在するガングリオシドである³。

最近の報告で、肥満動物及び糖尿病モデル動物の脂肪細胞に GM3 の発現が著しく増加すること⁴、また、GM3 合成遺伝子を欠損させたマウスではインスリン感受性が増加していると報告されている⁴。それらの研究から、GM3 が細胞膜におけるインスリンシグナル伝達を抑制しているのではないかという仮説もある⁵。

そこで本研究は、糖尿病モデル動物 Komeda diabetes-prone (Kob) ラット⁶を用い、GM3 が膵臓β細胞において発現するか、さらにアポトーシス⁷との関連やインスリン分泌低下に関与している可能性があるかを形態学的に検討した。

2 方法

糖尿病モデル動物として、慢性膵炎により徐々にランゲルハンス島β細胞の破壊が起こり、糖尿病を発症するとされる Kob ラット⁶の雄 5 匹を用いた。Kob ラットは飼育中ウロペーパー (エームス社) を用いて適宜尿糖を測定し、糖尿病の発症を待った。尿糖が 3+ (500 mg/dl) となり、尾動脈からの血糖が HI (500 mg/dl 以上) となった 59 週齢時に 5 匹を犠牲死させ検体を採取した。コントロールとして同等週齢 (55~60 週齢) SD 系ラット (雄) 5 匹を用いた。飼育条件は、12 時間オン・オフの日照サイクル、室温 22°C、自由飲水・飲食で飼育し、実験はすべて大阪府立大学動物実験指針に従った。

最終日にネプタール (150 mg/kg) で深麻酔し、心臓から血液を採取し、ニプロフリースタイル (ニプロ社) を用い電極法にて血糖値を測定した。ラットは続いてゼンボン固定液で還流固定し、取り出した膵臓を 30% スクロース (0.1 mol/l リン酸緩衝液含む) で浸漬後、クリオスタットで

厚さ 12 μm の凍結切片を作成し、ゼラチンスライドに貼り付け、ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色と、その隣りの切片においてインスリン及び GM3、または GM3 及びアポトーシス時に出現する活性化 Caspase-3 の二重免疫染色を行った。使用した抗体は、インスリンは第一抗体 (Serotec 社, mouse IgG)、第二抗体 (Molecular Probes 社, mouse IgG-Alexafluoro 594) を、GM3 は第一抗体 (日本バイオテスト社, mouse IgM)、第二抗体 (biotin 化抗 mouse IgM)、第三抗体 (streptavidin FITC) を用いた。活性化 Caspase-3 は第一抗体 (Cell Signaling 社, rabbit IgG)、第二抗体 (rabbit IgG-Alexafluoro 594) で染色した。二重免疫した標本はオリンパス蛍光顕微鏡で同一視野を G 励起 (Alexafluoro 594 赤蛍光)、と F 励起 (FITC 緑蛍光) 波長で交互に観察し、オリンパスの顕微鏡計測ソフト (Cell Sense) で画像を取り込み二重標識画像にして検討した。

3 結果

最終日のコントロールラットの体重は平均 421 g、血糖は平均 145 mg/dl、一方高い尿糖を示した Kob ラットの体重は平均 330 g、血糖は平均 435 mg/dl であり、Kob ラットは高血糖を示し、糖尿病を発症していると考えられた。

また Kob ラットの膵臓表面からの観察では、出血や炎症等による色調や形の変化は殆ど認められなかった。

膵臓組織をインスリンと GM3 の二重免疫反応後、蛍光顕微鏡観察した結果、Fig. 2 に示すようにコントロールラットの膵臓ではインスリン免疫陽性細胞群が多数認められた。しかしそのβ細胞には GM3 の免疫反応は殆ど認められなかった。また腺細胞にも GM3 は認められず、H&E 染色でも変性像は認められなかった。

一方 Kob ラットの膵臓では、Fig. 3 で示すようにインスリン蛍光を示す細胞は少なく、散在し、β細胞の大幅な数の減少が確認できた。また 2 重免疫染色と H&E 染色による形態学的検査により Kob ラットの膵臓では、次の 3 種類のタイプが混在して認められた。1 つはインスリンが陽性 (β細胞) であるが、GM3 の蛍光が認められなく、H&E 染色では、アポトーシス様構造は見られないもの (Fig. 3 ①)、2 つめはインスリン蛍光がみられたβ細胞に GM3 の顕著な蛍光が見られ、さらに H&E 染色において、アポトーシス特有の細胞質は酸性傾向で赤くなり、核は多数に分断され、濃染している様子 (アポトーシス小体) が観察されたもの (Fig. 3 ②)、3 つめは反対にインスリン蛍光は見られず、しかし GM3 免疫蛍光が強く、H&E 染色でアポトーシス特有の細胞質の赤変、核が分断されたアポトーシス小体が多数見られたもの (Fig. 3 ③) に分けられ、アポトーシス

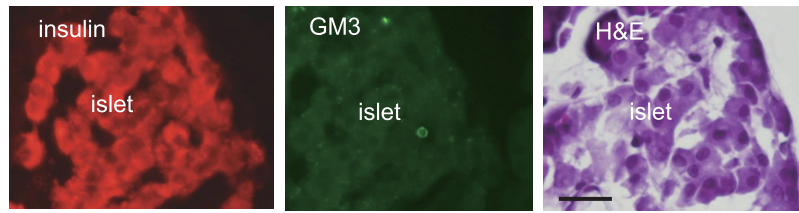


Fig. 2 コントロールラットの膵臓 β 細胞 (islet) の顕微鏡写真； β 細胞には強い Insulin 陽性蛍光 (左, 赤蛍光) が見られたが, 同一細胞上に GM3 陽性構造 (中, 黄緑蛍光) はほとんど出現しなかった. 右は隣接する部の H&E 染色；ホルモン分泌細胞は丸く, 核は中心にあり, 丸く大きいのが特徴である. Scale bar= 50 μ m.

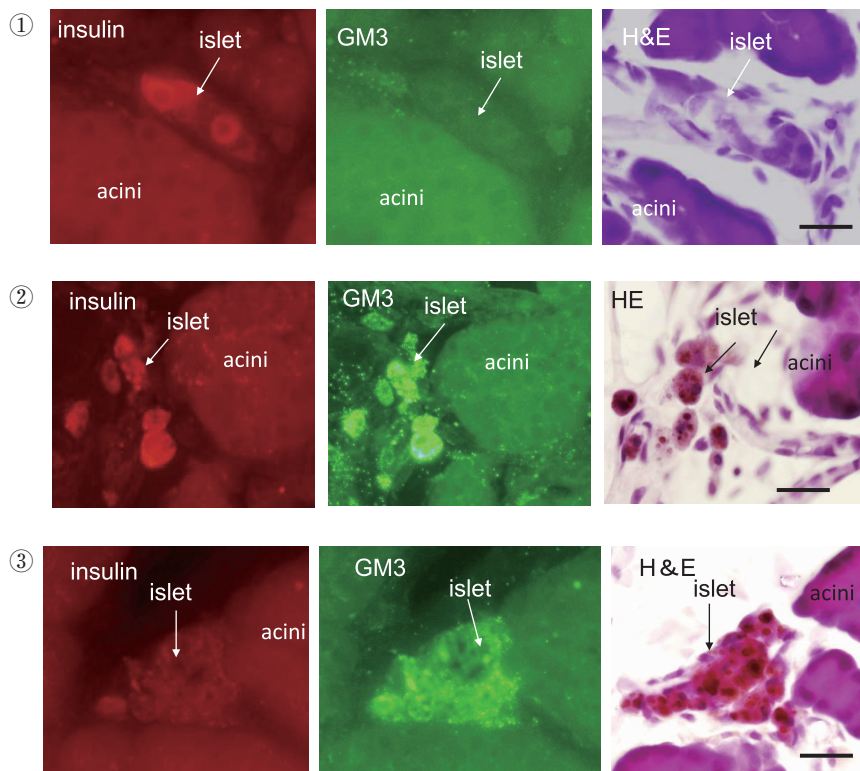


Fig. 3 Kob ラットの膵臓の顕微鏡写真：左列；インスリン免疫陽性, 赤蛍光, 中列；GM3 免疫陽性, 黄緑蛍光, 右列；H&E 染色. Kob ラットの膵臓では, インスリン免疫陽性を示す β 細胞の数は大幅に減少し, 二重免疫染色した GM3 陽性構造の出現様式, H&E 染色での形態の変化より①, ②, ③の3種の異なる標識形態が認められた. acini；腺細胞. Scale bar= 50 μ m.

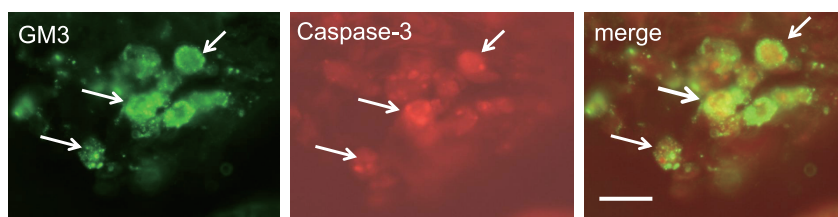


Fig. 4 Kob ラット膵臓 β 細胞の蛍光顕微鏡写真：GM3 免疫陽性細胞 (左) は同時に活性化 Caspase-3 陽性 (中) の出現が認められ, これらの細胞がアポトーシスを起こしていることが示された. Scale bar= 50 μ m.

様構造を示す細胞には必ず GM3 が出現した。

アポトーシス細胞には細胞内に Caspase-3 が活性化することが知られている⁷。そこで次に膵臓 β 細胞に出現した GM3 免疫陽性細胞が、アポトーシスを起こしているかどうか、活性化 Caspase-3 抗体を用い二重染色した結果、Fig. 4 に示すように GM3 陽性の細胞質に活性化 Caspase-3 免疫陽性構造が多数認められ、これらの β 細胞がアポトーシスを起こしていることが証明された。

4 考察

高血糖を示す Kob ラットの膵臓ランゲルハンス島 β 細胞では、インスリンの分泌細胞数が大幅に減少していた。さらに、Kob ラットの β 細胞では①インスリン陽性・GM3 陰性・アポトーシス陰性、②インスリン陽性・GM3 陽性・アポトーシス陽性、③インスリン陰性・GM3 陽性・アポトーシス陽性という異なった形態と免疫反応を示す 3 群が認められ、アポトーシスと GM3 の相関が強く示唆された。培養胸腺細胞において GM3 を処置するとアポトーシスを促進したという報告より⁸、GM3 の発現が、 β 細胞に何らかの機序でアポトーシスを促進し、 β 細胞の細胞死を起こし、結果インスリン分泌が低下し、糖尿病を発症していることが示唆される。細胞死の一つであるアポトーシスは、壊死と異なり細胞の内容物は殆ど漏出せず、炎症反応が見られないのが特徴である。さらにアポトーシスを起こした細胞は数時間のうちにマクロファージによって処理されるとされる⁷。今回 Kob ラットの膵臓では組織像から出血や白血球等の炎症細胞が顕著でなく、 β 細胞の数が大幅に減少していたことは、かなり多くの β 細胞でアポトーシスによる細胞死が起こり、消滅していることが示唆される。

GM3 の発現を誘発するものは炎症性サイトカインの Fas リガンドや TNF などが考えられる⁴。Fas や TNF は death factor と呼ばれ、細胞死を起こすことで知られている⁹。肥満により肥大化した脂肪細胞からアディポネクチンの分泌低下や TNF α の過剰分泌がおり、インスリン抵抗性になることも知られている⁵。事実 TNF α で刺激した脂肪細胞や典型的な肥満糖尿病モデル動物の脂肪細胞では、ガングリオシド GM3 およびその合成酵素遺伝子の発現が著しく増加している¹⁰。

ヒトでは 2 型糖尿病の発症と同時に膵臓ランゲルハンス島 β 細胞集団で、最初はやや大きくなり活発化するが、その後年を経るごとに細胞集団は徐々に小さくなり、同時にアポトーシス細胞が増加していくことが報告されている²。本研究結果から、ヒトでも肥満等により脂肪細胞が肥大・増加し、これらの脂肪細胞から TNF α が過剰に分泌され、膵臓

β 細胞に過剰に働き、 β 細胞の中で GM3 が発現し、GM3 が多量に膜に移行し、膜の異常が起こり、最終的にアポトーシスにむかう可能性が考えられ、今後の研究が待たれる。

脂質は栄養面だけでなく細胞への伝達シグナル（良い方向または悪い方向）としても重要に働き、インスリン抵抗性（インスリンの働きの低下）の一因として働くことも知られている¹¹。今後、糖尿病モデル動物を用いて何らかの方法でガングリオシド GM3 の発現を抑えることにより、 β 細胞のアポトーシスの抑制や、インスリン抵抗性の軽減等の成果に発展させたいと考えている。

文献

- 1 赤坂憲 (2007) インスリン抵抗性, “メタボリックシンドロームと生活習慣病” (島本和明編), 診断と治療社, 東京, pp. 45-65.
- 2 Rhodes CJ (2005) Type 2 diabetes - a matter of β -cell life death? Science, 307: 380-383.
- 3 安藤進 (1997) “脳機能とガングリオシド—新たに登場したニューロンの活性物質”, 共立出版, 東京, pp. 1-83.
- 4 Tagami S, Inokuchi J, Kabayama K, et al. (2002) Ganglioside GM3 participates in the pathological conditions of insulin resistance. J Biol Chem, 277: 3085-3092.
- 5 Yamashita T, Hashiramoto A, Haluzik M, et al. (2003) Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3. Proc Nat Acad Sci USA, 100: 3445-3449.
- 6 Tsuchitani M, Saegusa T, Narama I, et al. (1985) A new diabetic strain of rat (WBN/Kob) Labo Animals, 19: 200-207.
- 7 田沼靖一 (1998) アポトーシスの細胞生物学, アポトーシスの分子機構 “アポトーシス実験プロトコール” (田沼靖一監修) 秀潤社, 東京, pp. 14-27.
- 8 Zhou J, Shao H, Cox NR, et al. (1998) Gangliosides enhance apoptosis of thymocytes. Cell Immunol, 183: 90-98.
- 9 長田重一 (1996) Fas を介したアポトーシスの分子機構 “生命体システムにおけるアポトーシス” (勝木元也, 長田重一編) 講談社サイエンティフィク, 東京, pp. 108-126.
- 10 Kabayama K, Sato T, Inokuchi J, et al. (2007) Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. Proc Nat Acad Sci USA, 104: 13678-13683.
- 11 野澤義則 (2001) 膜脂質と情報伝達, “糖と脂質の生物学” (川寄敏裕, 井上圭三編) pp. 174-185.