

原 著

Troglitazone の膵島 β 細胞増殖に及ぼす影響

太根 伸能, 石井 主税, 根岸 清彦, 片山 茂裕

Effects of Troglitazone on Pancreatic Islet β Cell Proliferation

Nobuyoshi Tane, Chikara Ishii, Kiyohiko Negishi, Shigehiro Katayama (Fourth Department of Internal Medicine, Saitama Medical School, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

The effect of Troglitazone (Tro) on the proliferation of Wistar rat pancreatic islet β cells was evaluated immunohistologically. The rats were divided into a standard-diet group (control group, $n=9$), a fructose-containing diet group (FRU group, $n=8$), and a fructose-containing diet plus Troglitazone (70 mg/kg, per os) group (Tro group, $n=9$). In the Tro group, the pancreatic islet β cell area determined by immunological staining using a specific antibody against rat insulin was significantly lower in comparison with the control and FRU group. To elucidate the mechanisms, Tro was added to cultured MIN6 cells. Tro (0.2, 2, and 20 $\mu\text{g/ml}$) significantly and dose-dependently reduced the BrdU-labeled MIN6 cell number without affecting cell viability. Prolactin (PRL) increased the number of BrdU-labeled cells 1.7-times as compared to the controls, which was decreased by adding 2 $\mu\text{g/ml}$ of Tro, while phorbol myristate acetate (PMA) did not affect the BrdU-labeled cell number. These results suggest the possibility that Tro inhibits pancreatic islet β cell proliferation mainly through blocking the system mediated via PRL receptors (JAK-STAT system).

Keywords: Troglitazone, insulin secretion, pancreatic islet β cell proliferation, fructose, MIN6 cell*J Saitama Med School* 2001;28:139-142

(Received June 2, 2001)

緒 言

以前我々はWistar rat:標準餌群(以下対照群と略す),フルクトース含有餌群(以下FRU群と略す),フルクトース含有餌+Troglitazone群(以下Tro群と略す)を用いて,Troglitazoneの耐糖能,インスリン分泌への影響を検討した.その結果,飼育開始7週後に施行したブドウ糖負荷試験(2g/kg, ip)にて,Tro群のIRI・血糖値がFRU群に比べ有意に低値となり,骨格筋の膜分画で測定したGLUT4含量が有意に増加したことを報告した¹⁾.これらは,Troのインスリン抵抗性改善作用に伴うインスリン需要の低下の結果と考えられるが,Troは血管平滑筋の増殖を抑制するとの報告もあり^{2,3)},Troの膵島 β 細胞に対する直接作用も想定される.

そこで,上記検討で採取した膵臓を用いて,免疫組織学的に膵島 β 細胞量を検討し,さらにMIN6細胞を用いてTroの影響について検討した.

対象と方法

実 験 1:

8週齢の雄Wistar rat(日本クレア)を通常食を与

埼玉医科大学第四内科学教室
[平成13年6月2日 受付]

えた対照群($n=9$),フルクトース含有食(55% w/w)を与えたFRU群($n=8$),FRU群にTroglitazone(Tro:70 mg/kgとなるようポリエチレングリコール400g,グリセリン6g,水10mlに懸濁し経管投与)を与えたTro群($n=8$)に分け,7週間飼育の後ネンブタール麻酔下に心採血で屠殺し膵臓を採取した.膵組織は24時間ブアン固定後10%緩衝ホルマリンに浸潤固定後,パラフィン包埋した.約3 μ に薄切後,抗インスリン抗体(DAKO, USA)にはLSAB kit(DAKO)で,抗グルカゴン抗体・抗ソマトスタチン抗体・抗PP抗体(DAKO)の混合抗体はABC AP kit(Vector, USA)を用いて二重染色を行った.染色後,各切片はOlympus(Tokyo)およびCCDカメラ(Olympus, Tokyo)とPower PC 6100(Macintosh, USA)を結んで画像を取り込み,NIH Image 1.60(NIH, USA)を用いて膵島 β 細胞面積を測定し,膵全体に対する割り合い(%)を求めた.統計解析は,各群のデータを統計ソフトStat View4.5を用いて分散分析にて解析した.

実 験 2:

MIN6細胞(大阪大学 宮崎純一先生より分与)1 $\times$ 10⁴/wellを96 wellマルチプレート(Iwaki, Japan)にまき,FCS(-)DMEM(Sigma, USA)(5.6 mM glucoseを含む)にて24時間starvation後,2% FCS, 5.6 mM

glucoseを含むDMEM（以下培養液と略す）に交換し下記の実験を行った。

1) BrdU標識量に対するTroの影響：Tro 0.2, 2, 20 $\mu\text{g/ml}$ を含む培養液で24, 48, 72, 144, 168時間培養し、Biotrack Cell Proliferation Kit (Amersham, USA)を用いてBrdUを4時間標識し、ELIZA (450 nm)にて標識量を測定した(各n=12)。

2) Troの細胞毒性についての検討：MIN6をTro 0.2, 2, 20 $\mu\text{g/ml}$ を含む培養液にて24時間培養後、通常の方法に従って3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-tetrazolium bromide（以下MTTと略す）(Sigma)を4時間生細胞に取り込ませ、formazan crystal形成後溶解しELISA (570 nm)にてcell viabilityを測定した(各n=12)。

3) TroのMIN6増殖抑制機序についての検討：Tro (2 $\mu\text{g/ml}$)を添加した培養液及び非添加の培養液にPlatelet-derived growth factor (PDGF; 2, 20, 200 ng/ml, 各n=12), Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M, 各n=12), prolactin (PRL; 250 ng/ml, n=12)を加えて48時間培養し、上記の方法でBrdU標識量を測定した。尚、PDGF, PMA, PRLは各々細胞増殖シグナル伝達経路であるMAPK系, PKC系, JAK-STAT系を刺激する代表物質として選択した。

結果：

実験1

Tro群の膵 β 細胞量は、対照群、Fru群に比べ有意に低値を示した (Fig. 1)。

実験2

1) MIN6のBrdU標識量はcontrolと比較して、Tro添加時には全ての濃度(0.2・2・20 $\mu\text{g/ml}$)で、かつ24-168時間の全てで有意に低値を示した (Fig. 2, 3)。

2) 24時間培養後のcell viabilityはTroの各濃度ともcontrolと同程度であり、cytotoxicityは認められなかった (Fig. 3)。

3) Controlと比べてPDGF 2 ng/ml添加時のみBrdU標識量の有意な増加を認めた。一方、Tro 4 $\mu\text{g/ml}$ 添加時には、PDGF全ての濃度でBrdU標識量の有意な抑制させる効果が認められた (Fig. 4)。PMAは各濃度ともcontrolと比べ、BrdU標識量を有意に増加させる効果は認められなかった (Fig. 5)。PRL投与によりMIN6のBrdU標識量はcontrolの平均1.7倍にまで有意に増加したが、Tro 2 $\mu\text{g/ml}$ 添加によりcontrolと同程度にまで有意に抑制された (Fig. 6)。

考察

Troは各種培養細胞系を用いた実験で、インスリン受容体やIRS-1のチロシンリン酸化および、PI-3キナーゼの活性化を介してGLUT4のtranslocationを促進さ

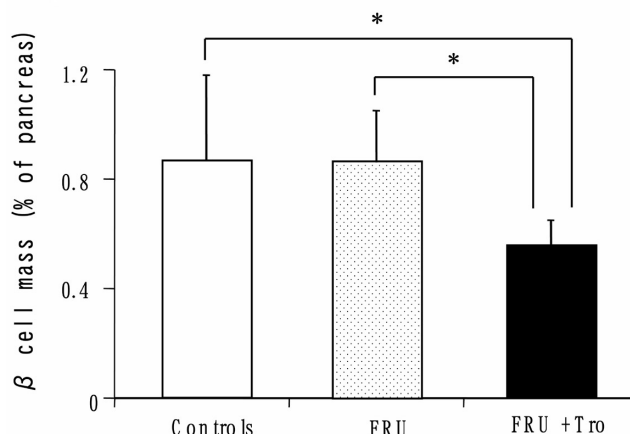


Fig. 1. β cell mass: In the Tro group (n=8), the pancreatic β cell area determined by immunostaining using a specific antibody against insulin was significantly lower in comparison with the control group (n=9) and the FRU group (n=8) ($P < 0.05$).

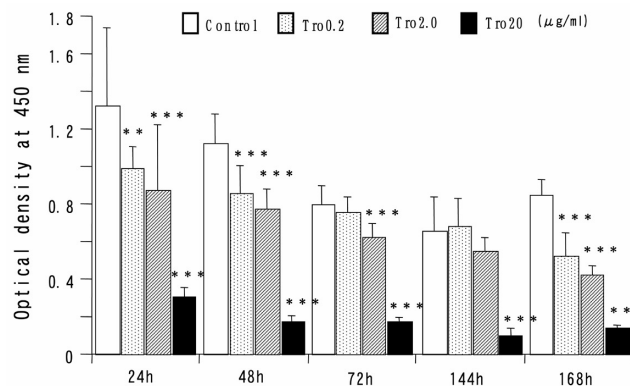


Fig. 2. Effect of Troglitazone on BrdU-labeled cell count. A significant dose-dependent decrease was observed at 24, 48 and 168 hours. At 72 and 144 hours, 2 and/or 20 $\mu\text{g/ml}$ of Troglitazone significantly decreased BrdU-labeled cell count. ($P < 0.01$, $P < 0.001$ vs. controls)

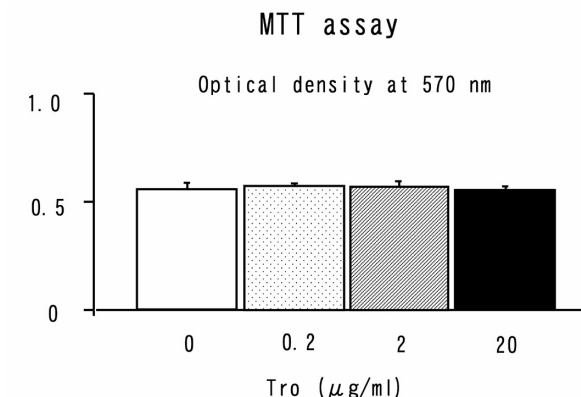


Fig. 3. Effect of Troglitazone on MIN6 cell viability. After 24 hours, cell viability was the same as in the controls at every Troglitazone concentration.

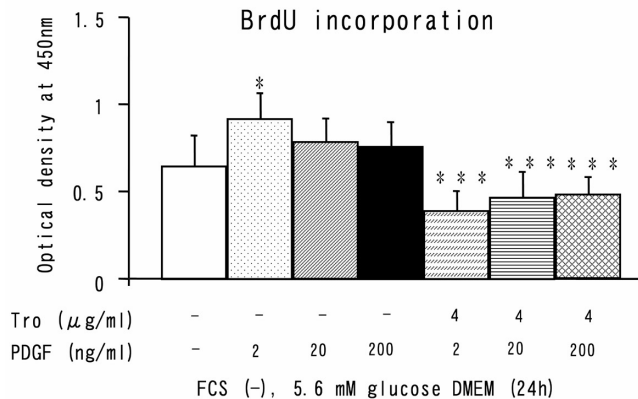


Fig. 4. Effect of PDGF with or without Troglitazone on MIN6 proliferation. A significant increase in BrdU-labeled cell count was observed only when 2 ng/ml of PDGF was added. When 4 μg/ml of Troglitazone was added, PDGF-induced increase in BrdU-labeled cell count was significantly suppressed. ($P < 0.05$, $P < 0.001$ vs. controls)

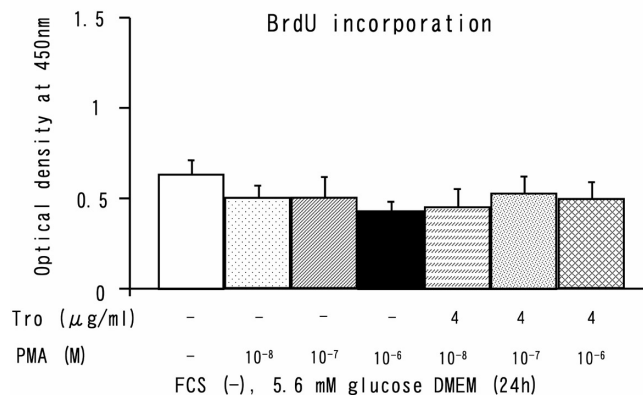


Fig. 5. Effect of PMA with or without Troglitazone on MIN6 proliferation. PMA did not increase the BrdU-labeled cell count when compared with controls.

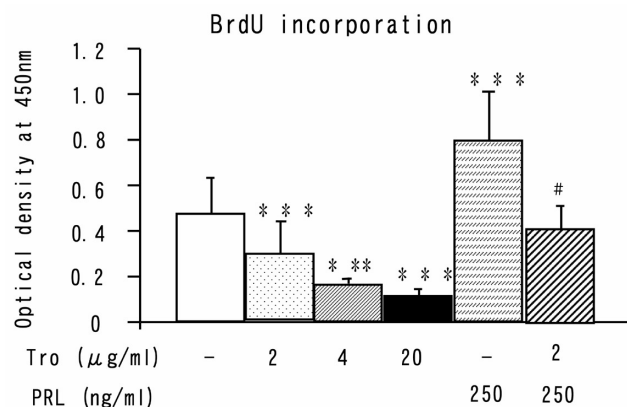


Fig. 6. Effect of PRL with or without Troglitazone on MIN6 proliferation. PRL significantly increased the BrdU labeled MIN6 cell count 1.7 times as compared to controls. However, the addition of Troglitazone (2 μg/ml) significantly suppressed PRL-induced increase in the cell count to the same level as in controls. ($P < 0.001$ vs. controls, # $P < 0.001$ vs. PRL)

せ血糖降下作用を示すことが報告されている⁴⁾。

Troの膵島β細胞に対する影響については、肥満・インスリン抵抗性・耐糖能異常を特徴とするdb/dbマウス⁵⁾およびKKマウス⁶⁾における検討で、インスリンを含む膵臓β細胞の再顆粒化、β細胞中のインスリン顆粒の著増が認められている。これらはTroのインスリン抵抗性改善効果に伴う二次的変化を反映した結果であり、Troが膵島β細胞の負担を軽減することを示唆している⁷⁾。また、Troは正常および肥満と耐糖能低下を示すZucker diabetic fatty (ZDF) ラットのラ氏島において直接的な脂肪枯渇作用を示し、この作用はZDFラットではβ細胞機能の改善を伴うと報告がある⁸⁾。一方、Troと細胞増殖抑制との関連については、MAPK系の抑制を介して血管平滑筋細胞の増殖を抑制するとの報告がある²⁾。今回のWistar ratを用いた検討で、Tro群の膵β細胞量がFru群のみならず対照群に比べても有意に低値を示したことから、Troが膵島β細胞の増殖を直接抑制した可能性が示唆された。そこで、我々はさらにMIN6細胞を用いてTroの影響について検討したところ、MIN6の増殖はTroの濃度依存性に抑制された。これまで、マウス膵β細胞の腫瘍化cell lineの一つであるINS-1細胞では、JAK-STAT系を介して増殖することが報告されている⁹⁻¹¹⁾。PDGF, PMA, PRLは各々細胞増殖シグナル伝達経路であるMAPK系, PKC系, JAK-STAT系を刺激する代表物質であるが、今回の検討ではPDGF, PMAはMIN6のBrdU標識量を有意に増加させる効果は認められなかった。一方、PRL投与によりMIN6のBrdU標識量はcontrolの平均1.7倍にまで有意に増加したことから、MIN6においてもJAK-STAT系を介して細胞増殖が生じる可能性が示唆された。また、Tro 2 μg/ml添加によりPRLによる増殖効果をcontrolと同程度にまで抑制したことから、TroはJAK-STAT系を阻害する可能性が示唆された。Troの細胞増殖抑制に関するシグナル伝達経路についてはさらに検討を要する。

結 論

Wistarラットを標準餌飼育群(対照群)、フルクトース含有餌飼育群(FRU群)、フルクトース含有餌+Troglitazone投与飼育群(Tro群)に分け、Troglitazone (Tro)の膵β細胞増殖への影響について免疫組織学的に検討した。Tro群の膵β細胞量は対照群、FRU群に比べ有意に低値であった。MIN6細胞を用いた検討では、(1) Troは濃度依存性(0.2・2・20 μg/ml)にMIN6細胞のBrdU標識率を有意に抑制した。(2) Cell viabilityは各濃度のTroでcontrolと同程度だった。(3) 一方、Prolactin (PRL)はBrdU標識量をcontrolの平均1.7倍に増加させたが、Tro 2 μg/ml添加により抑制されたことから、TroはPRL受容体を介する系(JAK-STAT系)を主に阻害する可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始ご協力頂いた陳素芳先生ならびに建部順子検査技師、浅見芳子検査技師に深謝致します。またMIN6細胞を快く分与下さいました大阪大学 宮崎純一先生に深謝致します。

文 献

- 1) Chen S, Noguchi Y, Izumida T, Tatebe J, Katayama S. A comparison of the hypotensive and hypoglycaemic actions of an angiotensin converting enzyme inhibitor, an AT1a antagonist and troglitazone. *J Hypertens* 1996;14:1325-30.
- 2) Law RE, Meehan WP, Xi XP, Graf K, Wuthrich DA, Coats W, et al. Troglitazone inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia. *J Clin Invest* 1996;98:1897-905.
- 3) Hattori Y, Hattori S, Kasai K. Troglitazone upregulates nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1999;33:943-8.
- 4) Zhang B, Szalkowski D, Diaz E, Hayes N, Smith R, Berger J. Potentiation of insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by thiazolidinedione-derived antidiabetic agents in Chinese hamster ovary cells expressing human insulin receptors and L6 myotubes. *J Biol Chem* 1994;269:25735-41.
- 5) Fujikawa T, Wada M, Fukuda K, Fukami M, Yoshioka S, Yoshioka T, et al. Characterization of CS-045, a new oral antidiabetic agent, II. Effects on glycemic control and pancreatic islet structure at a late stage of the diabetic syndrome in C57BL/KsJ-db/db mice. *Metabolism* 1991;40:1213-8.
- 6) Okuno A, Mizuno H, Yorikane E, Fujiwara T, Fukuda K, Fukami M, et al. Morphological improvement of pancreatic islets by CS-045 in spontaneous diabetic C57BL/KsJ-db/db mice with hyperinsulinemia. *Annu Rep Sankyo Res Lab* 1993;45:137-44.
- 7) 堀越大能, 藤原俊彦. トログリタゾンの薬効と作用機序. *日本臨床* 1997;55 (増刊号):125-30.
- 8) Shimabukuro M, Zhou Y-T, Lee Y, Unger RH. Troglitazone Lowers Islet Fat and Restores Beta Cell Function of Zucker Diabetic Fatty Rats. *J Biol Chem* 1998;273:3547-50.
- 9) Sekine N, Ullrich S, Regazzi R, Pralong WF, Wollheim CB. Postreceptor signalling of growth hormone and prolactin and their effects in the differentiated insulin secreting cell line, INS-1. *Endocrinology* 1996;137:1841-50.
- 10) Sekine N, Wollheim CB, Fujita T. GH signalling in pancreatic beta cells. *Endocr J* 1998;45(Suppl):S33-40.
- 11) Watson CJ, Burdon TG. Prolactin signal transduction mechanisms in the mammary gland: the role of the Jak/Stat pathway. *Rev of Reprod* 1996;1 (1):1-5.