

A Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Agonist Inhibits Macrophage Activation and the Development of Type 1 Diabetes

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9493

ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ アゴニストによる マクロファージ活性化制御と1型糖尿病発症抑止

金沢大学医学部医学科内科学第一講座 (主任: 小林健一教授)

安藤 仁

1型糖尿病の発症過程において、マクロファージはランゲルハンス島(ラ島)炎の形成と膵 β 細胞破壊に深く関与すると考えられている。チアゾリジン系薬剤は、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ のリガンドとして知られ、サイトカイン刺激により核内転写因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B)の活性化を介して誘導される単球走化性因子1やプラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター・タイプ1の遺伝子発現を抑制する。その類推として、この薬剤は同じくNF- κ Bによって制御されているマクロファージの活性化を抑制する可能性を考えた。そこで本研究では、少量頻回ストレプトゾトシン (multiple low-dose streptozotocin, MLDS) 投与によるマウス自己免疫性糖尿病モデルを用い、チアゾリジン系薬剤であるピオグリタゾンによるマクロファージ活性化・ラ島炎形成を標的とした糖尿病発症抑止効果について検討した。インターフェロン- γ とリポ多糖体は用量依存性、相乗的にCD-1マウス単離腹腔内マクロファージからの一酸化窒素 (nitric oxide, NO) 産生を刺激した。5-100 μ Mのピオグリタゾンは、0.5 U/mlのインターフェロン- γ と0.01 μ g/mlのリポ多糖体の共存下で亢進したNO産生を用量依存性に抑制した(ピオグリタゾン10 μ Mでは80.3 \pm 4.9%)。色素排泄法による検討では、ピオグリタゾンによる細胞毒性は認めなかった。雄性CD-1マウスに、単回投与では糖尿病を惹起し得ない少量のストレプトゾトシン (streptozotocin, STZ) 40 mg/kgを5日間連続で腹腔内注射すると、経過とともにラ島の辺縁から内部へと炎症細胞が浸潤し、引き続いて注射後2-4週間には高血糖を呈した。第7日のMLDSマウスより単離した腹腔内マクロファージからは対照群に比し有意な亜硝酸イオンの産生亢進を認め、一方、膵マクロファージや第28日の腹腔内マクロファージではそうした産生亢進を認めなかった。そこで、MLDSマウスにピオグリタゾン0.01%混餌食をSTZ投与開始7日前より投与した結果、ピオグリタゾンはMLDS投与後第7日における腹腔内マクロファージの活性化を有意に抑制した。第28日におけるラ島炎指数はピオグリタゾン投与群で対照群に比し有意に低く、ピオグリタゾンはMLDSマウスにおけるラ島への炎症細胞浸潤を阻害していた。さらに、ピオグリタゾン投与は、糖尿病発症率を第21日には対照群93%から47%へ、第28日には対照群100%から67%へと有意に低下させた($p=0.012$)。一方、STZ投与開始7日前からのピオグリタゾン投与は大量単回STZ (250 mg/kg) 投与による糖尿病発症には影響を及ぼさなかった。これらの結果は、チアゾリジン系薬剤がマクロファージ活性化を抑制し、MLDS糖尿病発症における自己免疫過程を阻害することを示唆する。

Key words type 1 diabetes, multiple low-dose streptozotocin, pioglitazone, thiazolidinedione, peroxisome proliferator-activated receptor γ

1型糖尿病は、インスリン産生膵 β 細胞に対する自己免疫反応を背景として、膵ランゲルハンス島(ラ島)にマクロファージやリンパ球などの炎症細胞が浸潤するラ島炎を生じることによって膵 β 細胞が傷害・破壊され、インスリンの絶対的欠乏が生じて発症する^{1)~3)}。すなわち、ラ島局所においてまず膵 β 細胞上の抗原がマクロファージを主体とした抗原提示細胞に取り込まれ、ヘルパーT細胞に提示される。抗原特異的に活性化されたヘルパーT細胞は、インターフェロン- γ (interferon- γ , IFN- γ)などのサイトカインを介して細胞傷害性T細胞を活性化し膵 β 細胞を傷害する。一方、ラ島に浸潤したマクロファージから分泌される腫瘍壊死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)やインターロイキン-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、へ

ルパーT細胞から分泌されるIFN- γ などのサイトカインも、直接的に、あるいは一酸化窒素 (nitric oxide, NO) や活性酸素などのフリーラジカルの産生を介して間接的に膵 β 細胞を傷害する、と考えられている^{3)~5)}。

近年、インスリン抵抗性の改善作用を有する2型糖尿病治療薬として臨床応用されたチアゾリジン系薬剤⁶⁾は、転写因子の核内受容体スーパーファミリーの1つであるペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ)のリガンドとして作用し⁷⁾、PPAR γ の活性化により脂肪細胞の分化を促進することが知られている⁸⁾⁹⁾。最近、当教室のOhtaら¹⁰⁾¹¹⁾や野原¹²⁾は、チアゾリジン系薬剤であるピオグリタゾンが培養細胞においてサイトカイン刺激によ

平成12年10月3日受付, 平成12年11月22日受理

Abbreviations : ED, effective dose; IFN- γ , interferon- γ ; IL-1 β , interleukin-1 β ; iNOS, inducible nitric oxide synthase; LPS, lipopolysaccharide; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; MLDS, multiple low-dose

り誘導される単球走化性因子1 (monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1) やプラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター・タイプ1 (plasminogen activator inhibitor type 1, PAI-1) の産生をmRNAレベルから抑制することを見出した。サイトカイン刺激によるMCP-1とPAI-1の発現誘導の少なくとも一部は核内転写因子カッパーB (nuclear factor kappa B, NF- κ B) の活性化を介することから¹³⁾¹⁴⁾、トログリタゾンはNF- κ Bにより制御される遺伝子群の発現を抑制し炎症性サイトカインやNOなどの産生も抑制しうる可能性を推察した。そこで本研究では、まずPPAR γ アゴニストであるチアゾリジン系薬剤がマクロファージの活性化に与える影響を試験管内にて検討した。さらに、マクロファージの活性化がその発症に重要な役割を担うと考えられる^{15)~17)}少量頻回ストレプトゾトシン (multiple low-dose streptozotocin, MLDS) 投与によるマウス1型糖尿病モデル¹⁸⁾におけるマクロファージ活性化・ラ島炎形成を標的とした糖尿病発症抑制効果について検討した。

材料および方法

I. 実験動物

実験には6から8週齢の雄性CD-1マウス (日本チャールズリバー, 横浜) を用い、飼育は金沢大学動物実験施設で行った。エサは標準配合飼料CRF-1 (日本チャールズリバー) を使用し、自由飲水、自由摂食下にマウスを飼育した。いずれの実験においても、マウスは1週間の予備飼育後、実験に供した。なお、動物の取り扱いについては金沢大学動物実験施設の指針に従った。

II. 試薬

RPMI1640培地, ウシ胎児血清, ペニシリン (50単位/ml)・ストレプトマイシン (50 μ g/ml) 混合液, およびリン酸緩衝生理食塩水はGibco BRL (Grand Island, USA) より購入した。ストレプトゾトシン (streptozotocin, STZ) およびIFN- γ はSigma (St. Louis, USA) より購入した。ハンクス液は日水製薬 (東京) より、リポ多糖体 (lipopolysaccharide, LPS) はDifco (Detroit, USA) よりそれぞれ購入した。ピオグリタゾンは武田薬品工業 (大阪) より供与を受けた。EDTA2ナトリウム, 亜硝酸・硝酸測定キットは同仁化学研究所 (熊本) より, Coomassie 蛋白測定キットはPierce (Rockford, USA) よりそれぞれ購入した。その他の試薬は和光純薬 (大阪) より購入した。

III. 腹腔内および脾マクロファージの単離

RPMI1640培地に10%の非働化したウシ胎児血清, ペニシリン・ストレプトマイシン混合液を加え培養液とした。マウスの腹腔内にハンクス液を注入して腹腔内浸出細胞を回収し、その後マウス脾臓を無菌的に摘出した。腹腔内浸出細胞浮遊液は1600回転/分で6分間遠心し上清を除去後, 0.15 M塩化アンモニウム, 1.0 mM炭酸水素カリウム, 0.1 mM EDTA2ナトリウムを混じり1 N塩酸でpH 7.2とした塩化アンモニウム緩衝液3 mlを加え溶血させた。30秒後直ちに十分量の培養液を加えて1000回転/分で10分間遠心し, 上清を除去後, 1×10^5 /mlとなるように適量の培養液に再浮遊させた。一方, 脾臓は5 mlの培養液を入れた55 \times 15 mmペトリ皿上で2.5 mlディスプレイ

ル注射器の尾部を用いてすりつぶし, 100 μ mナイロン製細胞濾過器 (Becton Dickinson, New Jersey, USA) を通して脾細胞浮遊液を回収した。脾細胞浮遊液も腹腔内浸出細胞同様, 塩化アンモニウム緩衝液で処理後, 1×10^7 /mlとなるように適量の培養液に再浮遊させた。その後, 濃度を調整した腹腔内浸出細胞浮遊液と脾細胞浮遊液を, 24穴平底プレート (Corning, New York, USA) に各穴500 μ lずつ5% CO₂濃度, 37°Cの条件下で培養した。1時間後に, 非付着性細胞をリン酸緩衝生理食塩水を用いて3回洗浄し, それぞれ腹腔内および脾マクロファージを単離した。なお, 非付着性細胞の除去が不十分な場合は, 1時間の培養と洗浄を2~3回繰り返した。

IV. ピオグリタゾンのマクロファージ活性化に及ぼす効果の検討

IFN- γ およびLPSにより腹腔内マクロファージから遊離するNO産生量をマクロファージ活性化の指標とした¹⁹⁾²⁰⁾。腹腔内マクロファージを単離後, 各穴に200 μ lの前述培養液と各濃度のIFN- γ , LPSおよびピオグリタゾンを加えて48時間培養し, その培養上清中に遊離したNO量を後述のごとく測定した。

また, ピオグリタゾンのマクロファージに対する細胞毒性を検討するため, 48時間培養後のマクロファージを0.025%トリプシン/EDTA溶液を用いてプレートから剥離後, トリパン・ブルーを含む細胞浮遊液を作成し血球計算板を用いて生細胞数を算出した。

V. NO産生量の測定

NOは速やかに代謝されるため, マクロファージからのNOの産生量はNOの代謝産物である亜硝酸イオン量を指標として求めた。培養上清中の亜硝酸イオン量はGriess法²¹⁾により測定した。すなわち, 検体にリン酸液とスルファニルアミドを加えて検体中の亜硝酸イオンによるジアゾニウム塩化物を生じさせ, そこにナフチルエチレンジアミンを加えてアゾカップリング反応により生成したアゾ色素を540 nmの吸光度で測定した。亜硝酸イオン濃度は, その吸光度を指標として標準試薬による標準曲線から算出した。

VI. MLDS糖尿病モデルにおけるピオグリタゾンの糖尿病発症抑制についての検討

1. MLDSマウスの作成

STZは, 無水クエン酸を蒸留水に溶解後水酸化ナトリウム溶液にてpH 4.5に調整した0.01 Mクエン酸緩衝液に4 mg/mlの濃度で溶解し, 溶解後は5分間以内に使用した。5日間連続で30 mg/kgまたは40 mg/kgのSTZをマウスの腹腔内に投与し, MLDSマウスを作成した。STZ初回投与日を第0日と設定し, 後述のごとく, 7日毎に血糖値をモニターし, 第14日と第28日に腹腔内および脾マクロファージからのNO産生量の測定とラ島の組織学的検討をそれぞれ行った。

2. 大量単回STZ糖尿病マウスの作成

大量単回STZ投与糖尿病マウスは, 0.01 Mクエン酸緩衝液を溶解液として25 mg/mlとしたSTZを250 mg/kg腹腔内投与し作成した。STZ投与日を第0日と設定し, 第0日, 第1日, 第2日, 第4日, 第6日に血糖値を測定した。

3. ピオグリタゾンの投与

streptozotocin; NF- κ B, nuclear factor kappa B; NO, nitric oxide; NOD, non-obese diabetic; PAI-1, plasminogen activator inhibitor type 1; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor γ ; SPIDDM, slowly progressive insulin-dependent diabetes mellitus; STZ, streptozotocin; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; ラ島, 脾ランゲルハンス島

STZ投与の7日前よりマウスを無作為に2群に分け、一方には標準配合飼料を与え、他方にはピオグリタゾン0.01%混餌食を与えて、自由摂食下に飼育した。摂食量より算出したピオグリタゾン摂取量は約12.5 mg/kg/日であり、ピオグリタゾン投与自体は摂食量や随時血糖に影響を与えなかった(結果未表示)。

4. MLDSマウスの腹腔内および脾マクロファージからのNO産生量の測定

40 mg/kgのSTZで作成したMLDSマウスから、前述のごとく腹腔内および脾マクロファージを単離し、5 U/mlのIFN- γ と0.1 μ g/mlのLPSの存在下、非存在下に培養した。クエン酸緩衝液のみを5日間連続で腹腔内投与したマウスからも腹腔内および脾マクロファージを同様に単離、培養し、対照とした。培養48時間後に、培養上清中の亜硝酸イオン量を測定し、Coomassie 蛋白測定キットを用いて測定した細胞蛋白量で補正し、NO産生量とした。

5. ラ鳥炎の重症度の組織学的検討

マウスの脾臓を摘出後10%ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋後5 μ mに薄切し、HE染色を施して鏡検した。各マウスにつき少なくとも30個以上のラ鳥を観察し、各ラ鳥の炎症細胞の浸潤の程度を以下のように点数化した。

0点：ラ鳥に炎症細胞の浸潤をまったく認めない。

1点：ラ鳥の周囲から軽度の炎症細胞浸潤を認めるが、その浸潤範囲はラ鳥全体の10%未満である。

2点：ラ鳥の10%以上50%未満の範囲に炎症細胞浸潤を認める。

3点：ラ鳥の50%以上の範囲に炎症細胞浸潤を認める。

さらに各マウスのラ鳥炎の重症度の指標として、次のようにラ鳥炎指数 (Insulinitis index) を算出した。ラ鳥炎指数 = 各マウスのラ鳥炎の合計点数 / 観察したラ鳥数。

6. 糖尿病発症の判定

マウスの血糖値は、自由摂食下で午後7時から午後10時の間に、簡易血糖測定器グルコカード (アベンティス・ファーマ、東京) を用い尾静脈から採取した全血を用いて測定した。血糖値が持続的に250 mg/dl以上を呈し始めた時点を糖尿病発症と判定した。

Ⅶ. 統計学的検討

測定値は $\bar{x} \pm \text{SEM}$ で表示した。NO産生量および血糖値に関しては、Studentの*t*検定を用いて2群間の有意差を判定した。ラ鳥炎指数の比較には一元配置分散分析法を用い、FisherのPLSD posthoc法にて有意差検定を行った。糖尿病の発症率は、Kaplan-Meier生存曲線を作成しMantel-Cox法を用いて検定した。なお、いずれも危険率5%未満 ($p < 0.05$) を統計学的に有意差ありとした。

成 績

I. 試験管内におけるピオグリタゾンのマクロファージ活性化におよぼす効果

1. IFN- γ およびLPSによるマウス単離腹腔内マクロファージの活性化

IFN- γ およびLPSによるマクロファージの活性化をNO産生を指標として評価した¹⁹⁾²⁰⁾。CD-1マウスから単離した腹腔内マクロファージをIFN- γ あるいはLPSの存在下に48時間培養後、培養上清中に遊離した亜硝酸イオンを定量した結果を図1に示

す。IFN- γ (図1A) およびLPS (図1B) はそれぞれ用量依存性にマクロファージからの亜硝酸イオン産生量を増加させ、ED₅₀ (50% effective dose) は各々1 U/ml, 0.05 μ g/mlであった。およそED₂₅に相当する0.5 U/mlのIFN- γ と0.01 μ g/mlのLPSの共存下では、IFN- γ 、LPS単独刺激下の各々約3.0倍、約11.5倍の亜硝酸イオン産生を認め、両者はマクロファージ活性化に対し相乗的であった(図1C)。

2. IFN- γ およびLPSによるマクロファージの活性化におよぼすピオグリタゾンの効果

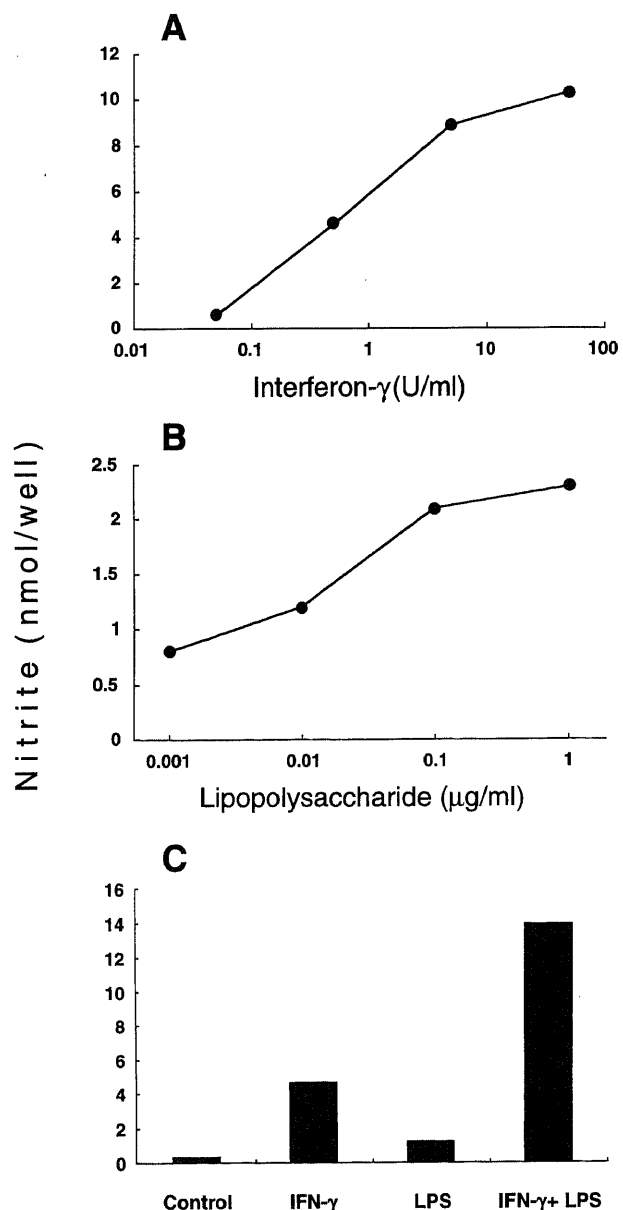


Fig. 1. Effect of IFN- γ and LPS on nitrite release from primary peritoneal macrophages. Primary peritoneal macrophages were harvested from male CD-1 mice of 6-8 weeks old. The cells were cultured in RPMI 1640 medium with IFN- γ or/and LPS supplemented with 10% fetal bovine serum for 48 hr at 37°C under 5% CO₂. Nitrite levels in the supernatants were measured by using Griess reagent. Both IFN- γ (A) and LPS (B) increased nitrite release dose-dependently, and the effect was synergistic (C).

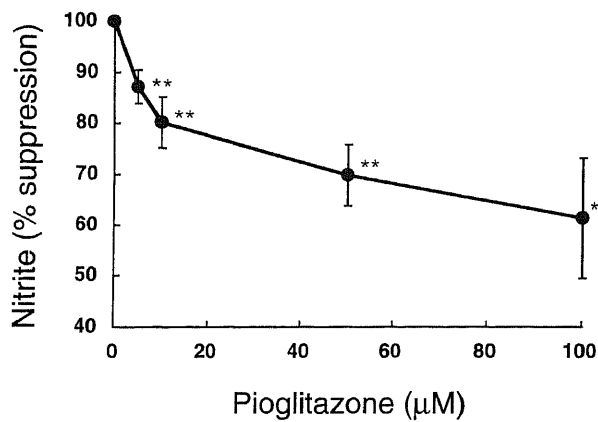


Fig. 2. Effect of pioglitazone on cytokine-induced nitrite release from primary macrophages in vitro. Primary peritoneal macrophages were cultured for 48 hr with or without pioglitazone (5, 10, 50, and 100 μ M) in the presence of 0.5 U/ml IFN- γ and 0.01 μ g/ml LPS, and nitrite levels in the supernatants were measured by using Griess reagent. Pioglitazone suppressed nitrite release dose-dependently. Values are $\bar{x} \pm$ SEM for 3 experiments performed in duplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Student's t-test.

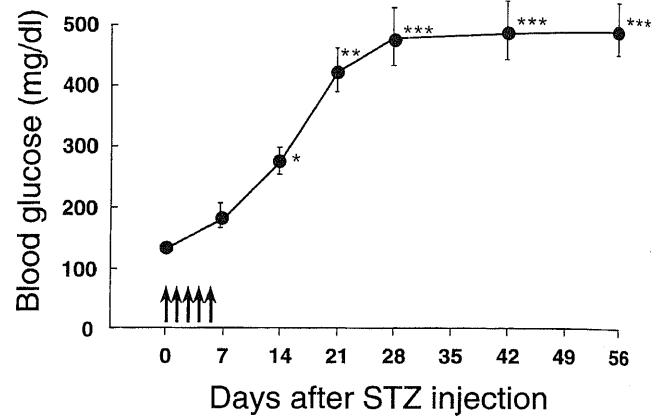


Fig. 3. Time course of changes in blood glucose levels in MLDS mice. Forty mg/kg body weight of STZ was given intraperitoneally for 5 consecutive days (arrows). Fed blood glucose levels were measured every week. MLDS mice developed hyperglycemia 2-4 weeks after STZ injection. Values are \bar{x} of 15 mice for each point. Vertical bars indicate SEM. * $p < 0.02$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ by Student's t-test.

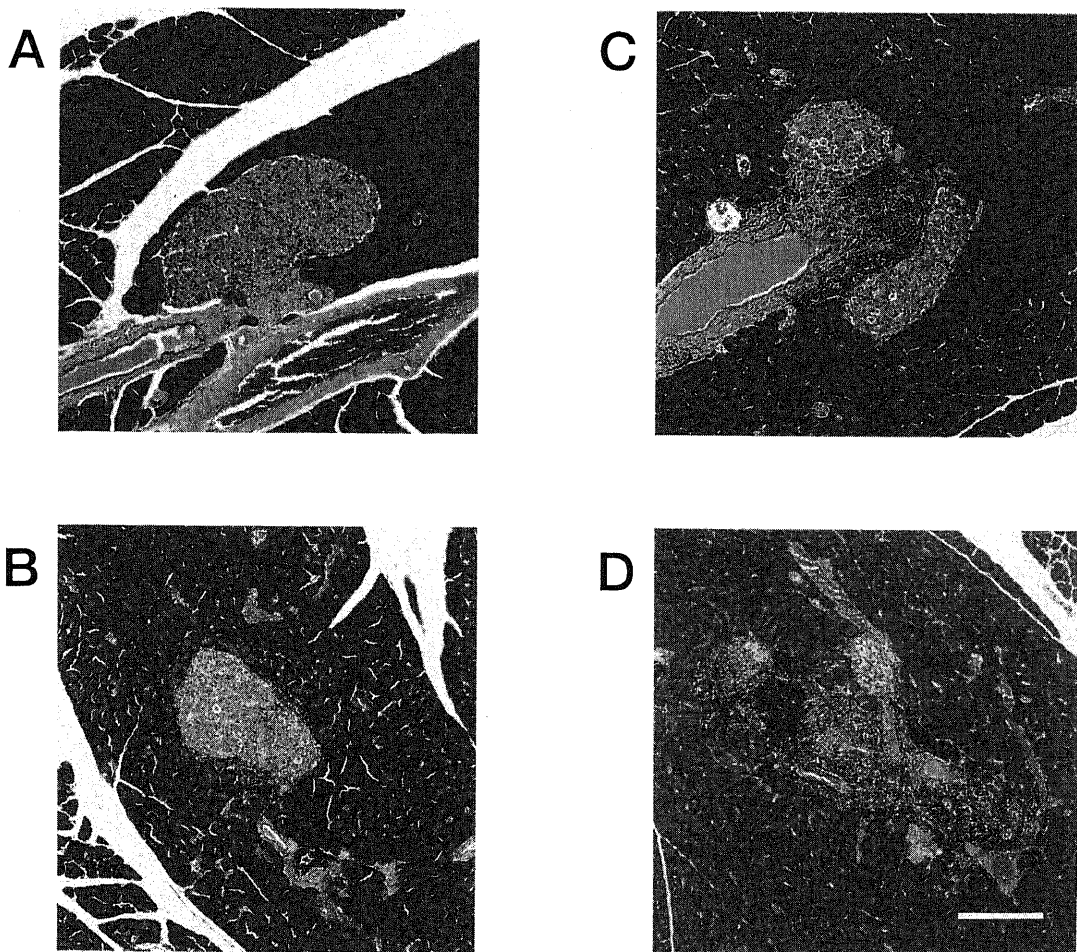


Fig. 4. Light microscopic photomicrographs of pancreatic islets from MLDS (40 mg/kg body-weight) mice at day 0 (A), 7 (B), 14 (C), and 28 (D). Mice were randomly selected for removal of the pancreata at day 0, 7, 14, and 28. The pancreata were fixed with 10% formalin and embedded in paraffin. The sections were cut in 5- μ m and stained with HE. At day 0, the islet is totally free of any mononuclear cells. At day 7, mononuclear cells infiltrate around the islet. At day 14, mononuclear cells infiltrate into islets. At day 28, mononuclear cells extensively infiltrate into islet. Scale bar indicates 150 μ m.

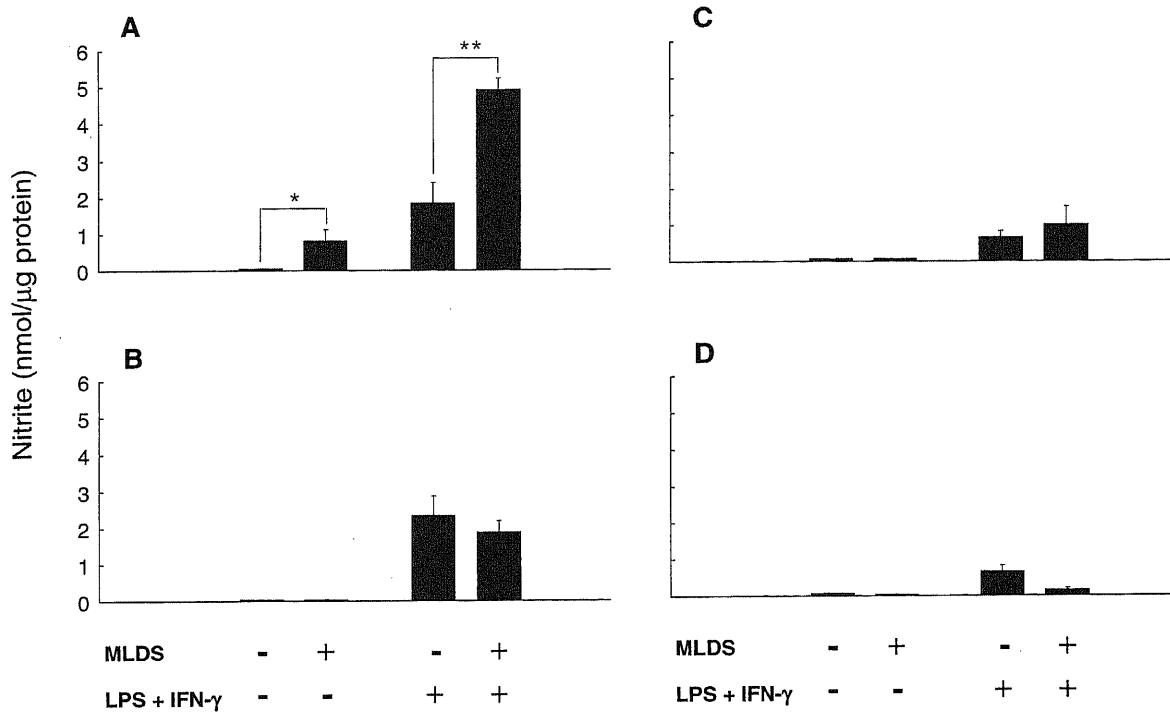


Fig. 5. Nitrite release from peritoneal (A, B) and splenic (C, D) macrophages ex vivo. Male CD-1 mice were intraperitoneally injected with 40 mg/kg body weight of STZ for 5 consecutive days. Control mice were treated with the buffer alone. Primary peritoneal macrophages were harvested from control and MLDS mice at day 7 (A) and 28 (B). Splenic macrophages were also isolated at day 7 (C) and 28 (D). The cells were cultured for 48 hr, and culture supernatants were assayed for nitrite levels. Nitrite levels were presented as nmol/ μ g of macrophage protein. Only peritoneal macrophages from MLDS mice at day 7 produced significantly large amount of nitrite compared with those from control mice both in the absence and the presence of LPS plus IFN- γ . MLDS, MLDS mice; LPS + IFN- γ , cultured in the presence of 0.1 μ g/ml of LPS and 5 U/ml of IFN- γ . Values are \bar{x} of at least 3 mice for each point. Vertical bars indicate SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Student's t-test.

0.5 U/mlのIFN- γ と0.01 μ g/mlのLPSの共存下で、ピオグリタゾンの存在下、非存在下にマクロファージを48時間培養し、ピオグリタゾンがマクロファージからのNO産生におよぼす影響について検討した結果を図2に示す。5, 10, 50, 100 μ Mのピオグリタゾン存在下で亜硝酸イオン産生量はピオグリタゾン非存在下のそれぞれ87.1 \pm 3.3%, 80.3 \pm 4.9%, 69.9 \pm 6.1%, 61.3 \pm 11.9%と有意に減少し、ピオグリタゾンはマクロファージからのNO産生を用量依存性に抑制した。ED50は生体内作用域と考えられるおよそ10 μ Mであり、ピオグリタゾンはこの濃度で明らかな抑制効果を示した。なお、トリパン・ブルー排泄法にてピオグリタゾンの細胞毒性の有無を検討したところ、10 μ Mのピオグリタゾン存在下、非存在下で生細胞率に有意差はなかった(ピオグリタゾン存在下, 79.0 \pm 2.9%; 非存在下, 82.0 \pm 5.3%; $p = 0.64$)。

II. 1型糖尿病モデルMLDSマウスの腹腔内マクロファージ活性化、ラ島炎、糖尿病発症に与えるピオグリタゾンの効果

1. 1型糖尿病モデル, MLDSマウスの確立

CD-1マウスに単回投与では糖尿病を惹起し得ない少量のSTZ 40 mg/kgを5日間連続で腹腔内注射すると、注射後1週間を過ぎた頃から徐々に血糖が上昇し始め、1ヶ月後にはインスリン依存型の糖尿病を発症した(図3)。このMLDSマウスの発症過程では、図4に示すように第7日頃よりラ島に炎症細胞の浸潤を認め、時間の経過とともに浸潤がラ島辺縁から内部へと

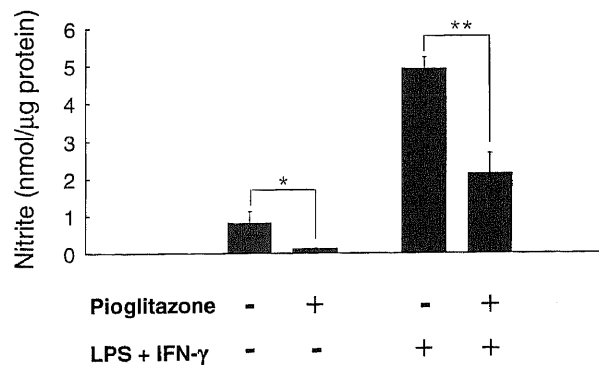


Fig. 6. Effects of pioglitazone on nitrite release from peritoneal macrophages ex vivo. Male CD-1 mice were fed a regular diet with or without pioglitazone (0.01% food admixture) from 7 days before the first STZ administration. Forty mg/kg body weight of STZ was given intraperitoneally for 5 consecutive days. Primary peritoneal macrophages were harvested from MLDS mice at day 7 and cultured for 48 hr, and culture supernatants were assayed for nitrite levels. The peritoneal macrophages from pioglitazone-treated MLDS mice produced significantly less amount of nitrite than those from non-treated MLDS mice. Pioglitazone, pioglitazone-treated group; LPS + IFN- γ , cultured in the presence of 0.1 μ g/ml of LPS and 5 U/ml of IFN- γ . Values are \bar{x} of 6 mice for each point. Vertical bars indicate SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Student's t-test.

広がり、最終的にはラ島が破壊されていた。

今回はさらに、STZ自体のアルキル化作用、NO遊離作用といった直接作用²⁹⁾をより抑えたモデルで検討するため、1回あたりのSTZ投与量を減少させてゆき、より少量のSTZ 30 mg/kgを用いて同様のMLDS糖尿病の系を確立した。この系でもラ島炎(表1)にひき続く糖尿病の発症(図8C, 図8D)を確認した。

2. MLDSマウスの糖尿病発症早期における腹腔内マクロファージの活性化

MLDSマウスから腹腔内および脾マクロファージを単離し、5 U/mlのIFN- γ と0.1 μ g/mlのLPSの存在下、非存在下に48時間培養後、培養上清中に遊離した亜硝酸イオンを定量した結果を図5に示す。STZ投与開始後第7日の検討では、MLDSマウスから単離した腹腔内マクロファージからは 0.80 ± 0.32 nmol/ μ g \cdot 蛋白と、クエン酸緩衝液のみを5日間連続で腹腔内投与した対照マウスから単離した腹腔内マクロファージ(0.04 ± 0.01 nmol/ μ g \cdot 蛋白)に比し、有意な亜硝酸イオン産生増加を認めた(図5A)。5 U/mlのIFN- γ と0.1 μ g/mlのLPSの共存下では、亜硝酸イオン量はMLDS群で 4.90 ± 0.33 nmol/ μ g \cdot 蛋白にまで増加し、対照群の 1.84 ± 0.57 nmol/ μ g \cdot 蛋白に比しさらに有意な差を認めた(図5A)。第28日のMLDSマウスの腹腔内マクロファージでは、図5Bのごとく、IFN- γ およびLPSの刺激時、非刺激時ともに第7日の腹腔内マクロファ

ジでみられた亜硝酸イオン産生の亢進は認められず、MLDSマウスの腹腔内マクロファージの活性化は一過性であった。また、MLDSマウスの脾マクロファージでは、第7日(図5C)および第28日(図5D)ともに、腹腔内マクロファージ(図5A)で認められた亜硝酸イオンの産生亢進は観察されなかった。

3. MLDSマウスの腹腔内マクロファージ活性化に与えるピオグリタゾンの効果

試験管内で認めたピオグリタゾンによる腹腔内マクロファージの活性化抑制作用(図2)を生体内で確認するため、ピオグリタゾン0.01%混餌食をSTZ投与開始7日前より与えたMLDSマウスから取り出した腹腔内マクロファージについて同様の検討を行った(図6)。MLDS投与後第7日に認められた腹腔内マクロファージからの亜硝酸イオン産生の亢進は、ピオグリタゾン投与群ではSTZを投与していない対照群に近いレベルまで顕著に抑制されており、IFN- γ とLPSによる刺激下・非刺激下でピオグリタゾン非投与MLDS群の各々43.4%、13.1%であった。

4. ピオグリタゾンによるMLDSマウスのラ島炎の抑制

活性化マクロファージの浸潤は、MLDSマウスにおけるラ島炎形成の初期段階に重要な役割を果たしていると考えられている^{15)~17)}。そこで、ピオグリタゾンがマクロファージ活性化の抑制を介してラ島炎の進展を抑制する可能性を検討した。第14日と第28日におけるラ島炎の程度を指数化した結果を表1に示す。30 mg/kgのSTZにより作成したMLDSマウスにおけるラ

Table 1. Effects of pioglitazone on insulinitis indices in multiple low-dose streptozotocin-treated mice

A dose of streptozotocin (mg/kg body weight)	Group	Insulinitis indices	
		Day 14	Day 28
30	Control	0.837 ± 0.279	1.091 ± 0.139
30	Pioglitazone	$0.173 \pm 0.083^*$	$0.180 \pm 0.108^{**}$
40	Control	Not determined	0.927 ± 0.047
40	Pioglitazone	Not determined	$0.151 \pm 0.093^{**}$

Values are $\bar{x} \pm$ SEM of at least five mice.

* $p=0.08$, ** $p<0.001$ versus control group by one-way analysis of variance with posthoc comparison.

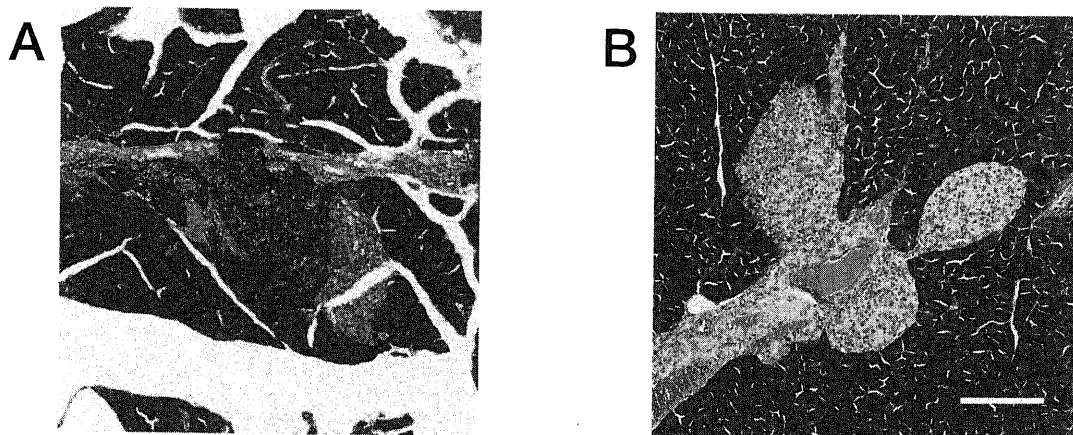


Fig. 7. Representative light microscopic findings of pancreatic islets from non-treated (A) and pioglitazone-treated (B) MLDS (30 mg/kg body-weight) mice at day 28. Pancreata were fixed with 10% formalin and embedded in paraffin. The sections were cut in 5- μ m and stained with HE. Scale bar indicates 150 μ m.

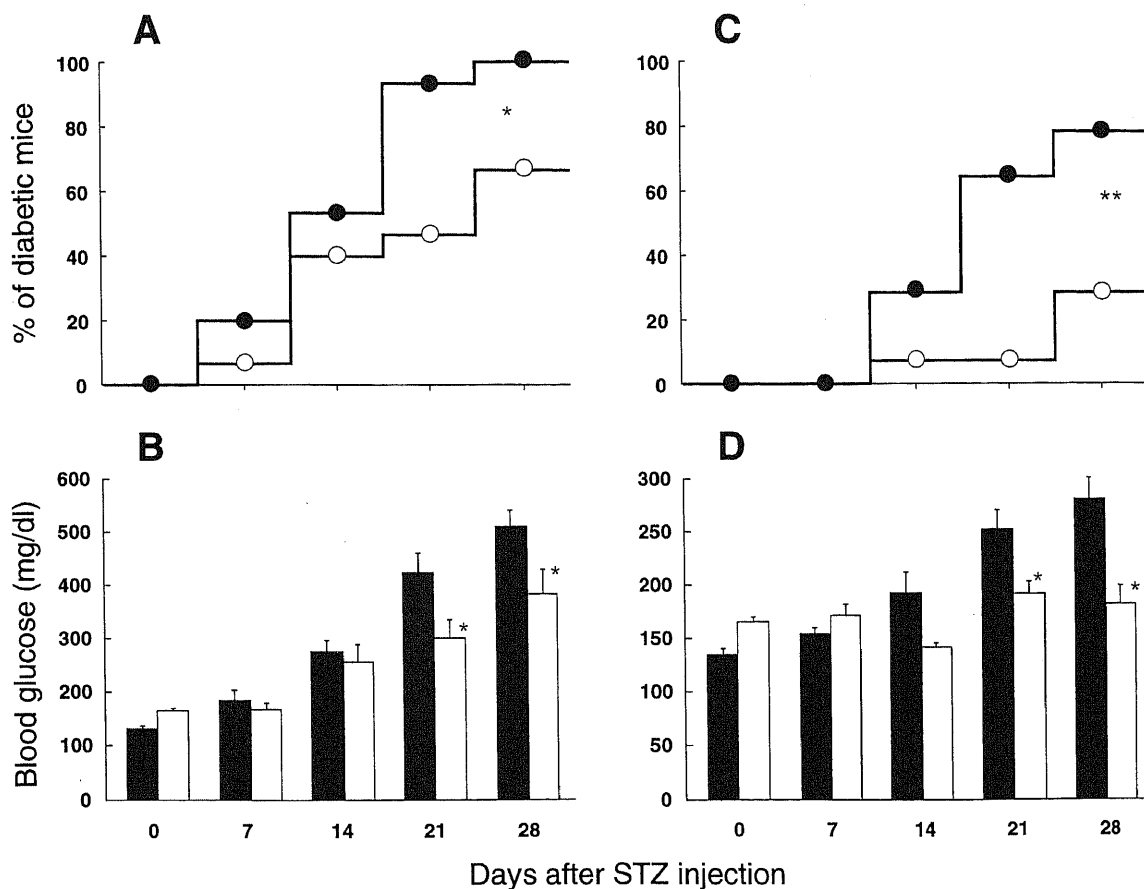


Fig. 8. Effects of pioglitazone on the development of MLDS diabetes in mice. Male CD-1 mice were fed a regular diet with (open circle, open bar) or without (closed circle, closed bar) pioglitazone. Pioglitazone was given as a 0.01% admixture from 7 days before the first STZ administration. Forty (A, B) or 30 (C, D) mg/kg body weight of STZ was given intraperitoneally for 5 consecutive days. Fed blood glucose levels were measured every week. The overall differences of the diabetes prevalence were significant. A and C, diabetes incidences; B and D, mean blood glucose levels. $n = 15$ (A, B) and 14 (C, D) for each point. Vertical bars indicate SEM.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by the Log-rank (Mantel-Cox) test (A, C) or Student's t -test (B, D).

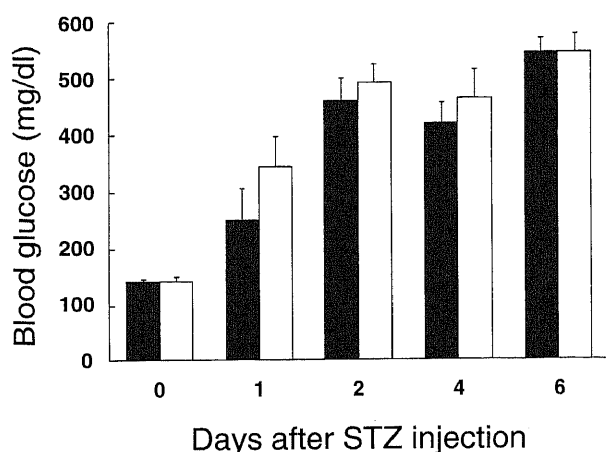


Fig. 9. Effects of pioglitazone on the development of single high-dose STZ diabetes in mice. Male CD-1 mice were fed a regular diet with (open bar) or without (closed bar) pioglitazone from 7 days before STZ administration. STZ at a dose of 250 mg/kg body weight was given intraperitoneally at day 0. Fed blood glucose levels were monitored at day 0, 1, 2, 4, and 6. There were no statistical differences in blood glucose levels between the pioglitazone-treated and the non-treated groups by Student's t -test. Values are \bar{x} of 5 mice for each point. Vertical bars indicate SEM.

島炎指数は、第14日では 0.837 ± 0.279 、第28日では 1.091 ± 0.139 であった。ピオグリタゾン投与群では、図7のごとくラ島炎の進展が抑制されており、ラ島炎指数は第14日では 0.173 ± 0.083 、第28日では 0.180 ± 0.108 と、対照MLDS群に比し有意に低値であった(表1)。このピオグリタゾンによるラ島炎の抑制効果は、40 mg/kgのSTZを投与した場合にも同様に認められた(表1)。

5. ピオグリタゾンによるMLDSマウスの糖尿病発症率の抑制

ピオグリタゾンによるラ島炎の進展抑制により、最終的にMLDSマウスの糖尿病発症が抑制されるか検討した。40 mg/kgのSTZを投与したMLDSマウスでは、第7日より糖尿病を発症し始め、第21日には93%のマウス、第28日にはすべてのマウスが糖尿病を発症した(図8A, 図8B)。ピオグリタゾン投与により、糖尿病発症率は第21日において47%、第28日において67%にとどまり、対照群に比し有意に低かった($p = 0.012$)。また、STZの直接的な作用をより抑えた系として確立した30 mg/kgのSTZにより作成したMLDSマウスでは、第21

日に64%,第28日に79%のマウスが糖尿病を発症したが、ピオグリタゾン投与群では第21日に7%,第28日に29%のマウスが糖尿病を発症したにすぎず、ピオグリタゾンは有意に糖尿病の発症を抑制した($p=0.006$) (図8C, 図8D)。

6. 自己免疫機序を介さないインスリン依存型糖尿病モデルマウスの糖尿病発症に与えるピオグリタゾンの影響

ピオグリタゾンのSTZ自身が持つ糖尿病性への影響およびインスリン依存状態での血糖値に与える影響を検討する目的で、大量単回(250 mg/kg)のSTZを投与し自己免疫学的機序を介さずに化学的にインスリン産生細胞を破壊することにより²²⁾インスリン依存型糖尿病モデルを作成した。図9に示すごとく、ピオグリタゾン投与の有無に関わらずSTZ投与2日後にはすべてのマウスが糖尿病を発症し、ピオグリタゾンは糖尿病発症率および血糖値に有意な影響をおよぼさなかった。

考 察

1型糖尿病は、膵β細胞が破壊されインスリン分泌能が枯渇することにより発症し、その発症過程には自己免疫機序が関与する^{1)~3)}。1型糖尿病の発症に関わる免疫担当細胞のなかでも、マクロファージは、抗原提示細胞として働き、また細胞傷害性のサイトカインやNOを分泌することにより、ラウ炎の形成と膵β細胞破壊に深く関与すると考えられている^{3)~5)}。実際、1型糖尿病の自然発症モデルであるBBラットでは発症過程初期にラウに浸潤する炎症細胞はマクロファージであり²³⁾、同じく非肥満糖尿病(non-obese diabetic, NOD)マウスではラウ炎の形成と糖尿病の発症がマクロファージの不活性化によって完全に抑制されることが知られている²⁴⁾²⁵⁾。STZによる糖尿病モデルはSTZが膵β細胞に対して特異的な細胞毒性を有することを利用したモデルであり、ラットやマウスにSTZを大量に投与した場合には、ラウ炎を来すことなく48時間以内に膵β細胞は破壊されインスリン依存状態の糖尿病を発症する²²⁾。一方、単回の投与では糖尿病を来さない少量のSTZ(30-40 mg/kg)を5日間連続でCD-1マウスに投与することにより作成したMLDS糖尿病モデルは、STZ投与後にラウ炎を伴って膵β細胞が傷害され、次第にインスリン依存状態へと至る、ヒト1型糖尿病に類似した糖尿病モデルである¹⁶⁾。MLDS糖尿病モデルにおいても、ラウ炎に先行してマクロファージが浸潤することが組織学的に証明されており²⁶⁾、さらに、NODマウス同様、シリカ¹⁵⁾や ω -3脂肪酸¹⁶⁾の投与によりマクロファージの機能を阻害するとラウ炎形成および糖尿病発症が抑止されることから、本モデルのラウ炎進展と糖尿病発症におけるマクロファージの役割の重要性が示唆されている。

今回の検討でマクロファージ活性化の指標として用いたNOは、平滑筋弛緩作用や免疫系における生体防御反応など様々な生理作用を媒介する生体にとって必須の細胞内・細胞間情報伝達物質として作用する²⁷⁾反面、誘導型NO合成酵素(inducible nitric oxide synthase, iNOS)によって過剰に産生されると自身の細胞毒性および過酸化亜硝酸などの二次的な活性物質の生成により臓器血流の減少や細胞傷害を生じ、慢性関節リウマチや炎症性腸疾患、敗血症性ショックなどの様々な疾病をひき起こす²⁸⁾。1型糖尿病発症に至る膵β細胞傷害機構においてもその関与が推察されており、試験管内ではNOがクレブス回路の鉄含有酵素アコニターゼ活性を阻害してミトコンドリア機能を低下させ²⁹⁾、またスーパーオキシドと反応して過酸化亜硝酸、さ

らにはヒドロキシルラジカルを生成し、膵β細胞の核およびミトコンドリアDNA鎖を切断することが示されている³⁰⁾。このDNA鎖切断は、ポリADPリボース合成酵素の活性化を介してその基質である細胞内NAD量の減少を来し、膵β細胞のプロインスリン合成の障害をもたらす³¹⁾³²⁾。さらにNOは、cGMP依存性タンパクキナーゼ³³⁾やFasの誘導・発現³⁴⁾を介してアポトーシスを惹起する。生体内においても、最近、膵β細胞にiNOSを過剰発現させたトランスジェニックマウスが作成され、NOの過剰産生が実際に膵β細胞のDNA鎖切断、細胞破壊をひき起こして1型糖尿病を発症させることが明らかとなった³⁵⁾。またiNOS欠損マウスではMLDS糖尿病発症に抵抗性であること³⁶⁾や、iNOSの阻害剤であるアミノグアニジンの投与によりNODマウスの糖尿病発症が遷延すること³⁷⁾も報告されており、NOが1型糖尿病の発症に深く関与していることが推察される。マクロファージでは、活性化の程度に応じてiNOSが誘導され、iNOSの発現依存性にNOが産生される²⁷⁾。活性化されたマクロファージは、自身よりNOを産生するのみならず、IL-1 β の産生・放出により膵β細胞内のiNOSを発現誘導する³⁵⁾³⁸⁾。また、このIL-1 β による膵β細胞内でのNO産生の誘導は、活性化されたマクロファージやT細胞から産生されるTNF- α の共存下でさらに亢進することも報告されている³⁹⁾。したがって、活性化マクロファージは膵β細胞傷害をもたらすNOの産生においても中心的役割を担うと考えられる。

本研究では、MLDSマウスの糖尿病発症過程において、これまでの報告²⁰⁾⁴⁰⁾同様、腹腔内マクロファージが活性化されることを確認し、その活性化が発症早期に一過性であること、また、脾マクロファージは活性化されないことを明らかにした。これらの事実は、MLDSマウスの腹腔内マクロファージ活性化がラウ局所でのマクロファージ活性化を反映する可能性を示唆する。NODマウスでも糖尿病発症直前のマウスの腹腔内マクロファージをラウ炎を形成する以前の幼少マウスに移植するとラウ炎および糖尿病発症が惹起されることが知られており⁴¹⁾、マウス1型糖尿病モデルにおける腹腔内マクロファージの活性化は、ラウ炎に先行するラウ局所でのマクロファージ活性化を反映しているものと考えられる。

チアゾリジン系薬剤は、2型糖尿病の一因であるインスリン抵抗性の改善を標的として1980年代初頭に開発され、近年、2型糖尿病治療薬として臨床応用されるに至った新しいタイプの薬剤である⁹⁾。最近までその分子レベルでの作用機序についてはほとんど解明されていなかったが、1995年になりチアゾリジン系薬剤が核内受容体型転写因子PPAR γ のリガンドであることが判明した⁷⁾。現在のところ、チアゾリジン系薬剤はPPAR γ を介して、主に、脂肪組織⁴²⁾や筋⁴³⁾でのTNF- α の産生抑制やTNF- α による細胞内インスリン情報伝達障害の改善作用⁴⁴⁾、前駆脂肪細胞の分化促進作用⁹⁾により、インスリン抵抗性を改善すると考えられている。ごく最近、PPAR γ ノックアウトマウス⁴⁵⁾やヒトのPPAR γ 遺伝子多型⁴⁶⁾⁴⁷⁾の解析結果が相次いで報告され、PPAR γ が生体内においてインスリン感受性に関与していることが示唆されている。

当教室のOhtaらは、チアゾリジン系薬剤が臨床応用される以前よりその抗動脈硬化作用に着目し、チアゾリジン系薬剤の1つであるトログリタゾンがヒトメサングウム細胞¹⁰⁾およびヒト膵静脈内皮細胞¹¹⁾においてTNF- α によって誘導されるMCP-1の発現をmRNAレベルから抑制することを見出してき

た。また、当教室の野原¹²⁾もトログリタゾンがヒト臍帯静脈内皮細胞において、TNF- α あるいはIL-1 β により誘導されるPAI-1の発現を抑制することを明らかにした。サイトカイン刺激によるMCP-1¹³⁾とPAI-1¹⁴⁾の発現誘導の一部には、核内転写因子NF- κ Bの活性化が関与している。NF- κ Bは、マクロファージにおけるiNOS⁴⁸⁾やTNF- α ⁴⁹⁾の発現誘導を含むマクロファージの活性化にも関与することが知られていることから、チアゾリジン系薬剤はマクロファージの活性化も抑制する可能性が考えられた。そこで本研究では、まず、IFN- γ とLPSによる腹腔内マクロファージの活性化をNO産生を指標として試験管内で観察し、新しいチアゾリジン系薬剤であるピオグリタゾンが試験管内においてマクロファージからのIFN- γ -LPS誘導性NO産生を用量依存性に抑制することを明らかとした。最近になり、Ricoteら¹⁹⁾は試験管内においてチアゾリジン系薬剤を含めたPPAR γ アゴニストがマクロファージにおけるiNOSの発現を抑制することを見出し、その一部は転写因子であるNF- κ BやSTAT (signal transducers and activators of transcription), AP-1 (activator promoter-1) の不活性化を介するものであることを示した。同様に、Jiangら⁵⁰⁾はPPAR γ アゴニストが単球においてTNF- α やIL-1 β , IL-6といった炎症性サイトカインの産生も抑制することを報告した。これらの報告は今回の知見を支持しており、チアゾリジン系薬剤に代表されるPPAR γ アゴニストは、試験管内において、マクロファージからのNOや炎症性サイトカインの産生をはじめとするマクロファージの活性化を抑制することが明らかとなった。

次に、試験管内で認められたチアゾリジン系薬剤によるマクロファージ活性化抑制作用を生体内でも確認するため、マクロファージの活性化が発症に重要な役割を担っている疾患モデルである¹⁵⁾⁻¹⁷⁾MLDSマウス1型糖尿病モデルを用い、チアゾリジン系薬剤が実際に腹腔内マクロファージの活性化やラ鳥炎形成、糖尿病発症を抑制し得るかどうかについて検討した。その結果、ピオグリタゾンは、発症早期のMLDSマウスの腹腔内マクロファージからのNO産生を抑制し、チアゾリジン系薬剤が自己免疫疾患モデル動物においてマクロファージ活性化を抑制し得ることを明らかとした。さらに、ピオグリタゾンはMLDSマウスのラ鳥炎の進展を抑制し、最終的に糖尿病の発症をも抑止した。ピオグリタゾン投与は、大量単回STZ投与により作成した自己免疫機序を介さない化学的なインスリン依存型糖尿病の発症と血糖値には影響を与えておらず、ピオグリタゾンがMLDS糖尿病の発症を抑制する機序として、STZによる膵 β 細胞の直接傷害作用の抑制やインスリン非依存性血糖降下作用が関与した可能性は考え難い。ごく最近になり、Bealesら⁵¹⁾もチアゾリジン系薬剤の1つであるトログリタゾンがNODマウスにおける1型糖尿病発症を抑制することを報告した。しかし、その機序については検討されておらず、また、トログリタゾンには抗酸化作用を有するビタミンE骨格であるクロマン環が存在し⁵²⁾、ビタミンE⁵³⁾や抗酸化剤⁵⁴⁾⁵⁵⁾の投与のみでも1型糖尿病モデルマウスの糖尿病発症が遅延することを考え合わせると、トログリタゾンの糖尿病発症抑制効果がチアゾリジン骨格の作用によるものか、あるいはビタミンE骨格を介した抗酸化作用によるものかは不明であった。本研究は、チアゾリジン骨格のみを有するピオグリタゾンを用いて検討を行っており、チアゾリジン系薬剤が1型糖尿病モデルの糖尿病発症を抑制し得ることを明確に示した。

チアゾリジン系薬剤が1型糖尿病発症を抑止する機序として、今回はマクロファージ活性化の指標としてNO産生のみを観察したが、マクロファージ活性化に伴うTNF- α やIL-1 β などの膵 β 細胞傷害に働くサイトカイン産生も抑制しているものと考えられる。また、ヒトメサンギウム細胞とヒト臍帯静脈内皮細胞において当教室で見出してきたように、膵 β 細胞上にもMCP-1あるいはMCP-1類似のケモカインがサイトカイン刺激により誘導されており、チアゾリジン系薬剤はそのケモカインの発現抑制を介してラ鳥炎形成を抑制した可能性も考えられる。ごく最近になってラットの膵 β 細胞をIL-1 β で刺激するとMCP-1の発現が誘導されることが見出され⁵⁶⁾、さらに、ラ氏鳥にMCP-1を過剰発現させたトランスジェニックマウスではラ鳥炎が惹起されることが報告されており⁵⁷⁾、1型糖尿病のラ鳥炎形成に先行して膵 β 細胞にMCP-1が発現誘導される可能性は十分にあり得る。今後は、MLDSマウスにおけるラ鳥でのMCP-1の発現とチアゾリジン系薬剤によるその抑制効果を検証する必要がある。

1型糖尿病は発症し進行すると生命維持のためにインスリン治療を欠くことができず、患者は多くの場合頻回のインスリン注射を余儀無くされる。また、インスリン治療による血糖コントロールは困難なことも多く、患者はしばしば高血糖や低血糖をくり返す。さらに、高血糖の持続は糖尿病性合併症による失明や慢性腎不全を惹き起こし、患者のクオリティー・オブ・ライフを著しく低下させる⁵⁸⁾。1型糖尿病の発症には遺伝因子が強く関与することが知られており、一卵生双生児での一致率は約40%と高率である⁵⁹⁾。また、欧米のみならず我が国でも1型糖尿病患者の同胞には1型糖尿病の発症が高頻度に認められている⁶⁰⁾。そのため、そうした1型糖尿病予備群ともいえる1型糖尿病患者の近親者にとって、1型糖尿病の発症予防は非常に重要な問題である。また最近、ゆっくりと進行するタイプの1型糖尿病である緩徐進行性インスリン依存型糖尿病 (slowly progressive insulin-dependent diabetes mellitus, SPIDDM)⁶¹⁾の早期診断が抗グルタミン酸脱炭酸酵素抗体の測定により比較的容易になり⁶²⁾⁶³⁾、早期SPIDDM患者に対するインスリン依存状態への進行抑止も問題となっている。現在までに、これらの1型糖尿病予備群⁶⁴⁾や早期SPIDDM患者⁶⁵⁾に対する発症・進行予防として少量インスリン投与が試みられ、その有効性が示唆されている。一方、インスリン注射よりも簡便な内服薬投与による1型糖尿病発症抑制の試みとしては、抗 β 細胞破壊効果をもつニコチン酸アミドの大規模臨床試験が1型糖尿病発症高危険群を対象として欧州で行われたが、成功には至らなかった⁶⁶⁾⁶⁷⁾。本研究の結果は、すでに2型糖尿病の治療薬として普及しているチアゾリジン系薬剤に1型糖尿病の発症や進行を抑止する内服薬としての道を開くものである。今後は、同薬剤がヒトの1型糖尿病の発症や進行を抑止できるかどうかについての臨床的検討が必要である。

結 論

チアゾリジン系薬剤の1つであるピオグリタゾンが、試験管内でマウス単離腹腔内マクロファージの活性化におよぼす影響をマクロファージからのNO産生を指標として検討した。さらに、ピオグリタゾンがMLDS投与によるマウス1型糖尿病モデルにおけるマクロファージ活性化を抑制し、ラ鳥炎形成や糖尿病発症を抑止し得るかどうかについて検討し、以下の結論を得た。

1. 試験管内において、IFN- γ および LPS はそれぞれ用量依存性に腹腔内マクロファージの活性化を惹起した。また IFN- γ と LPS は、その共存下で腹腔内マクロファージ活性化に対し相乗的に作用した。

2. 試験管内において、ピオグリタゾン は IFN- γ と LPS の共存下における腹腔内マクロファージの活性化を用量依存性に抑制した。

3. 色素排泄法による検討ではピオグリタゾンに細胞毒性を認めず、ピオグリタゾンのマクロファージ活性化抑制作用はその細胞毒性によるものではなかった。

4. CD-1 マウスに 40 mg/kg の STZ を 5 日間連続で腹腔内注射し、MLDS 1 型糖尿病モデルを作成した。さらに、STZ の直接作用をより抑えるため、30 mg/kg の STZ を用いた MLDS 1 型糖尿病モデルを作成、確立した。

5. MLDS 糖尿病マウスから単離した腹腔内マクロファージは、糖尿病発症早期において一過性に活性化していた。一方、対照マウスの腹腔内マクロファージや MLDS 糖尿病マウスの脾マクロファージにはそのような活性化を認めなかった。

6. ピオグリタゾン混餌食投与は、MLDS マウスの糖尿病発症早期における腹腔内マクロファージの活性化を有意に抑制した。

7. ピオグリタゾン混餌食投与は、MLDS マウスのラウ炎進展を有意に抑制した。

8. ピオグリタゾン混餌食投与は、MLDS マウスの糖尿病発症を有意に抑制した。

9. ピオグリタゾン混餌食投与は、大量単回 STZ 投与による 1 型糖尿病モデルマウスの糖尿病発症および血糖値には影響をおよぼさなかった。

10. 以上の結果より、ピオグリタゾンは、マクロファージの活性化を抑制し、1 型糖尿病モデルにおけるラウ炎の形成と糖尿病発症を抑止する作用を有することが明らかとなった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御検閲を賜りました恩師小林健一教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行に際し、終始、御指導、御助言をいただきました金沢大学医学部内科学第一講座 笹俊成助手ならびに金沢市立病院内科永井幸広博士に厚く御礼申し上げます。また、組織標本作成に御協力いただいた片山明子氏に深く感謝いたします。さらに、本研究に御協力いただきました金沢大学医学部第一内科学講座の皆様へ深謝いたします。なお、本論文の一部は The 34th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (1998, Barcelona, Spain) および第 42 回日本糖尿病学会年次学術集会 (1999, 横浜)、第 43 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2000, 名古屋) において発表した。

文 献

- 1) Eisenbarth GS, Ziegler AG, Colman PA. Pathogenesis of insulin-dependent (type I) diabetes mellitus. *In* Kahn CR, Weir GC (eds), Joslin's Diabetes Mellitus, 13th ed, p216-239, Lea & Febiger, Melvern, 1994
- 2) Castano L, Eisenbarth GS. Type-I diabetes: A chronic autoimmune disease of human, mouse, and rat. *Annu Rev Immunol* 8: 647-679, 1990
- 3) Lernmark A, Falorni A. Immunology of insulin-dependent diabetes mellitus. *In* Pickup JC, Williams G (eds), Textbook of Diabetes, 2nd ed, p15.1-15.23, Blackwell Science, Oxford, 1997
- 4) Rabinovitch A. Immunoregulatory and cytokine imbalances

in the pathogenesis of IDDM: therapeutic intervention by immunostimulation? *Diabetes* 43: 613-621, 1994

5) Rabinovitch A, Skyler JS. Prevention of type 1 diabetes. *Med Clin North Am* 82: 739-755, 1998

6) Fujita T, Sugiyama Y, Taketomi S, Sohda T, Kawamatsu Y, Iwatsuka H, Suzuoki Z. Reduction of insulin resistance in obese and/or diabetic animals by 5-[4-(1-methylcyclohexylmethoxy)benzyl]-thiazolidine-2,4-dione (ADD-3878, U-63,287, ciglitazone), a new antidiabetic agent. *Diabetes* 32: 804-810, 1983

7) Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). *J Biol Chem* 270: 12953-12956, 1995

8) Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr Opin Genet Dev* 5: 571-576, 1995

9) Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y, Kadowaki T. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest* 101: 1354-1361, 1998

10) Ohta MY, Nagai Y, Takamura T, Nohara E, Kobayashi K. Inhibitory effect of troglitazone on tumor necrosis factor alpha-induced expression of monocyte chemoattractant protein-1 in human mesangial cells. *Metabolism* 49: 163-166, 2000

11) Ohta MY, Nagai Y, Takamura T, Nohara E, Kobayashi K. Inhibitory effect of troglitazone on TNF- α -induced expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in human endothelial cells. *Diabetes Res Clin Pract* 48: 171-176, 2000

12) 野原えりか. 培養ヒト臍帯静脈内皮細胞におけるサイトカイン誘導プラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター・タイプ 1 発現に及ぼすトログリタゾンの抑制効果. *十全医会誌* 108: 467-474, 1999

13) Ping D, Boekhoudt GH, Rogers EM, Boss JM. Nuclear factor- κ B p65 mediates the assembly and activation of the TNF-responsive element of the murine monocyte chemoattractant-1 gene. *J Immunol* 162: 727-734, 1999

14) Ferran C, Millan MT, Csizmadia V, Cooper JT, Brostjan C, Bach FH, Winkler SA. Inhibition of NF- κ B by pyrrolidine dithiocarbamate blocks endothelial cell activation. *Biochem Biophys Res Commun* 214: 212-223, 1995

15) Ihm SH, Lee KU, Rhee BD, Min HK. Initial role of macrophage in the development of anti- β -cell cellular autoimmunity in multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Diabetes Res Clin Pract* 10: 123-126, 1990

16) Linn T, Noke M, Woehrl M, Kloer HU, Hammes HP, Litzlbauer D, Bretzel RG, Federlin K. Fish oil-enriched diet and reduction of low-dose streptozotocin-induced hyperglycemia: inhibition of macrophage activation. *Diabetes* 38: 1402-1411, 1989

17) Reddy S, Wu D, Elliott RB. Low dose streptozotocin causes diabetes in severe combined immunodeficient (SCID) mice without immune cell infiltration of the pancreatic islets. *Autoimmunity* 20: 83-92, 1995

18) Like AA, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic

- insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science* 193: 415-417, 1976
- 19) Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391: 79-82, 1998
- 20) Andrade J, Conde M, Sobrino F, Bedoya FJ. Activation of peritoneal macrophages during the prediabetic phase in low-dose streptozotocin-treated mice. *FEBS Lett* 327: 32-34, 1993
- 21) Green LG, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126: 131-138, 1982
- 22) Rodrigues B, Poucheret P, Battell ML, McNeill JH. Streptozotocin-induced diabetes: induction, mechanism(s), and dose dependency. In McNeill JH (ed), *Experimental models of diabetes*, p3-17, CRC Press LLC, Boca Raton, 1999
- 23) Lee KU, Kim MK, Amano K, Pak CY, Jaworski MA, Mehta JG, Yoon JW. Preferential infiltration of macrophages during early stages of insulinitis in diabetes-prone BB rats. *Diabetes* 37: 1053-1057, 1988
- 24) Lee KU, Amano K, Yoon JW. Evidence for initial involvement of macrophage in development of insulinitis in NOD mice. *Diabetes* 37: 989-991, 1988
- 25) Charlton B, Bacelj A, Mandel TE. Administration of silica particles or anti-Lyt2 antibody prevents beta-cell destruction in NOD mice given cyclophosphamide. *Diabetes* 37: 930-935, 1988
- 26) Kolb BV, Epstein S, Kiesel U, Kolb H. Low-dose streptozotocin induced diabetes in mice: electron microscopy reveals single-cell insulinitis before diabetes onset. *Diabetes* 37: 21-27, 1988
- 27) Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142, 1991
- 28) Moncada S, Higgs EA. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329: 2002-2012, 1993
- 29) Welsh N, Eizirik DL, Bendtzen K, Sandler S. Interleukin-1 β -induced nitric oxide production in isolated rat pancreatic islets requires gene transcription and may lead to inhibition of the Krebs cycle enzyme aconitase. *Endocrinology* 129: 3167-3173, 1991
- 30) Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radicals production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1620-1624, 1990
- 31) Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature* 294: 284-286, 1981
- 32) Radons J, Heller B, Bürkle A, Hartmann B, Rodriguez ML, Kröncke KD, Burkart V, Kolb H. Nitric oxide toxicity in islet cells involves poly (ADP ribose) polymerase activation and concomitant NAD⁺ depletion. *Biochem Biophys Res Commun* 199: 1270-1277, 1994
- 33) Leweth AC, Williams GT, Scarpello JHB, Morgan NG. Evidence for the involvement of cGMP and protein kinase G in nitric oxide-induced apoptosis in the pancreatic B-cell line, HIT-T15. *FEBS Lett* 400: 285-288, 1997
- 34) Stassi G, DeMaria R, Trucco G, Rudert W, Testi R, Galluzzo A, Giardano C, Trucco M. Nitric oxide primes pancreatic β cells for Fas-mediated destruction in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med* 186: 1193-1200, 1997
- 35) Takamura T, Kato I, Kimura N, Nakazawa T, Yonekura H, Takasawa S, Okamoto H. Transgenic mice overexpressing type 2 nitric-oxide synthase in pancreatic β cell develop insulin-dependent diabetes without insulinitis. *J Biol Chem* 273: 2493-2496, 1998
- 36) Flodström M, Tyrberg B, Eizirik DL, Sandler S. Reduced sensitivity of inducible nitric oxide synthase-deficient mice to multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes* 48: 706-713, 1999
- 37) Corbett JA, Mikhael A, Simizu J, Frederick K, Misko TP, McDaniel ML, Kanagawa O, Unanue ER. Nitric oxide production in islets from nonobese diabetic mice: Aminoguanigine-sensitive and -resistant stages in the immunological diabetic process. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8992-8995, 1993
- 38) Eizirik DL, Leijerstam F. The inducible form of nitric oxide synthase (iNOS) in insulin-producing cells. *Diabete Metab* 20:116-122, 1994
- 39) Eizirik DL, Sandler S, Welsh N, Cetkovic-Cvrlje M, Nieman A, Geller DA, Pipeleers DG, Bendtzen K, Hellerstrom C. Cytokines suppress human islet function irrespective of their effects on nitric oxide generation. *J Clin Invest* 93:1968-1974, 1994
- 40) Tsuji A, Sakurai H. Vanadyl ion suppresses nitric oxide production from peritoneal macrophages of streptozotocin-induced diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 226: 506-511, 1996
- 41) Shimada A, Takei I, Maruyama T, Kasuga A, Kasatani T, Watanabe K, Asaba Y, Ishii T, Tadakuma T, Habu S, Miyazaki J, Saruta T. Acceleration of diabetes in young NOD mice with peritoneal macrophages. *Diabetes Res Clin Pract* 24: 69-76, 1994
- 42) Hofmann C, Lorenz K, Braithwaite SS, Colca JR, Palazuk BJ, Hotamisligil GS, Spiegelman BM. Altered gene expression for tumor necrosis factor- α and its receptors during drug dietary modulation of insulin resistance. *Endocrinology* 134: 264-270, 1994
- 43) Murase K, Odaka H, Suzuki M, Tayuki N, Ikeda H. Pioglitazone time-dependently reduces tumor necrosis factor- α level in muscle and improves metabolic abnormalities in Wister fatty rats. *Diabetologia* 41: 257-264, 1998
- 44) Peraldi P, Xu M, Spiegelman BM. Thiazolidinediones block tumor necrosis factor- α -induced inhibition of insulin signaling. *J Clin Invest* 100: 1863-1869, 1997
- 45) Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Kadowaki T. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 4: 597-609, 1999
- 46) Barroso I, Gurnell M, Crowley VE, Agostini M, Schwabe

- JW, Soos MA, Maslen GL, Williams TD, Lewis H, Schafer AJ, Chatterjee VK, O'Rahilly S. Dominant negative mutations in human PPAR γ associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 402: 880-883, 1999
- 47) Hara K, Okada T, Tobe K, Yasuda K, Mori Y, Kadowaki H, Hagura R, Akanuma Y, Kimura S, Ito C, Kadowaki T. The Pro12Ala polymorphism in PPAR γ 2 may confer resistance to type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 271: 212-216, 2000
- 48) Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW, Murphy WJ. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon γ and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9730-9734, 1993
- 49) Drouet C, Shakhov AN, Jongeneel CV. Enhancers and transcription factors controlling the inducibility of the tumor necrosis factor-alpha promoter in primary macrophages. *J Immunol* 147:1694-1700, 1991
- 50) Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391: 82-86, 1998
- 51) Beales PE, Liddi R, Giorgini AE, Signore A, Procaccini E, Batchelor K, Pozzilli P. Troglitazone prevents insulin dependent diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Eur J Pharmacol* 357: 221-225, 1998
- 52) Fujiwara T, Yoshioka S, Yoshioka T, Ushiyama I, Horikoshi H. Characterization of new oral antidiabetic agent CS-045. Studies in KK and ob/ob mice and Zucker fatty rats. *Diabetes* 37: 1549-1558, 1988
- 53) Beales PE, Williams AJK, Albertini MC, Pozzilli P. Vitamin E delays diabetes onset in the non-obese diabetic mouse. *Horm Metab Res* 26: 450-452, 1994
- 54) Drash AL, Rudert WA, Borquaye S, Wang R, Lieberman I. Effect of probucol on development of diabetes mellitus in BB rats. *Am J Cardiol* 62: 27B-30B, 1988
- 55) Rabinovitch A, Suarez WL, Power RF. Lazaroid antioxidant reduces incidence of diabetes and insulinitis in nonobese diabetic mice. *J Lab Clin Med* 121:603-607, 1993
- 56) Chen MC, Schuit F, Eizirik DL. Identification of IL-1 β -induced messenger RNAs in rat pancreatic beta cells by differential display of messenger RNA. *Diabetologia* 42: 1199-1203, 1999
- 57) Grewal IS, Rutledge BJ, Fiorillo JA, Gu L, Gladue RP, Flavell RA, Rollins BJ. Transgenic monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in pancreatic islets produces monocyte-rich insulinitis without diabetes. *J Immunol* 159: 401-408, 1997
- 58) Mayou R, Bryant B, Turner R. Quality of life in non-insulin-dependent diabetes and a comparison with insulin-dependent diabetes. *J Psychosom Res* 34: 1-11, 1990
- 59) Tattersall RB, Pyke PA. Diabetes in identical twins. *Lancet* 2: 1120-1125, 1972
- 60) Ikegami H, Ogihara T. Genetics of insulin-dependent diabetes mellitus. *Endocr J* 43: 605-613, 1996
- 61) Kobayashi T, Tamemoto K, Nakanishi K, Kato N, Okubo M, Kajio H, Sugimoto T, Murase T, Kosaka K. Immunogenetic and clinical characterization of slowly progressive IDDM. *Diabetes Care* 16: 780-788, 1993
- 62) Kobayashi T, Nakanishi K, Okubo M, Murase T, Kosaka K. GAD antibodies seldom disappear in slowly progressive IDDM. *Diabetes Care* 19: 1031, 1996
- 63) Seissler J, de Sonnaville JJ, Morgenthaler NG, Steinbrenner H, Glawe D, Khoo-Morgenthaler UY, Lan MS, Notkins AL, Heine RJ, Scherbaum WA. Immunological heterogeneity in type I diabetes: presence of distinct autoantibody patterns in patients with acute onset and slowly progressive disease. *Diabetologia* 41: 891-897, 1998
- 64) Keller RJ, Eisenbarth GS, Jackson RA. Insulin prophylaxis in individuals at high risk of type I diabetes. *Lancet* 341: 927-928, 1993
- 65) Kobayashi T, Nakanishi K, Murase T, Kosaka K. Small dose of subcutaneous insulin as a strategy for preventing slowly progressive β -cell failure in islet cell antibody-positive patients with clinical feature of NIDDM. *Diabetes* 45: 622-626, 1996
- 66) Lampeter EF, Klinghammer A, Scherbaum WA, Heinze E, Haastert B, Giani G, Kolb H. The Duetsche Nicotinamide Intervention Study: an attempt to prevent type 1 diabetes. *Diabetes* 47: 980-984, 1998
- 67) Visalli N, Cavallo MG, Signore A, Baroni MG, Buzzetti R, Fioriti E, Mesturino C, Fiori R, Lucentini L, Matteoli MC, Crino A, Corbi S, Spera S, Teodonio C, Paci F, Amoretti R, Pisano L, Suraci C, Multari G, Sulli N, Cervoni M, De Mattia G, Faldetta MR, Boscherini B, Pozzilli P. A multi-centre randomized trial of two different doses of nicotinamide in patients with recent-onset type 1 diabetes (the IMDIAB VI). *Diabetes Metab Res Rev* 15: 181-185, 1999

A Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Agonist Inhibits Macrophage Activation and the Development of Type 1 Diabetes Hitoshi Ando, Department of Internal Medicine (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640-J. *Juzen Med Soc.*, **109**, 343-355 (2000)

Key words type 1 diabetes, multiple low-dose streptozotocin, pioglitazone, thiazolidinedione, peroxisome proliferator-activated receptor γ

Abstract

In the development of type 1 diabetes, macrophages play important roles in the development of insulinitis and islet β cell destruction. Thiazolidinedione is a direct ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ and inhibits the both cytokine-induced expression of monocyte chemoattractant protein 1 and plasminogen activator inhibitor type 1 which are mediated partly by nuclear factor kappa B (NF- κ B). Therefore, thiazolidinedione seemed to inhibit also macrophage activation mediated by NF- κ B. The aim of this study was to investigate the effect of pioglitazone, a thiazolidinedione compound, on the development of multiple low-dose streptozotocin (MLDS)-induced autoimmune diabetes via inhibition of macrophage activation. Interferon- γ and lipopolysaccharide dose-dependently and synergistically stimulated nitrite release from primary peritoneal macrophages from CD-1 mice. Pioglitazone, dose-dependently from 5 to 100 μ M, suppressed nitrite release from primary peritoneal macrophages stimulated with 0.5 U/ml interferon- γ and 0.01 μ g/ml lipopolysaccharide ($80.3 \pm 4.9\%$ of control at 10 μ M of pioglitazone). Pioglitazone did not affect the cell viability assessed by the trypan blue exclusion method. Male CD-1 mice intraperitoneally injected with five daily subdiabetogenic doses (40mg/kg body weight) of streptozotocin (STZ) developed mononuclear cell infiltration in and around islets, followed by hyperglycemia 2-4 weeks after STZ injection. Primary peritoneal macrophages harvested from MLDS mice at day 7 produced significantly large amount of nitrite compared with those from control mice. Such activation was not observed in the splenic macrophages or at day 28. Oral administration of pioglitazone (0.01% food admixture) from 7 days before the first STZ injection significantly inhibited the activation of peritoneal macrophages from MLDS mice at day 7. Insulinitis indices in the pioglitazone-treated group were significantly lower than those in the control group at day 28, indicating that pioglitazone blocked the infiltration of mononuclear cells into islets in MLDS mice. Pioglitazone reduced the diabetes prevalence, from 93 to 47% at day 21, and from 100 to 67% at day 28. The overall difference of the diabetes prevalence was significant ($p=0.012$). Pioglitazone administration from 7 days before STZ injection had no preventive or ameliorative effect on diabetes development induced by a single diabetogenic dose (250 mg/kg body weight) of STZ. These findings suggest that a thiazolidinedione blocks the autoimmune process in the development of MLDS diabetes, partly by inhibiting the macrophage activation.