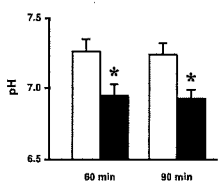


別紙様式 3

京都ヘルスサイエンス総合研究センター共同研究に係る研究成果
(ホームページ用)

グループ名	発症・治癒機構解明研究グループ		
	(所属)	(職名)	(氏名)
グループ長	京都府立医科大学	研究部長	奥田 司
研究組織の体制	京都府立医科大学 京都府立医科大学 京都府立医科大学 京都府立大学 京都薬科大学 京都工芸繊維大学	教授 教授 講師 助教 教授 教授	丸中良典 中村直登 福井道明 青井渉 芦原英司 Giuseppe Pezzotti
研究の名称	組織間質液pH変動を介する2型糖尿病インスリン抵抗性発症の分子細胞メカニズム解明		
研究のキーワード (注1)	糖尿病、組織間質液、インスリン抵抗性、pH		
研究の概要 (注2)	<p>糖尿病患者の数は、予備群も含めると約2,000万人と言われている。その内の2型糖尿病は生活習慣病であり、有効な治療薬は未だなく、生活指導が現時点では有効な対処法である。2型糖尿病の発症最重要成因はインスリン抵抗性であり、診断のため血糖値・HbA1C・インスリン抵抗性指数(HOMA-IR)が測定されてきたが、予防の観点からは正確な診断法がなく、更なる糖尿病発症のバイオマーカーを見出すことが急務である。申請者らは、2型糖尿病ラットの組織間質液pHが低下することを見出し(Biochem Biophys Res Commun 432:650, 2013)、この組織間質液pH低下がインスリンの受容体への結合能を低下させることを発見し(Biochem Biophys Res Commun 445:170-174, 2014)、間質液pHが新規のバイオマーカーとなり得ることを明らかにしたことから、本研究においては、1) 2型糖尿病における組織間質液pH低下の分子機構の解明、および2) ラマン分光を用いた細胞内H⁺動態解明を目的とした。</p>		
研究の背景	<p>糖尿病患者の数は、予備軍も含めると約2,000万人と言われている。その内の2型糖尿病は生活習慣病であり、有効な治療薬は未だなく、生活指導が現時点では有効な対処法である。2型糖尿病の発症最重要成因はインスリン抵抗性であり、診断のため血糖値・HbA1C・インスリン抵抗性指数(HOMA-IR)が測定されてきたが、予防の観点からは正確な診断法がなく、更なる糖尿病発症のバイオマーカーを見出すことが急務である。申請者らは、2型糖尿病ラットの組織間質液pHが低下することを見出し(Biochem Biophys Res Commun 432:650, 2013)、この組織間質液pH低下がインスリンの受容体への結合能を低下させることを発見し(J Physiol Sci. 63:S199, 2013)、間質液pHが新規のバイオマーカーとなり得ることを明らかにしたことから、本研究においては、1) 2型糖尿病における組織間質液pH低下の分子機構の解明、および2) ラマン分光を用いた細胞内H⁺動態解明を目的とする。</p>		

<p>研究手法</p>	<p>1) 2型糖尿病におけるインスリン抵抗性発現の分子機構の解明実験</p> <ul style="list-style-type: none"> 細胞・分子レベル実験：骨格筋モデルL6細胞を用いて、種々のpHに調整した培養液中で培養し、インスリンのインスリン受容体への結合親和性・インスリンの細胞内シグナル（IRS1リン酸化、AKT、PI3K、GLUT4細胞局在）への培養液pHの影響を検証した。さらには、高グルコース培地で培養したL6細胞における細胞内H⁺動態をラマン分光により検証した。 モデル動物実験：2型糖尿病モデルラットであるOLETF（Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty）ラットに、血糖値、血圧、血中インスリン活性を測定した。対照としては、LETOラットあるいはWisterラットを用いる。ラットの組織間質液のpHをニードル型アンチモン製pH電極にて連続測定し、血糖値、血漿インスリン値、血漿アルドステロン値、尿pH・Na⁺・K⁺血圧測定した。さらに、骨格筋・脂肪組織細胞内pHも合わせて測定した。同様に摂取した骨格筋および脂肪組織細胞におけるインスリンの糖取り込み能も測定する。 <p>2) ラマン分光を用いた細胞内H⁺動態解明</p> <ul style="list-style-type: none"> 細胞・分子レベル・モデル動物実験：ラマン分光法は、励起光を受けた分子が振動し、その分子の振動エネルギーによりシフトしたラマン散光（ラマンシフト）を測定することにより特定の分子を定量することが可能となる。1423 cm⁻¹ ラマンシフトはCOO⁻の分子振動であり、1076 cm⁻¹のラマンシフトはC=Oの分子振動によることが分かっている。一方、COO⁻およびC=Oの比率はpH依存的であるので、1423 cm⁻¹と1076 cm⁻¹のラマンシフト比率を計測することにより、原理的にはpHを計測することができる。この原理を利用して、さらに我々が開発した共焦点ラマン分光測定を用いることにより、細胞内の特定部位のpHを測定し、種々のpHおよびグルコース濃度に調整した培養液中で培養した骨格筋モデルL6細胞およびOLETFラット骨格筋細胞におけるpH計測法の開発およびH⁺動態を検証する。
<p>研究の進捗状況と成果</p>	<p>糖尿病の病態において、組織間質液pHが低下していることを明らかにした。</p> <p>肝臓周囲組織間質液の pH は、対照ラットに比べて、7.23 ± 0.02 (n = 6, control pH 7.34 ± 0.01, p < 0.01) に低下していた。また、記憶にかかわる脳内海馬周囲組織液をアンチモン電極を用いて測定したところ以下の結果を得た (n = 4, 黒いカラムが糖尿病ラット；白抜きカラムが対照ラット： p < 0.05)。</p>  <p>一方で、ラマン分光を用い、組織間質液pH測定を試みている。</p> $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ $\text{pH} = \text{pK} + \log \left(\frac{[\text{HCO}_3^-]}{\text{pCO}_2} \right)$ <p>上記の平衡が生体内では成立している。このことを元に、ラマン分光を用いた[HCO₃⁻]に成功した。ラマン分光 [HCO₃⁻] 測定を実施することにより、糖尿病の病態における pH 低下時における [HCO₃⁻] が可能となった。このことにより、糖尿病病態におけるミトコンドリア活性測定の可能性も視野に入った。今後の展開としては、健常人・メタボリックシンドローム（非糖尿病患者）・糖尿病患者における [HCO₃⁻] より、各群におけるミトコンドリア機能測定を行い、各病態と組織間質液pH低下の原因がミトコンドリア機能低下に起因することを明らかにする。</p>
<p>地域への研究成果の還元状況</p>	<p>本研究成果により、糖尿病の早期診断・予防を行なうことができ、地域住民の健康増進に多大な貢献を行なうことが可能となる。このことにより、本研究成果の還元となる。</p>

<p>研究成果が4大学連携にもたらす意義</p>	<p>4大学の持つ世界的レベルの異分野での研究能力を融合させることによる新たな学問概念構築を行い、その元に連携4大学の学生を医学・健康科学・薬学・工学を連携させた本研究に参画したことで、京都のヘルスサイエンスがより一層発展し、世界に通じる次世代研究者の育成ができたものと確信する。</p> <p>また、本共同研究成果に基づき、大型研究費確保のために各種研究費支援団体（例えばJST）への研究費申請を行なう予定である。</p>
<p>研究発表 (注3)</p>	<p>Shiozaki A, Nako Y, Ichikawa D, Konishi H, Komatsu S, Kubota T, Fujiwara H, Okamoto K, Kishimoto M, Marunaka Y, Otsuji E. Role of the Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter NKCC1 in cell cycle progression in human esophageal squamous cell carcinoma. <i>World J Gastroenterol</i> (in press)</p> <p>Sun H, Niisato N, Nishio K, Hamilton KL, Marunaka Y. Distinct action of flavonoids, myricetin and quercetin, on epithelial Cl⁻ secretion: useful tools as regulators of Cl⁻ secretion. <i>BioMed Res Int</i> (in press)</p> <p>Marunaka Y. Importance of expression and function of angiotensin II receptor type 1 in pulmonary epithelial cells. <i>Respiratory Physiol Neurobiol</i> 196C:39-42, 2014</p> <p>Hayata H, Miyazaki H, Niisato N, Yokoyama N, Marunaka Y. Lowered extracellular pH is involved in the pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance. <i>Biochem Biophys Res Commun</i> 445:170-174, 2014</p> <p>Hayata H, Miyazaki H, Niisato N, Yokoyama N, Marunaka Y. Lowered extracellular pH is involved in the pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance. <i>Biochem Biophys Res Commun</i> 445:170-174, 2014</p> <p>Hosogi S, Kusuzaki K, Inui T, Wang X, Marunaka Y. Cytosolic chloride ion is a key factor in lysosomal acidification and function of autophagy in human gastric cancer cell. <i>J Cell Mol Med</i> (in press)</p> <p>Shiozaki A, Ishikawa D, Otsuji E, Marunaka Y. Cellular Physiological Approach for Treatment of Gastric Cancer. <i>World J Gastroenterol</i> (in press)</p> <p>MARUNAKA Y. Roles of ionic environments in growth of human cancer cell and potentials of ion transporter blockers in cancer therapies. <i>J Gastrointestinal & Digestive System</i> 3:163, 2014</p> <p>Aoi W, Marunaka Y. The importance of regulation of body fluid pH in the development and progression of metabolic diseases. <i>Advances in Medicine and Biology</i> vol.77, pp. 177-189, 2014. Nova Publishers</p> <p>Marunaka Y, Yoshimoto K, Aoi W, Hosogi S, Ikegaya H. Low pH of interstitial fluid around hippocampus of the brain in diabetic OLETF rats. <i>Molecular and Cellular Therapies</i> 2:6, 2014</p> <p>Marunaka Y. Physiological roles of ionic environments in cell function. <i>Molecular and Cellular Diagnoses and Therapies</i> 2013.11.10, 2013, Shanghai, China (招待講演)</p> <p>Marunaka Y, Aoi W, Hosogi S, Niisato N, Yokoyama N, Hayata H, Miyazaki H, Kusuzaki K, Taruno A, Nomura T. What is the role of interstitial pH in diabetes mellitus? Improving action of propolis on type II diabetes mellitus via pH regulation. The 16th International Symposium on Molecular Medicine. 2013.10.10-12, 2013, Creta Maris, Greece (招待講演)</p> <p>Marunaka Y. The cellular ionic environment and its role in cell function. Italy meets Asia: Sci Venue in Kyoto 2013. 3013.4.26; Kyoto (招待講演)</p> <p>Hosogi S, MARUNAKA Y. Regulation of lysosomal pH and autophagy by cytosolic chloride ions. Japan-Italy Joint Symposium on "Ionic Dynamics in Normal and Tumor Tissues", 2013.4.27; Kyoto. (招待講演)</p> <p>Aoi W, MARUNAKA Y. Significance of interstitial pH in nutrients metabolism. Japan-Italy Joint Symposium on Ionic Dynamics in Normal and Tumor Tissues, 2013.4.27; Kyoto. (招待講演)</p> <p>MARUNAKA Y, Niisato N, Miyazaki H, Nakajima K, Hosogi S, Tarnu A, Yokoyama N. Action of quercetin on cell function via regulation of chloride ion transport. The 13th International Conference on Functional and Medical Foods with Bioactive Compounds: Science and Practice / The 1st International Symposium of Academic Society for Functional Foods and Bioactive Compounds. 2013.5.11-12; Kyoto. (招待講演)</p>