

マクロファージに対する微量元素の作用

辻 昭博, 田村 英之, 藤本 盛揮, 桜井 弘
京都薬科大学・代謝分析学教室

Effects of Inorganic Ion Dependent-Correlation between the Insulin-Mimetic Activity and Nitric Oxide Production from Macrophages

Akihiro TSUJI, Hideyuki TAMURA, Seiki FUJIMOTO and Hiromu SAKURAI

*Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University,
Nakauchi-cho 5, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607, JAPAN*

Summary: Nitric oxide (NO) production from macrophages has been proposed to mediate the destruction of islet B-cells. Recently, we found that vanadium suppresses NO production from macrophages in STZ-induced diabetic mice. Then, we examined whether inorganic ions with insulin-mimetic activity such as Hg (II), Cd (II), Se (IV), V (III), V (IV), Zn (II) and Mn (II) suppress NO production from macrophages. Dose-dependent inhibitory effects of these elements for NO production were observed, being in the following order: Hg (II) > Cd (II) > Se (IV) > V (III) > V (IV) > Zn (II) > Mn (II).

To evaluate the insulin-mimetic activity of these ions, we examined the inhibitory effects of FFA release from adipocytes at the concentration of 1mM of the ions. The inhibitory activity of FFA release from adipocytes was found to be in the order of Hg (II) > Cd (II) > Se (IV) > V (III) > V (IV) > Zn (II) > Mn (II).

A correlation between inhibitory activity of FFA release and that of NO production was observed. This finding suggests that insulin-mimetic effects of these ions depend partially on the inhibition of NO production in adipocytes.

マクロファージは、免疫の基礎となる感染防御に密接に関与している。炎症性刺激を受けたマクロファージは、NO合成酵素を誘導してNOを産生し、NOに感受性のある微生物に対して殺菌作用を示す。一方で、インスリン依存型糖尿病 (IDDM) の発症には、膵島β細胞に浸潤したマクロファージ由来の大量のNO放出が関与する可能性が唆されている。

我々は、4価バナジウムはこれまでに知られているインスリン様作用¹⁾だけでなく、マクロファージ

からの NO 産生を抑制して、膵島 β 細胞の破壊を妨げるために IDDM の予防作用を示すことを提案している²⁾。そのため、バナジウムと類似のインスリン様作用を示す無機元素である水銀、カドミウム、セレン、亜鉛およびマンガン³⁻⁵⁾にも同様の作用機序が期待される。本研究では、これらのインスリン様作用を示す無機元素とマクロファージの NO 産生能との相互作用を検討し、さらに脂肪細胞における脂質代謝に対する相互作用の結果と比較して報告する。

実 験 方 法

マクロファージの採取には、BALB/c 系雄性マウス (7 週齢) を、脂肪細胞の採取には Wistar 系雄性ラット (200~220g) を用いた。用いた元素は、以下のような *in vitro* でのインスリン様作用が報告されている元素とした。: HgCl_2 , CdCl_2 , VCl_3 , VOSO_4 , NaVO_3 , NaSeO_4 , NaSeO_6 , ZnSO_4 および MnCl_2

(1) マクロファージからの NO 産生能の評価

チオグリコール酸塩培地 (Difco) で誘導した腹腔マクロファージを、96well マイクロプレートに 2×10^5 個ずつとなるように分注した。培地は、新鮮な 10% 牛胎児血清 (Gibco) を含む RPMI1640 培地 (三光純薬) を用いた。種々の元素と、interferon (IFN)- γ (250unit/ml) (Gibco) および lipopolysaccharide (LPS) ($0.2 \mu\text{g/ml}$) (Difco) を加え、 37°C , 5 % CO_2 下で 24 時間インキュベートして、培養上清中の NO_2^- をグリース法により、マイクロプレートリーダーを用いて測定した。その後、細胞毒性をニュートラルレッドの取り込み法で評価した。

(2) 脂肪細胞からの脂肪酸遊離の抑制活性の評価

KRB 緩衝液中に分散したラット脂肪細胞に種々の微量元素とエピネフリン (10^{-5}M) を加えて 37°C , 3 時間インキュベートし、緩衝液中に放出された遊離脂肪酸 (FFA) を NEFA C-test Wako (和光純薬) を用いて定量した。

結 果 と 考 察

Fig. 1 に、マクロファージからの NO 産生に対する無機元素の作用を示す。今回用いた元素は、いずれも濃度依存的に NO 産生を抑制した。この抑制作用は、 $\text{Hg (II)} > \text{Cd (II)} > \text{Se (IV)} > \text{V (III)} > \text{V (IV)} > \text{Zn (II)} > \text{Mn (II)}$ の順序であった。これらのカチオン性元素による NO 産生抑制作用のメカニズムとしては、NO 合成酵素の補助因子である Ca (II) との拮抗作用の可能性が考えられるため、さらに検討中である。

今回用いた無機元素はいずれも、これまでにインスリン様作用を示すことが報告されているが、脂質代謝におけるそれぞれの活性の強弱の比較は報告されていない。そこで、これらの元素の濃度を 1mM に固定して、脂肪細胞における脂質代謝に与える影響を調べた。Fig. 2 に示すように、用いた元素のうち、V (V) および Se (VI) 以外は、いずれも脂肪細胞からのエピネフリン刺激による FFA 遊離を抑制し、その活性は、 $\text{Hg (II)} > \text{Cd (II)} > \text{Se (IV)} > \text{V (III)} > \text{V (IV)} > \text{Zn (II)} > \text{Mn (II)}$ の順序であった。一般に、 Hg (II) , Cd (II) および Se (IV) の投与は人体に強い毒性を示すため、高い効果を示したバナジウムを中心金属にもつ錯体を開発することにより、将来、経口投与可能な IDDM あるいは NIDDM 治療

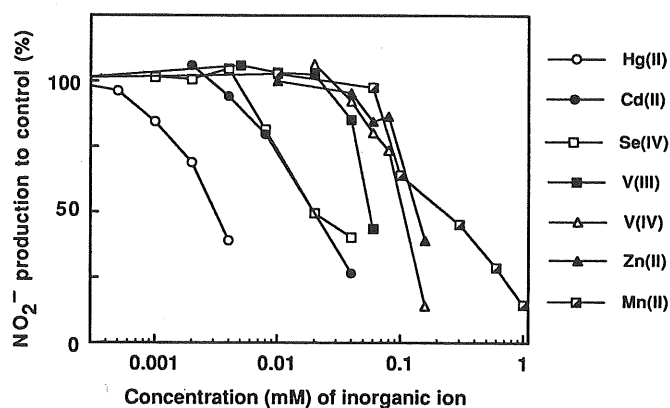


Fig. 1 Dose-dependent inhibitory effects of inorganic ions on NO_2^- production from macrophages treated with IFN-gamma plus LPS.

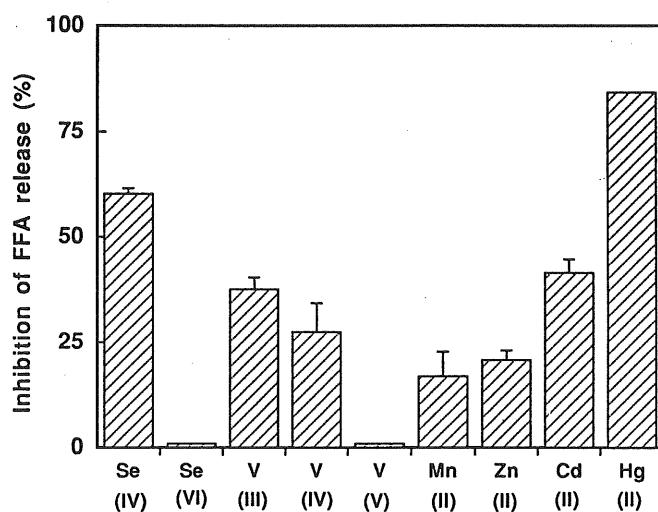


Fig. 2 Inhibitory effects of FFA release from rats adipocytes treated with epinephrine in the presence of inorganic ions (1mM)
Column heights are the means $\pm$ S.D. for 3 experiments.

薬の開発が可能と思われる⁶⁾。最近、硫酸バナジル (100mg/day) を経口投与すると、NIDDM 患者の血中 FFA は有意に低下し、インスリン感受性を改善することが報告された⁷⁾。したがって、糖尿病治療薬としてのバナジウムの適用が期待される。

一方、マクロファージからの NO 産生抑制作用と脂肪細胞からの FFA 遊離抑制作用との間には、

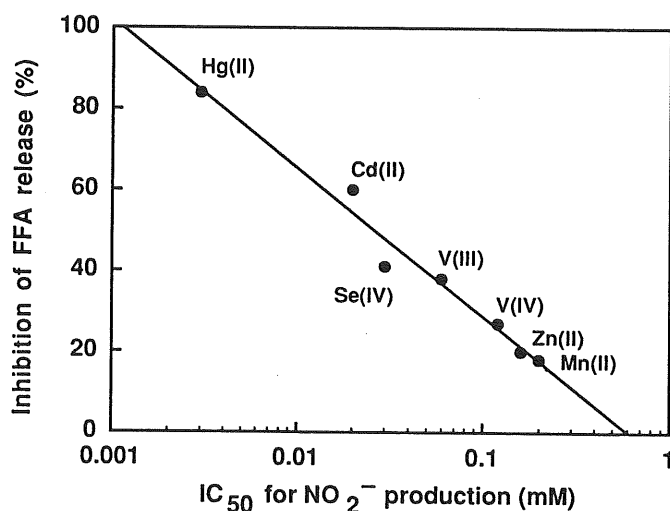


Fig. 3 A correlation between inhibitory effect of FFA release and that of NO production ($r=0.988$)

FFA release from rats adipocytes treated with epinephrine was measured in the presence of various inorganic ions (1mM). NO₂⁻ production from mice macrophages treated with IFN- γ plus LPS were determined in the presence of various inorganic ions.

Fig. 3 に示するような良好な相関性があることが判明した。現在、NO 産生と FFA 遊離との関係を示す機構は明らかではないが、この結果から、脂肪細胞での脂質代謝に NO が関与する可能性が示唆された。したがって、この観点でより詳細な検討を進めれば、バナジウムを含めた無機元素のインスリン様作用の解明に貢献すると思われる。

参 考 文 献

- 1) Shechter, Y. and Karlisch, S. J. D. (1980) *Nature* **284** : 556-558.
- 2) Tsuji, A. and Sakurai, H. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **226** : 506-511.
- 3) Ezaki, O. (1989) *J. Biol. Chem.* **264** : 16118-16122.
- 4) Ueda, M., Robinson, F. W., Smith, M. M. and Kono, T. (1984) *J. Biol. Chem.* **259** : 9520-9525.
- 5) Ezaki, O. (1990) *J. Biol. Chem.* **265** : 1124-1128.
- 6) 桜井 弘：現代化学，1996年7月号，pp.14-20.
- 7) Halberstam, M., Cohen, N., Shlimovich, P., Rossetti, L. and Shamon, H. (1996) *Diabetes* **45** : 659-666.