

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21400

研究課題名(和文) 幼若期発症1型糖尿病モデルの血管機能の解明

研究課題名(英文) An investigation of the cerebrovascular dysfunction in the juvenile-onset type 1 diabetic rat model.

研究代表者

恒岡 弥生 (TSUNEOKA, Yayoi)

東京理科大学・薬学部薬学科・助教

研究者番号：50734597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性合併症のひとつに中枢神経障害がある。糖尿病性の中枢神経障害の種類や程度は発症時期により異なり、若くして糖尿病となると障害が重篤になる傾向がある。本研究では、糖尿病の発症時期の違いに基づく脳血管障害メカニズムの解明を目指して、発症時期の異なる2種類の1型糖尿病モデルを作製し、脳血管透過性を評価した。幼若期発症1型糖尿病モデルでは、糖尿病発症直後に海馬や線条体の脳血管の透過性が上昇し、大脳では脳血管の透過性は少ないことがわかった。一方、このような変化は成体期発症1型糖尿病モデルでは認められなかった。今後は、詳細なメカニズムの調査を試みたい。

研究成果の概要(英文)：The diabetic complication in the central nervous system (CNS) is the critical problem, which decreases quality of life. The diabetic CNS disorder varies according to the onset time, and young patients tend to have more severe disability with the complications. In this study, we aimed to elucidate the mechanism of cerebrovascular disorder based on the different onset of diabetes mellitus (DM). We prepared juvenile-onset and adult-onset streptozotocin-induced type 1 DM rat models, and evaluated the cerebral vascular permeability with fluorescein sodium salt. In juvenile-onset DM rats, the cerebrovascular permeability in the hippocampus and striatum, but not the prefrontal cortex was higher than that in the vehicle group. These changes were not observed in adult-onset DM rats. These results suggest that the cerebral vascular in the hippocampus and striatum is susceptible to high glucose conditions.

研究分野：循環器薬理・血管毒性

キーワード：幼若期発症1型糖尿病 糖尿病性合併症 脳血管透過性

1. 研究開始当初の背景

糖尿病はインスリンの機能不全が原因で血液中の糖濃度が高値を示す疾患である。糖尿病では高血糖が原因となり様々な合併症が発症する。中枢神経性の合併症としては、不安やうつなどの精神障害や認知機能障害が起こることが報告されており、これらはQOLを低下させる。

糖尿病にはインスリンの抵抗性を主体とする2型と膵臓ベータ細胞の破壊によりインスリンの分泌不全を引き起こす1型がある。近年の疫学調査により1型糖尿病患者において、小児期発症患者は思春期発症患者よりも認知機能が低下することや大うつ病の併発率が増加することが報告された。しかし、こういった患者への向精神薬の治療効果は低く、発症メカニズムのさらなる解明と新たな治療ターゲットの探索が求められている。

ラットの幼若期に1型糖尿病を発症させると、認知機能の低下やうつ様行動が観察される。また、記憶形成の指標である海馬シナプス可塑性の変化が生じる。こういった変化は成体期に1型糖尿病を発症させたラットよりも顕著に現れ、臨床でも思春期に比べて小児期で合併症が重症化することを併せて考えると、これは発達途中の組織で障害が顕在化しやすいからであると考えられる。

そこで私は発達期のモデルを用いて糖尿病による血管障害や神経障害の発症機序を研究するという着想を得た。向精神薬の治療効果が特に幼若期で低いことから、神経細胞の発達とは何か別の原因が幼若期と成体期の重症度の違いに関与していると考えられる。糖尿病は血管の病気とも言われており、高血糖に起因する酸化ストレス等により血管内皮細胞が傷害されると、炎症や血栓が生じやすくなり合併症が発症する。脳血管には血管内皮細胞・基底膜・グリア細胞層からなる血液脳関門が存在し、血液と脳の周囲を流れる組織液：脳脊髄液との間の物質交換を制限している。高血糖により血液脳関門が損傷され、脳脊髄液のグルコース濃度が高くなることから、高血糖により血管内皮細胞が傷害され、血液脳関門の透過性が増すことで脳脊髄液内のグルコース濃度が増大し、神経細胞の機能が変化

し、行動異常に至ると考えられる。

しかし、この仮説は成体期発症の糖尿病でも起こりうるメカニズムであり、幼若期で重篤な精神障害や認知障害が見られる理由とはならない。何か幼若期と成体期で違いがあるはずである。申請者は、この問題に対し、血管障害や血液脳関門の障害の程度や種類が成体期と幼若期で異なっており、神経細胞に及ぼす影響が幼若期で大きくなるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、次の疑問を解決することで発達時期別の糖尿病による血管・神経障害の発症機序を解明することを目的とした。

(1) 高血糖による血液脳関門の機能障害に関して発達時期による差異がみられるか明らかにする。

(2) 血管障害が脳のどの部位に影響を及ぼすか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) モデル動物の作製

Wistar/ST系ラット(成体期発症モデルは雄、幼若期発症モデルは雌雄を使用)にストレプトゾトシン 85 mg/kg を腹腔内投与し1型糖尿病を発症させた。ストレプトゾトシンはグルコーストランスポーターGLUT2を介して膵臓細胞に取り込まれ細胞を破壊することでインスリンの分泌を阻害し1型糖尿病を惹起する。幼若期発症モデルは17日齢においてストレプトゾトシンを投与し、24-28日齢で実験に使用した。成体期発症モデルは10週齢でストレプトゾトシンを投与し11週齢で実験に使用した。コントロール群は生理食塩水を投与することで作製した。実験時に血糖値を測定し、300 mg/dL以上を1型糖尿病発症モデルとした。すべての実験で前頭皮質、海馬、線条体、視床下部の4部位を使用した。

(2) 脳血管透過性の評価

麻酔下、プロベネシドを前投与後、フルオレセインナトリウム 40 mg/kg を尾静脈より投与した。30分後、血液を採取し生理食塩水の経心灌流を行った。脳を摘出後、pHを確認し490 nmにおける血液および脳実質

の蛍光強度を測定した。血漿内に対する組織内フルオレセインナトリウム濃度比を脳血管透過性の指標とした。

(3) 血管密度の測定

麻酔下、エバンスブルー 40 mg/kg を尾静脈より投与した。1 分後に断頭、脳を摘出し、4% パラホルムアルデヒド中に一晚浸透させた。その後、冠状面スライスを作製しスライドガラス上で観察した。測定波長 454 nm における蛍光強度を測定した。血管密度は $10^6 \mu\text{m}^2$ あたりの蛍光面積とした。

(4) 血管構造・障害の観察

断頭後、クライオスタットを用いて冠状面スライス (20 μm) を作製しスライドガラスにマウントした。蛍光免疫組織染色法により血液脳関門の構成タンパク質: tight junction タンパク質 (claudin-5), グリア細胞 (グリア線維性酸性タンパク質 GFAP), グルコーストランスポーター、レクチンを染色した。

4. 研究成果

(1) モデル動物の作製

Streptozotocin 投与 1 週間で成体期および幼若期発症モデルにおいて十分な血糖値の上昇が認められた。両モデルの血糖値は投与前、投与後ともに同程度であった。

(2) 脳血管透過性の評価

幼若期発症 1 型糖尿病モデルでは、コントロール群に比べて海馬、線条体の 2 部位で透過性が上昇していることが分かった。前頭前皮質と視床下部では有意な差はみられなかった。成体期発症モデルでは、発症 1 週間での透過性の上昇は認められなかった。成体期と幼若期モデルの比較では、幼若期発症モデルにおいて前頭前皮質、海馬、線条体で有意に透過性が上昇していることが分かった。視床下部では幼若期・成体期のモデル・コントロール群とも透過性は高い傾向がみられたが、これは視床下部には血液脳関門がなく、フルオレセインナトリウムが移行しやすいためと思われる。

以上のことから海馬や線条体は、高血糖による影響を受けて血液脳関門が脆弱になりやすいと考えられる。これらの部位は記

憶形成や情動活動に重要な部位であり、行動薬理学的実験などにより関連を調べる必要がある。

(3) 血管密度の測定

幼若期発症 1 型糖尿病モデルをコントロール群と比較したところ、前頭皮質、海馬、線条体、視床下部の 4 部位すべてで脳血管密度には違いは認められなかった。また、エバンスブルーの脳実質内蛍光強度は若期発症 1 型糖尿病モデルにおいて有意ではないが高い傾向がみられた。

(4) 血管構造・障害の観察

幼若期発症 1 型糖尿病モデルとコントロール群間で比較検討した。まず、脳血管構造をレクチンの染色により確認した。レクチンは内皮細胞の糖鎖に結合するが、違いは見られなかった。この結果はエバンスブルーの結果と矛盾しない。また、グルコーストランスポーターの発現を調べた。トランスポーターのうち血管内皮細胞に存在し脳へのグルコースの移行に関わる GLUT1 の発現も両者で差異は見られなかった。血液脳関門を構成する claudin-5 と GFAP の共染色では、いずれの部位でも顕著な違いは見られず、結果にはばらつきがみられた。

以上の結果から、幼若期発症 1 型糖尿病モデルで観察された、高血糖初期の海馬や線条体における血管透過性の上昇は、経細胞輸送が主である可能性が示唆される。そこで今後は、詳細な経細胞輸送経路について調べていく予定である。ただ、血液脳関門を構成するタンパク質は claudin-5 以外にも存在しているので、今後は occludin や ZO-1、カドヘリンの染色を行うと同時に、脳実質・血管区分を分けた上で、Western blotting や RT-PCR 法を用いた詳細な定量化を目指す予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Tsuneoka Y., Irie M., Tanaka Y., Sugimoto T., Kobayashi Y., Kusakabe T., Kato K., Hamaguchi S., Namekata I., Tanaka H. Permissive role of reduced inwardly-rectifying potassium

current density in the automaticity of the guinea pig pulmonary vein myocardium. J Pharmacol Sci. 2017;133(4):195-202. doi: 10.1016/j.jphs.2016.12.006. 査読あり

Hamaguchi S., Hikita K., Tanaka Y., Tsuneoka Y., Namekata I., Tanaka H. Enhancement of automaticity by mechanical stretch of the isolated guinea pig pulmonary vein myocardium. Biol Pharm Bull. 2016;39(7):1216-1219. doi: 10.1248/bpb.b15-01013. 査読あり

Hamaguchi S., Tsuneoka Y., Tanaka A., Irie M., Tsuruta M., Nakayama T., Namekata I., Nada M., Aimoto M., Takahara A., Tanaka H. Manifestation of automaticity in the pulmonary-vein myocardium of rats with abdominal aorto-venocaval shunt. J Pharmacol Sci. 2015;128(4):212-215. doi: 10.1016/j.jphs.2015.07.041. 査読あり

[学会発表](計 5件)

佐内 恵美, 濱田 幸恵, 恒岡 弥生, 岡 淳一郎. 高グルコース条件下における神経細胞障害メカニズムの検討. 第60回日本薬学会関東支部大会. 2016年9月17日. 東京大学大学院薬学系研究科山上会館(東京都・文京区)

Tsuneoka Y., Irie M., Hamaguchi S., Namekata I., Tanaka H. Permissive role of reduced inwardly rectifying potassium current density in the Ca²⁺-dependent automaticity of the guinea pig pulmonary vein myocardium. The International and Interdisciplinary Symposium 2016 "Towards a New Era of Cardiovascular Research" (ISC2016). July 11-13. 2016. Akio Suzuki Memorial Hall, Tokyo Medical and Dental University (TMDU) M&D tower (Bunkyo-ku・Tokyo)

西村 翼, 恒岡 弥生, 岡 淳一郎. 幼若期発症1型糖尿病モデルラットにおける脳血管透過性の評価. 第134回日本薬理学会関東支部会. 2016年7月9日. 東京医療福祉大学(栃木県・大田原市)

恒岡 弥生, 西村 翼, 増淵 遼太郎, 岡 淳一郎. グルカゴン様ペプチド-2の末梢血管に対する作用. 第89回日本薬理学会年会. 2016年3月9-11日. パシフィコ横浜(神奈川県・西区)

恒岡 弥生, 西村 翼, 増淵 遼太郎, 濱田

幸恵, 岡 淳一郎. Glucagon-like peptide-2の新展開:末梢への作用. 第133回日本薬理学会関東支部会. 2015年10月10日. 柏の葉カンファレンスセンター(千葉県・柏市)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
恒岡 弥生 (TSUNEOKA YAYOI)
東京薬科大学・薬学部・助教
研究者番号: 50734597

(2)研究分担者 ()

研究者番号:

(3)連携研究者 ()

研究者番号:

(4)研究協力者 ()