

機関番号： 32620

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591073

研究課題名 (和文) 骨髄移植による膵β細胞容積増加のメカニズム

研究課題名 (英文) Mechanism of pancreatic beta cell expansion by bone marrow transplantation

研究代表者

綿田裕孝 (Watada Hirotaka)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：60343480

研究成果の概要 (和文)：骨髄移植により、膵β細胞容積が増加する現象が認められている。本研究においては、このメカニズムを解明せんとした。骨髄移植をさまざまな条件下で検討した結果、全身へ放射線照射すれば、骨髄液注入を行わなくとも膵β細胞容積増加が認められることが明らかになった。一方で、骨髄のみ、あるいは、膵のみに放射線照射を行った群では、膵β細胞容積増加が認められなかったことから、全身の放射線照射が膵β細胞容積増加に必須でかつ十分であることが明らかになった。また、VEGF-A ノックアウトマウスでは、骨髄移植を行っても、膵β細胞容積の増加は認められないことが明らかになった。以上より、骨髄移植による膵β細胞容積増加のためには、骨髄液の注入ではなく、全身の放射線照射が必須でかつ、十分であり、さらに、この現象には膵β細胞に発現する VEGF-A が必須と考えられた。

研究成果の概要 (英文)：Bone marrow transplantation increases beta cell mass, however its underlying mechanism has not been elucidated yet. In this study, we investigated its mechanism. Bone marrow transplantation experiments under several conditions revealed that systemic irradiation without injection of bone marrow cells can increase beta cell mass. On the other hand, irradiation only to bone marrow or only to pancreas cannot increase beta cell mass. In addition, using beta cell specific VEGF-A knock out mice, we found that VEGF-A expression in beta cells are essential for the increase in beta cell mass by bone marrow transplantation. Accordingly, systemic irradiation is essential and sufficient for bone marrow transplantation induced increase in beta cell mass and VEGF-A in beta cells are also essential for this phenomenon.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	108,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：膵β細胞、糖尿病、骨髄移植、VEGF-A、血管内皮

以前、我々は、膵β細胞再生療法として骨髄幹細胞から膵β細胞への分化誘導の検討過程において、興味深いデータを得た。具体的には、まず8週齢のC57BL/6マウスにSTZ(50mg/kg)を5日間連投。終了5日後に10Gyの放射線照射後GFPトランスジェニックマウスの骨髄を移植する群(移植群)と、移植しない群(非移植群)とに分けた。これらのマウスの血糖改善効果とともに、免疫組織染色を用いた膵β細胞領域と膵島領域のCD31(血管内皮細胞マーカー)陽性領域の面積定量を行い、骨髄移植の効果を比較検討した。インスリンとGFPとの2重染色により、骨髄細胞が膵β細胞に分化するというevidenceはほとんど得られなかったが、それにも関わらず、骨髄移植により、耐糖能が改善し、膵β細胞領域とCD31陽性領域の面積、膵島サイズの改善が認められた。なお、この現象はSTZ誘発糖尿病マウスに特異的に認められるものではなく、db/dbマウスにおいても同様な検討がなされ、同様な結果が得られている。

2. 研究の目的

そこで本研究においては、骨髄移植がどのような機序で膵β細胞容積の増加を導くかの全容を解明することを目的としている。我々は、この際、必ず膵ラ氏島の血管内皮数の増加を伴っているため、この血管内皮数増加が膵ラ氏島容積増加の鍵を握ると考えている。したがって、まずは、放射線照射がどのような機序で血管内皮細胞を増加させるのか? そのメカニズムを解明することが必須であると考え、そこで我々は、強力な血管内皮増殖作用を有するVEGF-Aに特に焦点をあて、VEGF-Aが、本現象に関与しているとの仮説をもとに、検討を進めた。

3. 研究の方法

骨髄移植の手法で、膵β細胞機能改善に関わると予測される手法として、

- 1) 骨髄の放射線照射
- 2) 膵への放射線照射
- 3) 骨髄幹細胞への末梢からの注入
- 4) 骨髄移植の成立

を考えた。そこで、以上の手法のなかで、どのような手法が膵β細胞機能改善に必須であるかの検討を行った。

具体的には、放射線照射を全身、腹部、腹部以外に分け、どこかの放射線照射が耐糖能改善に必要であるかを検討。それらのモデルをさらに、骨髄液の注入(骨髄幹細胞も含まれている。)をする群、しない群にわけ、骨髄液注入や骨髄移植が血糖改善効果、耐糖能改善

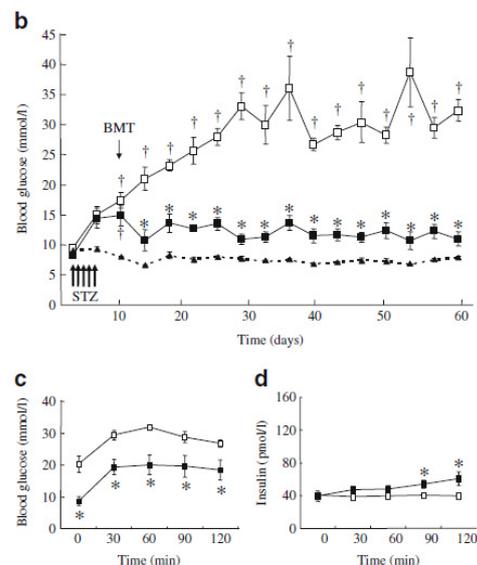
効果に必須であるかを調べる。さらに免疫組織染色を用いた膵β細胞領域と膵島領域のCD31(血管内皮細胞マーカー)陽性領域の面積定量も同時に評価する。

次に、この現象に、膵ラ氏島でのVEGF-A発現増加が耐糖能改善に必須であるか否かを解明する目的で、まず8週齢の膵β細胞特異的VEGF-AノックアウトおよびコントロールのVEGF-A^{flox/flox}マウスにSTZ(50mg/kg)を5日間連投。その後に骨髄移植をする群としない群とインスリン分け、これらのマウスの血糖改善効果、耐糖能改善効果を評価するとともに、免疫組織染色を用いた膵β細胞領域と膵島領域のCD31(血管内皮細胞マーカー)陽性領域の面積定量を行い、骨髄移植の効果における膵β細胞に発現するVEGF-Aの意義を検討する。

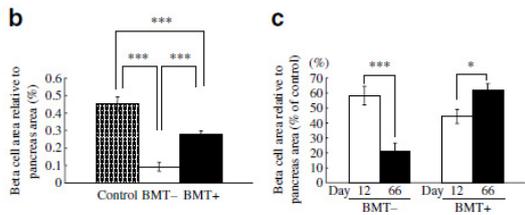
4. 研究成果

1) 骨髄移植による血糖値改善効果

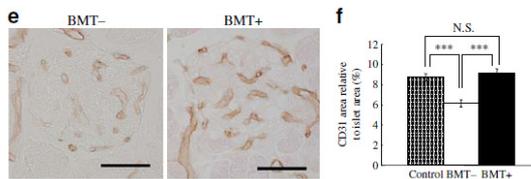
STZモデルマウスに骨髄移植(BMT)を行った群(●)と行わなかった群(○)の血糖値の変移を下図bに示す。この図に示すようにBMTにより血糖値は改善した。下図c,dにその際の血糖値とインスリン値の変化を示す。骨髄移植により、STZモデルマウスの耐糖能が改善し、それに伴い、インスリン分泌も改善をしていた。以上よりBMTにより膵β細胞機能改善効果が認められることが確認された。



2) 骨髄移植による膵β細胞容積増加効果

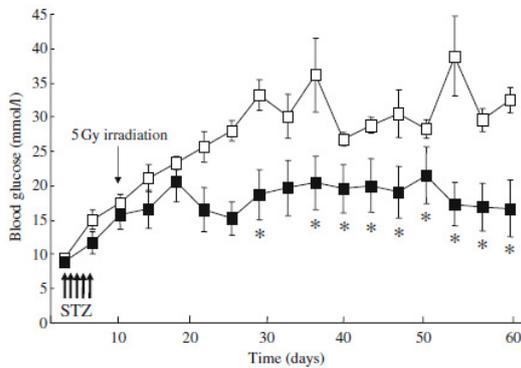


上述した血糖コントロール改善に伴う膵β細胞容積の変化に関して検討した。上図bに示すように膵β細胞容積はSTZ投与により著明に低下するが、その容積は骨髄移植により増加している。その時間経過を上図cに示す。骨髄移植により低下した膵β細胞容積が増加することが明らかになった。



この際、膵β細胞の血管密度を計測するとBMTにより血管密度が増加することが明らかになった。

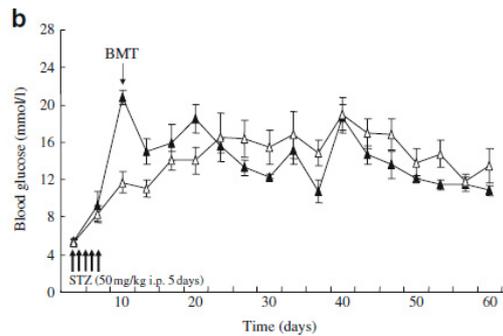
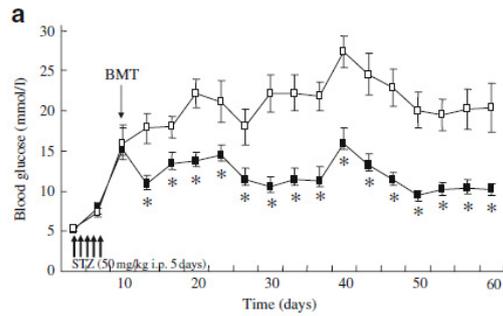
3) 放射線照射のみで膵β細胞容積が増加する。



次に、骨髄移植の何が膵β細胞機能改善に関与するのかを検討する目的で、様々なモデルを用いて膵β細胞容積に対する影響を検討した。その結果、上図に示すように全身に5

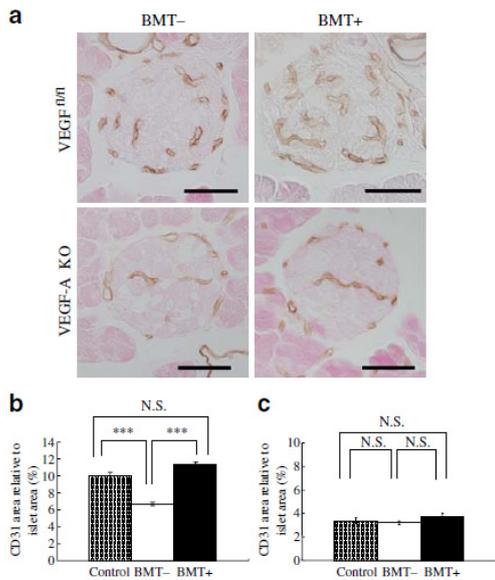
Gyの放射線照射をし、骨髄液を注入しなくとも血糖値の改善が認められた。この検討から、骨髄液注入の有無は、問題ではなく、骨髄と膵の両者への放射線照射が膵β細胞容積増加を介した耐糖能改善に必須であることが考えられた。

4) 骨髄移植による膵β細胞容積増加反応には膵β細胞に発現するVEGF-Aが必須である。



今までの検討の結果、骨髄移植に伴う膵β細胞容積増加反応には膵ラ氏島での血管増殖が伴っていることが明らかになった。この意義を検討する目的で、膵β細胞特異的VEGF-Aノックアウトマウスを用いて、骨髄移植の実験を行った。

上図aに、STZモデルマウスに骨髄移植(BMT)を行った群(●)と行わなかった群(○)の血糖値の変移を示す。再現性を持って骨髄移植は血糖値を改善させた。一方、上図bに示すように膵β細胞特異的VEGF-Aノックアウトマウスにおいては、BMTによる血糖値改善効果が認められなかった。



次に、膵β細胞特異的 VEGF-A ノックアウトマウスにおいて、BMT による膵ラ氏島内血管内皮密度増加効果を検討した。その結果、コントロールマウスでは BMT により膵ラ氏島内血管内皮密度の増加が認められるが、膵β細胞特異的 VEGF-A ノックアウトマウスでは BMT による膵ラ氏島内血管内皮密度の増加が認められなかった。

また同時に測定した膵ラ氏島容積にかんしても、コントロールマウスでは BMT により膵ラ氏島容積の増加が認められるが、膵β細胞特異的 VEGF-A ノックアウトマウスでは BMT による膵ラ氏島容積の増加が認められなかった。

以上より骨髄移植による膵β細胞容積増加のためには、全身の放射線照射が必須かつ、十分であることが明らかとなった。さらに、この現象には膵β細胞に発現する VEGF-A も必須と考えられた。

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)

1: Watada H. Role of VEGF-A in pancreatic beta cells. *Endocr J.* 2010 ;57(3):185-91.

2: Toyofuku Y, Uchida T, Nakayama S, Hirose T, Kawamori R, Fujitani Y, Inoue M, Watada H. Normal islet vascularization is dispensable for expansion of beta-cell mass in response to high-fat diet induced insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;383(3):303-7.

3: Nakayama S, Uchida T, Choi JB, Fujitani Y, Ogihara T, Iwashita N, Azuma K, Mochizuki H, Hirose T, Kawamori R, Inoue M, Watada H. Impact of whole body irradiation and vascular endothelial growth factor-A on increased beta cell mass after bone marrow transplantation in a mouse model of diabetes induced by streptozotocin. *Diabetologia.* 2009;52(1):115-24.

[学会発表] (計 1 件)

豊福優希子ら 高脂肪食負荷時の膵β細胞量調節における VEGF-A の関与 第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会 2009 年 5 月 大阪

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

綿田裕孝 (Watada Hiroataka)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号: 60343480

(2) 研究分担者

藤谷与士夫 (Yoshio Fujitani)
順天堂大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 30433783

(3) 連携研究者

該当なし