

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 7日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790431

研究課題名（和文）膵島細胞間の VEGF シグナル破綻による糖尿病発症機構

研究課題名（英文）The mechanism of diabetes development by impairment of VEGF signal between islet cells

研究代表者

河村 治清（KAWAMURA HARUKIYO）

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70527902

研究成果の概要（和文）：糖尿病非肥満モデルである SDT ラットは膵β細胞の減少により糖尿病を発症するが、初期病変として膵島の血管異常が認められる。これまでに血管内皮細胞における VEGF 応答性の亢進が示されたが、今回それらにはβ細胞からの過剰な IL-1β が関与していること、VEGF 分泌も亢進しているがそれは応答性の亢進以降に生じており、その結果 VEGF シグナルの悪循環を起こしていることが明らかとなった。以上の研究により、正常 VEGF シグナルの破綻がβ細胞障害と血管異常を引き起こし糖尿病を発症するメカニズムが解明された。

研究成果の概要（英文）：SDT rats, a model of non-obese spontaneous diabetes mellitus, exhibit vascular abnormalities within pancreatic islets as the initial changes, followed by β-cell deterioration. The present study revealed that enhanced signaling of VEGF in vascular endothelial cells is induced by excessive IL-1β secretion from β-cells. Moreover, increased VEGF secretion has been shown to be occurred after enhanced VEGF signaling, which causes vicious cycle of VEGF signaling. These results elucidated the mechanism by which the failure of normal VEGF signaling induces β-cell injury, microvascular failure, and consequential diabetes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：糖尿病・VEGF・膵島・血管内皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病は膵β細胞からのインスリン分泌不全と末梢臓器でのインスリン抵抗性により引き起こされる。膵β細胞の機能の低下によりインスリン分泌の障害はもたらされるが、近年β細胞量の減少も糖尿病発症時に認められることが示されており、β細胞量と糖尿病発症の関係について、現在詳細な解明が望まれている。

糖尿病自然発症モデルはそのようなヒトでの病態解明のために研究で広く用いられているが、ほとんどの糖尿病モデルは肥満を

伴っており、インスリン抵抗性を呈すものが多い。Spontaneously Diabetic Torii (SDT) ラットは近年 Sprague-Dawley (SD) ラットより確立された非肥満糖尿病自然発症モデルである。このモデルはインスリンの補充なしに長期生存が可能であり、病態の進行に伴い腎糸球体硬化や網膜新生血管などヒトの糖尿病と類似した合併症が出現することから、特に糖尿病合併症研究に極めて有用であることが知られている。14 週齢頃から耐糖能異常とインスリン分泌障害が認められ、20 週齢頃にはβ細胞の減少により高血糖を発症す

る。10~20 週齢の糖尿病発症前より  $\beta$  細胞量の低下が認められるが、初期 (8~10 週齢) の膵島の形態学的変化は血管拡張や出血である。

申請者はこれまでに血管の透過性や血管新生の研究を行ってきたことから、この SDT ラットにおいて、何らかの血管機能の破綻により膵島、腎、網膜の病変が出現するのではないかと推測した。これまで行ってきた研究により、SDT ラットでは血管内皮細胞における VEGF 応答性が亢進していることを明らかにしているが、その詳細なメカニズムは不明である。

## 2. 研究の目的

膵  $\beta$  細胞の減少により糖尿病を発症する SDT ラットにおいて、糖尿病発症前の初期変化は膵島の血管異常である。膵島は毛細血管を多く含んだ臓器であり、糸球体様の血管網構造を構築している。その構築により、 $\beta$  細胞への栄養源や酸素の急速な供給や血糖に応じたすばやいホルモン分泌が行われている。本研究では、SDT ラットの解析により、血管機能と膵島維持の関係について、またその糖尿病発症への寄与について、メカニズムを解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) SDT ラットの膵島と腎糸球体の血管反応

SDT ラットの糖尿病発症前の初期 (8~10 週齢) の変化として血管異常が認められることから、出血毒であり腎糸球体に出血と糸球体腎炎用変化を惹起することが知られているハブ毒をさらに若い 5 週齢のラットに投与し、ハブ毒に対する血管の応答性をみるため膵臓ならびに腎臓の組織学的検討を行った。

### (2) 膵島血管病変に対する $\beta$ 細胞由来因子の関与

血管機能異常を起こす因子として膵  $\beta$  細胞由来の因子が関与するかどうかを検討するため、 $\beta$  細胞を特異的に破壊する薬剤ストレプトゾトシンを 5 週齢のラットに投与し、膵臓の形態学的変化を経時的に解析した。

### (3) ハブ毒の VEGF 様効果に関する検討

ハブ毒にはプロテアーゼなど種々の出血因子が含まれているが、近年強力な血管透過性因子である VEGF と類似の物質が同定され、VEGF と同等の強い血管透過性亢進作用を示すことが報告されている。そこで、ハブ毒の VEGF 様活性を VEGF 受容体に対するリン酸化反応と、ハブ毒を可溶性 VEGF 受容体で前処置したものをラットに投与することによりハブ毒の効果が減弱するかどうかを検討した。

### (4) 膵島血管異常を惹起する $\beta$ 細胞由来因子の同定

膵島血管異常に関与している  $\beta$  細胞由来の因子を直接的に検討するために、ラットより膵島をコラゲナーゼ法により単離し、VEGF およびサイトカインである IL-1 $\beta$  の分泌量を ELISA 法にて測定した。

### (5) VEGF シグナルの糖尿病発症への関与

VEGF シグナルが糖尿病発症に関与しているかどうか、VEGF シグナル阻害薬を SDT ラットに 5 週齢より投与し、治療的介入により SDT ラットにみられる  $\beta$  細胞障害や糖尿病発症に対して効果が認められるかどうかを検討した。

## 4. 研究成果

### (1) SDT ラットの膵島と腎糸球体の血管反応

形態学的に異常の認められない若齢である 5 週齢の SDT ラットに、ハブ毒を 1 mg/kg および 2 mg/kg で尾静脈より投与し、6 時間後に膵臓ならびに腎臓をサンプリングし、HE 染色後、形態学的変化を観察した。その結果、対照群である SD ラットではほとんど出血が認められないのに対し、SDT ラットでは膵島および腎糸球体で出血病変が強く誘発された。このことから、SDT ラットでは 5 週齢においてすでに血管機能が障害されており、ハブ毒の中に含まれる何らかの因子に対する血管応答性が亢進していることが明らかとなった。

### (2) 膵島血管病変に対する $\beta$ 細胞由来因子の関与

5 週齢の SDT および SD ラットに膵  $\beta$  細胞を特異的に破壊するストレプトゾトシンを 60 mg/kg で腹腔内投与し、経時的に膵臓をサンプリングし形態学的変化を HE 染色ならびにインスリン免疫染色にて解析した。まず血糖値をモニターしたところ、SD ラットはストレプトゾトシン投与 1 週間後でも高血糖を呈さず、2 週間後以降でゆるやかな血糖値の上昇を示したが、SDT ラットでは投与後 1 週間後でかなりの高血糖を示し、8 週間後まで高血糖を維持した。

一方、ストレプトゾトシン投与 1 週間後の組織において、膵島  $\beta$  細胞の減少度合いが SD ラットに対し SDT ラットでより多く観察された。投与 8 週間後では、非投与群すなわち 13 週齢の SDT ラットは自然経過により  $\beta$  細胞の減少と膵島内出血および膵島周囲の炎症や線維化といった変性像が認められるのに対し、投与群では  $\beta$  細胞の消失とともに自然経過で見られる変性像がほとんど認められなかった。このように  $\beta$  細胞を若齢期に破壊することで膵島の変性像が消えることから、 $\beta$  細胞由来の何らかの因子が血管機能異常を

誘導することが示唆された。

### (3) ハブ毒の VEGF 様効果

ハブ毒の VEGF 様効果を検討するために、VEGF 受容体発現血管内皮細胞を用いてハブ毒による VEGF 受容体リン酸化をウエスタンブロッティングにて検討したところ、ハブ毒刺激により VEGF 受容体はリン酸化され、可溶性 VEGF 受容体にてそのリン酸化は阻害された。また可溶性 VEGF 受容体にてあらかじめ処理したハブ毒を 5 週齢の SDT ラットに投与すると、未処理群に比べ、膵島の出血は明らかに減少した。これらのことから、ハブ毒には VEGF 様作用があることが確認された。

### (4) 膵島血管異常を惹起する $\beta$ 細胞由来因子の同定

膵島血管異常に関与している  $\beta$  細胞由来の因子を直接的に検討するために、各週齢の SDT および SD ラットより膵島をコラゲナーゼ法により単離し、VEGF の分泌量を ELISA 法にて測定した。すると 5 週齢における VEGF 分泌量は SDT と SD ラットで差は認められず、血管異常がすでに認められる 13 週齢において SDT ラットで有意に VEGF 分泌量が増加していた (図 1)。

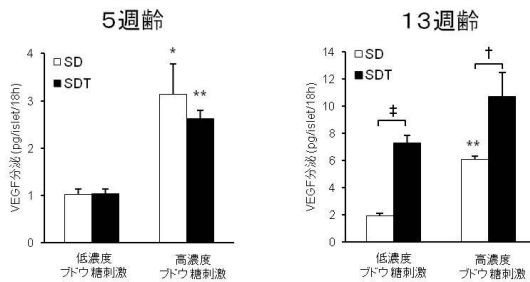


図 1 SDT および SD ラット膵島からの VEGF 分泌

$\beta$  細胞はサイトカインを分泌することが知られているので、代表的なサイトカインである IL-1 $\beta$  の分泌量を同様に ELISA 法にて測定したところ、5 週齢時ですでに SD ラットに比べ SDT ラットで IL-1 $\beta$  分泌量は増加していることが明らかとなった (図 2)。

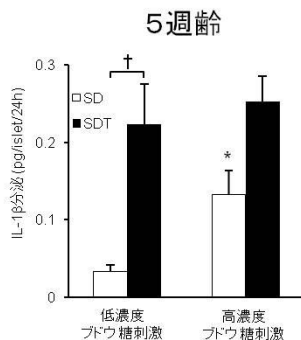


図 2 SDT および SD ラット膵島からの IL-1 $\beta$  分泌

### (5) VEGF シグナルの糖尿病発症への関与

VEGF シグナルが糖尿病発症に関与しているかどうか、VEGF シグナル阻害薬を SDT ラットに 5 週齢より連日経口投与し、血糖値の経時的測定による糖尿病発症率と膵臓の形態学的変化を解析した。非投与群でみられる 12 週齢以降の血糖値の上昇は投与群で有意に抑制され、糖尿病発症率も非投与群で 16 週齢で 100%なのに対し、投与群では 20%にまで減少した。形態学的解析においても、自然経過でみられる出血や炎症、線維化は投与群で完全に抑制されており、 $\beta$  細胞もほぼ完全に残存していた。

以上の結果より、SDT ラットの初期病変である膵島内血管異常において、 $\beta$  細胞由来の因子が関与しており、それにより血管内皮細胞の VEGF 受容体以降のシグナルが亢進していること、その  $\beta$  細胞由来の因子は VEGF ではなく IL-1 $\beta$  であること、VEGF 受容体以降のシグナル亢進により後天的に  $\beta$  細胞からの VEGF 分泌は増加し、過剰な VEGF シグナルの悪循環が引き起こされることが明らかとなった (図 3)。またその過剰な VEGF シグナルを阻害することで糖尿病発症を抑制しうることから、このような血管機能異常が生じているような糖尿病症例においては、過剰な VEGF シグナルを抑制するような治療方法が有用であることが期待される結果となった。

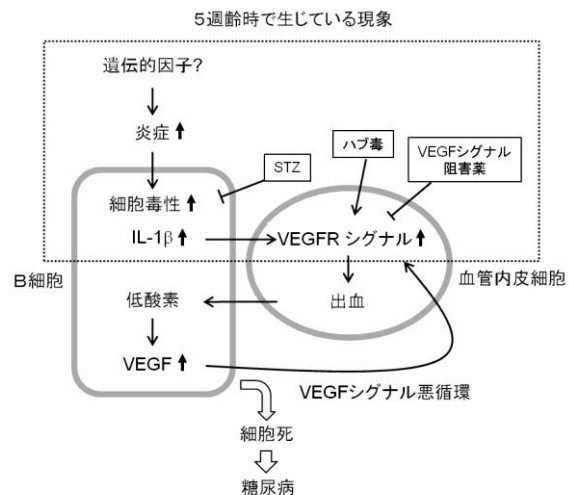


図 3 今回明らかにされた膵  $\beta$  細胞と血管内皮細胞の糖尿病発症における機能的関係のメカニズム

### 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 4 件)

(1) Takemoto M, Ishikawa T, Onishi S, O

kabe E, Ishibashi R, He P, Kobayashi K, Fujimoto M, Kawamura H, Yokote K. Atrovastatin ameliorates the urinary excretion of podocytes in patients with type2 diabetes complicated with dyslipidemia. *Diabetes Res Clin Pract.* 2013. ahead of print. 査読有  
doi:pri: S0168-8227(12)00516-5. 10.1016/j.diabres.2012.12.018.

(2) Kitamoto T, Takemoto M, Fujimoto M, Ishikawa T, Onishi S, Okabe E, Ishibashi R, Kobayashi K, Kawamura H, Yokote K. Sitagliptin successfully ameliorates glycemic control in werner syndrome with diabetes. *Diabetes care.* 2012. 35(12). e83. 査読有  
doi: 10.2337/dc12-1179.

(3) Onishi S, Takemoto M, Ishikawa T, Okabe E, Ishibashi R, He P, Kobayashi K, Fujimoto M, Kawamura H, Yokote K. Japanese diabetic patients with Werner syndrome exhibit high incidence of cancer. *Acta Diabetol.* 2012. 49. S259-260. 査読有  
doi: 10.1007/s00592-012-0424-z.

(4) Okabe E, Takemoto M, Onishi S, Ishikawa T, Ishibashi R, He P, Kobayashi K, Fujimoto M, Kawamura H, Yokote K. Incidence and characteristics of metabolic disorders and vascular complications in Werner syndrome patients in Japan. *J Am Geriatr Soc.* 2012. 60(5). 997-998. 査読有  
doi: 10.1111/j.1532-5415.2012.03944.x.

[学会発表] (計9件)

(1) 駒井絵里ら、糖尿病治療を契機として有症状ビタミンB1欠乏症を発症した一例、第50回日本糖尿病学会関東甲信越地方会、横浜、2013年1月26日

(2) 賀鵬ら、腎糸球体ポドサイトの炎症性障害に対するシロスタゾール/プロブコールの相加的保護作用、第24回日本糖尿病性腎症研究会、東京、2012年12月2日

(3) 賀鵬ら、腎糸球体ポドサイトの炎症性障害に対するシロスタゾール/プロブコールの相加的保護作用、第27回日本糖尿病合併症学会、福岡、2012年11月2日

(4) 岩田裕子ら、高 intact PTH血症を契機に発見されたビタミンD欠乏症の1例、第56回日本老年病学会関東甲信越地方会、東京、2012年9月29日

(5) 賀鵬ら、炎症性腎障害に対するシロスタゾール/プロブコールの保護作用、第44回日本動脈硬化学会総会学術集会、福岡、2012年7月19日

(6) 河村治清ら、ウェルナー症候群における糖尿病と悪性腫瘍の相関解析、日本内科学会第588回関東地方会、東京、2012年6月9日

(7) 賀鵬ら、炎症性腎障害に対するシロスタゾール/プロブコールの保護作用、第55回腎臓病学会、横浜、2012年6月3日

(8) 北本匠ら、2型糖尿病症例における血管内皮機能に影響を及ぼす因子の検討、第55回日本糖尿病学会年次学術集会、横浜、2012年5月19日

(9) 河村治清ら、我が国のウェルナー症候群患者における代謝異常および心血管疾患の解析、日本内科学会第587回関東地方会、東京、2012年5月12日

[図書] (計2件)

(1) 河村治清、横手幸太郎、糖尿病・代謝疾患の分指標的と治療薬辞典、羊土社、印刷中

(2) 河村治清、横手幸太郎、Modern Physician、新興医学出版社、2012、5

[産業財産権]  
なし

[その他]  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
河村 治清 (KAWAMURA HARUKIYO)  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：70527902

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし