

平成 22 年 5 月 11 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20880029

研究課題名（和文）糖尿病モデル動物における心血管リスクのバイオマーカーに関する研究

研究課題名（英文）Study on biomarkers of cardiovascular risks in diabetic model animals

研究代表者

浅井 史敏 (ASAI FUMITOSHI)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：00511677

研究成果の概要（和文）：新規の糖尿病モデル動物である WBN/Kob-Lepr<sup>fa</sup> ラットを用いて病態の特性およびヒト糖尿病患者において血管リスクの大きな要因である血栓機構について検討した。このラットでは生後 2～3 ヶ月の早い時期から肥満・インスリン抵抗性・膵β細胞の傷害および血栓バイオマーカーの変動などヒトの 2 型糖尿病と類似性が高い病態が発現することが明らかとなった。WBN/Kob-Lepr<sup>fa</sup> ラットは糖尿病研究に有用性が高いと期待される。

研究成果の概要（英文）：Present studies were performed to investigate pathophysiologic features related with diabetes and thrombosis, the main factor of cardiovascular risk, in the WBN/Kob-Lepr(fa) rat, a novel model of type 2 diabetes mellitus. It revealed that WBN/Kob-Lepr(fa) rats share a number of common features with human type 2 diabetic patients including obesity, insulin-resistance, damaged pancreatic β cells and abnormal thrombotic biomarkers. WBN/Kob-Lepr(fa) rats may be useful for diabetic researches.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,330,000	399,000	1,729,000
2009 年度	1,190,000	357,000	1,547,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,520,000	756,000	3,276,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：糖尿病、心血管リスク、バイオマーカー、インスリン抵抗性、

## 1. 研究開始当初の背景

近年、患者数が急増している糖尿病は、1 型糖尿病（膵臓ランゲルハンス島の β 細胞が障害を受けインスリン分泌が低下することに起因する）と 2 型糖尿病（インスリンに対する反応性が低下することに起因する）に分類

され、2 型糖尿病では正常人比べ 2～4 倍ほど心血管リスクが高いと報告されている (American Diabetes Association, *Diabetes Care*, 1989)。高血糖は糖尿病の主徴であるが、2 型糖尿病の心血管リスクは高血糖以外の要素によると考えられている。最近、注目を

集めているメタボリックシンドロームはインスリン抵抗性をベースにし、肥満・高血圧・糖尿病・動脈硬化などのマルチプル・リスクファクターが重層した生活習慣病と位置づけられている。特に、糖尿病患者は易血栓状態にあると考えられている。しかし、糖尿病による血小板活性化のメカニズムをヒトや動物の症例で実証することはきわめて困難である。

自然発症あるいは遺伝子操作による糖尿病モデル動物がマウスおよびラットにおいて多く作出されており、ヒト糖尿病や肥満の病態生理解明に大きなインパクトをもたらした。また、これらの動物は創薬における新規物質の薬効評価研究に汎用され有用性が高い。しかし、これらのモデル動物における糖尿病における血栓形成機構に関する研究は少なく、成績も相反するものが多い。

## 2. 研究の目的

本研究では心血管リスクのバイオマーカーとしての止血・血栓機構（血小板・血液凝固系・線溶系）に着目し、糖尿病モデル動物において止血・血栓機構（血小板・血液凝固系・線溶系）がどのような変化をきたしているのか明らかにすることを目的とした。実験には、最近、系統が確立した新規コンジュニク・ラット WBN/Kob-Lepr<sup>fa</sup> を使用した。このラットではラット肥満遺伝子（fa/fa）を発現し、高血糖を呈することが報告されている。

(1) WBN/Kob-Lepr<sup>fa</sup> の肥満および糖尿病の進展を経時的に観察する。糖尿病の発症前・発症初期・発症後期に解剖し、糖尿病および血栓関連バイオマーカーの変動について検討する。

(2) 既存の糖尿病治療薬を用いて、糖・脂質代謝および血栓関連のバイオマーカーに対する長期投与の影響を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 動物：雄性 WBN/Kob-Lepr<sup>fa</sup> ラット、WBN/Kob ラットおよび Wistar ラット（いずれも日本 SLC 株式会社より入手）を使用した。動物は 4 週齢で麻布大学内に搬入され、その後は温度・湿度・明暗サイクルの管理された飼育室で通常の市販ラット餌および水道水の自由に摂取にて飼育された。当施設に搬入後、1 週間の馴化期間の後、以下の実験に使用した。

### (2) 経時的な観察

体重測定ならびに 2 週間ごとに、無麻酔のラットの尾静脈よりヘパリン処理を施したガ

ラス毛細管に採取した血液を遠心して得た血漿を用いて血糖値、インスリン値およびトリグリセリド値を測定した。

### (2) 血液学的検査

解剖時に腹部大動脈よりクエン酸 Na 液あるいはヘパリンを充填した注射筒に採血した血液を用いて以下の検査を実施した。

①血液生化学的検査：ヘパリン添加血液より調製した乏血小板血漿を用いて自動分析装置（JCA-BM2250；日本電子株式会社）にて血液生化学的項目について測定をおこなった。

②血小板凝集：クエン酸 Na 添加血液より調製した多血小板血漿を用いて血小板凝集測定装置（HEMA TRACER313M；MCM 株式会社）にて ADP およびコラーゲン惹起血小板凝集を測定した。

③血液凝固時間：クエン酸 Na 添加血液より調製した乏血小板血漿を用いて血液凝固時間測定装置（STart4；ロッシュダイアグノスティック株式会社）にて血液凝固時間を測定した。

### (3) 病理組織学的観察

剖検時に摘出した臓臓をブアンの液に浸して組織固定し、パラフィン包埋後、ヘマトキシリン-エオジン染色および抗インスリン抗体染色して光学顕微鏡による組織観察を行った。

### (4) グルコース負荷試験 (ivGTT)

ラットをペントバルビタールによって麻酔後、グルコース溶液 (0.5 g/kg) を静脈内投与 (iv) した。グルコース投与前および投与 2、5、10、20 分後に頸静脈より採血した血液を遠心して血漿を分離し、血糖値およびインスリン値を測定した。

### (5) 薬物治療実験

上記 3 系統のラットを各 2 群に分け、インスリン抵抗性改善薬（トログリタゾン；TGT）の 0.2% (w/w) を含む餌（投与群）と通常餌（非投与群）を 7 週齢より 4 週間にわたり給餌した。7、9、11 週齢時にラット尾静脈より採血した血液を用い、血糖値およびインスリン値を測定した。また、11 週齢時にはペントバルビタール麻酔下においてグルコース負荷試験を実施した。

## 4. 研究成果

### ①病態特性の解明

WBN/Kob ラットの血糖値は試験期間中ほぼ一定であったが、WBN/Kob-Lepr<sup>fa</sup> ラットの血糖値および TG は 11 週齢より著しく上昇した。逆に、11 週齢まで高値を示した WBN/Kob-Lepr<sup>fa</sup> ラットのインスリン値は低下

し、WBN/Kob ラットの血中レベルに近づいた (図 1)。21 週齢時に実施した ivGTT では、WBN/Kob-Lepr<sup>fa</sup> ラットの血糖値および血中インスリン値は WBN/Kob ラットに比べ、高く維持された。試験期間中、WBN/Kob-Lepr<sup>fa</sup> ラットの体重は WBN/Kob ラットに比べ高値を示し、また 21 週齢時の精巣周囲脂肪重量も野生型に比べ 2 倍以上の高値を示した。これらの成績から WBN/Kob-Lepr<sup>fa</sup> ラットはヒトの肥満を伴う 2 型糖尿病に類似する病態を発症することが明らかとなった。

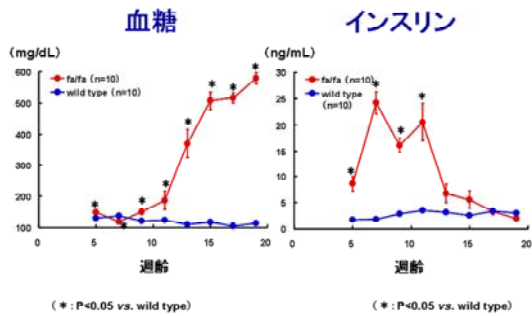


図 1 血中インスリン値の変動

#### ②組織学的病態特性

WBN/Kob-Lepr<sup>fa</sup> ラット膵臓では、7 週齢で間質に炎症性細胞の浸潤、結合組織の増生がみられた。11 週齢以降では、7 週齢でみられた間質性膵炎像に加え膵島構造の崩壊が観察され、インスリン陽性細胞は、膵臓組織中に孤立して散在しているものも認められた。野生型ラット膵臓では、15 週齢において 7 週齢の WBN/Kob-Lepr<sup>fa</sup> ラット膵臓でみられたものと同様な間質性膵炎像が観察された (図 2)。WBN/Kob-Lepr<sup>fa</sup> ラットでは、7 週齢の血中インスリン値、11 および 15 週齢の血糖値が他の群と比較して有意な高値を示した。血漿アミラーゼおよびリパーゼに大きな変動はみられなかった。これらの成績から WBN/Kob-Lepr<sup>fa</sup> ラットは、7 週齢ではすでに間質性膵炎を発症し、11 週齢では膵島構造の崩壊が引き起こされることで、野生型ラットに比べ早期に糖尿病を発症することが示された。

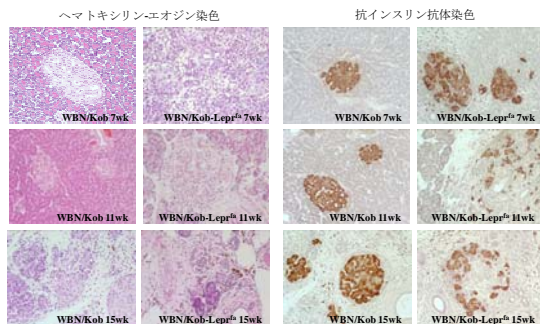


図 2 膵臓病変の推移

#### ③血液生化学および血栓パラメーターの変動に関する検討

1) WBN/Kob-Lepr<sup>fa</sup> ラットの血糖値は 11 週齢および 15 週齢では WBN/Kob ラットおよび Wistar ラットに比べ顕著に高く、インスリン値は 7 週齢で高かったものの、11 週齢および 15 週齢では他の 2 系統と同レベルにあった。2) WBN/Kob-Lepr<sup>fa</sup> ラットのトリグリセリド値は 11 週齢より高値となったが、総コレステロール値および HDL コレステロールは 7~15 週齢で他の 2 系統よりも高値を持続した。3) WBN/Kob-Lepr<sup>fa</sup> ラットの ADP 惹起およびコラーゲン惹起血小板凝集は 7 週齢では他の 2 系統よりも高値を示した。ADP (3 μM) 凝集は 11 週齢および 15 週齢で大きな変化は認められなかったが、コラーゲン凝集および ADP (1 μM) 凝集は低下傾向を示した (図 3 A)。4) WBN/Kob-Lepr<sup>fa</sup> ラットの血液凝固時間は内因系凝固時間 (APTT) で短縮傾向にあったが、外因系凝固時間 (PT) は延長傾向にあった (図 3 B)。

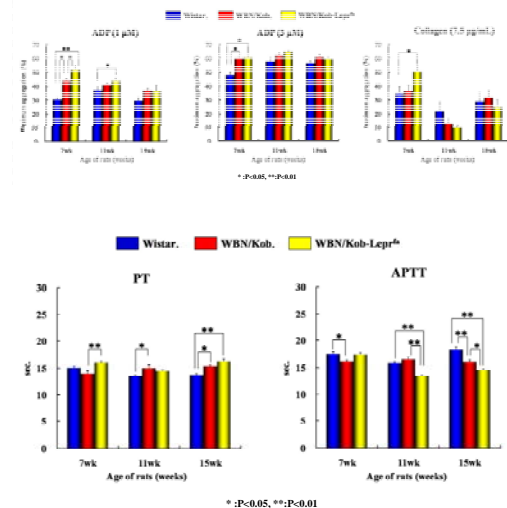


図 3 (A) 血小板凝集の変化、(B) 血液凝固時間の変化

新規 2 型糖尿病モデルの WBN/Kob-Lepr<sup>fa</sup> ラットでは糖代謝の異常のみならず、脂質代謝および止血血栓機構の異常がみられることが明らかとなった。

#### ④インスリン抵抗性改善薬の影響

1) 通常食を給餌した WBN/Kob-Lepr<sup>fa</sup> ラットでは、8 週齢より血糖値が顕著に上昇し、11 週齢まで高値が維持された。一方、トログリタゾン (TGT) 含有餌を給餌した WBN/Kob-Lepr<sup>fa</sup> ラットでは血糖値の上昇は見られず、むしろ低下傾向を示した。WBN/Kob ラットおよび Wistar ラットでは TGT 含有餌による血糖値の変化は見られなかった。

2) 11 週齢において実施したグルコース負荷試験では、Wistar ラットでは TGT 投与による影響は見られなかった。一方、WBN/Kob-Lepr<sup>fa</sup> ラットでは TGT 投与群で非投与群に比してグルコース負荷後の血糖値の上昇が顕著に抑制された。また、インスリンの上昇が非投与群に対して優位に上昇した (図 4)。

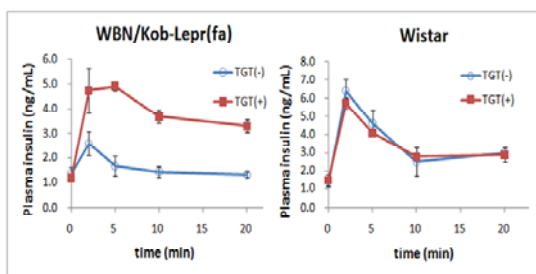


図 4 グルコース負荷試験 (ivGTT) におけるインスリン値の比較

以上のように、インスリン抵抗性改善薬である TGT により糖尿病の発症およびその進展が抑制されることから、WBN/Kob-Lepr<sup>fa</sup> ラットにおける糖尿病はインスリン抵抗性に起因することが示唆された。

本研究の成績より、WBN/Kob-Lepr<sup>fa</sup> ラットは肥満、インスリン抵抗性および膵β細胞の傷害を伴う糖尿病を生後 2～3 ヶ月の早い時期から高頻度で発症することが明らかとなった。また、WBN/Kob-Lepr<sup>fa</sup> ラットは糖・脂質代謝だけでなく血栓形成機構の亢進も認められ、ヒトの 2 型糖尿病患者の病態に類似する点が多いことが示された。これらのことから、WBN/Kob-Lepr<sup>fa</sup> ラットは糖尿病の基礎研究のみならず新規治療薬の開発においても有用性が高いと期待される。

## 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 0 件)

〔学会発表〕 (計 3 件)

① 新規 2 型糖尿病モデル動物としての WBN/Kob-Lepr<sup>fa</sup> ラットの特性

沖尚子、石澤治也、白井明志、市来加奈子、笠貫直美、浜田孝和、浅井史敏、第 148 回日本獣医学会学術集会 (2009/9/26、鳥取)

② 新規 2 型糖尿病モデル動物 WBN/Kob-Lepr<sup>fa</sup> ラットの特性 (第 2 報)

○田邊類、白井明志、梶典幸、浅井史敏、第 148 回日本獣医学会学術集会 (2009/9/26、鳥

取)

③ 新規 2 型糖尿病モデル・ラットにおける血小板凝集および血液生化学値の変動の解明  
浅井史敏、白井明志、平井範彦、石澤治也、沖尚子、大野 (市来) 加奈子、浜田孝和、第 83 回日本薬理学会 (2010/3/17、大阪)

〔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◇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

浅井 史敏 (ASAI FUMITOSHI)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号 : 0 0 5 1 1 6 7 7

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号 :