

機関番号：12501

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 年度～2010 年度

課題番号：21790378

研究課題名 (和文) SDT ラットにおける血管透過性亢進の糖尿病発症への関与

研究課題名 (英文) increased vascular permeability contributes to the development of diabetes in SDT rats

研究代表者

河村 治清 (KAWAMURA HARUKIYO)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：70527902

研究成果の概要 (和文)：自然発症糖尿病モデルラットである SDT ラットでは血管内皮細胞は VEGF に対する応答性が亢進していることが示された。また、SDT ラットに薬剤を投与し、この血管内皮細胞における過剰シグナルを阻害すると、膵β細胞の脱落および糖尿病の発症が抑制されることが明らかとなった。このことから、膵β細胞から分泌される VEGF が膵血管内皮細胞において過剰なシグナルを惹起し、その結果生じる血管障害もしくは膵β細胞障害因子の分泌促進により、膵β細胞死を引き起こすという新規の糖尿病の発症機構が明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：Vascular endothelial cells of SDT rat, a spontaneously diabetic model, showed enhanced response against VEGF in vitro. Pharmacological inhibition of the excessive signaling suppressed pancreatic b cell loss and development of diabetes in SDT rats. These data suggests a new mechanism of diabetes development that VEGF secreted from pancreatic b cells induces excessive signaling in pancreatic vascular endothelial cells, which causes vascular dysfunction or increase in secretion factors injuring pancreatic b cells, leading to the pancreatic b cell death.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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、SDT ラット、VEGF、血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

Spontaneously Diabetic Torii (SDT) ラットは 1997 年に Sprague-Dawley (SD) ラットより確立された遺伝性・自然発症糖尿病モデル動物である。20 週齢頃に膵β細胞数が激減し、雄性ラットでは 40 週齢までに 100%が重度の糖尿病を発症する。糖尿病の病型としてはインスリン補充なしに生存可能であることからこのラットを 2 型糖尿病モデルに分類する

研究者もいるが、急速経過での膵β細胞の消失に続いて重症の糖尿病が発症することから病因論的には 1 型糖尿病モデルラットに分類すべきであるとの意見もある。SDT ラットの疾患モデル動物としてユニークな点は、腎糸球体硬化や網膜新生血管などヒトにおける糖尿病と類似した合併症が出現することであり、糖尿病合併症の研究に極めて有用であると期待されている。申請者らは SDT ラッ

トの網膜や腎の病変が他の糖尿病げっ歯類モデルではみられないこと、腎および網膜の病変はヒトの網膜症発症の経過に比較し極めて短期間に形成されることから、**高血糖が長期に持続したことによる影響に加え、何らかの誘発因子が発症に寄与しているもの**と推察した。さらに、SDT ラットの膵島における最も初期の形態学的変化は膵島の血管拡張と出血である。自然経過中に膵β細胞数の急激な減少による糖尿病を発症するが、膵臓における最も初期の形態学的変化は膵島の血管拡張と出血であり、これに引き続いて様々な形態学的変化が生じる。申請者はこれまで血管の透過性や血管新生の研究を行ってきた (Kawamura et al. Blood 112: 3638-49, 2008; Kawamura et al. Cancer Res 68:4683-92, 2008) 経験から、**SDT ラットでは、何らかの血管機能の破綻により血管透過性の亢進などが生じ、膵島、腎、網膜の病変が出現するのではないか**ではないかと想起するにいたった。さらに、出血毒であり糸球体腎炎用変化を惹起することが知られているハプトキシンを正常ラットに投与し膵島の形態変化を観察したところ、非常に興味深いことに膵島に SDT ラットの膵島の初期病変と極めて類似した膵島内血管拡張と膵島内外の出血を来たすことを発見した (未発表データ)。

このことから、血管感受性の異常が糖尿病の発症に関与するという機構が存在するのではないかと考えた。

2. 研究の目的

SDT ラットは(1)ヒトの糖尿病性網膜症に類似した網膜血管病変を呈し、(2)病初期に膵島内血管の拡張、出血が生じ、その後に膵β細胞数の急激な減少、糖尿病を発症する。このことより、**血管機能異常が存在し、糖尿病発症に寄与しているものと考えられる。**

膵島には毛細血管が豊富に存在しており、糸球体様の血管網構造を構築している。膵島毛細血管は膵β細胞へ酸素・栄養などを供給しているのみならず、様々な生理活性物質を血管内皮細胞から産生し、膵β細胞機能に影響を及ぼすことが報告されている。

本研究では、自然発症糖尿病モデルであり、血管機能異常が存在すると推察された、SDT ラットを用いた解析により、血管機能が膵島の機能維持にどのように関与しているのかを明らかにし、新規の糖尿病発症・進展機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) SDT ラットの膵島、腎血管機能の解析

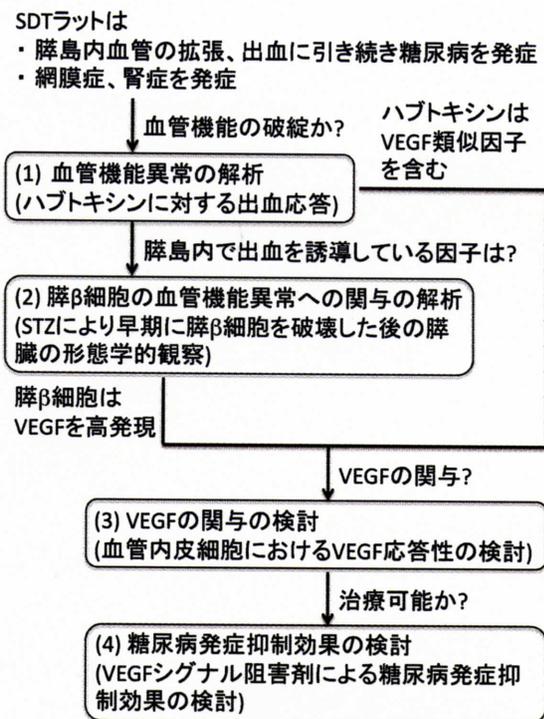
前述のように、申請者らは、ハプトキシンを正常ラットに投与し、SDT ラットの初期病変と類似した膵島内血管拡張、出血をきたす

ことを見いだした。そこで、SDT ラットではハプトキシンに対する血管の応答性が亢進している可能性が考え、種々の用量のハプトキシンを SDT ラットに投与し、膵臓・腎臓における組織変化を対照ラットである SD ラットと比較検討した。

(2) 膵β細胞由来因子の膵島血管病変への関与の検討

血管機能異常を惹起する因子として、膵β細胞由来の因子の関与を想定した。SDT ラットに膵β細胞特異的に細胞死を起こすストレプトゾトシンを投与し、自然経過より早い時期に膵β細胞を破壊し、膵臓の形態学的変化を経時的に解析した。

図1 これまでの解析の流れ



(3) 血管機能異常を惹起する膵β細胞由来因子の同定

ハプトキシン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、強力な血管透過性亢進因子である VEGF と類似の物質として、Trimeresurus flavoviridis snake venom VEGF (TfsvVEGF) 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 (Takahashi et al, 2004)。また、膵β細胞は VEGF を高発現していることから、膵β細胞から分泌され、血管傷害をもたらす因子として VEGF の関与を想定し、検討した。このため、SDT ラットおよび SD ラットから単離した血管内皮細胞に対し、種々

の濃度の VEGF を添加し、誘導されるシグナルの強度をウエスタンブロット法で評価した。

(4) VEGF シグナルの糖尿病進展への関与の検討および、阻害剤による治療的介入

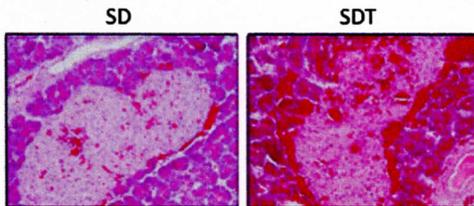
SDT ラットの血管反応性亢進に VEGF が関与していることを同定した後、薬剤的に VEGF シグナルを阻害することにより、SDT ラットの自然経過中にみられる膵β細胞死、インスリン分泌能低下、糖尿病発症、進展の抑制が可能か否かを解析することにより、VEGF シグナルの糖尿病進展への関与を明白にするとともに、治療の可能性を検討した。

4. 研究成果

(1) SDT ラットの膵島、腎血管機能の解析

5 週齢および 6 週齢の SDT ラットおよび対照正常ラットである SD ラットに対し、出血毒であり糸球体腎炎のモデル動物作製に用いられるハプトキシン 2 mg/kg を尾静脈より投与し、6 時間後に膵、腎の形態学的変化を観察した。その結果、SD ラットに比較し、SDT ラットでは膵島および糸球体での出血病変が強く誘発された (図 2)。このことから SDT ラットでは血管機能が障害されており、ハプトキシンに含まれる何らかの出血因子に対する血管応答性が亢進していることが明らかになった。

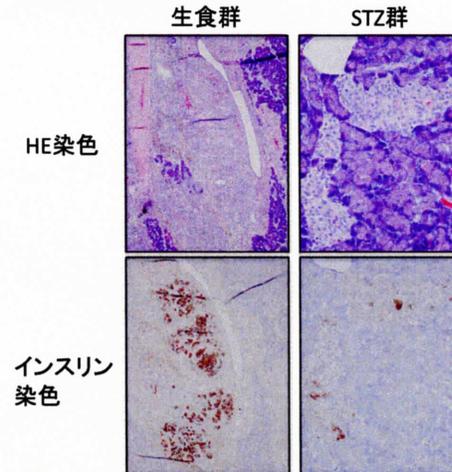
図2 SDTラットはハプトキシンによる出血応答性が亢進している



(2) 膵β細胞由来因子の膵島病変への関与の検討

血管機能異常を惹起している原因として、膵β細胞由来の因子の関与を考えた。5 週齢の SDT ラットに膵β細胞特異的に細胞死を起こすストレプトゾトシンを 60 mg/kg で腹腔内注射し、自然経過より早い時期に膵β細胞を破壊し、膵臓の形態学的変化を経時的に解析した。その結果、投与後 28 日、56 日後において、自然経過で生じるはずの膵島内出血および膵島周囲の変性再生像がみられなかった (図 3)。このことから膵β細胞由来の何らかの液性因子が血管機能異常を誘導することが示唆された。

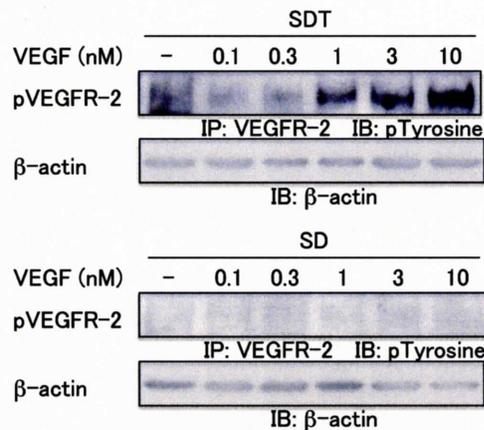
図3 膵β細胞破壊による膵島内出血および再生変性像の発症抑制



(3) 血管機能異常を惹起する膵β細胞由来因子の同定

膵β細胞は VEGF を高発現しており、また、ハプトキシンには VEGF 類似の因子が含まれていることから、膵β細胞から分泌され、血管傷害をもたらす因子として VEGF の関与を想定した。そこで、SDT ラットおよび SD ラットよりマグネットビーズを用いて腎糸球体を単離し (Takemoto M., et al. Am. J. Pathol. 2002; 16: 799-805.), これに 0.1-10 nM の VEGF を添加し、誘導される VEGF receptor-2 のリン酸化の程度をウエスタンブロット法で評価した。その結果、SDT ラットでは VEGF による VEGF receptor-2 リン酸化が亢進しており (図 4)、SDT ラットの血管内皮細胞では VEGF に対する反応性が亢進していることが明らかとなった。

図4 SDTラットにおけるVEGF応答性亢進



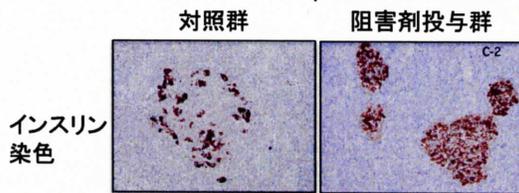
(4) VEGF シグナルの糖尿病進展への関与の検

討および、阻害剤による治療的介入

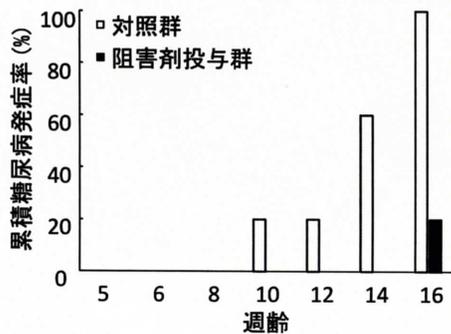
SDT ラットに対し、VEGF シグナル阻害剤 1.5-5 mg/kg/day を 5 週齢より連日経口投与し、血糖値の経時的測定による糖尿病発症率および膵臓の形態学的変化を解析した。その結果、自然経過で見られる出血は完全に抑制されており、さらに、 β 細胞数減少の抑制、糖尿病発症の抑制も認めた (図 5)。このことから **VEGF シグナル阻害による膵 β 細胞保護作用** が示された。

図5 SDTラットにおけるVEGF阻害剤による膵 β 細胞保護作用

A. VEGFシグナル阻害剤による膵 β 細胞脱落抑制効果



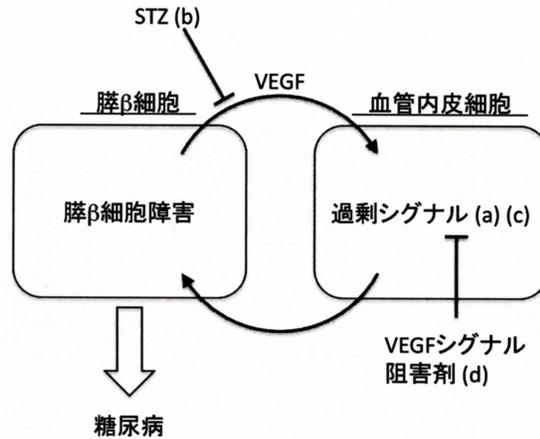
B. VEGFシグナル阻害剤による糖尿病発症抑制効果



これまで膵 β 細胞から分泌される VEGF、Ang-1 は、血管網の構築に重要であることが知られており、血管内皮細胞からは IV 型コラーゲンやラミニンなどの細胞外マトリックスや HGF などの増殖因子が産生され、膵 β 細胞の分化・増殖に関与するという報告がある。しかし、膵 β 細胞-血管内皮細胞間のクロストークに関する理解は未だに十分ではなく、膵島の機能維持にどのような病態生理的役割を果たしているかも不明である。本研究のこれまでの結果より、SDT ラットでは、膵島内の過剰な VEGF シグナルが膵 β 細胞-血管内皮細胞相互作用の破綻をきたし、膵 β 細胞が障害されるといふ新たな糖尿病発症機序が明らかになった (図 6)。現在、SDT ラット以外の糖尿病モデル動物を用いた解析を進行中であるが、予備実験の結果では、肥満 2 型糖尿病モデルマウスにおいても同様の機構が糖尿病の発症に関わっていることが示唆されており、様々なタイプの糖尿病に共通する普遍的なメカニズムである可能性があ

る。今後、さらに詳細なメカニズムが明らかになれば、新たな糖尿病治療の標的となりうるものと考えられる。

図6 膵 β 細胞-血管内皮細胞の相互作用破綻による糖尿病進展メカニズム



- (a) 血管応答性亢進 (ハプトキシンによる高度の出血)
- (b) 膵 β 細胞由来因子による血管機能障害 (STZでの膵 β 細胞破壊による膵島の血管病変の消失)
- (c) VEGFの関与 (血管内皮細胞でのVEGFシグナルの亢進)
- (d) 過剰VEGFシグナルによる膵 β 細胞障害

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)

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/physiol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河村 治清 (KAWAMURA HARUKIYO)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：70527902

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

岩永 敏彦 (IWANAGA TOSHIHIKO)
北海道大学・組織細胞学分野・教授
研究者番号：10160128