

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390185

研究課題名(和文)生活習慣病形成におけるリンパ管システム破綻の役割の解明

研究課題名(英文)The role of lymphatic system and its functional failure in development of metabolic disorders.

研究代表者

横手 幸太郎 (YOKOTE, Koutaro)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：20312944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、リンパ管の生活習慣病への関与を明らかにするため検討を行った。肥満2型糖尿病モデルマウスの膵臓ではリンパ管が増生しており、膵島においてVEGF-Cの発現が上昇していた。In vitroでの検討では、IL-1 やTNF- $\alpha$ により膵 $\alpha$ 細胞でのVEGF-Cの発現が誘導された。以上より、糖尿病、肥満で発現が上昇する炎症性サイトカインが膵島でのVEGF-Cの発現を誘導し、膵リンパ管の増生をもたらすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to detect the contribution of lymphatic vessels to lifestyle related disease. In obese type2 diabetic mice, pancreatic lymphatic vasculature was increased and VEGF-C expression was enhanced in islets. In vitro study showed that IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  upregulated VEGF-C in pancreatic  $\alpha$  cells and pancreatic  $\beta$  cells. These results indicated that in diabetes and obesity, elevated inflammatory cytokine induce VEGF-C expression in islets, thereby pancreatic lymphatic vessels were increased.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般(含心身医学)

キーワード：生活習慣病 リンパ管 糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

近年、社会の高齢化と生活習慣の欧米化が糖尿病、脂質異常症、高血圧など生活習慣病の増加を招き、それらを原因とする心血管疾患は我が国における死亡原因の第2位を占めるにいたっている。様々な領域において、生活習慣病および動脈硬化の研究は進展を遂げているが、その根本的解決に結びつく画期的な成果は得られていない。

本研究では、動脈、静脈に次ぐ第3の脈管系に位置付けられながら、未だその生理的・病的意義が十分に確立していない「リンパ管システム」に焦点を当てる。すなわち、リンパ管の機能異常が生活習慣病の病態形成に寄与するという仮説のもと、膵細胞機能とインスリン分泌、脂肪細胞機能とインスリン抵抗性、粥状動脈硬化形成、そして加齢の観点から検証を進める。

(1) これまでの研究成果を踏まえ、着想に至った経緯

これまで我々は、動脈硬化形成における細胞増殖制御因子の役割を主たるテーマとして研究を推進し、近年では、血管平滑筋細胞の増殖・遊走抑制因子NOV/CCN3 やがん抑制遺伝子p53の下流で内皮細胞保護的に働くGLS2 など新規の動脈硬化抑制性分子を同定してきた

(Shimoyama et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010; Suzuki et al. *Proc Natl Acad Sci*, 2010)。その研究過程で、動脈硬化モデルマウスや野生型マウスにおいて各臓器の形態を病理学的に比較検討した結果、肥満・2型糖尿病モデルマウスの一つであるdb/dbマウスの膵ランゲルハンス島や脂肪組織では、リンパ管網の形態変化が見られ、その形成に重要な役割を果たすVEGF-C (C型内皮増殖因子)の発現パターン(次頁左図、未公表成績)にも異常をきたしていることを見出した。この知見にヒントを得て、海外での報告を精査してみると、以下に述べるように、リンパ管系の機能異常と代謝異常との関連を示唆する報告が複数存在することが分かった。

(2) 本研究に関連すると思われる海外での知見臨床的には、高コレステロール血症および高中性脂肪血症を呈し動脈硬化性疾患を生じ易い家族性混合型高脂血症において、Prox-1、FoxC2 などリンパ管発生に重要な転写因子の発現低下が報告され、脂質代謝、メタボリックシンドロームとリンパ管形成異常の関連が示唆される。また動物実験では、Chyマウスと呼ばれるVEGFR-3 (VEGF-C 受容体)の変異マウスにおいて皮下のリンパ管が減少し、脂肪細胞の過剰蓄積を認めることが示されている。さらに、静脈からリンパ管内皮が形成される過程に必須なProx-1 遺伝子ヘテロ欠損マウスは、成長に伴い肥満・インスリン抵抗性を生じる(Harvey et al. *Nat Genet*, 2005)。このマウスの特徴として、内臓脂肪

組織の中でも、特にリンパ管の豊富な腸管膜のリンパ節周囲に脂肪蓄積が著明であった。また、動脈硬化巣においてリンパ管の発達が少ないことも報告されている(Am J Pathol 170:, 2007)が、その意義の詳細は明らかでない。これら一連の知見は、リンパ管機能の変化がインスリン抵抗性や脂質異常、さらには動脈硬化の発症と関わることを示唆する。しかし、各種代謝病態におけるリンパ管システムの形態学的な精査や遺伝子発現パターンの解析、さらにリンパ管機能を修飾したモデル動物における脂肪細胞や膵細胞の機能、そして動脈硬化形成に関する体系的な研究は、これまで国内はもとより海外においても実施されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、動脈、静脈に次ぐ第3の脈管系に位置付けられながら、未だその生理的・病的意義が十分に確立していない「リンパ管システム」に焦点を当てる。すなわち、「リンパ管の機能異常が生活習慣病の病態形成に寄与する」という仮説のもと、膵細胞機能とインスリン分泌、脂肪細胞機能とインスリン抵抗性、動脈硬化形成、加齢の観点からそれぞれ検証を進める。

## 3. 研究の方法

(1) 肥満、糖尿病の膵臓、脂肪組織および動脈硬化巣におけるリンパ管網の形態学的解析

肥満2型糖尿病モデルであるob/obマウス、db/dbマウス、KKAyマウス、1型糖尿病モデルであるAkitaマウス、また、高脂肪餌負荷により肥満・インスリン抵抗性を惹起したマウスを用いて、膵臓および内臓脂肪組織におけるリンパ管網をリンパ管内皮細胞のマーカーである抗LYVE-1抗体による免疫染色で解析した。また、アポE欠損マウスを高コレステロール餌にて飼育し、粥状動脈硬化を惹起し、大動脈におけるリンパ管網の発達をLYVE-1に対する抗体で免疫染色により解析した。

(2) リンパ管新生因子VEGF-Cの発現解析

ob/obマウスおよび高脂肪餌負荷マウスの膵臓において、強力なリンパ管新生因子であるVEGF-Cの発現を免疫染色で解析した。また、単離膵島におけるVEGF-Cの発現変化をリアルタイムPCRにて解析した。

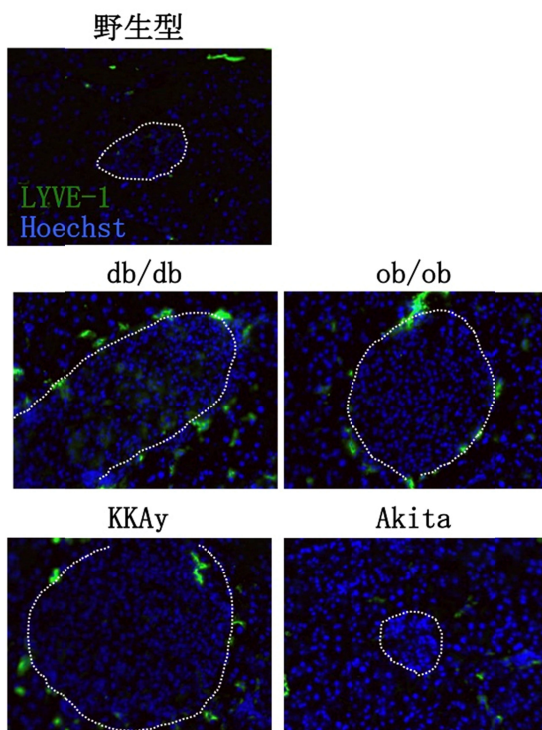
(3) VEGF-C発現亢進機構の解析

培養膵細胞(TC1.9細胞)、培養膵細胞(MIN6細胞)および単離膵島に、グルコース、インスリン、炎症性サイトカインを添加し、VEGF-Cの発現変化をリアルタイムPCRにて解析した。

#### 4. 研究成果

高コレステロール餌負荷アポE欠損マウスおよび通常餌飼育野生型マウスにおいて、抗LYVE-1抗体による免疫染色では、野生型においても粥状動脈硬化を惹起した大動脈においてもリンパ管はほとんどみられなかった。内臓脂肪組織においては、ob/obマウス・高脂肪餌負荷マウスいずれにおいても非肥満野生型マウスに比較してリンパ管網の減少を認めた。膵臓においては、1型糖尿病モデルであるAkitaマウスのみならず、肥満2型糖尿病モデルマウスであるob/obマウス、db/dbマウス、KKAyマウスでもリンパ管が増生していた(図1)。

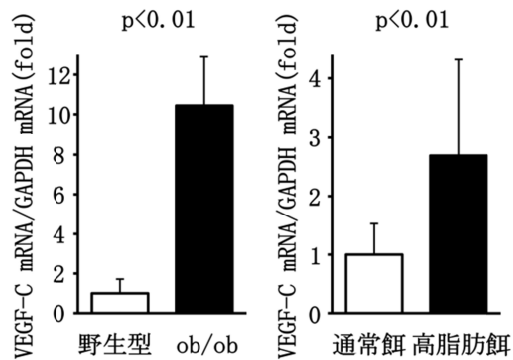
図1 糖尿病モデルマウスの膵臓におけるリンパ管網の発達



また、高脂肪餌飼育により肥満、インスリン抵抗性を惹起したマウスでも同様に膵臓におけるリンパ管の増生を認めた。この結果は、肥満や糖尿病に伴って膵臓におけるリンパ管の発達が明らかに変化することを示している。特に肥大した膵島の周辺にリンパ管が密着して増生して認めたことから、膵島から分泌される何らかの因子が、リンパ管の発達を促進していることが推察された。

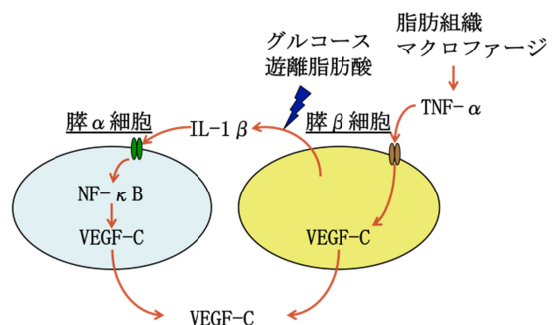
そこで、強力なリンパ管新生促進因子である VEGF-C に着目して検討を進めた。単離膵島における VEGF-C の発現をリアルタイム PCR にて解析したところ、ob/ob マウスでは野生型に比較して VEGF-C の発現が約 10 倍に上昇していた。さらに、高脂肪食負荷マウスにおいても 2.7 倍の VEGF-C の発現上昇を認めた(図2)。

図2 ob/obマウス、高脂肪餌負荷マウスにおける膵島でのVEGF-Cの発現



免疫染色では、膵島全体に VEGF-C の発現を認め、また、培養細胞を用いた RT-PCR による検討では、膵細胞株である TC1.9 細胞、膵細胞株である MIN6 細胞の両者で VEGF-C の発現を認めた。次に、この膵島における VEGF-C の発現亢進のメカニズムを明らかにするため、グルコースやインスリン、アディポネクチン・TNF- $\alpha$ ・IL-1 といった糖尿病や肥満関連サイトカインの関与について検討した。その結果、TC1.9 細胞では IL-1 により、MIN6 細胞では TNF- $\alpha$  により VEGF-C mRNA の発現が誘導され、また、単離膵島を用いた検討でも両サイトカインは VEGF-C の発現を亢進した。グルコースやインスリンは VEGF-C の発現には影響しなかった。VEGF-C の発現調節には NF- $\kappa$ B が関与していることが知られている。NF- $\kappa$ B は TNF- $\alpha$  および IL-1 の下流シグナルであり、TC1.9 細胞、MIN6 細胞でもこれらの炎症性サイトカインの刺激により NF- $\kappa$ B が活性化され、核内へ移行することが免疫染色で確認された。そして、NF- $\kappa$ B の活性化阻害剤である PTD-p65-P1 で処理することにより、これらの炎症性サイトカインによる VEGF-C の発現誘導は濃度依存性に抑制された。このことより、糖尿病、肥満状態で発現が上昇する TNF- $\alpha$  や IL-1 が膵細胞、膵細胞での VEGF-C の発現を誘導し、膵リンパ管の増生を促していることが示唆された(図3)。

図3 糖尿病、肥満ではTNF- $\alpha$ やIL-1 $\beta$ が膵 $\alpha$ 細胞、膵 $\beta$ 細胞でのVEGF-Cの発現を誘導し、リンパ管の増生を促す



主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計42件)

Mandai Y, Takahashi D, Hase K, Obata Y, Furusawa Y, Ebisawa M, Nakagawa T, Sato T, Katsuno T, Saito Y, Shimaoka T, Yokosuka O, Yokote K, Ohno H. (2013) Distinct Roles for CXCR6+ and CXCR6-CD4+ T Cells in the Pathogenesis of Chronic Colitis. *PLoS One*. 8(6):e65488.

査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0065488

Kawaguchi T, Ohwada C, Takeuchi M, Shimizu N, Sakaida E, Takeda Y, Sakai S, Tsukamoto S, Yamazaki A, Sugita Y, Jiang M, Higashi M, Yokote K, Tamura J, Bujo H, Nakaseko C. (2013) LR11: a novel biomarker identified in follicular lymphoma. *Br J Haematol*, 163(2):277-280. 査読有

doi: 10.1111/bjh.12467

Sonezaki K, Maezawa Y, Takemoto M, Kobayashi K, Tokuyama T, Takada-Watanabe A, Simoyama T, Sato S, Saito Y, Yokote K. (2013) Alteration of VEGF and Angiopoietins expressions in diabetic glomeruli implicated in the development of diabetic nephropathy. *Advanced Studies in Medical Sciences*, (1)11-28. 査読有

www.m-hikari.com

Takemoto M, Ishikawa T, Onishi S, Okabe E, Ishibashi R, He P, Kobayashi K, Fujimoto M, Kawamura H, Yokote K. (2012) Atrovastatin ameliorates the urinary excretion of podocytes in patients with type2 diabetes complicated with dyslipidemia.

*Diabetes Res Clin Pract*. 100(1):e26-9.

査読有

doi: 10.1016/j.diabres

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

doi: 10.2337/dc12-1179

Matsumoto T, Sakurai T, Tanaka T, Ishibashi T, Tachibana K, Ishikawa K, Yokote K. (2012) The anti-ulcer agent, irsogladine, increases insulin secretion by MIN6 cells. *Eur J Pharmacol* 685:213-217. 査読有

doi: 10.1016/j.ejphar.2012.04.005

Koshizaka M, Takemoto M, Sato S, Tokuyama H, Fujimoto M, Okabe E, Ishibashi R, Ishikawa T, Tsurutani Y, Onishi S, Mezawa M, He P, Honjo S, Ueda S, Saito Y, Yokote K. (2012) Angiotensin II Type 1 Receptor Blocker Prevents Renal Injury via Inhibition of the Notch Pathway in Ins2 Akita Diabetic Mice. *Exp Diabetes Res*.159874. 査読有

doi: 10.1155/2012/159874

Furukawa K, Sato T, Katsuno T, Nakagawa T, Noguchi Y, Tokumasa A, Yokote K, Yokosuka O, Saito Y. (2012) Smad3 contributes to positioning of proliferating cells in colonic crypts by inducing EphB receptor protein expression. *Biochem Biophys Res Commun* 405(4):521-526. 査読有

doi: 10.1016/j.bbrc.2011.01.045

Tanaka A, Sakurai K, Kaneko K, Ogino J, Yagui K, Ishikawa K, Ishibashi T, Matsumoto T, Yokote K, Saito Y.

(2012) The role of the hypoxia-inducible factor 1 binding

site in the induction of aquaporin-1 mRNA expression by hypoxia. DNA Cell Biol 30(8):539-44. 査読有

doi: 10.1089/dna.2009.1014

Takeda Y, Nakaseko C, Tanaka H, Takeuchi M, Yui M, Saraya A, Miyagi S, Wang C, Tanaka S, Ohwada C, Sakaida E, Yamaguchi N, Yokote, K., Hennighausen L, Iwama A. (2011) Direct activation of STAT5 by ETV6-LYN fusion protein promotes induction of myeloproliferative neoplasm with myelofibrosis. Br J Haematol. 153,5,589-598. 査読有

doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08663.x

Tsurutani Y, Fujimoto M, Takemoto M, Irisuna H, Koshizaka M, Ohnishi S, Ishikawa T, He P, Honjo S, Maezawa Y, Saito Y, Yokote, K. (2011) The roles of transforming growth factor- $\beta$  and Smad3 signaling in adipocyte differentiation and obesity. Biochem Biophys Res Commun. 1;407(1),68-73. 査読有

doi: 10.1016/j.bbrc.2011.02.106

[学会発表](計59件)

Yokote, K. (2013) Atherosclerosis as a reluctant failure of the protective vascular response. The 1<sup>st</sup> Symposium of Leading Graduate School at Chiba University Immune System Regulation and Innovative Therapeutics, June 8, Tokyo.

Yokote, K. (2012) (Symposium) Cellular regulation in diabetic complications. 2012 Shanghai Symposium on Obesity and Diabetes, April 7, Shanghai, China.

Yokote, K., Shimoyama, T., Mezawa, M., Takemoto, M. (2011) The role of CCN3 in response to vascular injury. 第4回日本

CCNファミリー研究会、8月26日、岡山。

横手幸太郎 (2011) (招待講演) Statin in treatment of metabolic syndrome. 第27回タイ内科学会、4月29日、タイ。

[図書](計0件)

[その他]

ホームページ等  
ガイドライン  
ウエルナー症候群の診療ガイドライン  
2012  
<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/cell-biol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横手 幸太郎 (YOKOTE, Koutaro)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号: 20312944

(2) 研究分担者

竹本 稔 (TAKEMOTO, Minoru)  
千葉大学・大学院医学研究院・准教授  
研究者番号: 60447307

藤本 昌紀 (FUJIMOTO, Masaki)  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 20451742