

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：35303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25560215

研究課題名(和文) 膵ランゲルハンス島の微小血行動態を解析しうる新規イメージング技術の開発と応用

研究課題名(英文) Development of the novel in vivo bio-imaging technique to visualize microcirculation of pancreatic islet and its application to elucidate the pathogenesis of diabetes

研究代表者

柏原 直樹 (Kashihara, Naoki)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：10233701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病は膵ランゲルハンス島(ラ氏島)のインスリン産生細胞である細胞の機能異常・細胞数減少により発症する。さらに糖尿病発症後も細胞障害が持続し、糖尿病は難治化する。ラ氏島の微小血行動態変化が持続的な細胞障害に関与すると考え、これを検証するために、これまで不可能であった生体動物でラ氏島血流を可視化する新規技術の開発に成功した。この技術を用いて、高血圧の成因とも関係のあるアンジオテンシンがラ氏島血流とインスリン分泌を制御することを明かにした。本技術を活用することで糖尿病における細胞障害の機序をさらに詳細に解析し、新規治療法開発に繋がることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic beta cell dysfunction and its progressive loss are the main causative mechanisms of diabetes. Deterioration of microcirculation of islet blood flow could be involved in this mechanism. We have successfully developed a novel technique by which we could visualize microcirculation of pancreatic islet. We hypothesized that angiotensin II directly regulates the pancreatic islet microcirculation and thereby regulates insulin secretion. Angiotensin II significantly induced blood vessel contraction in the islets in a dose-dependent manner. In contrast, the angiotensin type 1 receptor blocker induced vasodilation. Glucose-stimulated insulin secretion was decreased by angiotensin II infusion. These results show that angiotensin II is involved in the regulation of pancreatic islet microcirculation and insulin secretion.

We expect this novel technique could contribute to delineate the pathogenesis of diabetes and develop therapeutic strategy for diabetes.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・生体医工学・生体材料学

キーワード：ランゲルハンス島 in vivo imaging法 内皮障害 微小血行動態 インスリン分泌 耐糖能障害 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

本邦の糖尿病患者数は、生活習慣変化に伴い増加の一途を辿っている。糖尿病は発症後に治癒することは極めて困難であり、脳卒中、心血管病等の大血管障害と網膜症・腎症・神経障害などの細小血管合併症を引き起こす。腎不全や成人の失明の主要な疾患となっている。医療経済的にも大きな負担を社会に強いており、今後も高齢化に従い、一層増加するものと危惧されている。

2 型糖尿病発症の主要要因は、膵細胞の機能異常とインスリン抵抗性である。糖尿病発症時点で細胞数は約 1/2 に減少し、その後も減少が持続し難治化する。しかしながら、細胞障害・持続的脱落のメカニズムについては十分に解明されておらず、従って、糖尿病進行を抑制する有効な治療法も確立されていない。

2 型糖尿病の膵ラ氏島には細胞数の減少とラ氏島線維化に加えて微小血管障害(硝子化、内腔狭小化)が認められる。また高血圧や高齢者ではラ氏島微小血管障害、線維化が先行して認められ、糖尿病発症要因と推定されている。

## 2. 研究の目的

膵ランゲルハンス島(ラ氏島)微小血管は高度に分化した血管構築を有している。高血圧・糖尿病では腎・網膜血管等に微小血管障害を合併するが、同時にラ氏島内にも微小血管障害を生じる。これが高血圧患者に糖尿病合併率が高い一因と推定される。本研究では新規 in vivo imaging 技術を開発し「ラ氏島内の微小血管障害・血行動態変化が細胞障害とその持続に關与する」仮説を検証する。本研究の主目的は、1)ラ氏島微小血管の血行動態変化を生体動物で可視化解析しうる新規 in vivo live imaging 法を開発し、2)ラ氏島血流調節とインスリン分泌の機能的連関を解明し、さらに 3) ラ氏島微小血行動態変化による細胞障害機序を解析し、4)糖尿病・高血圧における膵ラ氏島・細胞保護(糖尿病発症・進展抑制)のための治療戦略立案に資する事である。

## 3. 研究の方法

2 光子レーザー顕微鏡と各種蛍光プローブを用いて、生体動物において膵ラ氏島内微小血行動態を解析する in vivo imaging 技術を確立する。

生体内でインスリン分泌細胞を同定し、インスリン産生変化をリアルタイムでモニターするためにインスリンプロモーター-下で蛍光色素遺伝子を発現する遺伝子改変マウスを利用する。次いで細胞によるインスリ

ン分泌能とラ氏島微小血流との調節機序との連関を解析する。ブドウ糖や循環系ペプチド、特にレニン・アンジオテンシン系の血流調節及びインスリン分泌能における役割を検討する。さらに糖尿病モデル動物における、ラ氏島血流・血管構築異常を解析する。最終段階として、RA 系阻害薬、PPAR- agonist、インクレチン関連薬等の薬剤によるラ氏島血管血流改善作用と関連する細胞保護(インスリン分泌能、抗アポトーシス)作用を解析する。

## 4. 研究成果

1). 膵ラ氏島内微小血行動態解析法の基盤技術の確立と調節機序の解析

(1)生体膵ラ氏島における微小血管構築変化、血流の可視化技術確立

2 光子励起方式レーザー走査型顕微鏡(two-photon laser scanning fluorescence microscope:)と標識 probe を用い、生体臓器における血流動態等を可視化検出しうる新規 in vivo imaging 法を確立した。

マウスインスリンプロモーター下流にDsRed(赤色蛍光蛋白)を発現する遺伝子改変マウス(DsRed マウス)を用いて、細胞及び膵島にDsRed 蛋白を強制発現させ、細胞及び膵島を可視化した。続いて、マウス内頸静脈にカテーテルを挿入し、同部位からFITC 標識された分子量 500kDa Dextran (FITC-Dextran)を投与し、これにより、細動脈及び毛細血管、細静脈を可視化することが成功した。

これらを組み合わせることで、赤色蛍光(DsRed)により細細胞及び膵島を可視化でき、同時に緑色蛍光標識プローブ(FITC-Dextran)で膵島内の微小血行動態を可視化検出しえた。

(2)ラ氏島血流調節とインスリン分泌調節の連関機序の検討

DsRed マウスと2光子レーザー顕微鏡を用いて、アンジオテンシン(AII)し、ラ氏島内微小血流の変化を解析した。DsRed マウスに頸静脈よりFITC-Dextran を投与し、膵島内微小血管を描出し、血流変化を経時的にモニターした。ラ氏島からのインスリン分泌をモニターするために、膵動脈と門脈にカテーテルを挿入し、頸動脈よりブドウ糖液あるいは、A 等を投与し、ラ氏島微小血管の血行動態変化と同時に門脈血中のインスリン濃度を測定し、血行動態変化がインスリン分泌に与える影響を検討した。

AII は用量依存性に膵内細小動脈を収縮させ、ラ氏島内血流を低下させた。同時にラ氏島からのインスリン分泌を低下させることが判明した。

2). 血管作動性物質の持続投与による膵ラ氏島内微小血管変化の解析

DsRed マウスに All を osmotic pump を用いて 2 週間投与し、ラ氏島微小血流変化、細胞障害を解析した。アンジオテニン II 受容体拮抗薬 (ARB) 投与の影響を解析した。

経口ブドウ糖負荷試験を行なったところ、耐糖能障害が出現し、同時にラ氏島からのインスリン分泌能の低下を認めた。

ARB はラ氏島血流を増大させ、ラ氏島からのインスリン分泌を促進させることが判明した。

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 2 件)

1. Ithoriya C, Satoh M, Kuwabara A, Sasaki T, Kashihara N. Angiotensin II Regulates Islet Microcirculation and Insulin Secretion in Mice. Microcirculation. 2014. [Epub ahead of print] 査読有  
doi: 10.1111/micc.12094.
2. Satoh M, Nagasu H, Haruna Y, Ithoriya C, Kadoya H, Sasaki T, Kashihara N. Hypertension promotes islet morphological changes with vascular injury on pre-diabetic status in SHRsp rats. Clin Exp Hypertens. 2014;36(3):159-64. 査読有  
doi: 10.3109/10641963.

[学会発表](計 7 件)

1. Ithoriya C, Satoh M, Sasaki T, Kashihara N, Rosuvastatin Activates Transcription Factor Nrf2 through p21cip1 Expression and Prevents Albuminuria through Preservation of Glomerular Endothelial Integrity in AKITA Diabetic Mice. ASN2013, Nov 9, 2013, Georgia World Congress Center (Atlanta, USA)
2. 庵谷千恵子、佐藤稔、春名克祐、角谷裕之、板野精之、藤本壮八、駒井則夫、佐々木環、柏原直樹. 高血圧モデル動物における膵組織障害と ARB による膵内微小血管保護作用・耐糖能改善効果の検討. 第36回日本高血圧学会総会 2013年10月24日 大阪国際会議場(大阪市)
3. 庵谷千恵子、佐藤 稔、板野精之、角谷裕之、城所研吾、佐々木環、柏原直樹. ロスバスタチンは Nrf2 活性化を介して抗酸化能を増強し糖尿病性腎症の進展

を抑制する. 第 28 回日本糖尿病合併症学会 2013年9月13日 旭川グランドホテル(旭川市)

4. Ithoriya C, Satoh M, Itano S, Kadoya H, Nishi Y, Kidokoro K, Komai N, Sasaki T, Kashihara N, Rosuvastatin Maintain Glomerular Endothelial Surface layer Through Nrf2 Activation in Mouse Diabetic Nephropathy. WCN2013, June 1, 2013, Hong Kong Convention and Exhibition Centre (Hong Kong)
5. 城所研吾、佐藤 稔、駒井則夫、矢田豊隆、佐々木環、柏原直樹. 内皮 GTP-cyclohydrolase 1 機能維持は内皮機能改善を介し糖尿病性腎症の発症・進展を抑制する. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 2013年5月18日 熊本キャッスルホテル(熊本市)
6. 角谷裕之、佐藤 稔、春名克祐、庵谷千恵子、西佑子、城所研吾、駒井則夫、佐々木環、柏原直樹. 高血圧による膵ラ氏島組織障害のメカニズムの解明とアンジオテニン 受容体拮抗薬 (ARB) による膵保護作用の検討. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 2013年5月18日 熊本キャッスルホテル(熊本市)
7. 庵谷千恵子、佐藤 稔、桑原篤憲、角谷裕之、西佑子、城所研吾、駒井則夫、佐々木環、柏原直樹. in vivo live imaging 技術を用いたアンジオテニン によるマウス膵島微小血流及びインスリン分泌制御機構の解析. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 2013年5月17日 熊本キャッスルホテル(熊本市)

[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 0 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  
：<http://www.kawasaki-jinzo.net/greeting>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

柏原 直樹 ( KASHIHARA NAOKI )  
川崎医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10233701

### (2)研究分担者

佐藤 稔 ( SATOH MINORU )  
川崎医科大学・医学部・講師  
研究者番号：70449891