

博士論文

糖尿病抵抗性ラットの発見と その機序の解明に関する研究

長木 孔明

目次

第1章 序論	1
1-1 糖尿病	2
1-2 血糖調節	2
1-3 糖尿病モデル動物	3
1-4 膵 β 細胞とストレプトゾトシンの作用	4
1-5 酸化的ストレスと糖尿病	6
1-6 糖尿病の合併症としての神経障害と虚血性心疾患	8
1-7 本論文の目的	8
付表および付図	10
第2章 WTC ラットのストレプトゾトシンに対する感受性と糖代謝	12
2-1 緒言	13
2-2 材料及び方法	14
2-2-1 動物	
2-2-2 ストレプトゾトシンに対する感受性	
2-2-3 インスリン分泌量の測定	
2-2-4 膵臓、骨格筋、肝臓の摘出	
2-2-5 GLUT2 および Kir6.2 の発現量の評価	
2-2-6 血中 GLP-1 濃度	
2-2-7 膵臓、骨格筋、肝臓における GLP-1R および GLUT の発現量	
2-2-8 統計解析	
2-3 結果	18
2-3-1 ストレプトゾトシンに対する感受性の評価	
2-3-2 インスリン分泌量の評価	
2-3-3 ストレプトゾトシンの取り込みに関与する遺伝子の発現量の評価	

2-3-4	血中 GLP-1 濃度に関する検討	
2-3-5	膵臓、骨格筋、肝臓における GLP-1 受容体(GLP-1)遺伝子および骨格筋における GLUT4 遺伝子および肝臓における GLUT2 遺伝子の発現に関する検討	
2-4	考察	21
2-5	小括	23
	付表および付図	24
第 3 章	WTC ラットのストレプトゾトシン抵抗性に関する抗酸化機構	33
3-1	緒言	34
3-2	材料及び方法	35
3-2-1	動物	
3-2-2	アロキサンの投与	
3-2-3	SOD の発現量	
3-2-4	組織学的検討	
3-2-5	ストレプトゾトシンの投与と膵臓、骨格筋、肝臓の摘出	
3-2-6	膵臓、骨格筋、肝臓におけるメタロチオネイン発現量の評価	
3-2-7	統計解析	
3-3	結果	39
3-3-1	アロキサン投与による血糖値および体重への影響	
3-3-2	膵臓における SOD 産生量	
3-3-3	膵臓における SOD の発現部位に関する検討	
3-3-4	メタロチオネインの発現量に関する検討	
3-4	考察	41
3-5	小括	43
	付表および付図	45

第4章 抗酸化剤を投与したラットにおけるストレプトゾトシンの作用抑制に関する検討	54
4-1 緒言	55
4-2 材料及び方法	56
4-2-1 動物	
4-2-2 マンニトールおよびアスコルビン酸の前処置後のストレプトゾトシン投与の影響	
4-2-3 血中 SOD 濃度の測定	
4-2-4 統計解析	
4-3 結果	58
4-3-1 活性酸素除去剤の前処置がストレプトゾトシンの作用に与える影響	
4-3-2 活性酸素除去剤の前処置による SOD 産生量に対する影響	
4-4 考察	59
4-5 小括	61
付表および付図	62
第5章 WTC ラットの生体機能と糖尿病合併症	64
5-1 緒言	65
5-2 材料及び方法	66
5-2-1 動物	
5-2-2 テレメーター送信機の埋め込み	
5-2-3 心電図記録	
5-2-4 心拍変動解析	
5-2-5 ストレプトゾトシンの投与と血糖値測定	
5-2-6 病理組織学的検討	
5-2-7 統計解析	
5-3 結果	69
5-3-1 血糖値と体重の変化	

5-3-2	ストレプトゾトシンが心拍数、体温、活動量に及ぼす影響	
5-3-3	ストレプトゾトシンが自律神経系機能に及ぼす影響	
5-3-4	ラットの脾臓における病理組織学的検討	
5-4	考察	72
5-5	小括	76
	付表および付図	78
第6章 総括および結論		92
引用文献		97
謝辞		105

第 1 章

序論

1-1 糖尿病

糖尿病はインスリン作用の不足による慢性高血糖を主徴とし、種々の特徴的な代謝異常を伴う症候群と定義されている。その発症には遺伝因子と環境因子がともに関与している。代謝異常が長期にわたると、特有な細小血管合併症をきたしやすく、動脈硬化をも促進し、代謝異常の程度によって無症状からケトアシドーシスや昏睡に至る幅広い病態を示す。わが国における糖尿病の患者数は年々増加し、2012年の国民健康・栄養調査によると950万人が糖尿病を強く疑われ、糖尿病予備軍を含めると2050万人存在すると報告されており、この50年間で30倍以上の増加を示している。地球規模においても、2011年に3億6600万人であった糖尿病患者数は2030年には5億5200万人に増加する予測がされている (D. R. Whiting et al. 2011)。

糖尿病発症・進展におけるインスリン分泌の重要性が解明されてきており、1型糖尿病では、インスリンを分泌・合成する、ランゲルハンス島の膵β細胞の破壊・消失がインスリン作用不足の重要な原因であり、2型糖尿病は、インスリン分泌低下や、インスリン抵抗性をきたす素因を含む複数の遺伝因子に環境因子および加齢が加わって発症する。その他に、遺伝子異常、膵外分泌不全や他の疾患の影響によるものや、妊娠糖尿病も存在する。

1-2 血糖調節

グルコースは細胞膜上の糖輸送担体(glucose transporter: GLUT)を介して、細胞内外の糖濃度勾配に基づくエネルギー非依存性の促通拡散輸送により細胞

内に取り込まれる。生体の重要なエネルギー源であるグルコースの、消費量、消費時間などは個々の人で異なり、通常は 1 日の平均消費エネルギーを食事で分割摂取した後に、余剰となったエネルギーは直ちに貯蔵される。

中枢神経系、赤血球、腎髄質はエネルギーをグルコースに依存しており、主として GLUT1 を発現し、常に一定量のグルコースを消費する。腸管からのエネルギー吸収が終了した時間帯では、グルコースは肝臓に貯蔵されているグリコーゲンの分解と糖新生により補給され、約 50%が中枢神経系で、25%が肝臓や消化管および筋肉で消費される。

食後の血糖値は組織や細胞でのグルコースの取り込みにより規定されるが、食後に上昇したグルコースは膵β細胞を刺激してインスリンの分泌を促進する。肝臓は消化管から流入したグルコースと分泌されたインスリンが高濃度で合流する臓器であり、肝細胞は膜上に存在している GLUT2 を介して、グルコースを取り込み、グリコーゲンとして貯蔵する。筋肉、脂肪細胞などのインスリン標的細胞では、GLUT4 が細胞質に存在しており、インスリンが細胞膜上のインスリン受容体に結合すると、そのシグナルにより GLUT4 が細胞膜上に移動して、グルコースの取り込みを促進する。食後のインスリン血中濃度が上昇している時間帯には、とくに筋肉で GLUT4 を介してグルコースの取り込みが促進され、余剰のグルコースはグリコーゲンとして蓄積される。

1-3 糖尿病モデル動物

2 型糖尿病は、遺伝因子に高カロリー、高脂肪食、運動不足などの環境因子が加わり引き起こされるインスリン分泌低下やインスリン抵抗性が原因となり発

症する。膵 β 細胞の機能が低下し、インスリン分泌が低下する。一方、インスリン抵抗性は、骨格筋・肝臓などの臓器のインスリン感受性が低下することや肥満やレプチン作用の低下によるエネルギー消費機構の低下によって引き起こされる。糖尿病発症因子や増悪因子の例として肝臓疾患、膵臓疾患、内分泌疾患など、いくつかの臓器が関与しているが、おもな原因臓器並びに臓器相関を明らかにしていくことは重要である。さらに、糖尿病の発症増加は遺伝的素因に加え、高脂肪食・運動不足などの環境要因の負荷が重要な役割を果たしている。これらのことを明らかにするためには糖尿病モデル動物の使用は非常に重要である。糖尿病モデル動物の由来は様々であり、自然発症性モデル、トランスジェニックマウスおよび薬剤誘発性のモデルが存在する。例えば、自然発症性モデルとして、Wistar ラットを用いて経口ブドウ糖負荷試験(OGTT)を行い、耐糖能の低下している個体による選抜交配を重ねることによって確立された Goto-Kakizaki ラットが存在し(Akash MS et al. 2013)、トランスジェニックマウスとして、Cre-loxP システムを利用し作製されたトランスジェニックマウス(Sauer B et al. 1988, Rajewsky K et al. 1996)が存在する。また、薬剤誘発型の糖尿病モデル動物として、ストレプトゾトシン(STZ)やアロキサンを投与した糖尿病モデル動物が存在する。

1-4 膵 β 細胞とストレプトゾトシンの作用

膵臓にはランゲルハンス島と呼ばれる特殊な細胞の集まりがあり、その中でも膵 β 細胞はインスリンの産生・分泌という大きな役割を担っている。インスリンは血糖値を低下させる作用があり、体内でその作用を持つホルモンはイン

スリンのみである。血糖値が高くなると、より多くのグルコースが GLUT2 に認識され膵β細胞に取り込まれて代謝され、細胞内で ATP が産生されることにより ATP レベルが上昇し、膵β細胞の膜上に存在する ATP 感受性 K チャネルが閉鎖する。この事により、膵β細胞の膜は脱分極し、電位依存性 Ca チャネルが活性化することによって、細胞外から Ca イオンが流入し、インスリン顆粒の開口放出が起こる。この一連の反応がインスリン分泌の機序である(Fig. 1-1)。

STZ はグルコースの 2 位の炭素に結合したヒドロキシル基がメチルニトロソ尿素に置換された化合物で、元々抗生物質として *Streptomyces achromogenes* から単離された(Vavra JJ et al. 1959)。膵β細胞への毒性を持ち、膵β細胞を特異的に破壊し、1型糖尿病を引き起こす物質として知られている。STZはGLUT2を介して膵β細胞に取り込まれる。作用機序は諸説あり、アルキル化剤としての特徴を持つことから、DNA のグアニンを架橋し、DNA の二本鎖を一本鎖にほどく過程を阻害し、転写・複製が不可能となることで毒性を発揮する(Szkudelski T. 2001)という報告や、膵β細胞から抗原となるタンパク質が放出されることにより、免疫系が活性化されて、最終的にフリーラジカルなどの攻撃を受けるために膵β細胞が破壊される。その結果として、インスリンの分泌ができなくなるため糖尿病になる(El-Mahmoudy A et al. 2005)という報告がある。

多くの哺乳類は STZ に対して感受性があり、多種多様な動物を用いた糖尿病研究に STZ が用いられる。しかしながら、例えば、ウサギは STZ の投与に対し、膵β細胞の傷害が機能的にも形態学的にも小さく、高い抵抗性を持っている(B. Kushner et al. 1969)。げっ歯類においてさえ、マウスはラットと比較し、STZ の糖尿病誘発効果に対して感受性が低い。さらにヒトにおいても、いくつかの *in vitro* 及び *in vivo* 実験からヒトの膵島は STZ に対して相対的に抵抗性がある

可能性が指摘されている(H. Yang et al. 2002)。このように STZ に対する感受性は動物種によって程度が様々である。

1-5 酸化ストレスと糖尿病

活性酸素は糖尿病の発症に関与すると考えられている。その機序として活性酸素が細胞を破壊する際に、ミトコンドリアを変性させることでグルコースから ATP を産生できなくなることや、膵β細胞の機能が障害を受けることによりインスリンの分泌が低下することが考えられている。STZ が膵β細胞に取り込まれた後の細胞毒性の発現機序の一つに、活性酸素の生成が膵β細胞の特異的な破壊を誘発する(El-Mahmoudy A et al. 2005)ことが示されている。しかしながら、活性酸素の種類は様々であり、この点に関して、STZ によって生成が誘発される活性酸素には一酸化窒素があげられている(Szkudelski T. 2001)が、全貌については明らかにされていないところが多い。

また、STZ と同様に膵β細胞を特異的に破壊し、糖尿病を誘発する薬剤としてアロキサンが存在する。アロキサンはスーパーオキシドアニオンの産生を誘発し、過酸化水素を産生させ、ヒドロキシラジカルの産生を誘発することで、膵β細胞を破壊する(Bromme HJ et al. 2002) (Fig. 1-2A)。この経路において、スーパーオキシドを過酸化水素に変換する酵素としてスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)が存在する。さらに、過酸化水素は本来、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼによって水と酸素に変換されるが、そこに重金属が存在すると、「過酸化水素+重金属→ヒドロキシラジカル」という反応がおこる。これについて、過酸化水素と鉄(II)イオンからフェントン反応によりヒドロキシラ

ジカルが生成されると言われている。ここで示される鉄(II)イオンはヘキサアクア鉄(II)を意味する。しかしながら、ヘキサアクア鉄(II)イオンは生体内では全く存在しない(Harrison PM and Aroiso P. 1996)ことが明らかになっている。さらに近年になって、フェントン反応ではヒドロキシラジカルは発生していないという実験結果が報告された(Enami et al. 2014)。また、亜鉛やカドミウムによって生成が誘導される、金属結合性タンパク質のメタロチオネインは重金属の無毒化を担いヒドロキシラジカルの産生を抑制する(J. Duprez et al. 2012) (Fig. 1-2B)。特に亜鉛はインスリン分泌に関与するため膵β細胞には豊富に存在し、糖代謝に重要な役割を果たす骨格筋や肝にも多く含まれている。膵β細胞の酸化損傷からの保護にメタロチオネインが関与していることも明らかにされている(Park L et al. 2011)。

メタロチオネインには1～4までのサブタイプがあり、1及び2型は肝臓、腎臓、膵臓、心臓などほとんどの組織に分布している。3型は特に脳に局在するが、小腸、膵臓、舌、腎臓などでも検出される。4型は扁平上皮細胞にみられるが詳細は不明である。細胞内ではメタロチオネインはその大半は通常細胞質に存在し、近年、メタロチオネインが欠損すると肝再生がおこらない事が示された(Oliver JR et al. 2005)。さらに、メタロチオネインがミトコンドリアの内膜と外膜の間に局在し、ミトコンドリア酸素呼吸を調節することが報告された(Ye B et al. 2001)。酸素呼吸の場であるミトコンドリアは、細胞内で生成される活性酸素の大半を恒常的に産生している事から強力な活性酸素消去能を持つメタロチオネインの役割が注目される。

1-6 糖尿病の合併症としての神経障害と虚血性心疾患

糖尿病患者において合併症発症の予防は非常に重要なことである。合併症は、急性合併症と慢性合併症に分けられるが、一般的に合併症という場合には慢性合併症のことを指し、細血管障害、大血管障害、その他の障害に分類されている。細血管障害には糖尿病三大合併症と呼ばれる糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害が含まれる。大血管障害は糖尿病に特異的ではないが、糖尿病自体が危険因子であり、他の危険因子と関わり合って糖尿病の罹病経過とは無関係に発症が認められる。その中でも心臓と脳に関わる合併症は直接的に命に関わることから、近年、注目度が増加してきている。

糖尿病神経障害は糖尿病患者に最も多い合併症の一つである。感覚神経、運動神経、自律神経のいずれかの障害を受けるが、自律神経障害はしばしば日常生活を大きく損なわせる他、突然死の危険性も増大する。そして、糖尿病患者において、虚血性心疾患の発症率が高いことは多くの大規模研究で示されており、発症した場合の予後も悪いことが明らかになってきている。

1-7 本論文の目的

糖尿病の発症要因には遺伝的素因が関与しており、糖尿病の原因遺伝子として *KCNQ1* 遺伝子が同定された(Yasuda et al. 2008, Unoki et al. 2008)ものの、リスクアレルと糖尿病の病態に関してはその詳細についてほとんど明らかにされていなかった。これまでに当研究室では **QT** 延長症候群の研究材料として、京都大学で発見された自然発症性の *KCNQ1* 変異ラットである **WTC-deafness**

KYOTO ラット(Gohma H et al. 2006)を使用して研究を進めてきた。そこで、私はこのモデルラットを使用して糖尿病発症における KCNQ1 の役割を解明するための予備実験としてこのラットのコントロール系である WTC ラットへの STZ 投与を行ったところ血糖値が上昇しない現象を発見した。

また、ヒトの膵島は STZ に対して感受性が低く、WTC ラットの膵島の機能を元にヒトの膵島の機能の理解を深めることができる可能性があり、今後の糖尿病研究の発展において、STZ に対して抵抗性をもつラットの膵島の機能を解析することは重要である。

そこで、本研究では、WTC ラットにおける STZ に対する反応を詳細に検討し、WTC ラットが STZ 抵抗性を示す機序及び WTC ラットの特徴を明らかにすることを目的とした。そのために、対照動物として、これまでに糖尿病研究において広く使用されている Wistar ラットを用い、STZ に対する感受性及びグルコースや STZ の取り込みに重要な役割を果たす遺伝子についての発現解析、STZ がフリーラジカルを産生させることにより膵β細胞を破壊するという機序に基づいたフリーラジカルの代謝についての解析、循環系及び自律神経系機能の観点から *in vivo* における実験を行った。

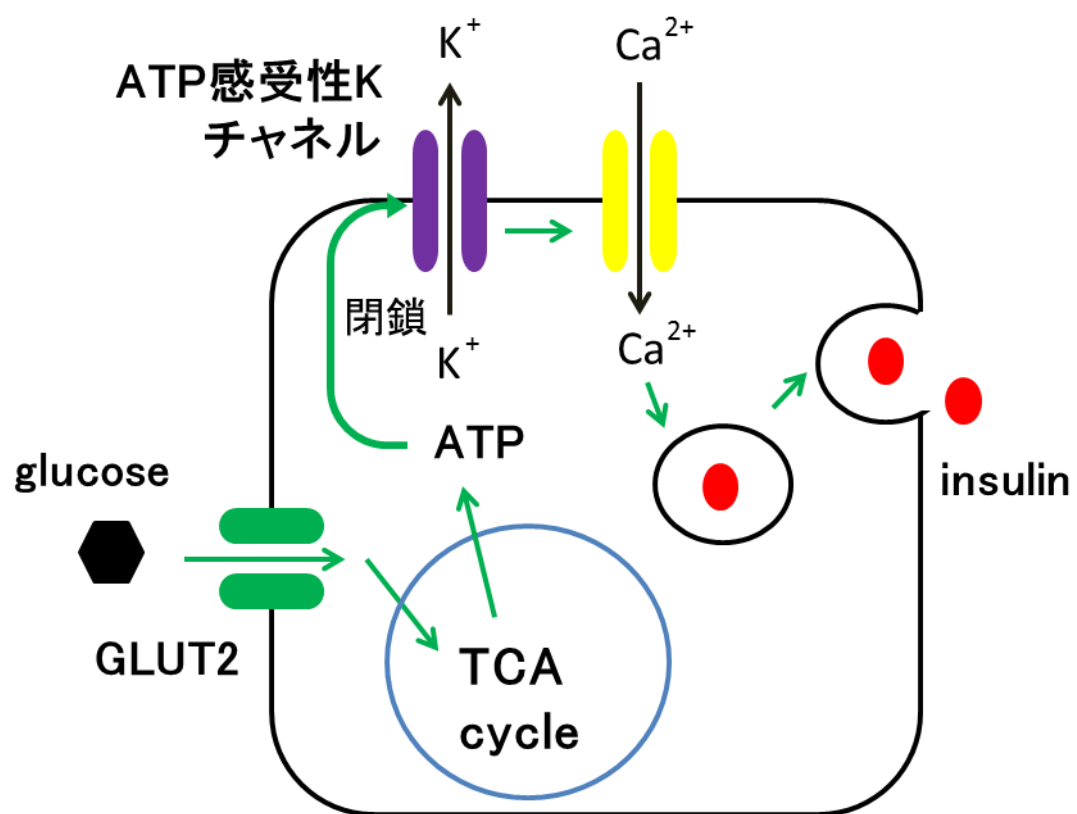
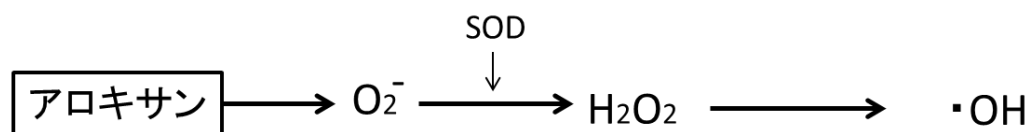


Fig. 1-1. 膵β細胞におけるグルコースの取り込みからインスリン分泌に至る過程

A



B

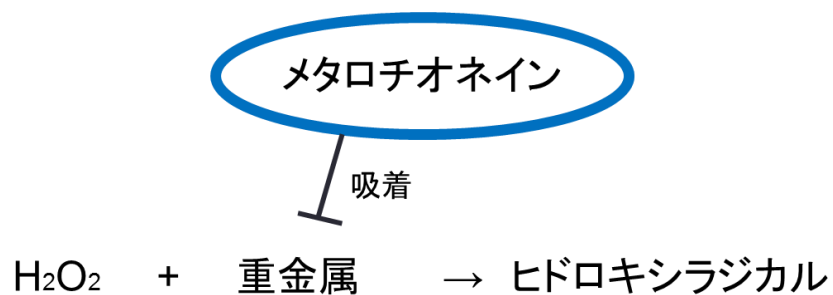


Fig. 1-2 (A)アロキサンにより生成される活性酸素の反応。(B)過酸化水素からヒドロキシラジカルが生成される反応とメタロチオネインの作用。

第 2 章

WTC ラットの ストレプトゾトシンに対する 感受性と糖代謝

2-1 緒言

前章で述べたように、予備実験において STZ を腹腔内に投与することにより血糖値が上昇しない現象を WTC ラットで発見した。STZ は GLUT2 を介して膵 β 細胞に取り込まれるが、STZ の細胞毒性は膵 β 細胞に発現している GLUT2 の量に強く依存していることが報告されている(Hosokawa et al. 2001, Yang H and Wright JR. 2002)。また、グルコースの刺激によって誘発されるインスリン分泌には、ATP 感受性 K チャネルに依存する経路と依存しない経路が知られている(Miki T et al. 1998)。ATP 感受性 K チャネルをコードする Kir6.2 を欠損させると GLUT2 の活性が小さくなることにより STZ 抵抗性を示すという報告もある(Xu J et al. 2008)。さらに食刺激により小腸の L 細胞から分泌される GLP-1 は、膵 β 細胞の GLP-1 受容体に作用しインスリン分泌を促進する(J.E. Campbell & D.J. Drucker. 2013)のみならず、膵 β 細胞の保護にも関与している(Duttaroy A et al. 2011)。さらに、肝臓および骨格筋の GLP-1 受容体にも作用し、グルコースの取り込みを促進させるという働きを持っている(Drucker DJ. 2007)。

そこで本章では、WTC ラットにおける STZ に対する抵抗性の機序の一端を明らかにするため、インスリン分泌機構と糖代謝に関して検討することを目的とした。

2-2 材料及び方法

2-2-1 動物

本実験では京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設から購入した WTC ラットを自家繁殖することにより、8-12 週齢の WTC ラット(体重約 200-300g)を用いた。対照として 8-12 週齢 Wistar ラット(体重約 250-320g)を日本 SLC より購入して用いた。本実験は東京大学動物実験委員会の承認を得て行った(承認番号: P13-805)。

2-2-2 ストレプトゾトシンに対する感受性

STZ (Wako, Osaka, Japan)に対する感受性の差異を検討するために、生理食塩水に STZ を溶解し、50mg/kg、75mg/kg、100mg/kg の用量で腹腔内投与を行った。STZ 投与直前および投与後 4 日目に血糖値および体重を測定した。

血糖値は尾静脈より約 1 μ l の全血を採取し、ワンタッチウルトラ(LifeScan, Inc., Milpitas, CA, USA)を用いることにより測定を行った(A. Velangi et al. 2005)。

2-2-3 インスリン分泌量の測定

STZ (50mg/kg)を投与 4 日後のラットにおいて、絶食時および飽食時のインスリン分泌量を測定した。グルコース(2g/kg)強制経口投与 60 分後を飽食時のインスリン分泌量として測定した。対照群として、ストレプトゾトシン非投与群を用いた。試料は血液 1ml あたり 0.04ml EDTA (100mg/dl)を加え遠心し、採取された血漿を測定試料とし、レビスインスリン(U-E タイプ)キット (Shibayagi Co., Gunma, Japan)を用いることにより測定を行った。

2-2-4 膵臓、骨格筋、肝臓の摘出

STZ (50mg/kg)を腹腔内投与 4 日後のラットを、ウレタン(1g/kg)深麻酔状態で開腹し、素早く膵臓、肝臓、骨格筋としてヒラメ筋を摘出した後、液体窒素で急速凍結した。対照群として、STZ を投与しないラットを同様に処置した。

2-2-5 GLUT2 および Kir6.2 の発現量の評価

各標本から ISOGEN(NIPPON GENE, Tokyo, Japan)を用いて RNA を抽出し作製した RNA サンプルに DNase I (Promega, Madison)処理を施した。吸光度計を用いて RNA サンプルの濃度測定を行い、サンプル間濃度を調整した。逆転写反応は ALV Reverse Transcriptase(TAKARA BIO INC., Siga, Japan)を用い、PCR 反応は、TaKaRa Ex Taq HS (TAKARA BIO INC.) 1units/42 μ l について、94°C 60sec. でインキュベートした後、

- 1) 94°C 30sec.

2) 61°C 30sec.

3) 72°C 60sec.

を 40 サイクルでインキュベートすることにより行った。また、ハウスキーピング遺伝子として GAPDH を用い、遺伝子増幅に用いたプライマーは Sigma 社から購入した。プライマーの塩基配列を Table 2 に示した。PCR 産物は 2%アガロースゲル上で電気泳動し、ゲルをエチジウムブロマイド 0.5 μ l/ml で 15 分間染色した後に、ゲルに紫外線を照射して撮影を行った。

2-2-6 血中 GLP-1 濃度

STZ (50mg/kg)を投与して 4 日後のラットにおいて、絶食時および飽食時の血中 GLP-1 濃度を、ELISA 法によって GLP-1, Active form Assay Kit (Immuno-Biological Laboratories Co, Ltd., Gunma, Japan)を用いることにより測定した。

2-2-7 脾臓、骨格筋、肝臓における GLP-1R および GLUT の発現量

各標本から ISOGEN(NIPPON GENE)を用いて RNA を抽出し作製した RNA サンプルに DNase I (Promega, Madison)処理を施した。吸光光度計を用いて RNA サンプルの濃度測定を行い、サンプル間濃度を調整した。逆転写反応は ALV Reverse Transcriptase (TAKARA BIO INC.)を用い、PCR 反応は、TaKaRa Ex Taq HS (TAKARA BIO INC.) 1units/ 42 μ l について、94°C 60sec. でイン

キュベートした後、

- 1) 94°C 30sec.
- 2) 61°C 30sec.
- 3) 72°C 60sec.

を 40 サイクルでインキュベートすることにより行った。また、ハウスキーピング遺伝子として GAPDH を用い、遺伝子増幅に用いたプライマーは Sigma 社から購入した。プライマーの塩基配列を Table 2 に示した。PCR 産物は 2%アガロースゲル上で電気泳動し、ゲルをエチジウムブロマイド 0.5 μ l/ml で 15 分間染色した後に、ゲルに紫外線を照射して撮影を行った。

2-2-8 統計解析

結果は平均値±標準誤差で表し、統計処理は Student's *t*-test により危険率 5% 以下のものを有意とした。

2-3 結果

2-3-1 ストレプトゾトシンに対する感受性の評価

STZ の投与により、Wistar ラットでは 50mg/kg 投与から血糖値が投与前と比べて有意に増加したが、WTC ラットでは有意な変化は認められなかった(Fig. 2-1)。また、用量依存性はいずれの系統においても認められなかった。体重に関しても、Wistar ラットにおいて STZ の投与により減少が見られたが、WTC ラットでは、体重に変化は見られなかった(Fig. 2-2)。

2-3-2 インスリン分泌量の評価

対照群においては、Wistar ラット及び WTC ラットのどちらにおいても、グルコース投与によりインスリン分泌量は有意に増加した(Fig. 2-3)。STZ 投与群においては、Wistar ラットにおいて、グルコース投与によるインスリン分泌刺激が消失していた。WTC ラットにおいてはグルコース投与によるインスリン分泌能は保持されるのみならずむしろ増大していることが認められた。

2-3-3 ストレプトゾトシンの取り込みに関与する遺伝子の発現量の評価

GLUT2 (Fig. 2-4A)及び Kir6.2 (Fig. 2-4B)の発現量は Wistar ラットと WTC

ラットとで有意な差は認められなかった。

2-3-4 血中 GLP-1 濃度に関する検討

WTC ラットは Wistar ラットと比較し、GLP-1 濃度が低い傾向が認められた (Fig. 2-5)。また、GLP-1 は飽食時には絶食時と比較して、多く分泌される傾向が認められたが、STZ の投与によって GLP-1 の分泌量が受ける影響においては、絶食時及び飽食時ともに有意な違いはなかった。

2-3-5 膵臓、骨格筋、肝臓における GLP-1 受容体(GLP-1R)遺伝子および骨格筋における GLUT4 遺伝子および肝臓における GLUT2 遺伝子の発現に関する検討

膵臓における GLP-1R の発現に関して、Wistar ラットおよび WTC ラットにおける系統間での発現量の差および STZ の投与による発現への影響は認められなかった (Fig. 2-6)。

骨格筋における GLUT4 の発現量は、Wistar ラットおよび WTC ラットにおいて系統間および STZ の投与による発現への影響は認められなかった (Fig. 2-7A)。GLP-1R の発現量は系統間での発現量の有意な差は認めなかったが、STZ の投与により Wistar ラットにおいては有意に発現が減少した (Fig. 2-7B)。

肝臓においては、GLUT2 の発現量も GLP-1R の発現量も、Wistar ラットおよび WTC ラットにおける系統間での有意な差も STZ の投与による発現量への

影響は認められなかった(Fig. 2-8)。

2-4 考察

WTC ラットにおいて STZ の腹腔内投与により、血糖値の上昇が認められないことが明らかとなった。Wistar ラットにおいては過去の報告とほぼ同様に 50mg/kg の投与で有意に血糖値が上昇していた(Hicks KK et al. 1998, Shradha Bisht et al. 2011)。さらに、グルコース刺激によるインスリン分泌量の増大は、STZ 投与後の Wistar ラットにおいては喪失していたが、WTC ラットにおいては維持されており、膵β細胞の機能が保全されていることが明らかとなった。

WTC ラットは、1988 年京都大学大学院医学部附属動物実験施設において、Wistar KYOTO ラットの近交化途上に分離された TRM 系統のコアイソジェニック系統として確立されたラットであり、WTC ラットにおいて STZ を投与した報告はこれまでに存在せず、本実験において WTC ラットにおいて STZ 抵抗性を持つことが示唆される結果が得られたことは新たな発見であり、さらにその機序に関して検討する必要があると考えられた。

次に、この STZ 抵抗性について、Glucose transporter の発現が低下していると STZ 抵抗性が認められる(Hosokawa et al. 2001, Yang H and Wright JR. 2002)、あるいは、ATP 感受性 K チャネルを司る Kir6.2 の発現不足により GLUT2 の活性が低下し STZ 抵抗性が現れる(Xu J et al. 2008)という報告があることから、膵臓における GLUT2 および Kir6.2 の発現量に関する検討を行った。しかしながら、WTC ラットにおいても、Wistar ラットと比較してもそれらの発現に有意な差は認められなかった。これらの結果から、STZ の取り込みについては WTC ラットにおいても行われることが明らかとなり、WTC ラットにおいて STZ 抵抗性を示す機序に、膵β細胞自体が STZ 抵抗性を有している可能性が推察された。また、GLUT2 について肝臓における発現量を検討した結果、

Wistar ラットおよび WTC ラットにおける系統間における差が認められなかったことから、一つの可能性として考えられる肝臓におけるグルコースの取り込み及び STZ の排除機構についても、Wistar ラットと WTC ラットとの間に顕著な差はないことが明らかとなった。しかしながら、GLUT2 は膵 β 細胞および肝臓以外にも小腸および腎臓の細胞で発現している(Thorens B et al. 1998)。このことから、これらの臓器における排除機構が関与している可能性も否定はできない。また、本実験では膵臓全体を試料として用いており、膵 β 細胞の単離を行った後に GLUT2 や Kir6.2 のタンパク発現量を検討することが必要かもしれない。

さらに、STZ 投与後における WTC ラットおよび Wistar ラットにおける血糖値の差に、糖代謝が行われる代表的な組織である、骨格筋および肝臓における糖の取り込みが関与しているかについて検討した。その結果、どちらの組織においても、糖の取り込みの役割を担う Glucose transporter の発現に系統間による顕著な差がなく、STZ の投与後においても有意な変化は認められなかった。しかしながら、特に骨格筋においては GLUT4 の発現に加えて、細胞膜表面へのトランスロケーションが糖の取り込みには重要である。WTC ラットにおいてはインスリン分泌能が維持されていることから、GLUT4 の膜移動に必要なインスリン刺激が存在すること、さらに、STZ の投与後において、Wistar ラットにおいて、インスリン感受性の増大に関わる GLP-1 の受容体遺伝子の発現が減少していたことから、WTC ラットと Wistar ラットとでは、より一層糖代謝能に差が存在する可能性が考えられる。

以上の事から、WTC ラットにおける STZ に対する抵抗性は、膵 β 細胞内での STZ の代謝における差が要因となっている可能性が考えられた。

2-5 小括

本章ではWTCラットのSTZに対する感受性を用量反応性も含めて検討した。その結果、いずれの用量においてもWTCラットではSTZによる糖尿病の誘発が妨げられた。また、インスリンの分泌能も維持されていた。この理由として、膵β細胞におけるATP感受性Kチャネルの欠損やGLUT2の発現低下がSTZの膵β細胞への取り込みを抑制することでSTZ抵抗性をもたらすことが考えられたため、GLUT2およびATP感受性KチャネルをコードするKir6.2の遺伝子発現の検討を行った。その結果、どちらの遺伝子の発現量もWTCラットとWistarラットとで有意な差は認められなかったことから、WTCラットにおけるSTZの取り込みはWistarラットと同様に行われていることが考えられた。次に、膵臓以外での糖代謝や膵β細胞の保護およびインスリン受容体の感受性増大に関与するGLP-1に着目し、GLP-1濃度およびGLP-1Rの発現について検討した。その結果、STZの投与によりWistarラットの骨格筋においてGLP-1Rの発現が減少しており、WTCラットとWistarラットとで、より一層糖代謝能に差が現れることが推察された。これらのことから、WTCラットにおけるSTZ抵抗性に関して、膵β細胞の内部におけるSTZの細胞毒性発現に対する機能が要因となっている可能性があると考えられた。

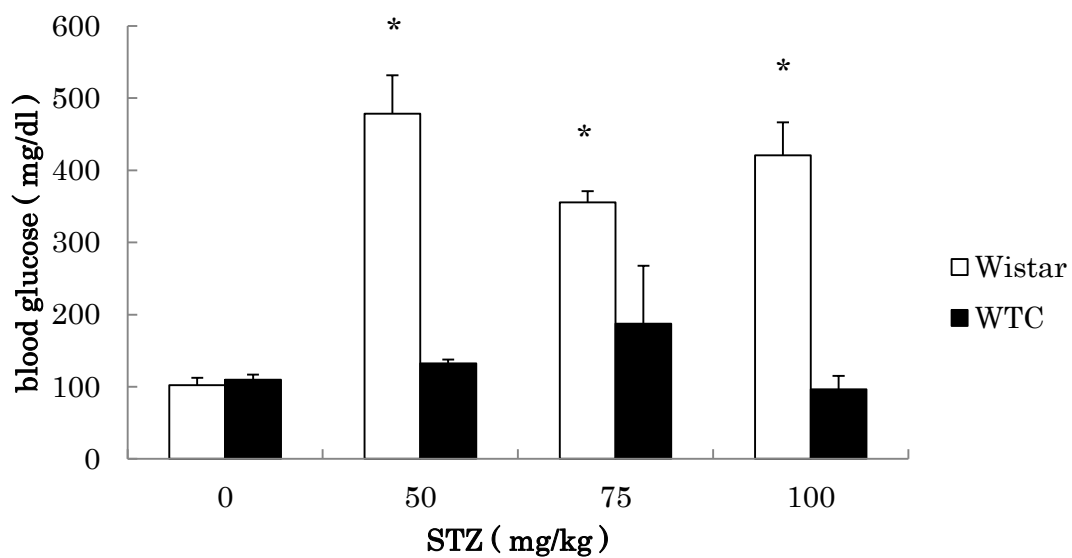


Fig. 2-1. ストレプトゾトシン(STZ)を 0mg/kg (Wistar; n = 6, WTC; n = 6)、50mg/kg (Wistar; n = 4, WTC; n = 4)、75mg/kg (Wistar; n = 3, WTC; n = 4)、100mg/kg (Wistar; n = 3, WTC; n = 3)の用量で投与して 4 日目の Wistar ラットおよび WTC ラットの血糖値。* : $p < 0.05$ vs. 0mg/kg

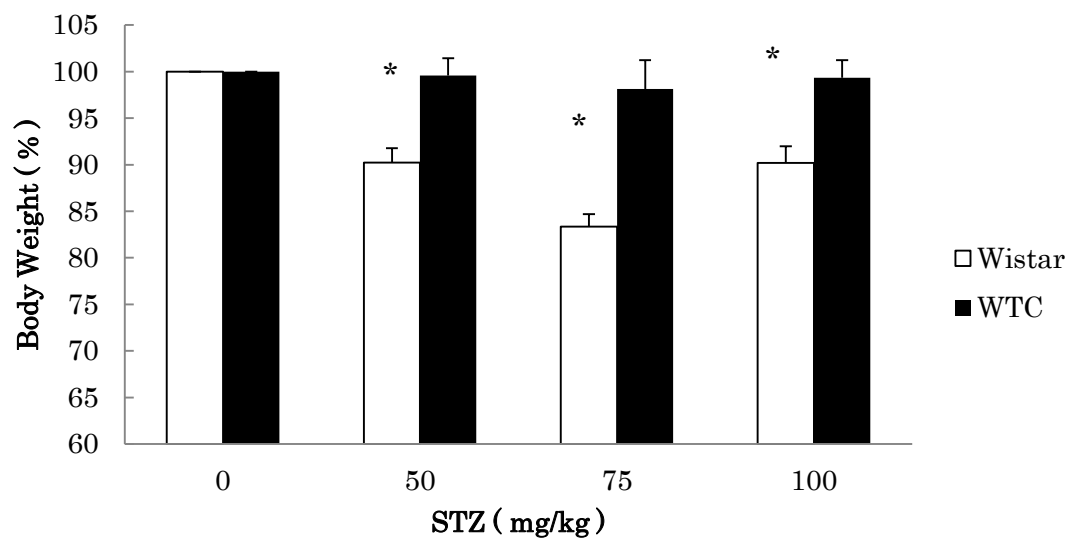


Fig. 2-2. ストレプトゾトシン(STZ)を 0mg/kg (Wistar; n = 6, WTC; n = 6)、50mg/kg (Wistar; n = 6, WTC; n = 6)、75mg/kg (Wistar; n = 3, WTC; n = 4)、100mg/kg (Wistar; n = 3, WTC; n = 3)の用量で投与して 4 日目の Wistar ラットおよび WTC ラットの体重。* : $p < 0.05$ vs. 0mg/kg

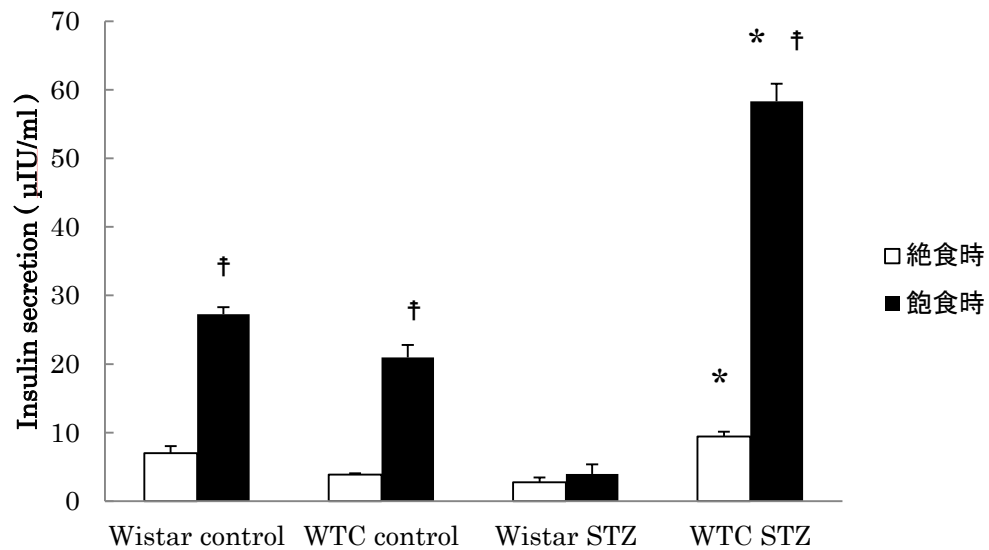


Fig. 2-3. ストレプトゾトシン(STZ) (50mg/kg)の投与前と投与後における絶食時(Wistar; n = 3, WTC; n = 3)および飽食時(グルコース 2g/kg 強制経口投与後 60 分) (Wistar; n = 3, WTC; n = 3)のインスリン分泌量。

* : $p < 0.05$ vs. Wistar. † : $p < 0.05$ vs. 絶食時。

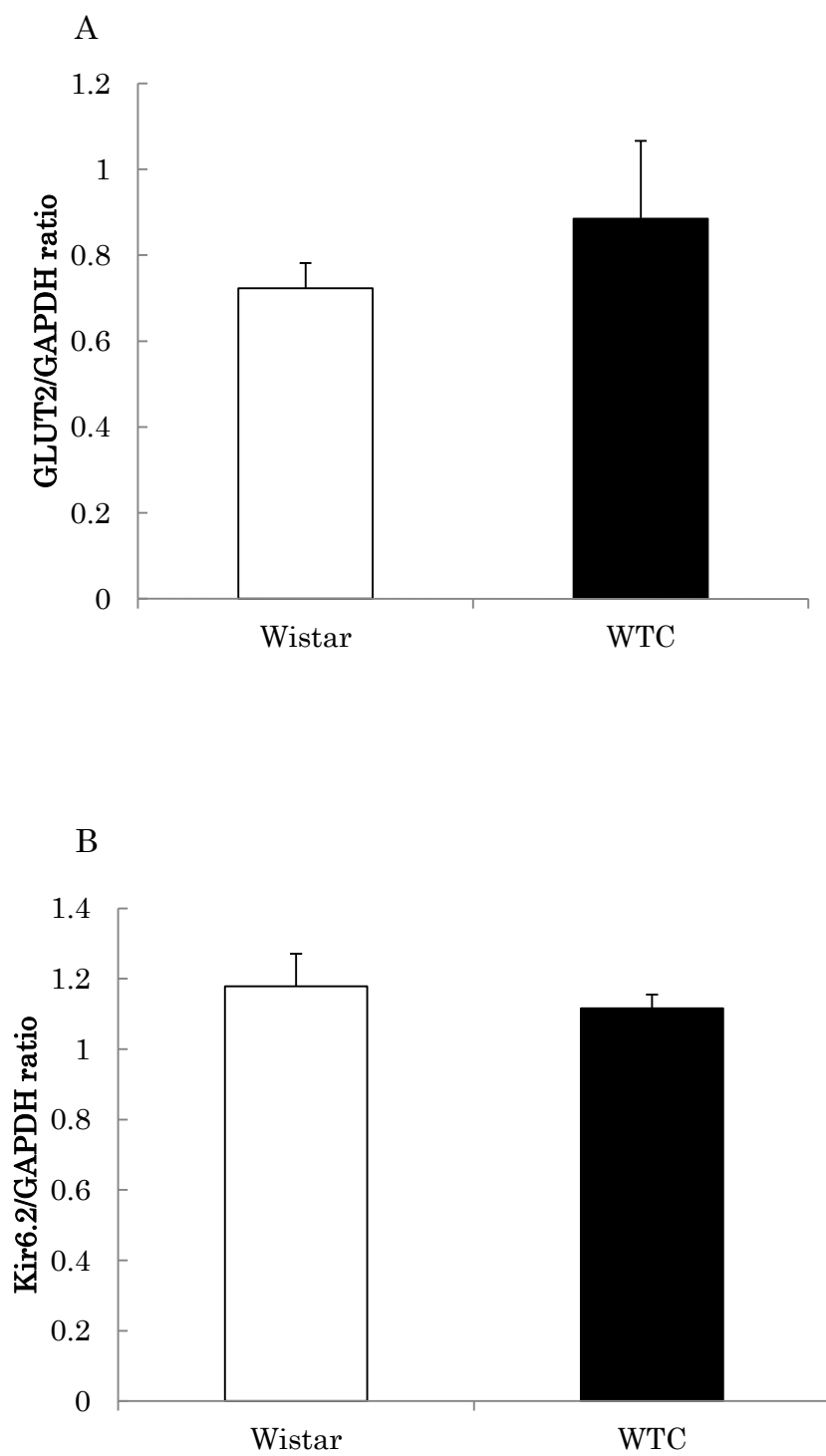


Fig. 2-4. ストレプトゾトシン(STZ)の投与前における Wistar ラット(n = 6)および WTC ラット(n = 6)における、(A)GLUT2 および(B)Kir6.2 の mRNA 発現量。

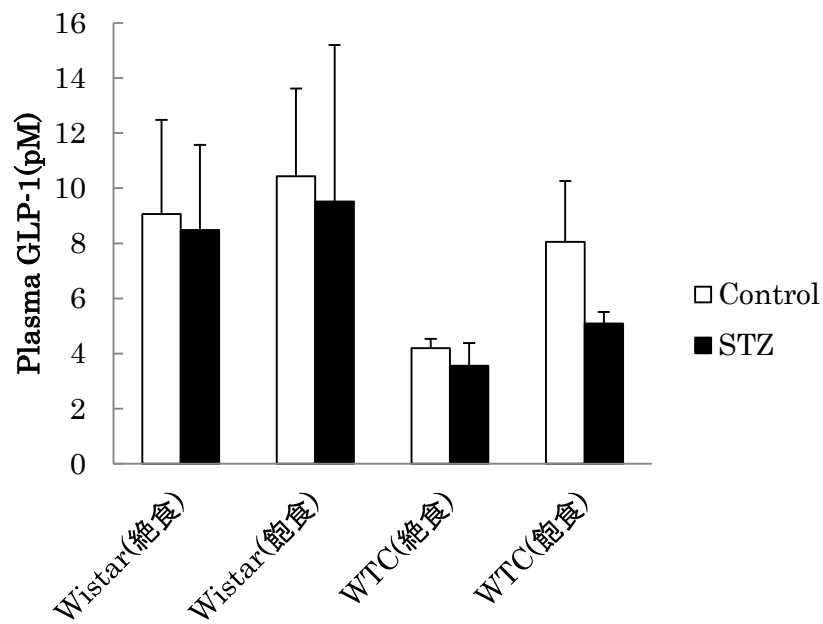


Fig. 2-5. ストレプトゾトシン(STZ)投与前後の Wistar ラット(n = 3)および WTC ラット(n = 3)における絶食時および飽食時(グルコース 2g/kg 強制経口投与後 60 分)の血中 GLP-1 濃度の測定。

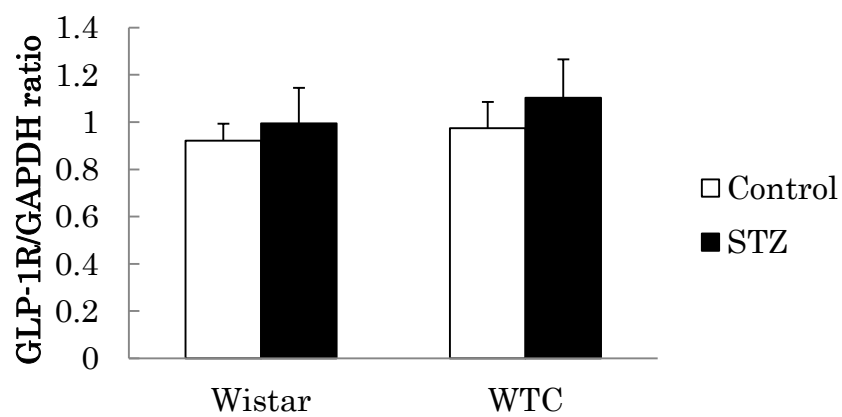


Fig. 2-6. ストレプトゾトシン(STZ) (50mg/kg)投与前後の Wistar ラット(n = 4) および WTC ラット(n = 4)の膵臓における GLP-1R の mRNA 発現量。

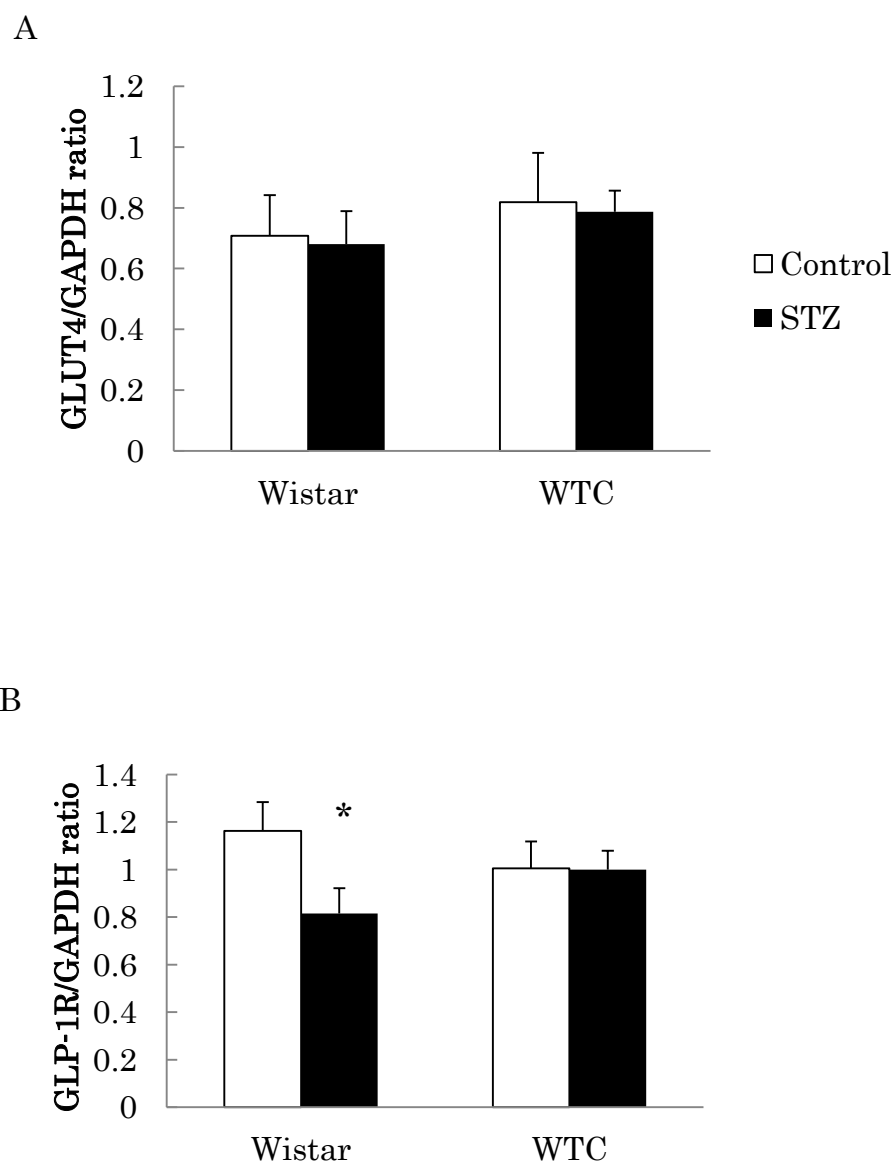


Fig. 2-7. ストレプトゾトシン(STZ) (50mg/kg)投与前後の Wistar ラット(n = 4) および WTC ラット(n = 4)の骨格筋における(A)GLUT4 および(B)GLP-1R の mRNA 発現量。* : $p < 0.05$ vs. Wistar.

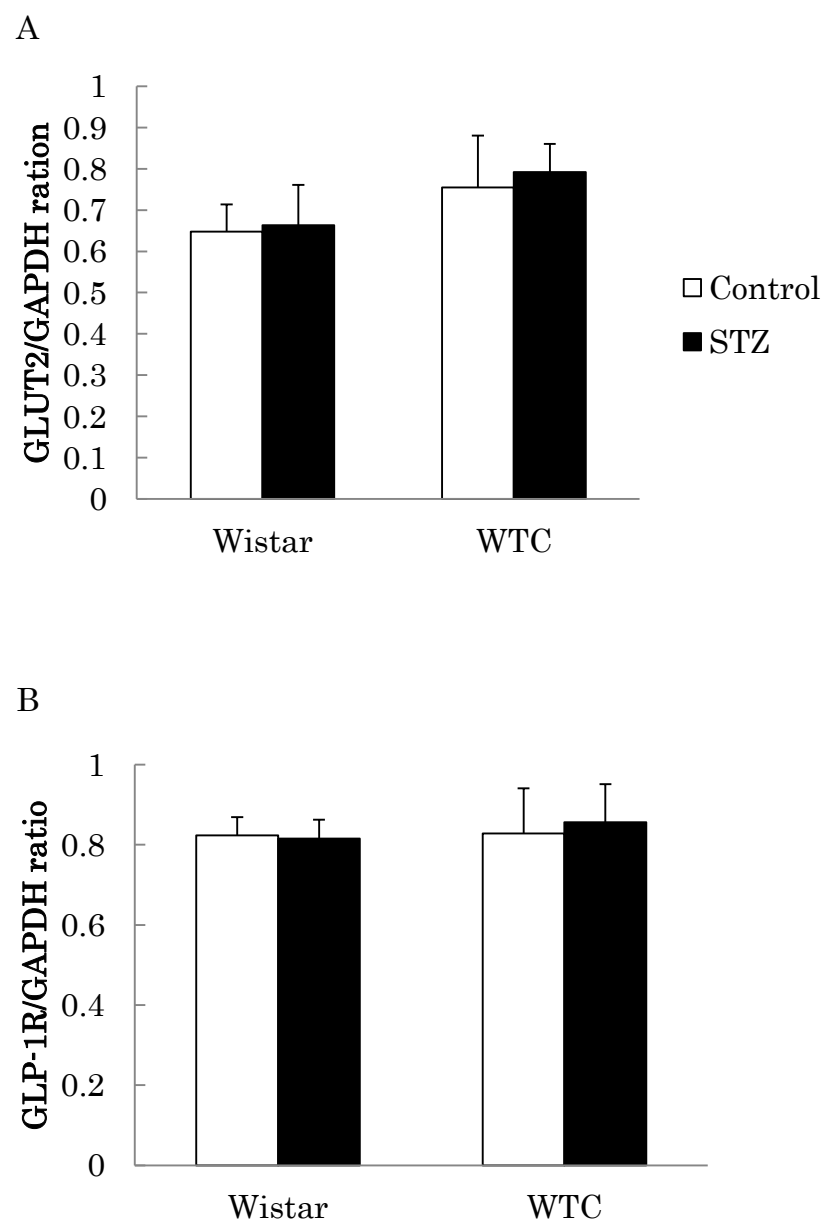


Fig. 2-8. ストレプトゾトシン(STZ) (50mg/kg)投与前後の Wistar ラット(n = 4) および WTC ラット(n = 4)の肝臓における(A)GLUT4 および(B)GLP-1R の mRNA 発現量。

gene	Sense	Antisense
GLUT2	CAATTTTCATCATCGCCCTCT	TGCAGCAATTTTCGTCAAAAG
Kir6.2	CGCATGGTGACAGAGGAATG	GTGGAGAGGCACAACCTTCGC
GLP-1R	AGTAGTGTGCTCCAAGGGCAT	AAGAAAGTGCGTACCCCACCG
GLUT4	GCACAGCCAGGACATTGTTG	CCCCCTCAGCAGCGAGTGA
GAPDH	CTCATGACCACAGTCCATGC	TTCAGCTCTGGGATGACCTT

Table 2. RT-PCR 法に使用したプライマーの塩基配列。

第 3 章

WTC ラットの ストレプトゾトシン抵抗性に 関与する抗酸化機構

3-1 緒言

前章において、WTC ラットにおける STZ 抵抗性の発現機序が STZ の取り込み後の機構に起因するという可能性が考えられたため、膵β細胞に STZ が取り込まれた後の細胞毒性の発現について着目した。STZ が細胞毒性を発現する機序として生成された活性酸素を介するという説がある。STZ によって誘導される活性酸素種の詳細は不明であるが、STZ と同様に膵β細胞を特異的に破壊し、糖尿病を誘発する薬剤であるアロキサンはスーパーオキシドアニオンの産生を誘発し、過酸化水素を産生させ、ヒドロキシラジカルの産生を誘発することにより、膵β細胞を破壊する(Bromme HJ et al. 2002)ことが知られている。そこで、STZ の細胞傷害性にこの経路の関与の有無を明らかにするために、アロキサンに対する影響についての検討を加えた。

スーパーオキシドを過酸化水素に変換する酵素として SOD が存在する。そこで、膵臓において代表的な抗酸化酵素として知られる SOD の産生量を測定した。また、過酸化水素は本来、カタラーゼとグルタチオンペルオキシダーゼによって水と酸素に変換されるが、そこに重金属が存在すると、「過酸化水素+重金属→ヒドロキシラジカル」という反応がおこる。この反応において、メタロチオネインは重金属の無毒化を担いヒドロキシラジカルの産生を抑制する。特に亜鉛はインスリン分泌に関与すること、糖代謝に重要な役割を果たす骨格筋や肝に多く含まれていることから、この経路に関わる最も重要な抗酸化物質であるため、膵臓、肝臓および骨格筋におけるメタロチオネインの発現量を STZ による影響も含めて検討した。

3-2 材料及び方法

3-2-1 動物

本実験では京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設から購入した WTC ラットを自家繁殖することにより、8-12 週齢の WTC ラット(体重 200-300g)を用いた。対照として 8-12 週齢 Wistar ラット(体重 250-320g)を日本 SLC より購入して用いた。本実験は東京大学動物実験委員会の承認を得て行った(承認番号: P13-805)。

3-2-2 アロキサンの投与

アロキサンに対する感受性の差異を検討するために、生理食塩水にアロキサンを溶解し、150mg/kg の用量で腹腔内投与を行った(Ryle RR et al. 1984)。アロキサン投与直前および投与後 4 日目に血糖値および体重を測定した。

血糖値は尾静脈より約 1 μ l の全血を採取し、ワンタッチウルトラ(LifeScan, Inc.)を用いることにより測定を行った。

3-2-3 SOD の発現量

脾臓における SOD の産生量を測定した。試料の前処理は以下のように行った。

- 1) 生理食塩水でよく洗い、脱血した。
- 2) 水分をよくふき取り、湿重量を計測した。
- 3) 湿重量 200 mg に対し、1.5 ml のショ糖緩衝液(0.25 mol/l ショ糖、10mmol/l トリス塩酸緩衝液 pH 7.4、1 mmol/l EDTA)を加え、脾臓組織をホモジナイザーによってホモジナイズした。
- 4) 10,000×g、60 分間遠心し、上清を測定試料として用いた。

SOD 産生量の測定は SOD Assay Kit-WST (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Kumamoto, Japan) を用いることにより行った。

3-2-4 組織学的検討

動物をウレタン(1g/kg)深麻酔状態で開腹し、腹大動脈より放血し案楽死処置を行い、脾臓を摘出した。脾臓組織を中性緩衝ホルマリン液で 12~24 時間浸漬固定した。その後、エタノール脱水し、キシレン置換後、パラフィンに包埋、4μm 連続切片を作製した。脱パラフィン後、10%の過酸化水素水を含むメタノールで内因性ペルオキシダーゼを除去し、ブロッキングした後、抗イヌ SOD-1 ウサギモノクローナル抗体(StressGen, Ann Arbor, MI)を一次抗体として組織切片と 4℃にて一晩反応させた。その後洗浄し、ウサギ Envision(Dako, Tokyo, Japan)を用い二次抗体と 37℃にて 40 分間反応させた後、3,3'-ジアミノベンジン(DAB)溶液を用いて発色させ、可視化させた。

3-2-5 ストレプトゾトシンの投与と膵臓、骨格筋、肝臓の摘出

STZ (50mg/kg)を腹腔内に投与し4日後にウレタン(1g/kg)深麻酔状態で開腹し、素早く膵臓、肝臓を、骨格筋としてヒラメ筋を摘出した後、液体窒素で急速凍結した。対照群として STZ を投与しないラットに同様の処置をした。

3-2-6 膵臓、骨格筋、肝臓におけるメタロチオネイン発現量の評価

各標本から ISOGEN(NIPPON GENE)を用いて RNA を抽出し作製した RNA サンプルに DNase I (Promega)処理を施した。吸光光度計を用いて RNA サンプルの濃度測定を行い、サンプル間濃度を調整した。逆転写反応は ALV Reverse Transcriptase(TAKARA BIO INC.)を用い、PCR 反応は、TaKaRa Ex Taq HS (TAKARA BIO INC.) 1units/42 μ l について、94 °C 60 sec. でインキュベートした後、

- 1) 94 °C 30 sec.
- 2) 61 °C 30 sec.
- 3) 72 °C 60 sec.

を 40 サイクルでインキュベートすることにより行った。また、ハウスキーピング遺伝子として GAPDH を用い、遺伝子増幅に用いたプライマーは Sigma 社から購入した。プライマーの塩基配列を Table 3 に示した。PCR 産物は 2%アガロースゲル上で電気泳動し、ゲルをエチジウムブロマイド 0.5 μ l/ml で 15 分間染色した後に、ゲルに紫外線を照射して撮影を行った。

3-2-7 統計解析

結果は平均値±標準誤差で表し、統計処理は Student's *t*-test により危険率 5% 以下のものを有意とした。

3-3 結果

3-3-1 アロキサン投与による血糖値および体重への影響

アロキサンを投与した群において、Wistar ラットでは血糖値が投与前と比べて有意に上昇したが、WTC ラットでは有意な変化は見られなかった(Fig. 3-1A)。また、体重においては、Wistar ラットおよび WTC ラット、どちらの群においてもアロキサン投与により有意に減少したが、その減少割合は Wistar ラットでは 20%、WTC ラットでは 4%となり、顕著な差が認められた(Fig. 3-1B)

3-3-2 脾臓における SOD 産生量

Wistar ラットの方が脾臓における SOD 産生量は、WTC ラットと比較して、有意に多かった(Fig. 3-2)。

3-3-3 脾臓における SOD の発現部位に関する検討

Wistar ラットおよび WTC ラットの脾臓において SOD 免疫染色を行った組織像を Fig. 3-5 に示した。脾島と他の領域における SOD の染色強度を比較すると、Wistar ラットと WTC ラットで有意な差は認められなかった(Fig. 3-3)。一方、WTC ラットの脾島における SOD の染色強度は Wistar ラットと比較して低い傾

向が認められた($p = 0.061$) (Fig. 3-4)。

3-3-3 メタロチオネインの発現量に関する検討

メタロチオネインの発現量は、STZ 投与前では Wistar ラットと WTC ラット
の間に顕著な差は認められなかった(Figs. 3-6, 3-7 and 3-8)。しかしながら、STZ
投与により、Wistar ラットにおいて膵臓と肝臓においてメタロチオネイン 2A
の発現量の有意な減少が認められた(Figs. 3-6B, 3-8B)。WTC ラットにおいては
STZ の投与によるメタロチオネインの発現量への影響は全く認められなかった。

3-4 考察

WTC ラットにおいて、アロキサンの投与によっても糖尿病の誘発が妨げられた。アロキサンによる糖尿病の誘発機序は、スーパーオキシドアニオンを産生することにより、過酸化水素を経てヒドロキシラジカルを生成し、それが膵β細胞を破壊することにより生じることから、WTC ラットにおける STZ に対する抵抗性はこの経路における保護作用が関与しているものと考えられた。

WST 法による WTC ラットの膵組織における SOD 産生量解析では Wistar ラットと比較して約半分近くと少なく、膵島における SOD 免疫染色強度の解析でも同様の傾向が認められた。このことから、WTC ラットの膵島では、スーパーオキシドアニオンが過酸化水素に変換され難い状態になることが想定される。しかしながら、アロキサンは、最終的にヒドロキシラジカルの生成を介して膵β細胞の傷害を引き起こしている。また、スーパーオキシドアニオンは約 5 秒で消失する活性酸素であり、ヒドロキシラジカルと比較すると、酸化力は極めて弱い。さらに、過酸化水素は本来、カタラーゼとグルタチオンペルオキシダーゼによって水と酸素に変換されるが、そこに重金属が存在すると、「過酸化水素+重金属→ヒドロキシラジカル」という反応がおこる。メタロチオネインは重金属の無毒化を担い、ヒドロキシラジカルの産生を抑制する(J. Duprez et al. 2012, Park L et al. 2011)。特に亜鉛は膵臓、骨格筋や肝臓に多く含まれており、この経路に関わる最も重要な抗酸化物質である。メタロチオネインには 1~4 までのサブタイプがあり、1 及び 2 型は肝臓、腎臓、膵臓、心臓などほとんどの組織に分布している。3 型は特に脳に局在するが、小腸、膵臓、舌、腎臓などでも検出される。4 型は扁平上皮細胞にみられるが詳細は不明である。そして細胞内ではメタロチオネインはその大半は通常細胞質に存在する(Oliver JR et al.

2005)。このことから本章では、メタロチオネイン 1A および 2A の発現量が全身における活性酸素の除去に特に重要であると考え、膵臓のみならず骨格筋および肝臓においてもそれらの発現量を検討した。STZ の投与前には WTC ラットと Wistar ラットの間に発現量の差は認められなかったが STZ の投与により Wistar ラットでは肝臓および膵臓においてメタロチオネインの発現量が減少していた。

すなわち、STZ 投与前において、Wistar ラットと WTC ラットにおけるメタロチオネインの発現量が同程度であることを踏まえると、膵臓における SOD 発現量の違いにより、過酸化水素がより多く生成されることにより、Wistar ラットにおいては相対的にヒドロキシラジカルの産生が行われやすいということが推定される。さらに、STZ の投与後において Wistar ラットにおいてメタロチオネインの発現量が減少していくことから、WTC ラットと活性酸素除去能の差はさらに広がると推測され、Wistar ラットは、活性酸素に対する感受性が一層高まると考えられる。したがって、WTC ラットはこの特徴的な抗酸化機構が働くことによって、ヒドロキシラジカルが産生されにくい特徴を持っているために STZ 抵抗性を示すことが考えられた。

3-5 小括

WTC ラットにおけるストレプトゾトシン抵抗性の機序が、STZ が膵β細胞に取り込まれた後に発現する細胞毒性に対する機構に起因することが考えられたことから、その細胞毒性である活性酸素の処理に関する検討を行った。STZ により生成される活性酸素の詳細は不明であるが、アロキサンによって生成される活性酸素および膵β細胞の破壊を導く活性酸素の詳細はスーパーオキシドアニオンから過酸化水素を経て、ヒドロキシラジカルが生成され、それが膵β細胞を破壊することがすでに報告されている。アロキサンの投与によっても WTC ラットにおいて糖尿病が誘発されなかったことから、この経路が STZ による糖尿病誘発機序に関与すると考え、スーパーオキシドアニオンを過酸化水素に変換する SOD の産生量を検討したところ Wistar ラットにおいて産生量が高いという結果が得られた。さらに過酸化水素について、そこに重金属が存在すると過酸化水素と重金属が反応してヒドロキシラジカルが生成される。この際、メタロチオネインが重金属を無毒化することでヒドロキシラジカルの生成を抑制する機構がある。亜鉛は膵β細胞に多く存在しており、メタロチオネインの作用は重要と考えられる。さらに、糖代謝に重要な役割を果たす骨格筋や肝臓にも多く含まれていることからこれらの臓器においてもメタロチオネインの発現量について検討したところ、STZ の投与前には WTC ラットと Wistar ラットの間に発現量の差は認められなかったが STZ の投与により Wistar ラットにおいて肝臓および膵臓においてメタロチオネインの発現量が減少していた。これらの結果から、WTC ラットにおいてはヒドロキシラジカルの産生が特に行われ難いことが考えられた。しかしながら、WTC ラットにおいてはスーパーオキシドアニオンが残存する傾向が強くなることになるが、スーパーオキシドアニオン

の酸化力はヒドロキシラジカルの酸化力と比較し、極めて弱いため、特にヒドロキシラジカルの生成が膵 β 細胞の破壊には重要であることは明らかであり、WTC ラットは以上の理由により、STZ 抵抗性を示すことが考えられた。

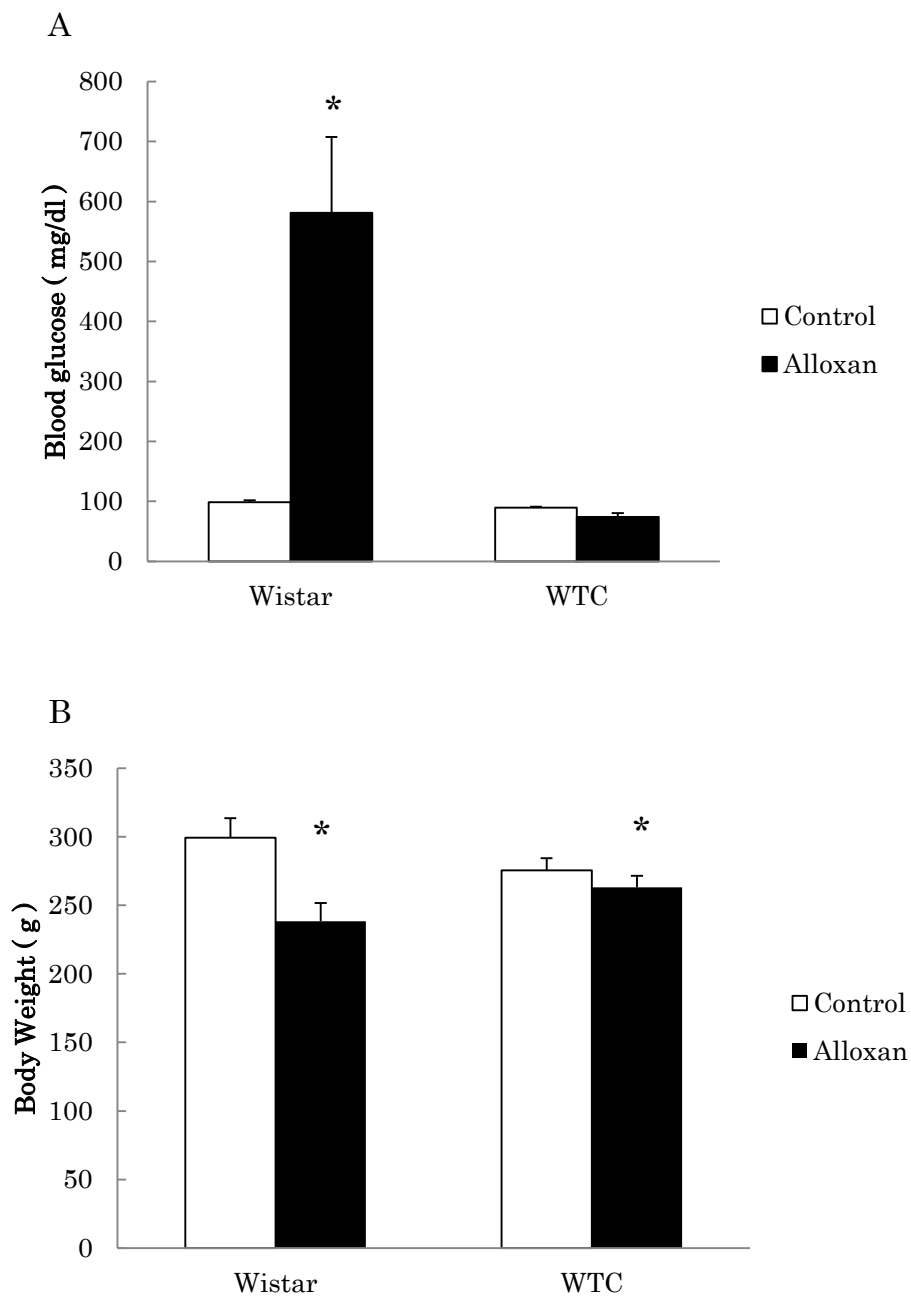


Fig. 3-1. アロキサン(Alloxan)を 150mg/kg の用量で投与して 4 日目の Wistar ラット(n = 6)および WTC ラット(n = 4)の(A)血糖値および(B)体重。* : $p < 0.05$ vs. control

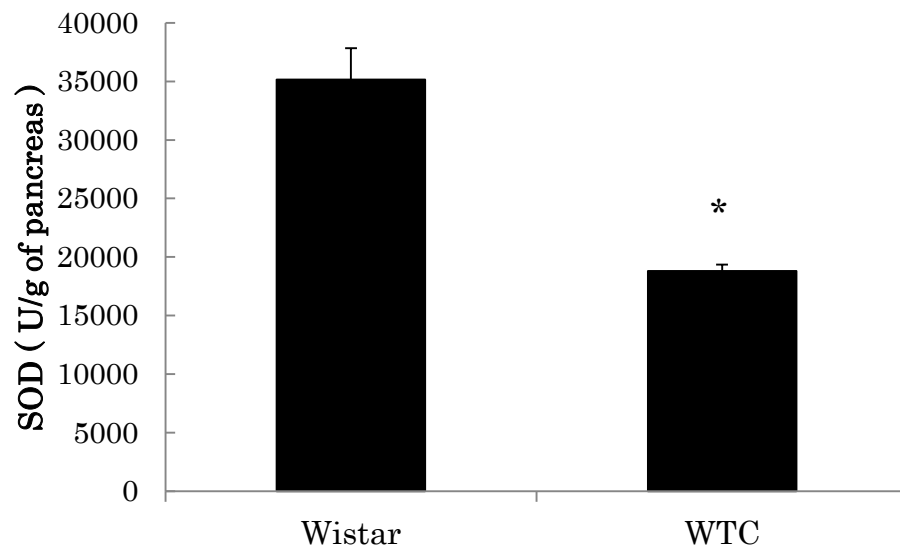


Fig. 3-2. WST 法を用いて測定された Wistar ラット(n = 5)および WTC ラット (n = 5)の膵組織におけるスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)の産生量。

* : $p < 0.05$ vs. Wistar

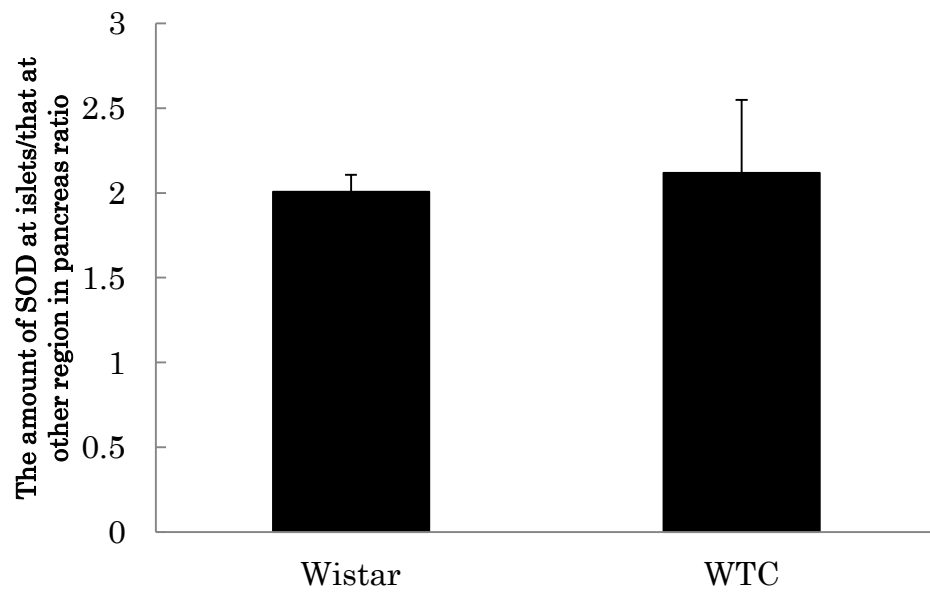


Fig. 3-3. Wistar ラット(n = 3)および WTC ラット(n = 3)の膵島における SOD 発現量と他領域における SOD 発現量との単位面積当たりの存在比。

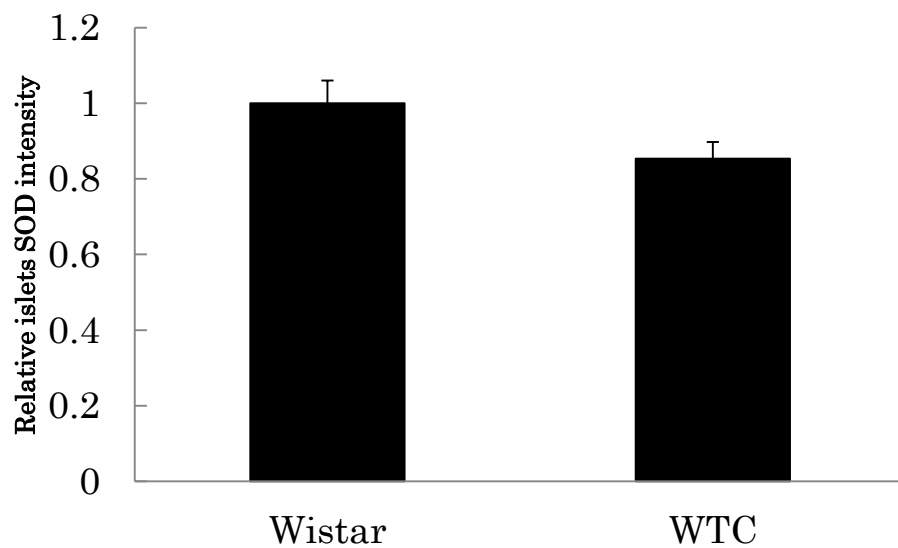
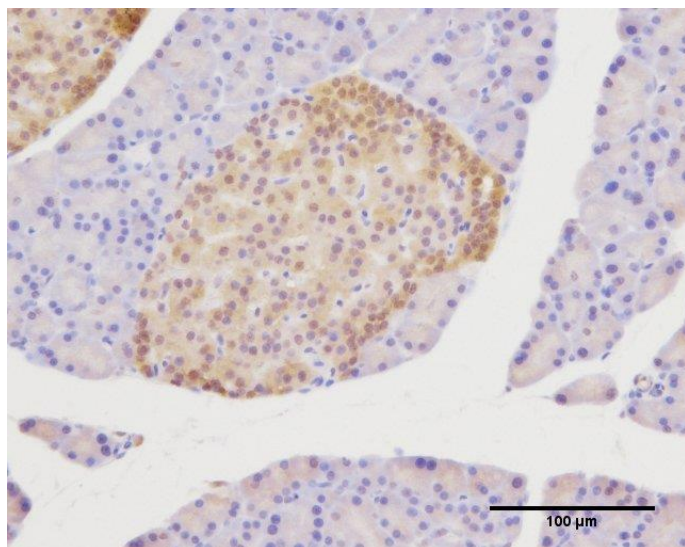


Fig. 3-4. Wistar ラット(n = 3)および WTC ラット(n = 3)の膵島における SOD 免疫染色強度の比較。

A



B

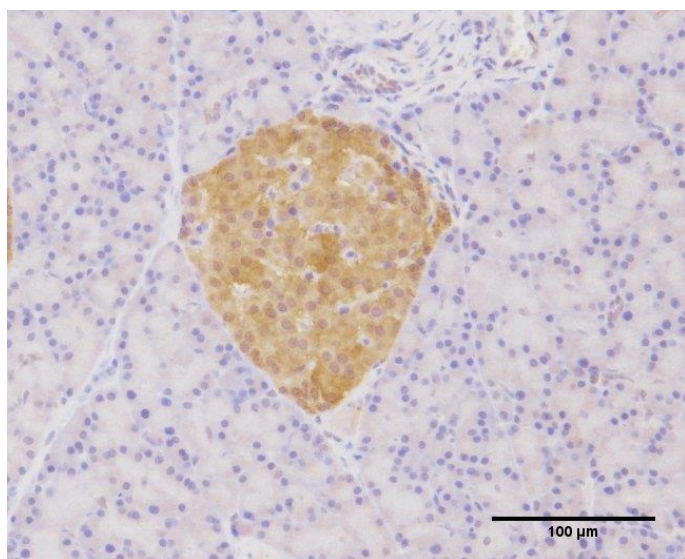
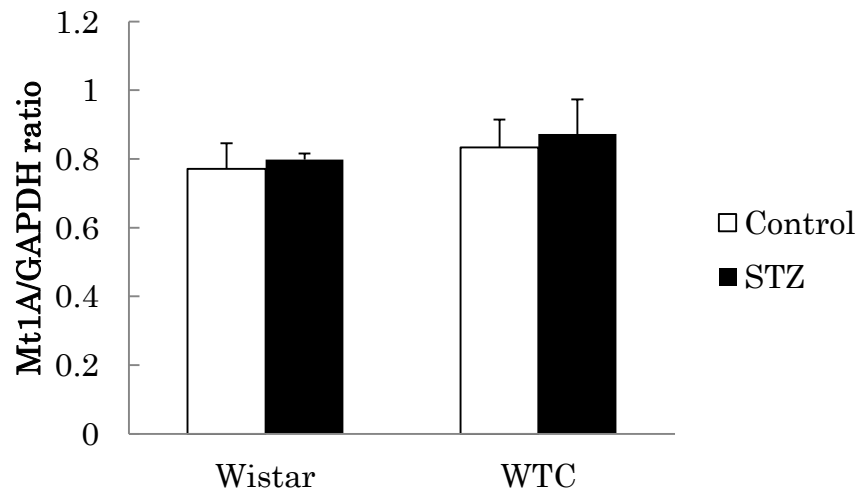


Fig. 3-5. SOD 免疫染色を行ったラットの脾組織像。

A : Wistar ラット

B : WTC ラット

A



B

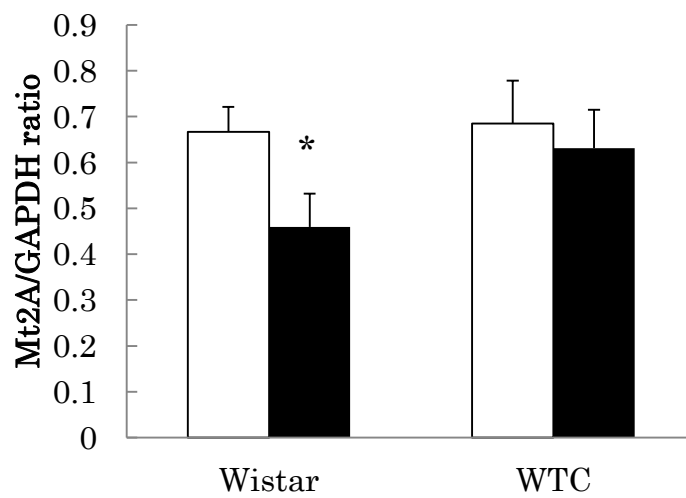
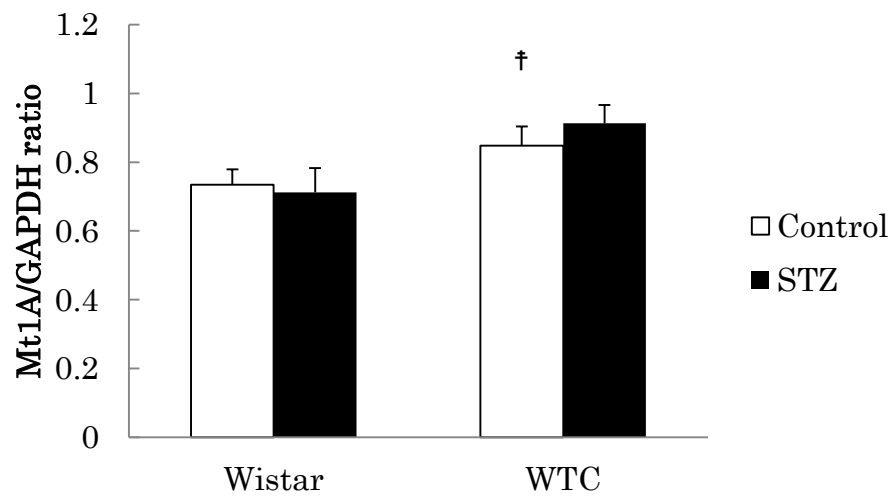


Fig. 3-6. Wistar ラット(n = 4)および WTC ラット(n = 4)の膵組織のストレプトゾトシン(STZ) (50mg/kg)の投与前後における(A)メタロチオネイン 1A (Mt 1A) および (B)メタロチオネイン 2A (Mt 2A)の mRNA 発現量。* : $p < 0.05$ vs. control.

A



B

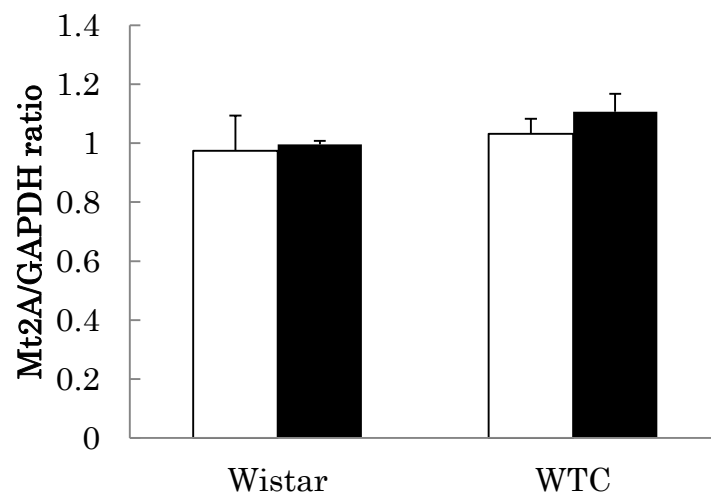
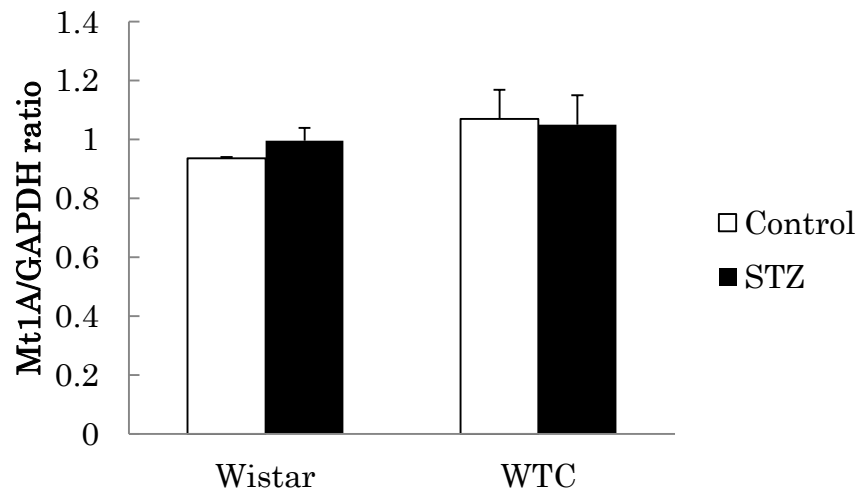


Fig. 3-7. Wistar ラット(n = 4)および WTC ラット(n = 4)の骨格筋のストレプトゾトシン(STZ) (50mg/kg)の投与前後における(A)メタロチオネイン 1A (Mt 1A) および (B)メタロチオネイン 2A (Mt 2A)の mRNA 発現量。 †: p < 0.05 vs. Wistar.

A



B

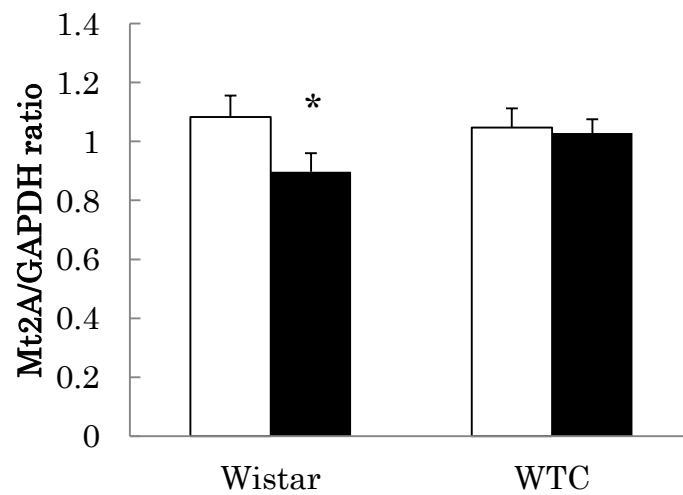


Fig. 3-8. Wistar ラット(n = 4)および WTC ラット(n = 4)の肝臓のストレプトゾ
トシン(STZ) (50mg/kg)の投与前後における(A)メタロチオネイン 1A (Mt 1A)
および (B)メタロチオネイン 2A (Mt 2A)の mRNA 発現量。* : p < 0.05 vs.
control.

gene	Sense	Antisense
Mt1A	GGACCCCAACTGCTCCTG	CGAGGCACCTTTGCAGACAC
Mt2A	CAGCGATCTCTCGTTGATCTCC	CTTGTCCGAAGCCTCTTTGC
GAPDH	CTCATGACCACAGTCCATGC	TTCAGCTCTGGGATGACCTT

Table 3. RT-PCR 法に使用したプライマーの塩基配列。

第 4 章

抗酸化剤を投与したラットにおける ストレプトゾトシンの 作用抑制に関する検討

4-1 緒言

前章において、臓器レベルでの SOD 発現量及びメタロチオネインの遺伝子発現量を検討した結果、WTC ラットにおいてヒドロキシラジカルの産生抑制が STZ の作用を抑制させることが考えられた。そこで、Wistar ラットにおける *in vivo* 実験において、ヒドロキシラジカルの産生を抑制することにより、STZ に対する影響を検討するために、Wistar ラットにおいて活性酸素の除去剤の投与を行った。

4-2 材料及び方法

4-2-1 動物

本実験では 8-12 週齢 Wistar ラット(体重約 250-320g)を日本 SLC より購入して用いた。本実験は東京大学動物実験委員会の承認を得て行った(承認番号: P13-805)。

4-2-2 マンニトールおよびアスコルビン酸の前処置後のストレプトゾトシン投与の影響

生理食塩水に活性酸素除去剤としてマンニトール(1g/kg)またはアスコルビン酸(750mg/kg)を溶解し、ラットに投与した(Dillard C.J. et al. 1982)。その投与 30 分後に同様に生理食塩水に STZ (WAKO)を溶解し、50mg/kg の用量で腹腔内投与を行った。STZ 投与前および投与 4 日後に血糖値および体重を測定した。

血糖値は尾静脈より約 1 μ l の全血を採取し、ワンタッチウルトラ(LifeScan, Inc.)を用いることにより測定を行った(A. Velangi et al. 2005)。

4-2-3 血中 SOD 濃度

試料は血液 1ml あたり 0.04ml EDTA (100mg/dl)を加え、遠心し、採取さ

れた血漿を測定試料として用い、前章と同様に SOD の産生量を測定した。

4-2-4 統計解析

結果は平均値±標準誤差で表し、統計処理は Student's *t*-test により危険率 5% 以下のものを有意とした。

4-3 結果

4-3-1 活性酸素除去剤の前処置がストレプトゾトシンの作用に与える影響

マンニトールを予め投与した群においては、STZ の投与による血糖値の上昇は全く認められなかった。アスコルビン酸を予め投与した群においては、STZ を投与した結果、血糖値の有意な上昇が認められた(Fig. 4-1)。しかしながら、マンニトールおよびアスコルビン酸をそれぞれ前もって投与し、STZ を投与した群において、STZ のみの投与を行った群と比較し、血糖値の上昇が有意に抑制された。体重においては、マンニトール+STZ 投与群とアスコルビン酸+STZ 投与群のどちらにおいても有意な減少が認められた。第 2 章における STZ 単独投与時の体重変化率と比較すると有意な差はなかった。

4-3-2 活性酸素除去剤の前処置による SOD 産生量に対する影響

マンニトールをあらかじめ投与した後 STZ を投与した群、アスコルビン酸をあらかじめ投与した後 STZ を投与した群においても、STZ のみの単体投与を行った群と比較し、血中 SOD 濃度に有意な差は認められなかった(Fig. 4-2)。

4-4 考察

前章において、SOD 及びメタロチオネインの発現量から、WTC ラットにおいてはヒドロキシラジカルの生成が行われにくい特徴を持っていることが明らかとなった。しかしながら、前章までに示されたことは、WTC ラットにおいて、STZ に対して抵抗性を示すことと抗酸化能が高いということの相関があるということであり、抗酸化能が高いために STZ 抵抗性を示すという決定的な根拠とはならない。そこで本章では、活性酸素除去剤の投与によるアロキサンの作用への影響を検討した報告(Dillard C.J. et al. 1982)に基づき、マンニトール(1g/kg)またはアスコルビン酸(750mg/kg)を Wistar ラットに投与することによって、活性酸素除去能を高めた状態に置き、STZ の投与を行う処置をした。結果として、抗酸化剤の前投与によって STZ の作用は抑制されたことから、WTC ラットにおいて、抗酸化能が高いために、STZ 抵抗性が発現したといえる。しかしながら、マンニトールの投与においては STZ を投与しても、血糖値の上昇が全く認められなかったが、アスコルビン酸の投与を行った群に関しては STZ の投与により血糖値の有意な上昇が認められた。体重の減少においては、第 2 章における STZ 単独投与と比較しても、マンニトールの投与およびアスコルビン酸の投与では差が認められなかった。マンニトールやアスコルビン酸の投与は体重の変化には影響を及ぼしにくいということが考えられる。以上のような違いは、マンニトールとアスコルビン酸が除去する活性酸素の種類に起因するものと考えられる。マンニトールはヒドロキシラジカル特異的なスカベンジャーである(B. Shen, R.G. Jensen & H.J. Bohnert: Plant Physiol., 113, 1177. 1997, B. Shen, R.G. Jensen & H.J. Bohnert: Plant Physiol., 115, 527. 1997)という報告があり、アスコルビン酸は特定の活性酸素に作用することなく、特に

ヒドロキシラジカルへの作用は弱く、広く全般的に作用するとされている(T. Osaka. 1999)。

このことから、活性酸素を除去することで STZ の作用を抑制することができ、活性酸素の中でも特にヒドロキシラジカルの除去が STZ の作用の抑制に強く関わっていることが明らかとなった。以上の事から、前章の結果を踏まえると、WTC ラットにおける STZ 抵抗性の発現の機序は、WTC ラットにおける特徴的な抗酸化機構に起因するものであると考えられた。

4-5 小括

前章において、WTC ラットにおいて、ヒドロキシラジカルの産生が抑制されることにより、STZ 抵抗性を示すことが考えられたが、前章までに考察されたことを *in vivo* 実験によって明らかにするために、Wistar ラットに対して抗酸化剤であるマンニトールおよびアスコルビン酸を投与した後、STZ を投与することにより、糖尿病の誘発にどのような影響を与えるかについて検討した。マンニトールをあらかじめ投与した群においても、アスコルビン酸をあらかじめ投与した群においても、STZ を単体で投与した群と比較して、血糖値の上昇が有意に妨げられた。しかしながら、マンニトールを投与した群における STZ の糖尿病誘発作用の抑制が著しく、この理由については、マンニトールがヒドロキシラジカルを特異的に除去し、アスコルビン酸は全般的に活性酸素を取り除くため、STZ の作用の抑制に差が認められたものと考えられ、さらに、特にヒドロキシラジカルの除去能が STZ の作用抑制について非常に重要であることが示された。

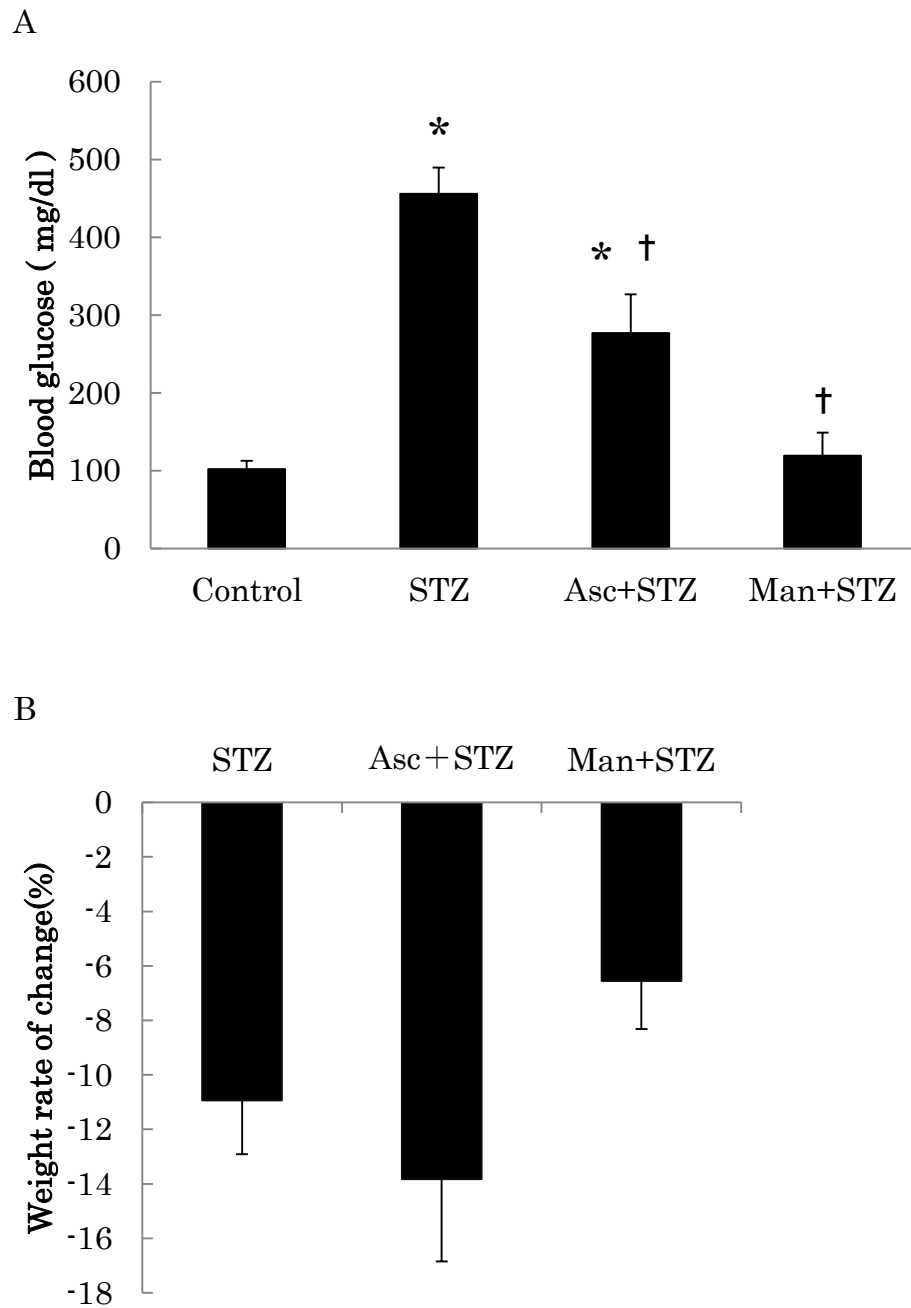


Fig. 4-1. アスコルビン酸(Asc; 750mg/kg, n = 5)およびマンニトール(Man; 1g/kg, n = 5)をあらかじめ投与した後、ストレプトゾトシン(STZ; 50mg/kg)を投与した4日目の(A)血糖値(Control; n = 5, STZ; n = 5)および(B)体重変化率(STZ; n = 5)。* : $p < 0.05$ vs. control.

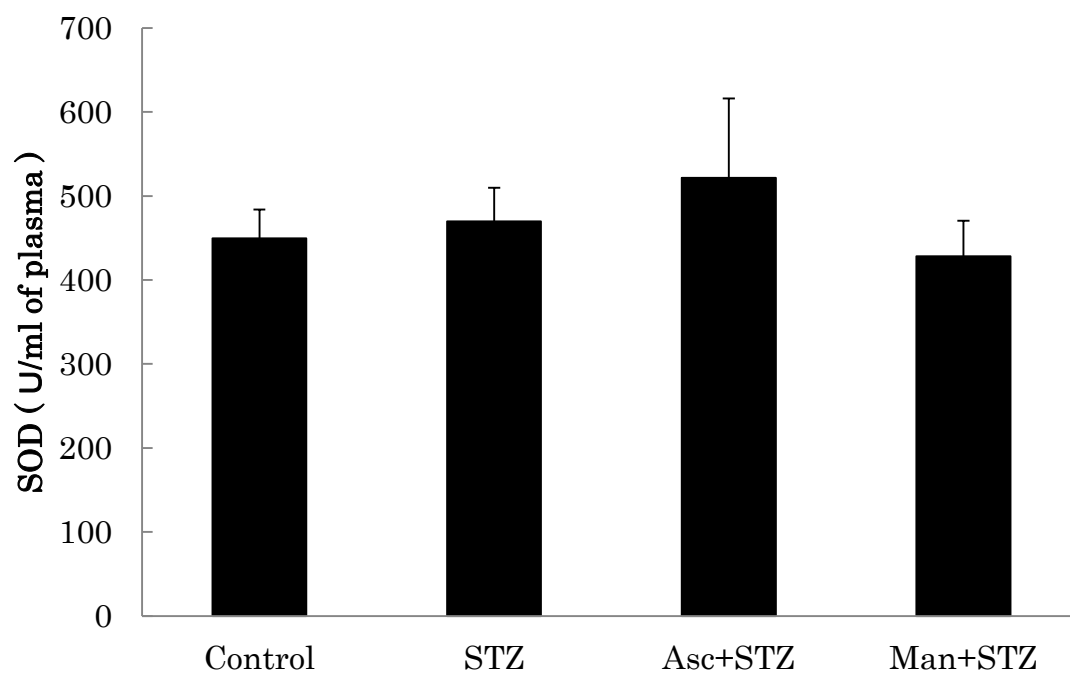


Fig. 4-2. アスコルビン酸(Asc)およびマンニトール(Man)をあらかじめ投与し、streptozotocinを投与した群(Asc+STZ; n = 5, Man+STZ; n = 5)におけるstreptozotocin単体投与群(n = 5)との血中 SOD 濃度の比較(Control; n = 5)。

第 5 章

WTC ラットの生体機能と糖尿病合併症

5-1 緒言

これまでに WTC ラットにおけるストレプトゾトシン抵抗性は抗酸化能が維持されているために起こることが明らかとなった。本章では、WTC ラットの生体機能に関してはほとんど検討されていないことから、循環系と自律神経系機能に関して STZ に対する影響も含め検討を加えた。

生体现象をできるだけ生理的な状態で評価するためには、無麻酔・無拘束下において記録を行う必要がある。そこで、本章ではテレメトリー法を用いることにより、STZ が心拍数、体温、活動量および自律神経系機能に及ぼす影響を評価した。

5-2 材料及び方法

5-2-1 動物

本実験では、京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設から購入した WTC ラットを自家繁殖することにより、WTC ラット(体重 200-300g)を用いた。対照として Wistar ラット(体重 250-320g)を(株)埼玉実験動物より購入して用いた。本実験は東京大学動物実験委員会の承認を得て行った(承認番号: P13-805)。

5-2-2 テレメーター送信機の埋め込み

心電図測定に先立ち、ネンブタール(30mg/kg i.p.)麻酔下で心電図・体温・活動量計測用テレメトリー送信機本体 (weight=3.9g, volume=1.9cc ; TA10ETA-F20, Data Science, St. Paul, MN, USA)をラットの頸背部皮下に外科的に埋入した。本体に接続された記録電極は+側を左後肢大腿部の皮下に、マイナス側を右肩甲部の皮下に設置し、標準第Ⅱ肢誘導心電図が記録できるようにした。

5-2-3 心電図記録

心電図波形は約 1 週間の手術からの回復期を経た後、記録を開始した。動物

は 1 匹ずつ個別のアクリルケージに収容し、照明および温度の制御が可能なインキュベーションチャンバー内で飼育した。チャンバー内の照明条件は、明期(8:00~20:00)、暗期(20:00~8:00)の 12 時間周期とし、温度条件は 24℃とした。飼育期間中は自由飲水とした。テレメーター送信機からの心電図信号は受信ボード(Data Science)に無線によって受信し、ECG processor analyzing system(Softron, Tokyo, Japan)を用いて記録した。

一方、心拍数、体温、活動量を、Data Quest 分析システム(Data Science)を用いて 5 分ごとに継続して記録した。これらの記録はストレプトゾトシン投与 1 週間前から投与後 3 週間まで行った。

5-2-4 心拍変動解析

上記の心電図記録を用いて自律神経系機能の変化を評価するために心拍変動解析を行った。低周波数(LF)成分と高周波数(HF)成分はそれぞれ LF:0.01-1.0Hz、HF:1.0-3.0Hz にピークを持つ成分として解析した。心拍変動の HF 成分は副交感神経系機能の指標として、また、LF/HF 比は交感神経系と副交感神経系機能のバランスを表す指標として使用した(Kuwahara et al. 1994)。

5-2-5 ストレプトゾトシンの投与と血糖値測定

STZ (60mg/kg i.p.)の腹腔内投与は記録開始後 7 日目に行い、投与直前、投与後 4、8、12 日目にワンタッチウルトラを用いて血糖値の計測を行った。

5-2-6 病理組織学的検討

Wistar ラットおよび WTC ラットにおける STZ の投与による膵 β 細胞の影響を観察するために、STZ の投与前と投与後における膵組織について、以下のよう免疫組織化学的検討を試みた。

動物をウレタン(1g/kg)深麻酔状態下で開腹し、腹大動脈より放血し案楽死処置を行い、膵臓を摘出した。膵組織を中性緩衝ホルマリン液で 12~24 時間浸漬固定した。その後、エタノール脱水し、キシレン置換後、パラフィンに包埋、4 μ m 連続切片を作製した。脱パラフィン後、10%の過酸化水素水を含むメタノールで内因性ペルオキシダーゼを除去し、ブロッキングした後、抗インスリンモルモットモノクローナル抗体(Dako)を一次抗体として組織切片と 4°Cにて一晩反応させた。その後洗浄し、マウス Envision(Dako)を用い二次抗体と 37°Cにて 40 分間反応させた後、3,3'-ジアミノベンジジン(DAB)溶液を用いて発色させ、可視化させた。

5-2-7 統計解析

結果は平均値 \pm 標準誤差で表し、統計処理は Student's *t*-test により危険率 5%以下のものを有意とした。

5-3 結果

5-3-1 血糖値と体重の変化

Wistar ラットでは STZ 投与後 4 日目において顕著な血糖値の上昇が認められ、8、12 日目と減少するものの高い値が維持された。一方、WTC ラットにおいては 4 日目には Wistar ラットと比較すると、その上昇の程度は Wistar ラットと比較し有意に小さかったが、8 日目以降は 300mg/dl 程度のレベルで推移した (Fig. 5-1A)。

体重の変化においても両群で顕著な差異が認められ、WTC ラットでは体重に増減が認められなかったのに対して、Wistar ラットでは体重が顕著に減少し、投与後 12 日目においては約 20%減少した (Fig. 5-1B)。

5-3-2 ストレプトゾトシンが心拍数、体温、活動量に及ぼす影響

心拍数、体温、活動量の変化について、STZ 投与 3 日前から投与後 20 日目までの各指標の変化における WTC ラットと Wistar ラットの典型的な例を Fig. 5-2 と Fig. 5-3 に示した。STZ 投与前にはいずれの指標にも、明瞭な日内変動の存在が確認された。また、STZ 投与前日、1、3、7、14、17、20 日後の各指標の変化を平均値で Fig. 5-4 に示した。

また、STZ 投与前において、WTC ラットは Wistar ラットに比べて心拍数は有意に低く、活動量及び体温に関しては有意な差は認められなかった (Fig. 5-5)。

Wistar ラットでは STZ 投与後 3 日目を境に明期、暗期のどちらにおいても、心拍数、体温、活動量が徐々に低下し、20 日目においてはいずれの指標も有意に低い値を示した。特に活動量は暗期における低下が著しく、日内変動も消失した(Figs. 5-6, 5-7)。

WTC ラットでは、明期の心拍数に 3 日目から低下する傾向が見られたものの、Wistar ラットと比べ、それぞれの指標の低下は比較的遅く、その程度も小さいことが明らかになった。そして活動量も含め 20 日目においても明確な日内変動が維持されていた。

5-3-3 ストレプトゾトシンが自律神経系機能に及ぼす影響

STZ 投与前から投与後 20 日目までの各指標における変化の典型的な例を一時間毎の値で Figs. 5-8, 5-9 に示した。また、投与前日、投与後 1、3、7、14、17、20 日目の各指標の変動を Figs. 5-10A, 5-11A, 5-12A に示した。投与前には多くの指標に、明瞭な日内変動の存在することが確認された。WTC ラットは Wistar ラットと比較し、HF は有意に高く、LF/HF 比も顕著に低かった。

投与前、投与後 7 日目、14 日目の LF、HF および LF/HF 比を比較した結果を Figs. 5-10B, 5-11B, 5-12B に示した。LF について関して、Wistar ラットにおいては 3 日目から急激に値が下がり、7 日目では有意に低下していた。一方、WTC ラットにおいては投与 3 日後から徐々に低下し始め、投与 14 日後に有意な低下を示し、Wistar ラットと同程度の値を示した。HF については WTC ラットにおいて徐々に低下する傾向が見られ、投与後 7 日目には有意に低下しており、14 日目には多少回復するものの、投与前と比較し有意に低い値を維持し

た。Wistar ラットにおいては STZ 投与後も投与前と同程度の値を維持した。LF/HF 比は Wistar ラットでは徐々に低下する傾向が見られ、投与後 3 日目を境に急激に下がり、投与後 7 日目には有意に低下していた。またこの値はさらに下がり続けた。WTC ラットでは投与 7 日目まではほとんど変化なく維持されたが、その後徐々に低下し、投与 14 日後には対照値と比べ、有意に低下していたが、Wistar ラットのそれと比較すると緩やかな変化を認めた。

5-3-4 ラットの膵島における病理組織学的検討

Wistar ラットおよび WTC ラットにおける STZ の投与前と投与後のランゲルハンス島の組織像を、Fig. 5-14 に示した。

STZ の投与により Wistar ラットでは膵島が有意に小さくなっていたが、WTC ラットでは有意な変化は認められなかった。膵島における β 細胞陽性細胞の占有領域は、Wistar ラットでは STZ 投与によって有意に小さくなったが、WTC ラットでは変化は認められず、さらに、Wistar ラットとの比較においても有意に STZ の作用が妨げられていることが認められた(Fig. 5-13)。

5-4 考察

STZ 投与前後における生体反応に関して、無麻酔・無拘束下のラットにおいて心拍数、体温、活動量と自律神経系機能の変化を継時的に明らかにすることができた。

Wistar ラットにおいて、STZ 投与により、血糖値は有意に上昇し、体重は有意に減少し、これまでの研究(Howarth et al, 2009, Gnoni et al, 2010)と同様の傾向が見られた。一方、WTC ラットにおいても STZ 投与により、その上昇の程度は Wistar ラットと比べて有意に小さいものの、血糖値の上昇が認められた。しかしながら、WTC ラットの体重には顕著な変化は見られなかった。また、STZ の投与による膵 β 細胞の傷害に関して、WTC ラットにおいては有意な膵 β 細胞の破壊は認められず、WTC ラットでは膵 β 細胞が生存し続け、さらにその機能が維持されていることが考えられた。これらのことについて、WTC ラットにおいて STZ の投与後に関して、体重に減少が見られなかったということは、STZ の投与後においても、WTC ラットにおいては膵 β 細胞がいまだ十分に生存し、機能が残存しているために、グルコース刺激によって起こるインスリン分泌の増大が起こっており、グルコースをエネルギー源として、依然として細胞が利用できており、タンパク質・脂質が分解されずにいるためであるということも考えられが、血糖値の上昇自体は生じていることから、その機序に関してはさらに詳細な検討が必要であると考えられた。

本章の実験においては、過去のいくつかの同様な研究(Howarth et al. 2005, 2006)で使用している 60mg/kg という STZ の用量を用いた。過去の知見との生体に対する反応を比較検討する点からこの用量を使用した。第 2 章の結果とは明らかに異なった。50mg/kg、75mg/kg と 100mg/kg において Wistar ラット

の血糖値に及ぼす影響について、必ずしも高い用量を用いたほうが高値を示すとも限らないことから、より詳細な用量依存性に関して WTC ラットについては検討する必要があるのかもしれない。その中でも、STZ の投与に対して、WTC ラットにおける膵 β 細胞の傷害が軽度であったことは、着目すべき点である。前章までに述べた活性酸素の反応に関して、例えば、過酸化水素はスーパーオキシドアニオンやヒドロキシラジカルと比較して、長い時間安定状態を保てる活性酸素であり、生体の中ではセカンドメッセンジャーとしての存在意義を持つこともある物質であり、生体の反応には複雑に関係する。STZ の投与により発生する活性酸素の量とその処理過程においてはたらく抗酸化機構のバランスというものが、本章までに認められた非用量依存的な、STZ の用量と STZ の投与後の血糖値との関係を生み出しているのではないかと考えられる。

また、正常時における WTC ラットの心拍数は Wistar ラットと比較して有意に少なかった。その要因として、副交感神経系機能が優位な特徴を有することが関与しているものと考えられた。STZ 投与後は Wistar ラットにおいて、投与後数日で心拍数、体温、活動量ともに有意に減少することが報告されており (Howarth et al. 2006)、本実験においても同様の傾向が見られた。また、WTC ラットにおいては Wistar ラットと比べて、心拍数減少、体温低下、活動量低下の見られるまでの期間やその程度が小さかったことは、WTC において血糖値は上昇したものの、STZ に対する感受性が低く、血糖値が Wistar ラットと比べて上昇の程度が少なく代謝機能の低下が小さかったためであるという可能性が考えられた。特に、前章までの議論の対象であった活性酸素は、あらゆる細胞を細胞死に至らしめ、あらゆる疾患の発症に関与する代表的な物質であり、WTC ラットにおける抗酸化能の高さが、各指標の変化の程度に影響している可能性は十分に考えられる。糖尿病性血管合併症に関して、高血糖によるミトコンド

リア由来活性酸素の産生過剰が糖尿病性血管合併症の発症機序として最も重要な因子である可能性(Nishikawa T et al. 2000)が示唆されており、WTC ラットにおいては、これらの活性酸素の処理能力が優れており、合併症の症状の進行が緩やかであることが考えられる。

自律神経系機能の変化に関しては WTC ラットと Wistar ラットでは対照値から差異が認められた。WTC ラットの HF 値が顕著に高く、LF/HF 比が低かったことから Wistar ラットに比べて副交感神経系が有意に働いていることが推察された。Wistar ラットにおける過去の報告(Howarth et al. 2005)では、LF/HF 比が STZ 投与後に上昇しており、本実験における結果とは異なっていた。その要因としては、投与後の早い時期から心拍数、体温、活動量が変化していることから、自律神経系に対する影響も異なっていることが推測される。本実験の結果からは、LF の低下と LF/HF 比の低下から、交感神経系活動が相対的に低下したと考えられた。WTC ラットにおいては、LF、HF の減少が見られるものの LF/HF 比が減少していることから副交感神経系の活動が交感神経系の活動と比べ抑制の程度が低く、副交感神経系活動がより優位になっているものと考えられた。STZ 誘発性糖尿病ラットにおける自律神経系機能の評価を行った研究はまだ少なく、さらなる検討が必要であると考えられた。

一方、最近マウスの STZ 誘発性糖尿病モデルにおいて心拍数の調節におけるコリン作動性神経のリモデリングに関する研究が報告された(Mabe AM and Hoover DB. 2011)。この論文では STZ 投与後 14 週まで観察しているが糖尿病による心拍数の低下は、コリン作動性神経や心房におけるコリン作動性神経に対する感受性の変化というよりは、コリン作動性神経の節前線維もしくは神経節における神経伝達物質の機能低下に起因すると結論付けられている。これらのことから、副交感神経系機能が優位である WTC ラットの特性は糖尿病の合併

症として知られる自律神経障害の見地からも糖尿病合併症の発症機構を詳細に検討するうえで興味深いモデル動物となることが期待される。

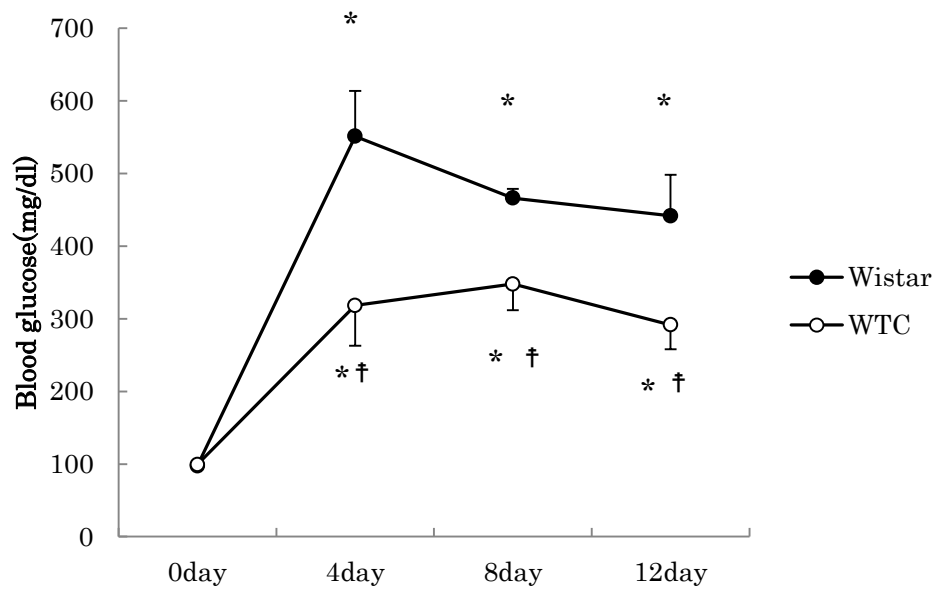
5-5 小括

前章までに WTC ラットにおいて STZ 抵抗性が抗酸化能の特徴によるものと示された。本章では、WTC ラットの生体機能に関してはほとんど検討されていないことから、STZ に対する心拍数、体温、活動量および自律神経系機能に及ぼす影響を検討した。本章では、Wistar ラットを用いた過去のいくつかの同様な研究(Howarth et al. 2005, 2006)で使用した 60mg/kg という STZ の用量を用いたところ、血糖値の上昇の程度は Wistar ラットと比較して顕著に小さかったものの、STZ 投与による血糖値の上昇を認めた。しかしながら、組織所見において WTC ラットにおける膵β細胞の破壊は Wistar ラットと比較して顕著に軽度であり、STZ 投与前と比較しても膵β細胞は減少しておらず、機能も維持されているものと考えられた。しかしながら、第 2 章における結果との異なりは明らかであり、その理由として、活性酸素の役割が一つに考えられる。過酸化水素は安定性が比較的高く、生体においてはセカンドメッセンジャーとして使われており、生体には複雑に関与している。そのため、活性酸素と抗酸化機構のバランスは重要であり、本章までに認められた STZ に対する用量非依存的な反応をもたらしていることが考えられる。

また、正常時における WTC ラットの心拍数は Wistar ラットと比較して有意に少なかった。その要因として、副交感神経系機能が優位な特徴を有することが関与しているものと考えられた。また、STZ 投与に対する影響として、Wistar ラットでは心拍数、活動量が有意に低下し、明期に低く暗期に高いというげっ歯類の特徴である日内変動も不明瞭になるのに対して、WTC ラットではその影響が小さく、高血糖時における代謝機能の低下に対する抵抗性があることが認められた。高血糖によるミトコンドリア由来活性酸素の産生過剰が糖尿病性血

管合併症の発症機序としてもっとも重要な因子である(Nishikawa T et al. 2000)と報告されており、WTC ラットにおける活性酸素の処理能力が、このような因子を除去していることが考えられる。自律神経系機能は、STZ 投与前から WTC ラットにおいては HF 値が高く副交感神経系活動が優位であった。STZ 投与後は、Wistar ラット、WTC ラット共に副交感神経系活動が優位に傾くが、WTC ラットではその変化の程度は小さかった。マウスの STZ 誘発性糖尿病モデルにおいて心拍数の低下が、コリン作動性神経の節前線維もしくは神経節における神経伝達物質の機能低下に起因する(Mabe AM and Hoover DB. 2011)と報告されていることから、副交感神経系機能が優位である WTC ラットの特性は、糖尿病合併症の一つである自律神経障害の見地からも、糖尿病合併症の発症機構を詳細に検討する上で、興味深いモデル動物となることが期待される。

A



B

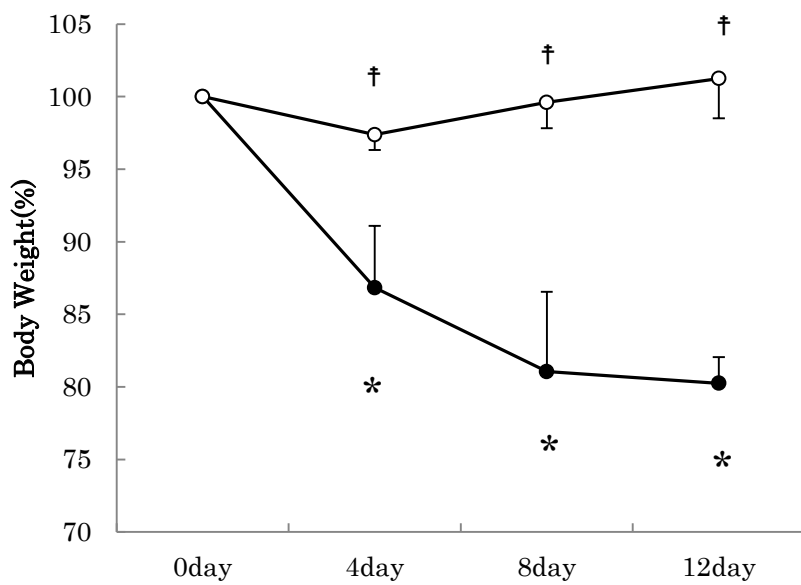
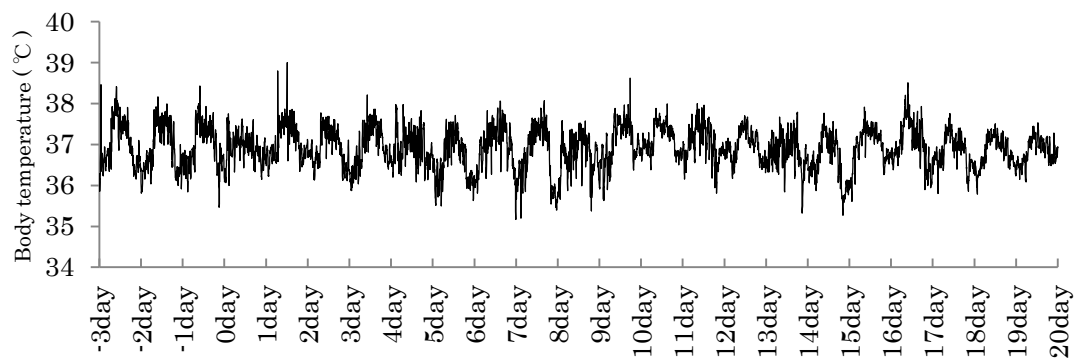


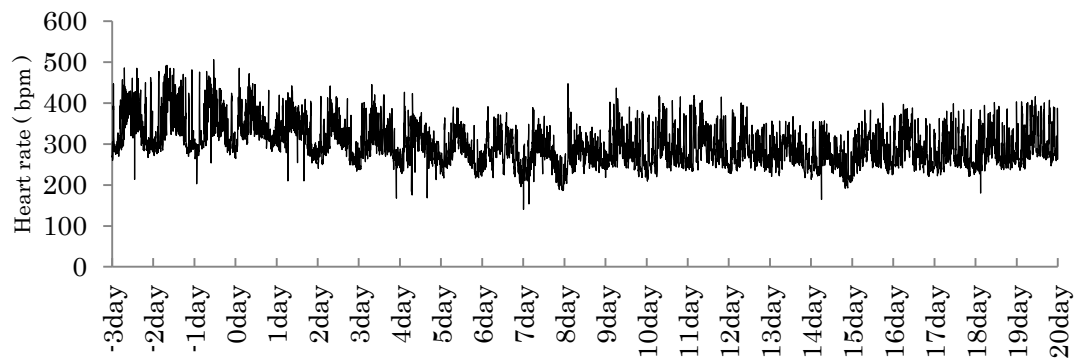
Fig. 5-1. Wistar ラット(n = 6)および WTC ラット(n = 6)におけるストレプトゾトシン(STZ) (60mg/kg)投与後 12 日目までの(A)血糖値および(B)体重の推移。

* : $p < 0.05$ vs. 0 day † : $p < 0.05$ vs. Wistar

A



B



C

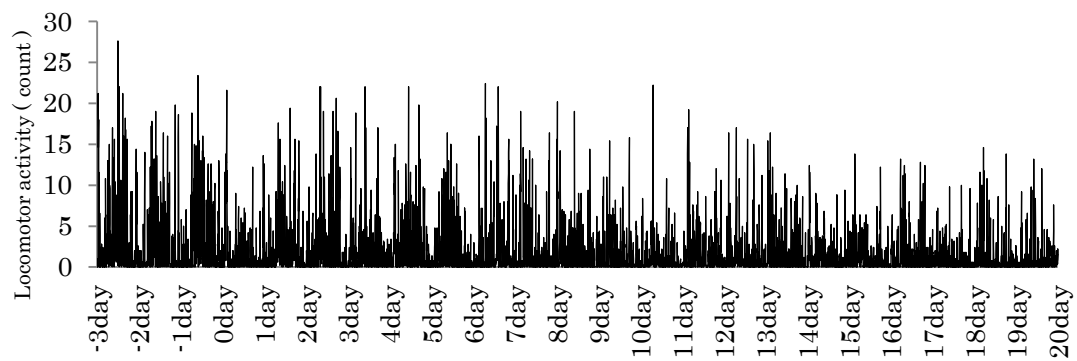
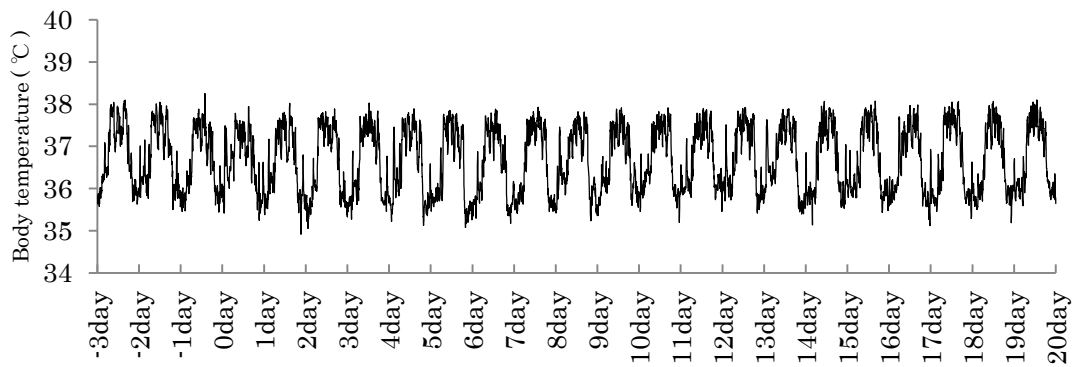
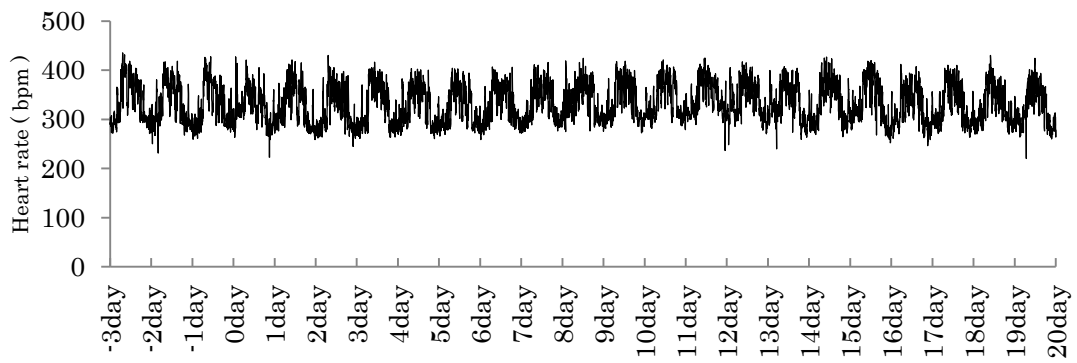


Fig. 5-2. Wistar ラットにおけるストレプトゾトシン(STZ) (60mg/kg)の投与前後の(A)体温、(B)心拍数および(C)活動量の STZ 投与後 20 日目までの変化の典型例。0day に STZ を投与。横軸の目盛りはそれぞれの日の 13 時。

A



B



C

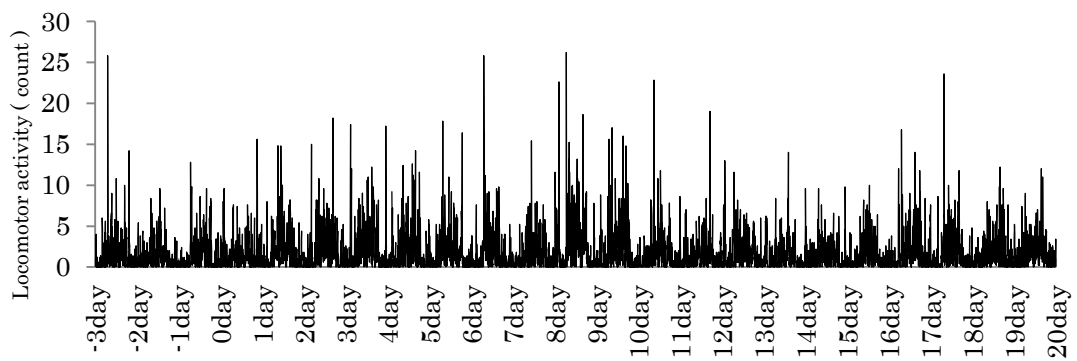
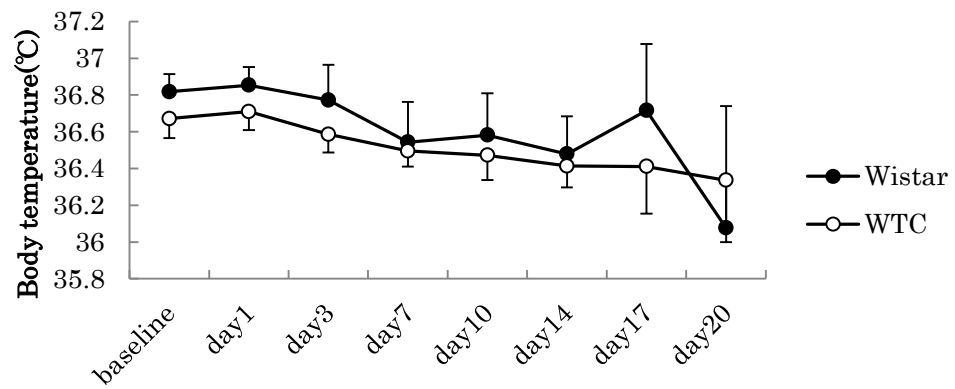
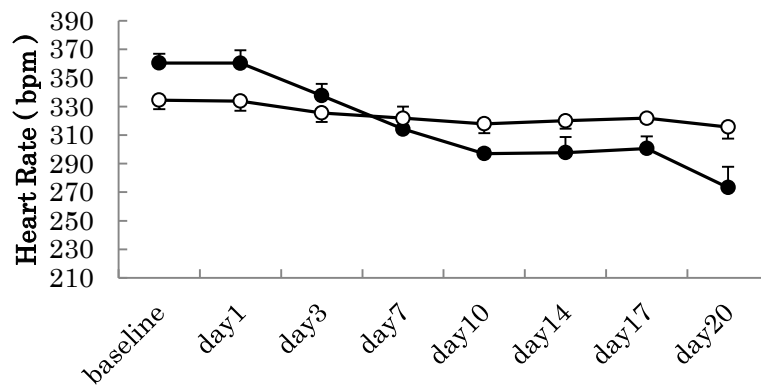


Fig. 5-3. WTC ラットにおけるストレプトゾトシン(STZ) (60mg/kg)の投与前後の(A)体温、(B)心拍数および(C)活動量の STZ 投与後 20 日目までの変化の典型例。0day に STZ を投与。横軸の目盛りはそれぞれの日の 13 時。

A



B



C

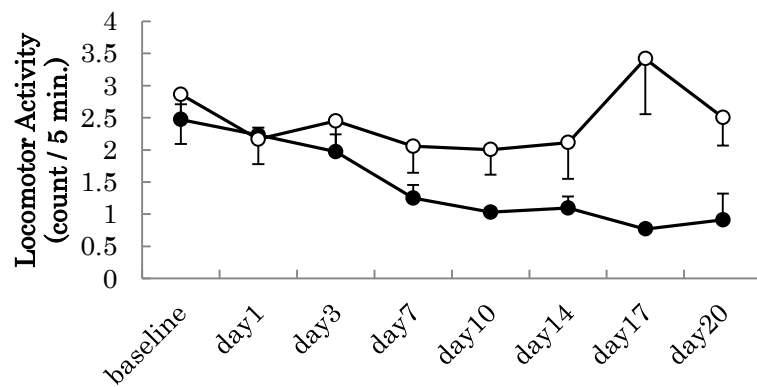
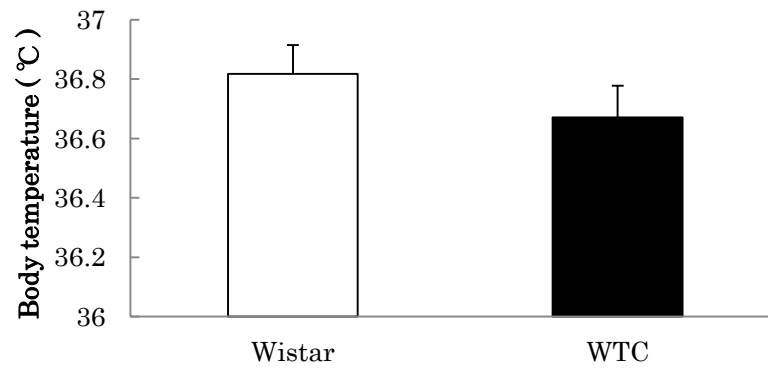
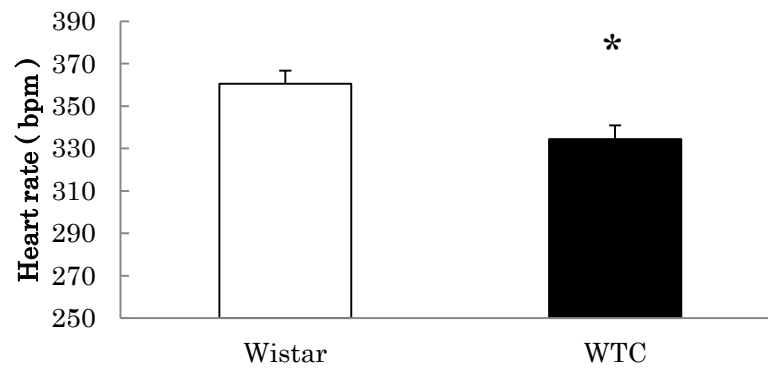


Fig. 5-4. Wistar ラット(n = 6)および WTC ラット(n = 6)におけるストレプトゾ
トシン(STZ) (60mg/kg)投与後の(A)体温、(B)心拍数および(C)活動量の経時的変
化の平均値。

A



B



C

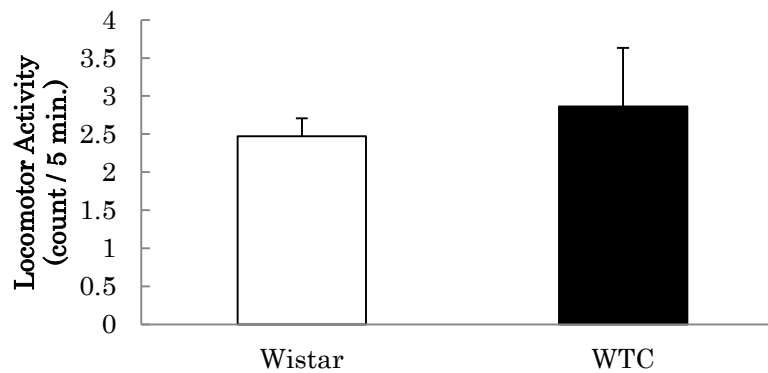
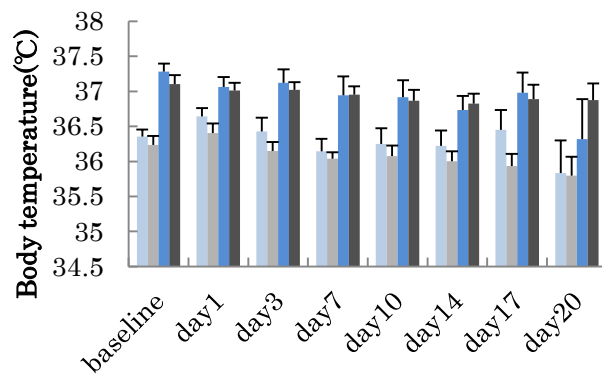


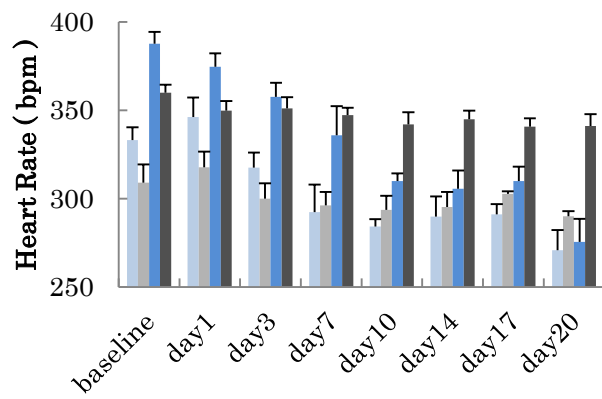
Fig. 5-5. Wistar ラット(n = 6)および WTC ラット(n = 6)におけるストレプトゾトシン(STZ)の投与前における(A)体温、(B)心拍数および(C)活動量の一日の平均。

* : $p < 0.05$ vs. control.

A



B



C

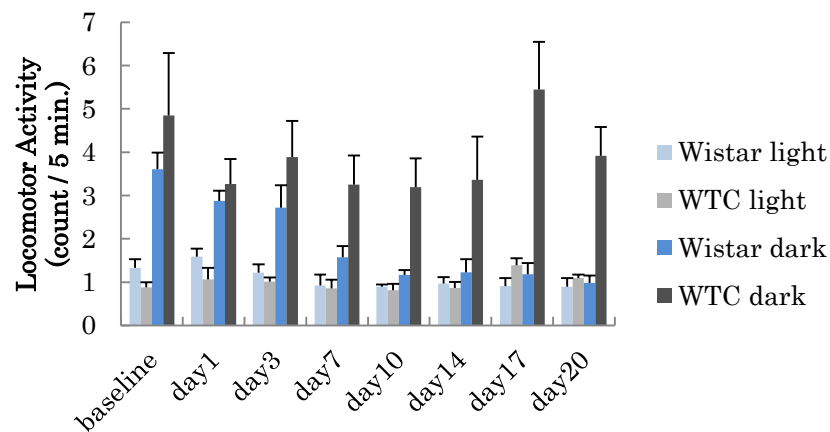
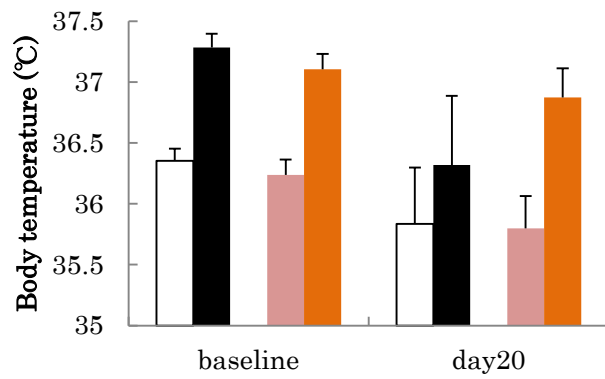
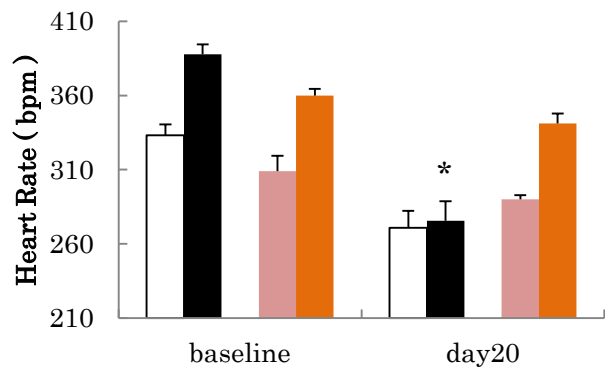


Fig. 5-6. Wistar ラット(n = 6)および WTC ラット(n = 6)におけるストレプトゾトシン(STZ) (60mg/kg)投与による明期および暗期それぞれの(A)体温、(B)心拍数および(C)活動量。

A



B



C

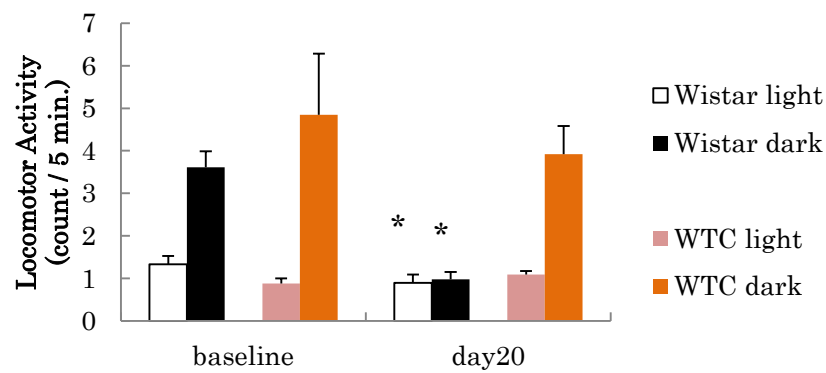
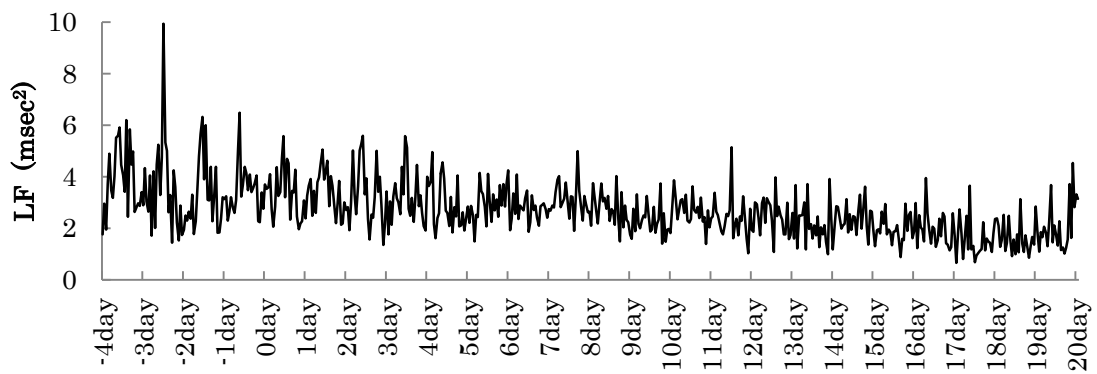
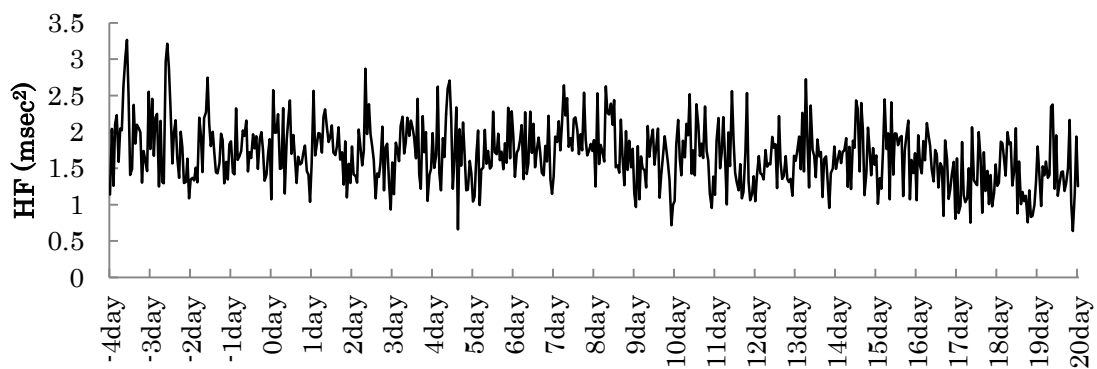


Fig. 5-7. Wistar ラット(n = 6)および WTC ラット(n = 6)におけるストレプトゾトシン(STZ) (60mg/kg)投与後 20 目における明期および暗期それぞれの(A)体温、(B)心拍数および(C)活動量。*: $p < 0.05$ vs. control.

A



B



C

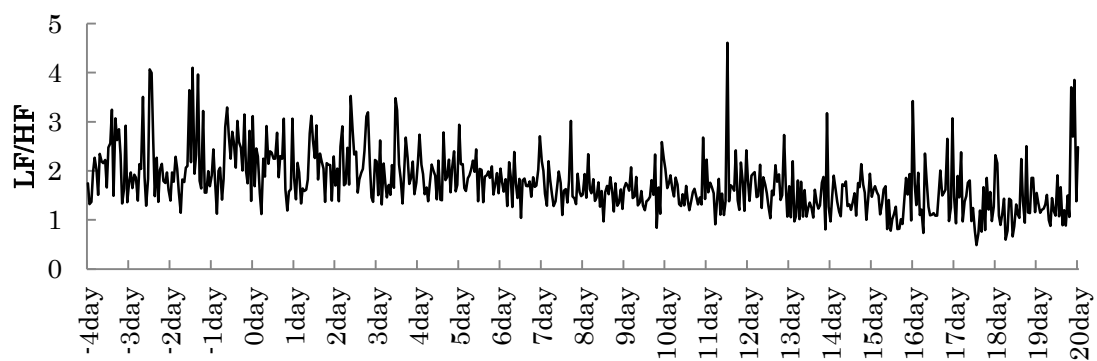
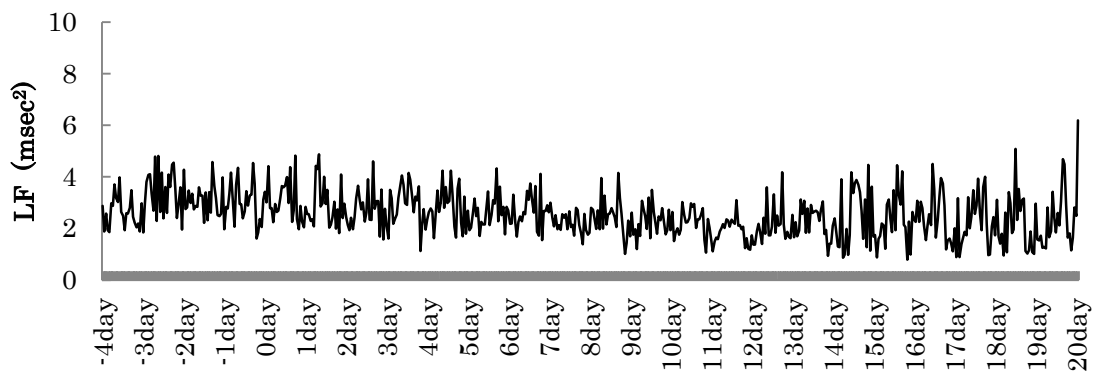
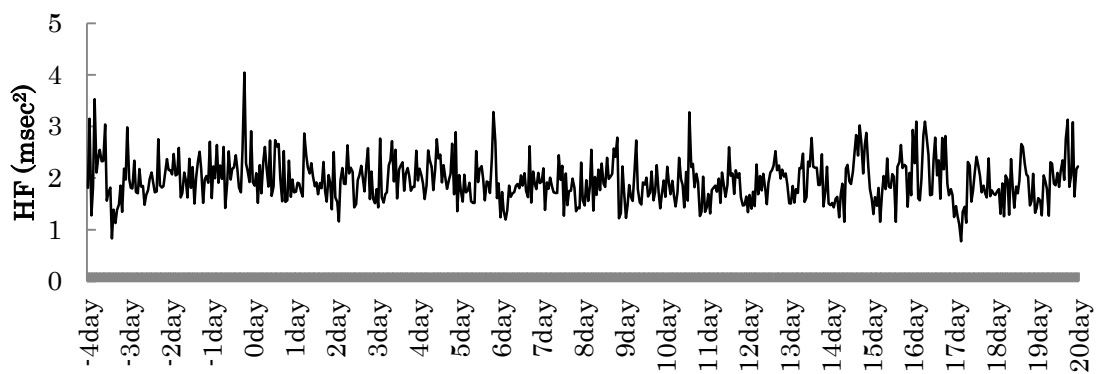


Fig. 5-8. Wistar ラットにおけるストレプトゾトシン(STZ) (60mg/kg)の投与前後の(A)LF 値、(B)HF 値および(C)LF/HF 比の STZ 投与後 20 日目までの変化の典型例。0day に STZ を投与。横軸の目盛りはそれぞれの日の 13 時。

A



B



C

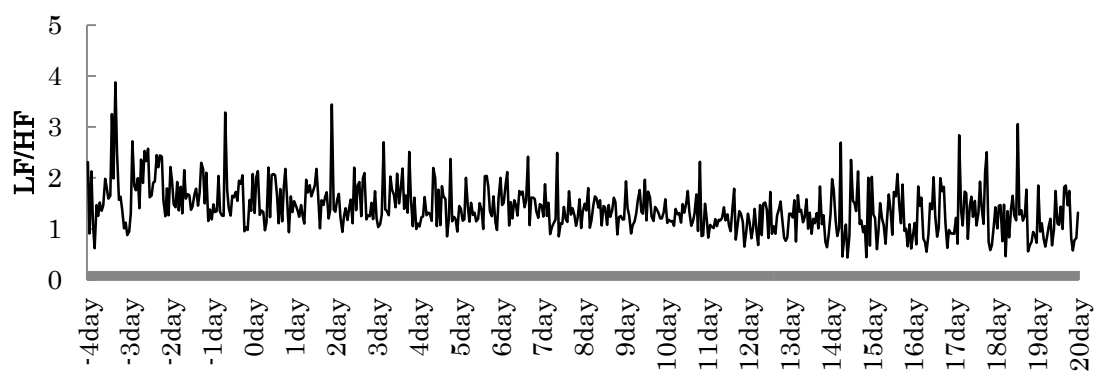
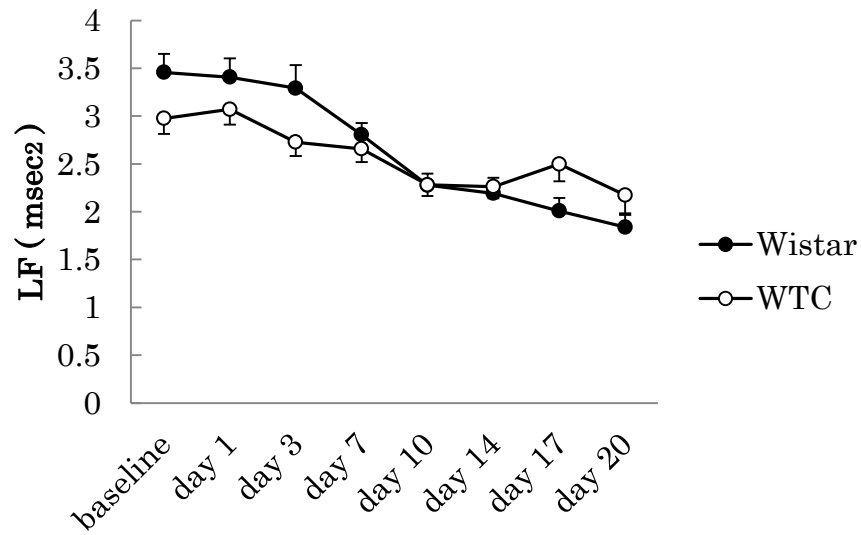


Fig. 5-9. WTC ラットにおけるストレプトゾトシン(STZ) (60mg/kg)の投与前後の(A)LF 値、(B)HF 値および(C)LF/HF 比の STZ 投与後 20 日目までの変化の典型例。0day に STZ を投与。横軸の目盛りはそれぞれの日の 13 時。

A



B

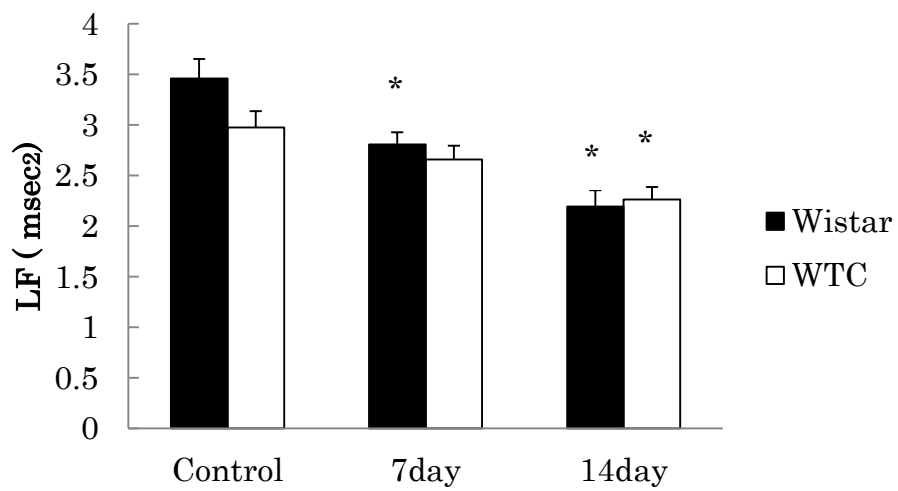


Fig. 5-10. Wistar ラット(n = 6)および WTC ラット(n = 6)における LF 値の(A) ストレプトゾトシン(STZ) (60mg/kg)投与後 20 日目までの経時的変化および (B) STZ 投与後 7、14 日目における比較。 * : $p < 0.05$ vs. control.

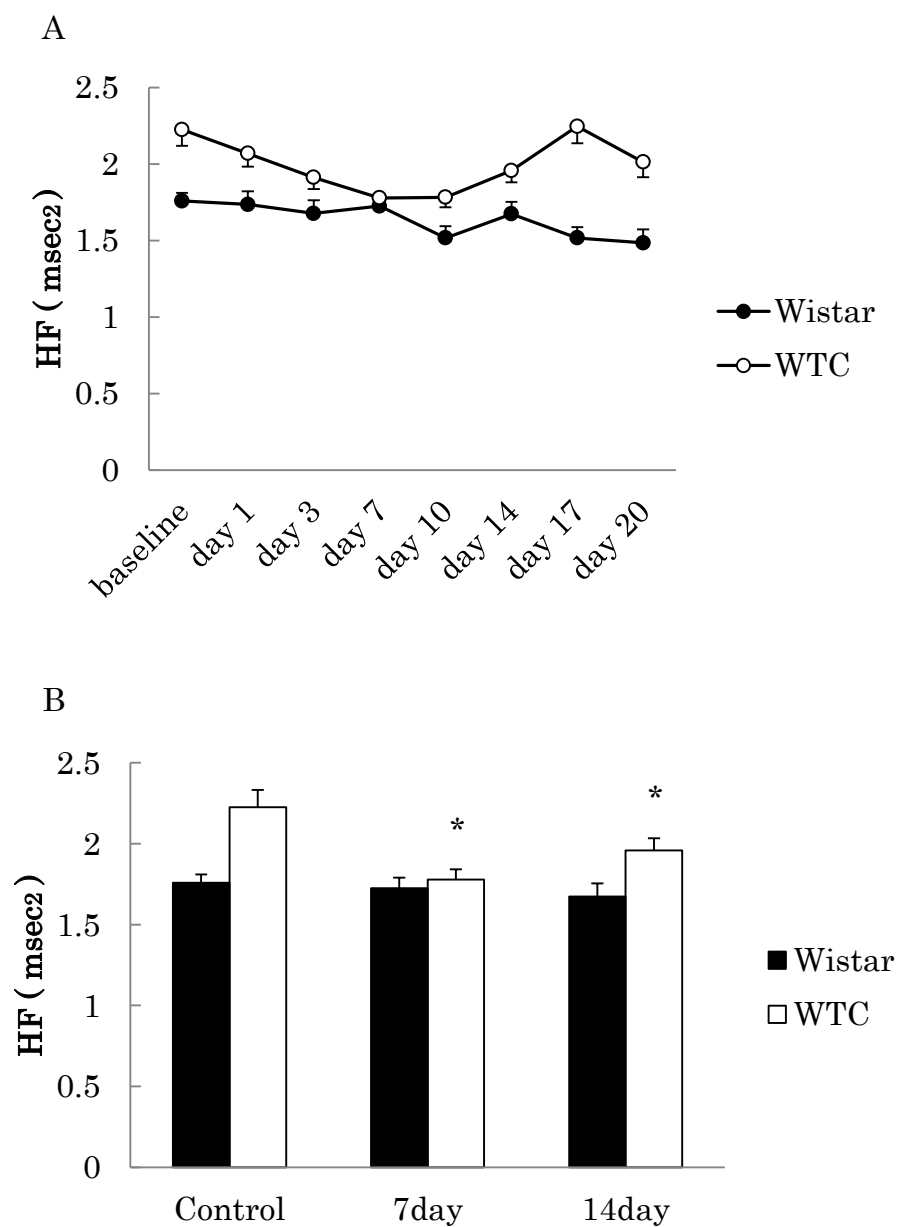


Fig. 5-11. Wistar ラット(n = 6)および WTC ラット(n = 6)における HF 値の(A) ストレプトゾトシン(STZ) (60mg/kg)投与後 20 日目までの経時的変化および (B) STZ 投与後 7、14 日目における比較。*: $p < 0.05$ vs. control.

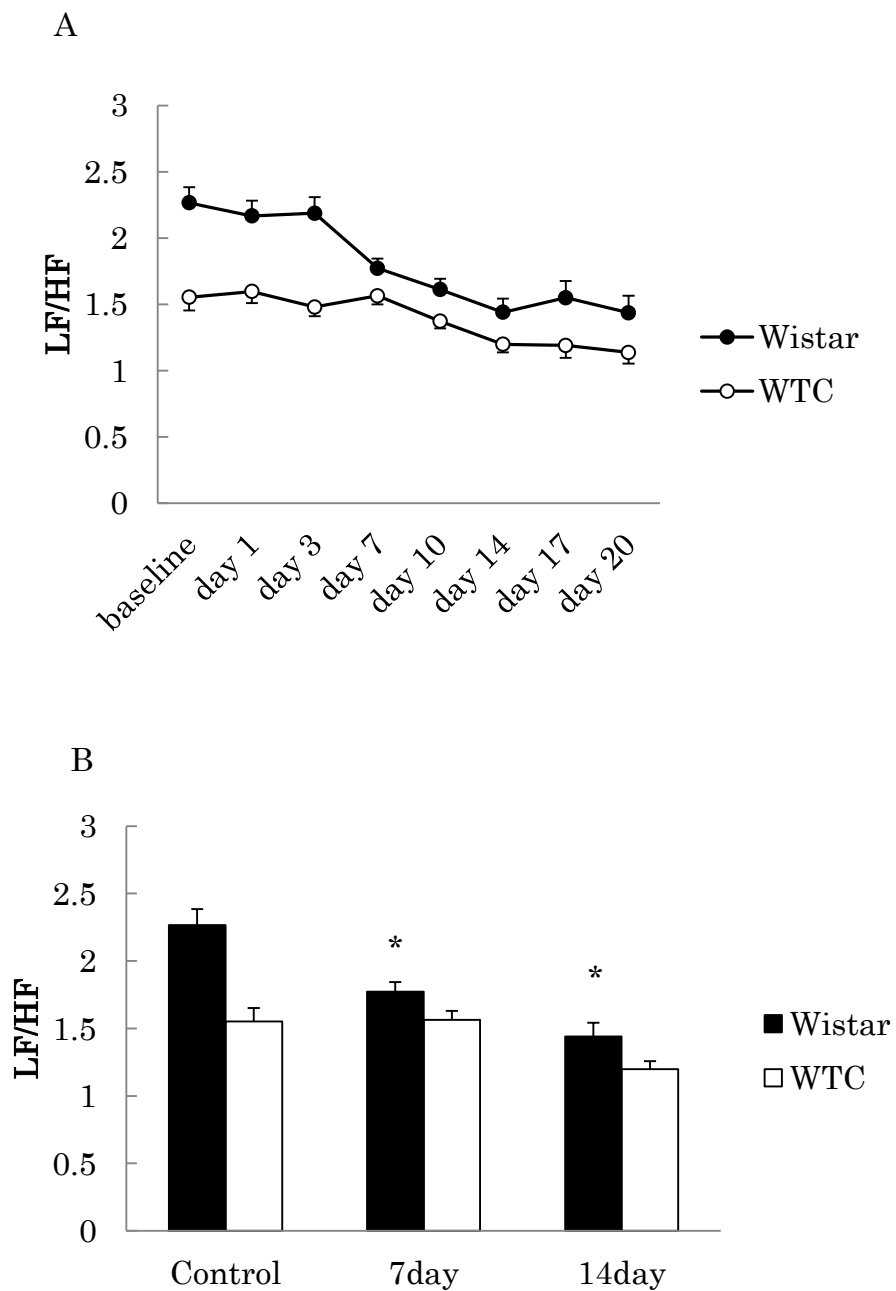
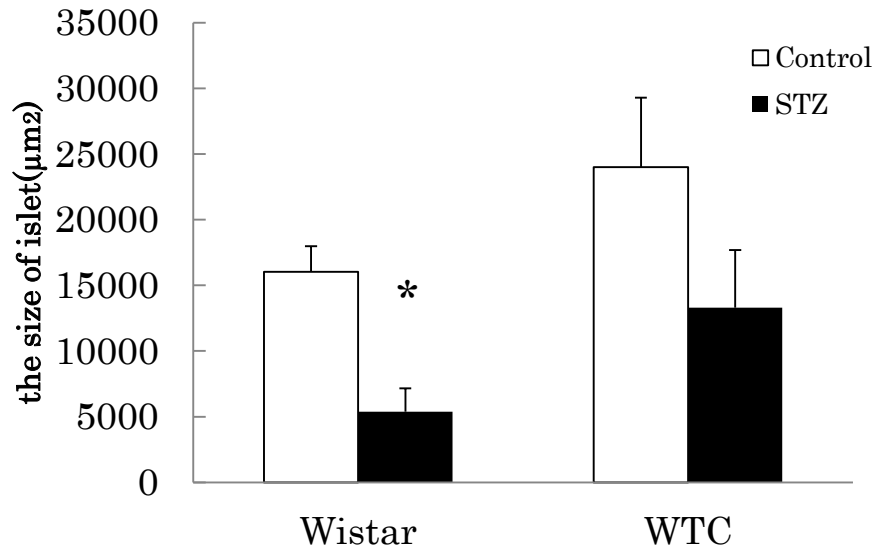


Fig. 5-12. Wistar ラット(n = 6)および WTC ラット(n = 6)における LF/HF の(A) ストレプトゾトシン(STZ) (60mg/kg)投与後 20 日目までの経時的変化および (B) STZ 投与後 7、14 日目における比較。* : $p < 0.05$ vs. control.

A



B

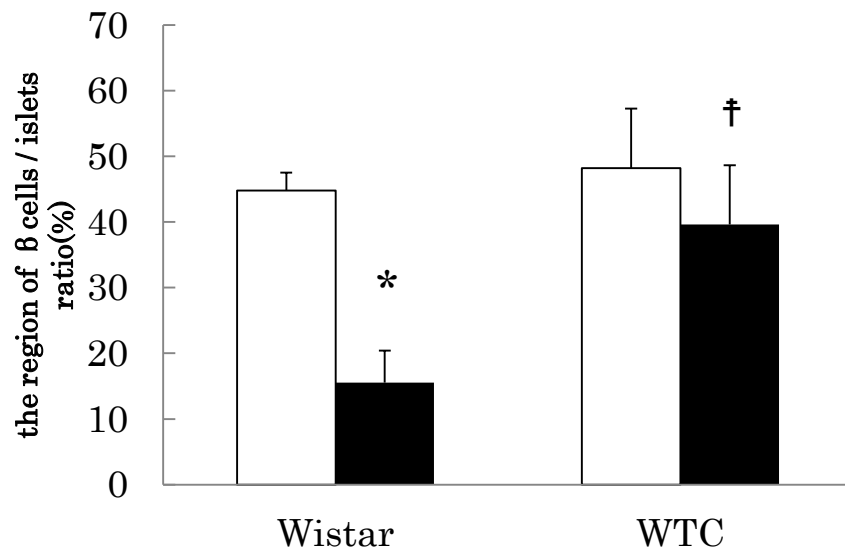
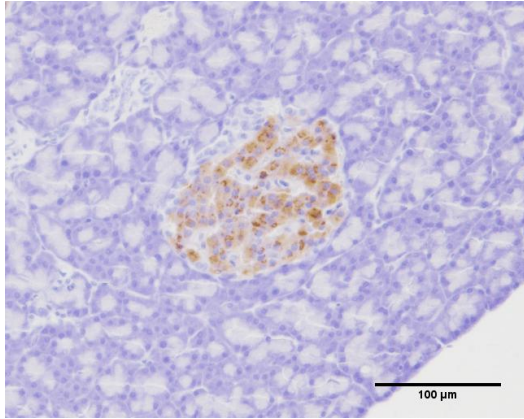


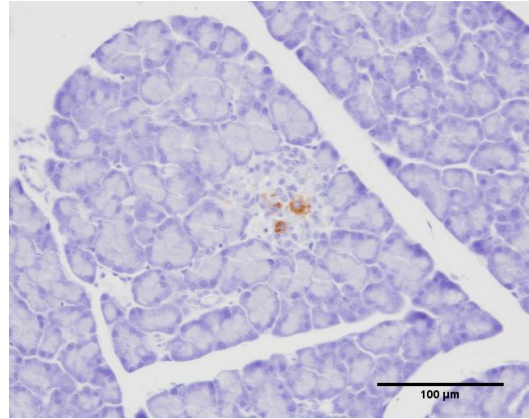
Fig. 5-13. Wistar ラット(対照群; n=3, STZ 投与群; n=3)およびWTC ラット(対照群; n=3, STZ 投与群; n=3)の対照群および STZ 投与群における(A)膵島 1 つ当たりの大きさ及び(B)膵島における β 細胞陽性を示す細胞の存在する領域。

* : $p < 0.05$ vs. control. † : $p < 0.05$ vs. Wistar

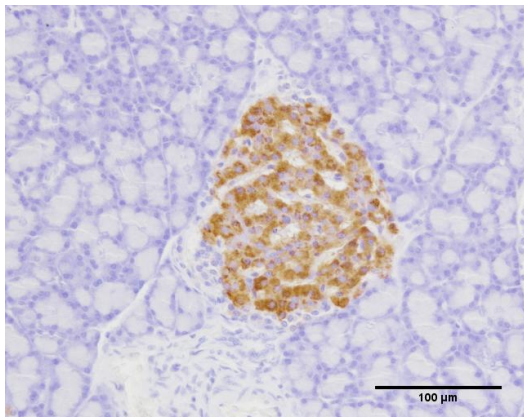
A



B



C



D

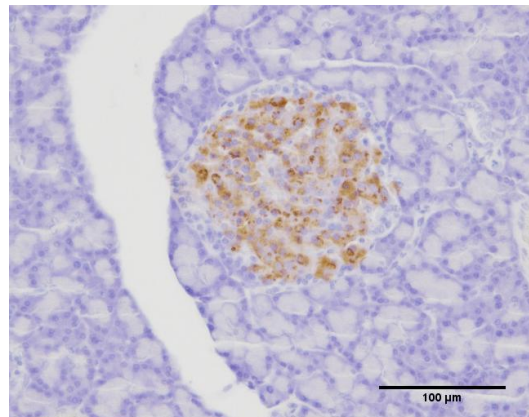


Fig. 5-14. インスリン免疫染色を行った膵組織像。

A : Wistar ラットの正常時

B : Wistar ラットの STZ 投与時

C : WTC ラットの正常時

D : WTC ラットの STZ 投与時

第 6 章

総括および結論

糖尿病の原因遺伝子として **KCNQ1** 遺伝子が同定され、リスクアレルと糖尿病の病態との詳細を明らかにするための予備実験として、自然発症性 **KCNQ1** 変異ラットである **WTC-deafness KYOTO** ラットのコントロール系である **WTC** ラットへの **STZ** 投与を行ったところ血糖値が上昇しない現象を発見した。さらに、ヒトの膵島は **STZ** に感受性が低いことから、**STZ** に対して抵抗性を持つラットの存在はヒトの膵島の機能の理解の手助けとなることで今後の糖尿病研究の発展に繋がる可能性を持っている。そこで、本研究は、**WTC** ラットにおける **STZ** に対する反応を詳細に検討し、**WTC** ラットが **STZ** 抵抗性を示す機序および **WTC** ラットの生体機能の特徴を明らかにすることを目的とした。

最初に、**WTC** ラットの **STZ** に対する感受性を詳細に検討すると共に、**STZ** に対する抵抗性の機序の一端を明らかにするために、インスリン分泌機構と糖代謝に関して検討した。**WTC** ラットはいずれの用量においても **STZ** による糖尿病の誘発が妨げられた。その理由として、膵β細胞における ATP 感受性 K チャネルをコードする **Kir6.2** の欠損や **GLUT2** の発現低下が **STZ** の膵β細胞への取り込みを抑制することで **STZ** 抵抗性をもたらすことが考えられたため、**GLUT2** および **Kir6.2** の遺伝子発現の検討を行った。その結果、どちらの遺伝子の発現量も **WTC** ラットと **Wistar** ラットとで有意な差は認められず、**WTC** ラットにおける **STZ** の取り込みは **Wistar** ラットと同様に行われていることが考えられた。次に、膵臓以外での糖代謝や膵β細胞の保護およびインスリン受容体の感受性増大に関与する **GLP-1** に着目し、**GLP-1** 濃度および **GLP-1R** の発現について検討した。その結果、**STZ** の投与により **Wistar** ラットの骨格筋において **GLP-1R** の発現が減少しており、**WTC** ラットにおいて、**Wistar** ラットと比較して、より一層糖代謝能に差が現れることが推察された。これらのことから、**WTC** ラットにおける **STZ** 抵抗性に関して、膵β細胞の内部における **STZ**

の細胞毒性に対する機能の関与が考えられた。

STZ により生成される活性酸素の詳細は不明であるが、アロキサンによって膵β細胞の破壊を導く活性酸素種として、スーパーオキシドアニオンから過酸化水素を経て、ヒドロキシラジカルが生成され、それが膵β細胞を破壊することがすでに報告されている。アロキサンの投与によっても STZ と同様に WTC ラットにおいて糖尿病が誘発されなかったことから、STZ による細胞傷害性にも、この経路がストレプトゾトシンによる糖尿病誘発機序に関わると考えた。そして、スーパーオキシドアニオンを過酸化水素に変換する SOD の発現量を検討したところ Wistar ラットにおいて発現量が高い結果が得られた。また、過酸化水素について、そこに重金属が存在すると過酸化水素と重金属が反応してヒドロキシラジカルが生成される。この時にメタロチオネインが重金属を無毒化することでヒドロキシラジカルの生成を抑制する機構がある。亜鉛は膵β細胞に多く存在しており、メタロチオネインの作用は重要と考えられる。さらに、糖代謝に重要な役割を果たす骨格筋や肝臓にも多く含まれていることからこれらの臓器においてもメタロチオネインの発現の検討を行ったところ、STZ の投与前には WTC ラットと Wistar ラットの間に発現の差は認められなかったが、STZ の投与により Wistar ラットにおいて肝臓および膵臓においてメタロチオネインの発現が減少していた。これらの結果から、WTC ラットにおいてはヒドロキシラジカルの産生が特に行われにくいことが考えられた。しかしながら、WTC ラットにおいてはスーパーオキシドアニオンが残存する傾向が強くなると推察される。だが、スーパーオキシドアニオンの酸化力はヒドロキシラジカルの酸化力と比較し、極めて弱いため、特にヒドロキシラジカルの生成が膵β細胞の破壊には重要であると考えられ、WTC ラットはこの特徴的な抗酸化機構が働くことで、STZ 抵抗性を示すことが考えられた。

しかしながら、これまでに示されたことは、WTC ラットにおいて、STZ に対して抵抗性を示すこととヒドロキシラジカルの産生が行われにくい特徴を持つことの相関があるということであり、その特徴により STZ 抵抗性を示すという決定的な根拠とはならない。そこで次に、活性酸素除去剤としてマンニトールまたはアスコルビン酸を Wistar ラットに投与することによって、活性酸素除去能を高めた状態に置き、STZ の投与を行う処置をした。結果として、活性酸素除去剤の前投与によって STZ の作用は抑制されたことから、WTC ラットにおいて、抗酸化能が高いために、STZ 抵抗性が発現した可能性が考えられる。しかしながら、マンニトールの投与においては STZ を投与しても、血糖値の上昇が全く認められなかったが、アスコルビン酸の投与を行った群に関しては STZ の投与により血糖値の有意な上昇が認められた。この違いは、マンニトールとアスコルビン酸が除去する活性酸素の種類に起因するものと考えられる。マンニトールはヒドロキシラジカル特異的なスカベンジャーであるが、アスコルビン酸は特にヒドロキシラジカルへの特異性はなく、活性酸素には広く全般的に作用する。

このことから、活性酸素を除去することで STZ の作用を抑制することができ、活性酸素の中でも特にヒドロキシラジカルの除去が STZ の作用の抑制に強く関わっていることが明らかとなった。以上のことから、WTC ラットにおける STZ 抵抗性の発現の機序は、WTC ラットにおける抗酸化能の高さに起因するものであると考えられた。

また、WTC ラットの生体機能に関してはほとんど検討されていないことから、循環系と自律神経系機能に関して STZ に対する影響も含め検討を加えた。また、正常時における WTC ラットの心拍数は Wistar ラットと比較して有意に少なかった。その要因として、副交感神経系機能が優位な特徴を有することが関与し

ているものと考えられた。また、STZ 投与に対する影響として、Wistar ラットでは心拍数、活動量が有意に低下し、明期に低く暗期に高いというげっ歯類の特徴である日内変動も不明瞭になるのに対して、WTC ラットではその影響が小さく、STZ に対しても抵抗性があることが認められた。マウスの STZ 誘発性糖尿病モデルにおいて心拍数の低下が、コリン作動性神経の節前線維もしくは神経節における神経伝達物質の機能低下に起因すると報告されていることから、副交感神経系機能が優位である WTC ラットの特性は、糖尿病合併症の一つである自律神経障害の見地からも、糖尿病合併症の発症機構を詳細に検討する上で、興味深いモデル動物となることが期待される。

以上の結果から、WTC ラットの STZ に対する抵抗性は、SOD の発現が少なく、メタロチオネインの発現が安定していることにより酸化力がきわめて高いヒドロキシラジカルの産生抑制機構を有するためであること、加えて STZ による細胞傷害性の活性酸素種としてヒドロキシラジカルの重要性を明らかにした。STZ に対する抵抗性を同様に有するウサギやヒトにおける機序の詳細はいまだ不明であるが、糖尿病発症の見地からヒトの膵島の機能を理解する上で抗酸化機構を視点に加え研究を発展させることは、新たな予防法や治療法の開発においても重要な役割を果たすことが考えられた。

引用文献

M.S. Akash, K. Rehman, S. Chen. Goto-kakizaki rats: Its suitability as non-obese diabetic animal model for spontaneous type 2 diabetes mellitus, *Curr. Diabetes Rev.* 9 (2013) 387-396.

S. Bisht, S.S. Sisodia. Assessment of antidiabetic potential of cinnamomum tamala leaves extract in streptozotocin induced diabetic rats, *Indian. J. Pharmacol.* 43 (2011) 582-585.

H.J. Bromme, W. Morke, E. Peschke. Transformation of barbituric acid into alloxan by hydroxyl radicals: Interaction with melatonin and with other hydroxyl radical scavengers, *J. Pineal Res.* 33 (2002) 239-247.

J.E. Campbell, D.J. Drucker. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action, *Cell. Metab.* 17 (2013) 819-837.

C.J. Dillard, K.J. Kunert, A.L. Tappel. Effects of vitamin E, ascorbic acid and mannitol on alloxan-induced lipid peroxidation in rats, *Arch. Biochem. Biophys.* 216 (1982) 204-212.

D.J. Drucker. The role of gut hormones in glucose homeostasis, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 24-32.

J. Duprez, L.P. Roma, A.F. Close, J.C. Jonas. Protective antioxidant and antiapoptotic effects of ZnCl₂ in rat pancreatic islets cultured in low and high glucose concentrations, PLoS One 7 (2012) e46831.

A. Duttaroy, F. Voelker, K. Merriam, X. Zhang, X. Ren, K. Subramanian, T.E. Hughes, B.F. Burkey. The DPP-4 inhibitor vildagliptin increases pancreatic beta cell mass in neonatal rats, Eur. J. Pharmacol. 650 (2011) 703-707.

A. El-Mahmoudy, Y. Shimizu, T. Shiina, H. Matsuyama, M. El-Sayed, T. Takewaki. Successful abrogation by thymoquinone against induction of diabetes mellitus with streptozotocin via nitric oxide inhibitory mechanism, Int. Immunopharmacol. 5 (2005) 195-207.

S. Enami, Y. Sakamoto, A.J. Colussi. Fenton chemistry at aqueous interfaces, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111 (2014) 623-628.

G.V. Gnoni, A.M. Giudetti, E. Mercuri, F. Damiano, E. Stanca, P. Priore, L. Siculella. Reduced activity and expression of mitochondrial citrate carrier in streptozotocin-induced diabetic rats, Endocrinology 151 (2010) 1551-1559.

H. Gohma, T. Kuramoto, M. Kuwamura, R. Okajima, N. Tanimoto, K. Yamasaki, S. Nakanishi, K. Kitada, T. Makiyama, M. Akao, T. Kita, M. Sasa, T. Serikawa. WTC deafness kyoto (dfk): A rat model for extensive investigations of Kcnq1 functions, Physiol. Genomics 24 (2006) 198-206.

P.M. Harrison, P. Arosio. The ferritins: Molecular properties, iron storage function and cellular regulation, *Biochim. Biophys. Acta* 1275 (1996) 161-203.

K.K. Hicks, E. Seifen, J.R. Stimers, R.H. Kennedy. Effects of streptozotocin-induced diabetes on heart rate, blood pressure and cardiac autonomic nervous control, *J. Auton. Nerv. Syst.* 69 (1998) 21-30.

M. Hosokawa, W. Dolci, B. Thorens. Differential sensitivity of GLUT1- and GLUT2-expressing beta cells to streptozotocin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289 (2001) 1114-1117.

F.C. Howarth, M. Jacobson, O. Naseer, E. Adeghate. Short-term effects of streptozotocin-induced diabetes on the electrocardiogram, physical activity and body temperature in rats, *Exp. Physiol.* 90 (2005) 237-245.

F.C. Howarth, M. Jacobson, M.A. Qureshi, M. Shafiullah, R.S. Hameed, E. Zilahi, A. Al Haj, N. Nowotny, E. Adeghate. Altered gene expression may underlie prolonged duration of the QT interval and ventricular action potential in streptozotocin-induced diabetic rat heart, *Mol. Cell. Biochem.* 328 (2009) 57-65.

F.C. Howarth, M. Jacobson, M. Shafiullah, E. Adeghate. Effects of insulin treatment on heart rhythm, body temperature and physical activity in

streptozotocin-induced diabetic rat, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33 (2006) 327-331.

B. Kushner, M. Lazar, M. Furman, T.W. Lieberman, I.H. Leopold. Resistance of rabbits and guinea pigs to the diabetogenic effect of streptozotocin, *Diabetes* 18 (1969) 542-544.

M. Kuwahara, K. Yayou, K. Ishii, S. Hashimoto, H. Tsubone, S. Sugano. Power spectral analysis of heart rate variability as a new method for assessing autonomic activity in the rat, *J. Electrocardiol.* 27 (1994) 333-337.

A.M. Mabe, D.B. Hoover. Remodeling of cardiac cholinergic innervation and control of heart rate in mice with streptozotocin-induced diabetes, *Auton. Neurosci.* 162 (2011) 24-31.

T. Miki, K. Nagashima, F. Tashiro, K. Kotake, H. Yoshitomi, A. Tamamoto, T. Gono, T. Iwanaga, J. Miyazaki, S. Seino. Defective insulin secretion and enhanced insulin action in KATP channel-deficient mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 10402-10406.

T. Nishikawa, D. Edelstein, X.L. Du, S. Yamagishi, T. Matsumura, Y. Kaneda, M.A. Yorek, D. Beebe, P.J. Oates, H.P. Hammes, I. Giardino, M. Brownlee. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage, *Nature* 404 (2000) 787-790.

J.R. Oliver, T.W. Mara, M.G. Cherian. Impaired hepatic regeneration in metallothionein-I/II knockout mice after partial hepatectomy, *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 230 (2005) 61-67.

L. Park, D. Min, H. Kim, J. Park, S. Choi, Y. Park. The combination of metallothionein and superoxide dismutase protects pancreatic beta cells from oxidative damage, *Diabetes Metab. Res. Rev.* 27 (2011) 802-808.

K. Rajewsky, H. Gu, R. Kuhn, U.A. Betz, W. Muller, J. Roes, F. Schwenk. Conditional gene targeting, *J. Clin. Invest.* 98 (1996) 600-603.

P.R. Ryle, J. Barker, P.A. Gaines, A.D. Thomson, J. Chakraborty. Alloxan-induced diabetes in the rat - protective action of (-) epicatechin? *Life Sci.* 34 (1984) 591-595.

B. Sauer, N. Henderson. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the cre recombinase of bacteriophage P1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85 (1988) 5166-5170.

B. Shen, R.G. Jensen, H.J. Bohnert. Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals, *Plant Physiol.* 115 (1997) 527-532.

B. Shen, R.G. Jensen, H.J. Bohnert. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts,

Plant Physiol. 113 (1997) 1177-1183.

T. Szkudelski. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas, *Physiol. Res.* 50 (2001) 537-546.

B. Thorens, H.K. Sarkar, H.R. Kaback, H.F. Lodish. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells, *Cell* 55 (1988) 281-290.

H. Unoki, A. Takahashi, T. Kawaguchi, K. Hara, M. Horikoshi, G. Andersen, D.P. Ng, J. Holmkvist, K. Borch-Johnsen, T. Jorgensen, A. Sandbaek, T. Lauritzen, T. Hansen, S. Nurbaya, T. Tsunoda, M. Kubo, T. Babazono, H. Hirose, M. Hayashi, Y. Iwamoto, A. Kashiwagi, K. Kaku, R. Kawamori, E.S. Tai, O. Pedersen, N. Kamatani, T. Kadowaki, R. Kikkawa, Y. Nakamura, S. Maeda. SNPs in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes in east asian and european populations, *Nat. Genet.* 40 (2008) 1098-1102.

J.J. VAVRA, C. DEBOER, A. DIETZ, L.J. HANKA, W.T. SOKOLSKI. Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic, *Antibiot. Annu.* 7 (1959) 230-235.

A. Velangi, G. Fernandes, T.M. Wolever. Evaluation of a glucose meter for determining the glycemic responses of foods, *Clin. Chim. Acta* 356 (2005) 191-198.

D.R. Whiting, L. Guariguata, C. Weil, J. Shaw. IDF diabetes atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 94 (2011) 311-321.

J. Xu, L. Zhang, A. Chou, T. Allaby, G. Belanger, J. Radziuk, B.J. Jasmin, T. Miki, S. Seino, J.M. Renaud. KATP channel-deficient pancreatic beta-cells are streptozotocin resistant because of lower GLUT2 activity, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294 (2008) E326-35.

H. Yang, J.R. Wright Jr. Human beta cells are exceedingly resistant to streptozotocin in vivo, *Endocrinology* 143 (2002) 2491-2495.

K. Yasuda, K. Miyake, Y. Horikawa, K. Hara, H. Osawa, H. Furuta, Y. Hirota, H. Mori, A. Jonsson, Y. Sato, K. Yamagata, Y. Hinokio, H.Y. Wang, T. Tanahashi, N. Nakamura, Y. Oka, N. Iwasaki, Y. Iwamoto, Y. Yamada, Y. Seino, H. Maegawa, A. Kashiwagi, J. Takeda, E. Maeda, H.D. Shin, Y.M. Cho, K.S. Park, H.K. Lee, M.C. Ng, R.C. Ma, W.Y. So, J.C. Chan, V. Lyssenko, T. Tuomi, P. Nilsson, L. Groop, N. Kamatani, A. Sekine, Y. Nakamura, K. Yamamoto, T. Yoshida, K. Tokunaga, M. Itakura, H. Makino, K. Nanjo, T. Kadowaki, M. Kasuga. Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus, *Nat. Genet.* 40 (2008) 1092-1097.

B. Ye, W. Maret, B.L. Vallee. Zinc metallothionein imported into liver mitochondria modulates respiration, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001)

2317-2322.

大阪武雄, 日本化学会 『活性酸素』 丸善, p.27 (1999)

謝辞

本研究を遂行するに至り、多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻獣医衛生学教室教授・桑原正貴博士、食と生体機能モデル学教室准教授・伊藤公一博士に心より感謝申し上げます。本研究に不可欠な WTC ラットを提供してくださいました京都大学大学院医学研究科付属動物実験施設に感謝いたします。本研究の実験に際して、快く実験機器や実験の場を提供してくださったのみならず、多くの貴重なご助言を賜りました、東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物学教室の皆様、同獣医生理学教室の皆様、繁殖育種学教室の皆様、獣医病理学教室の皆様に感謝申し上げます。また、多大なるご支援、ご助言を賜りました獣医衛生学教室各位の皆様に厚くお礼申し上げます。最後に、本研究の材料となった動物に心から感謝するとともに、ご冥福をお祈りいたします。