

博士論文

血管内皮細胞における IRS2 は
インスリン分泌に重要な役割を果たす

橋本 信嗣

血管内皮細胞における IRS2 は
インスリン分泌に重要な役割を果たす

所属：糖尿病・代謝内科

指導教員：門脇 孝

申請者名：橋本 信嗣

目次

1	要旨	2
2	序文	3
3	方法	11
4	結果	18
5	考察	39
6	謝辞	50
7	引用文献	51

1 要旨

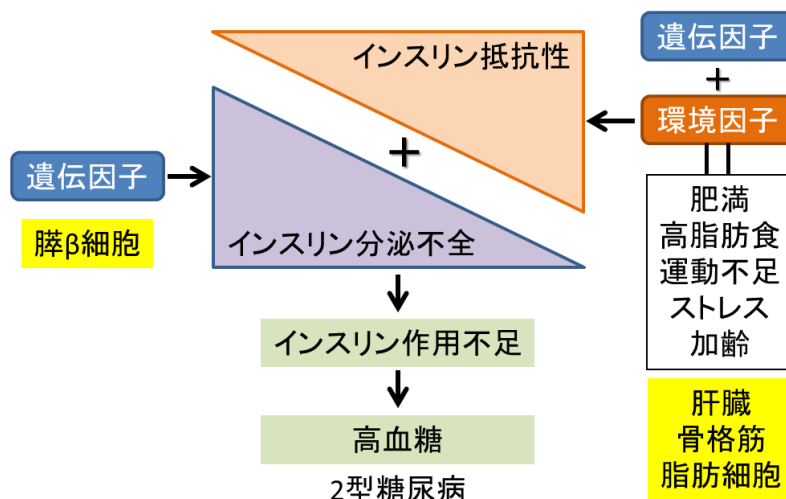
近年、血管内皮細胞が膵β細胞機能やインスリン分泌に重要な役割を果たしていることが報告されている。本研究では、血管内皮細胞における Insulin receptor substrate (IRS) 2 の膵β細胞機能に対する役割を解明すべく、血管内皮細胞特異的 IRS2 欠損 (ETIrs2KO)マウスを用いて検討を行った。ETIrs2KO マウスは膵β細胞機能そのものには異常を認めなかったが、膵島血流量とインスリン分泌が野生型マウスに比して低下していることを明らかにした。さらに、ACE 阻害剤により膵島血流量を改善することで、インスリン分泌が改善することを明らかにした。本研究結果は、血管内皮細胞における IRS2 発現量低下に伴った膵島血流量の減少が、インスリン分泌不全を発症する原因の1つであることを明らかにした。

2 序文

現在、わが国では 2 型糖尿病患者の数が増加の一途をたどっており、最新の厚生労働省の「患者調査」によると糖尿病患者数は 316 万 6,000 人となり、過去最高となっている。さらに、「糖尿病が強く疑われる者」は約 950 万人、「糖尿病の可能性を否定できない者」を合わせると約 2,050 万人にもものぼるといわれている。2 型糖尿病は、遺伝素因に、過食、運動不足、肥満などの環境因子が加わり、インスリン分泌不全とインスリン抵抗性という 2 つの大きな要因が単独または相互に関連し発症する疾患である (1, 2)。日本人は遺伝因子として欧米人に比べてインスリンの分泌能が低いうえ (約 1/2 ともいわれる)、環境因子として急速に進んだ食生活の欧米化や運動不足により肥満や内臓脂肪の蓄積にともなうインスリン抵抗性が進んだ結果、相対的なインスリンの作用不足に陥り 2 型糖尿病の急増にいたっていると考えられている。インスリン分泌不全は遺伝因子などによる膵 β 細胞量と機能の欠損が関与していると考えられ、インスリン抵抗性は過食、運動不足による肥満・内臓脂肪の増加などの環境因子、遺伝因子の両方が関与していると考えられている (図 2-1)。インスリン抵抗性の程度に応じて膵 β 細胞の機能やその量が代償的に亢進・増加し、必要とするインスリン量を供給することで通常は血糖値が維持される。しかしながら、このインスリンの代償的過剰分泌が膵 β 細胞の疲弊を招き、インスリン分泌障

害を経て 2 型糖尿病を発症すると考えられている (3)。

2 型糖尿病の病態発症因子

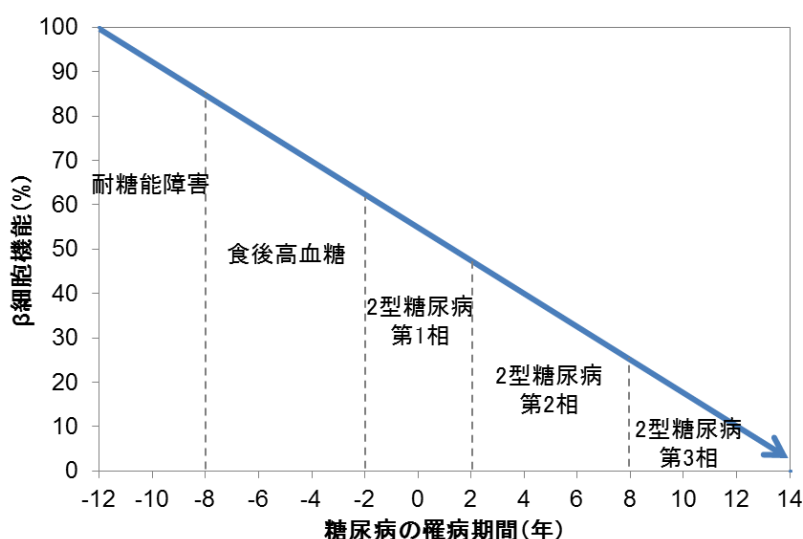


(図 2-1)

英国で実施された UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) の臨床試験結果から、高血糖症状で 2 型糖尿病と診断されるときには、インスリンを分泌する膵β細胞の機能が正常に比べて 50%も減少していることが報告されている (図 2-2) (4, 5)。また、そもそも 2 型糖尿病の発病 (膵β細胞機能が低下する始まり) は、その診断がくだされる 10 年前、あるいはそれ以上も前から始まっていると考えられている。膵β細胞の量と機能の欠損が 2 型糖尿病の特徴とされ、2 型糖尿病における膵β細胞の量は、健常人に比して 20~40%減少していると考えられているが、一方でインスリン分泌量は 80%以上も減少していることが知られている。つまり、2 型糖尿病では、膵β細胞量の減少だけではなく、膵β細胞機能不全もしくはそれに加

えた何らかの理由でインスリン分泌不全が起きていることを示唆している。

β細胞機能と糖尿病の罹病期間



(引用文献 5 より改変)

(図 2-2)

膵島は膵臓全体の 1~2%の体積しか占めないが、血管網が非常に発達しており膵臓全体の 5~10%もの血流を受けている非常に血流が豊富な器官であることが知られている (図 2-3) (6)。更に、膵臓表面に存在する膵島の酸素分圧は 40 mmHg 程あり、他の組織に比べて非常に高い圧力にさらされていることが知られている (7, 8)。これは膵β細胞が適切にグルコースを感知し、代謝するために必要な酸素が供給されているためであると考えられている (9, 10)。また、その高い血管密度は、膵β細胞の再生 (11, 12) や膵島から分泌されるホルモンを即座に全身に循環させるた

めに重要であるとも考えられている。近年、膵島に流れ込む血流量とインスリン分泌量の間は何らかの関係性があることを示唆する研究結果がいくつか報告されている。岩瀬らのグループは、グルコースやSU剤などのインスリン分泌を誘発する物質が膵島血流量を増加させることや、膵島血流量とインスリン分泌量との間に相関関係があることを示している(13)。さらに、renin-angiotensin system (RAS) 阻害作用を有する angiotensin-converting enzyme (ACE) 阻害剤や angiotensin II receptor 阻害剤 (ARB) は膵島血流量を増加させることで、グルコース応答性インスリン分泌を増強させ、耐糖能異常を改善することが報告されている(14-16)。また、RAS 阻害剤に加えて、いくつかの血管拡張剤が膵島血流量を増加し、耐糖能異常を改善することも報告されている(17, 18)。これらの結果は、インスリン分泌量は膵島血流量によっても調節されていることを示唆している。また、2型糖尿病における膵島血流量に関する文献報告もなされている。例えば、2型糖尿病モデルラットである GK ラットにおいては、12週齢では正常ラットに比して膵島血流量が増加しているのに対し、52週齢の末期の糖尿病状態においては正常ラットに比して膵島血流量が顕著に低下していることが報告されている(19)。さらに、2型糖尿病モデルマウスである ob/ob マウスにおいても、1ヶ月齢の膵島血流量は正常マウスに比して高値を示すのに対し、糖尿病が進展した6~7ヶ月齢においては顕著に低下していることが報告されている(20)。これらの結果から、2型糖尿病の病態においてもインスリン分泌と膵島血流

量の間に何らかの関係があることが示唆されるが、明確な関係性は明らかにされていない。

ラット膵島を用いた腐食標本の電子顕微鏡写真



(引用文献 21 より転載)

(図 2-3)

我々は以前、インスリンシグナルにおいて重要な役割を担うインスリン受容体基質 (insulin receptor substrate (IRS))₂ を血管内皮細胞に特異的に欠損した (ETIrs2KO) マウスを作成した (22)。本マウスでは、血管内皮細胞において血管拡張作用をもつ nitric oxide (NO) を産生する酵素である内皮型 NO 合成酵素のインスリンによる活性化が約 1/3~1/4 に低下しており、グルコースクランプ法によりインスリン感受性

を測定したところ骨格筋においてインスリンによる糖の取り込みが有意に低下していることを明らかにしている。さらに、マイクロバブルを用いて毛細血管の拡張能について評価したところ、野生型マウスで認められたインスリンによる血管拡張が、ETIrs2KO マウスでは有意に障害されていることも明らかにしている。以上の結果から、ETIrs2KO マウスではインスリンによる内皮型 NO 合成酵素の活性化が十分に起こらないため、毛細血管の拡張や骨格筋間質へのインスリンの移行が障害され、骨格筋におけるインスリン依存性の糖の取り込みが低下していることを明らかにした。さらに、肥満・2型糖尿病モデルマウスとして8週間にわたり高脂肪食を負荷したマウスの血管内皮細胞における IRS2 の発現を調べたところ、野生型マウスに比して約1/4まで低下していることを明らかにした。また、インスリンによる内皮型 NO 合成酵素の活性化を調べたところ、ETIrs2KO マウスと同様に約1/3まで低下していることがわかった。高インスリン血症を呈する肥満・2型糖尿病状態では、インスリンシグナルの活性化により SREBP (sterol regulatory element binding protein) の産生が誘導され、この SREBP が IRS2 遺伝子のプロモーター部位に結合することで、IRS2 遺伝子の発現を抑制することが報告されている (23)。また、インスリンシグナルの下流に存在する転写因子である Forkhead transcriptional factor (FOXO) が、インスリンシグナルの活性化により不活化することで、IRS2 遺伝子の転写活性が低下することも報告されている (24)。これらの結果から、2型糖尿病では血管内皮細胞における

インスリン受容体基質，特に **IRS2** の発現量が低下しているため，食後にインスリンが分泌されてもそのシグナルは十分に伝達されずに内皮型 **NO** 合成酵素の活性化が低下し，毛細血管の拡張や骨格筋間質へのインスリンの移行が正常に起こらず骨格筋における糖の取り込みが障害されているものと結論付けた。

これまでの研究結果から，私は 2 型糖尿病に伴う血管内皮細胞の **IRS2** の発現量低下が膵島血流量の低下を引き起こし，その結果インスリン分泌の低下が起こるのではないかとの仮説を立てた。糖尿病の発症要因となるインスリン分泌不全に陥るメカニズムを解明することは，急増する糖尿病を制御する上で重要な研究テーマである。また，これまでの膵島血流量とインスリン分泌に関する研究報告を概観すると，膵島血流量が増加することでインスリン分泌が増加することは明らかにされている。しかしながら，膵島血流量の低下がインスリン分泌におよぼす影響については明確にされていない。

そこで本研究では，現在急増している 2 型糖尿病におけるインスリン分泌不全メカニズムを解明すべく，血管内皮機能障害を呈する **ETIrs2KO** マウスの膵 β 細胞機能およびインスリン分泌に関して解析を行った。その結果，血管内皮細胞の **IRS2** の発現量低下に伴う膵島血流量の低下によってインスリン分泌が低下すること，また，

血管内皮細胞に発現する **IRS2** がインスリン分泌に極めて重要な役割を果たしている
ことを見出した。

3 方法

動物

血管内皮細胞特異的に IRS2 遺伝子を欠損した ETIrs2KO マウスは、既に我々が樹立したものを用いた (22)。C57BL/6J マウスについては、日本クレア社から購入した。動物は 12 時間毎の明暗サイクルのもと、自由摂餌および自由給水にて飼育した。すべての実験には雄性動物を用いた。また、すべての動物実験は東京大学動物実験実施マニュアルに従い実施した。

in vivo インスリン分泌試験

実験に使用する動物はインスリン分泌実験 16 時間前 (前日の 19 時) より絶食を行った。グルコース負荷試験では、グルコース (Wako, Tokyo, Japan) を 3.0 g/kg で腹腔内に単回投与した。アルギニン、グルカゴン負荷インスリン分泌試験では、2.1 g/kg のアルギニン (Wako, Tokyo, Japan) もしくは 10 mg/kg のグルカゴン (Glucagon G Novo, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) を腹腔内に投与した。血糖値は、尻尾より採取した血液を用い自動血糖測定器 (Glutest Pro, Sanwa Kagaku Kenkyusho, Nagoya, Japan) により測定した。また、採取した血漿を用い、Insulin radioimmunoassay (RIA) kit (Institute of Isotopes, Budapest, Hungary) にて血漿インスリン値の測定を行った。

単離膵島を用いたインスリン分泌試験

マウスの膵島は、コラゲナーゼ法により単離した (25)。単離膵島を用いたインスリン分泌試験は、0.2 % BSA 含有 krebs-ringer bicarbonate (KRB) buffer (129 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 2.5 mM CaCl₂, 5 mM NaHCO₃, and 10 mM HEPES; pH7.4) を用いた static incubation 法にて実施した。static incubation 法では、採取した 10 個の膵島を 500 μ l の 2.8 mM グルコース含有 KRB buffer にて、37°C で 30 分間静置した後に、それぞれのグルコース濃度を含有した KRB buffer にて、37°C で 60 分間静置した。上清を回収し、Insulin RIA kit を用いてインスリン量の測定を行った。また、採取した膵島を acid-ethanol solution (0.38 M HCl, 74% Ethanol) に移し、-30°C で一晩培養して溶解させた後に膵島のインスリン含量を Insulin RIA kit を用いて測定した。さらに DNA 含量を DNA assay kit (PicoGreen, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて測定した。

膵島灌流実験

膵島による継時的なインスリン分泌量を評価するため、膵島灌流実験を行った。単離した膵島は大きさを基準に群わけを行い、それぞれのカラムに 50 個ずつ移した。カラムは 37°C のウォーターバス内に移し、温度を 37°C の一定に保った。さらに、37°C

に保った 2.8 mM 含有 KRB buffer を 0.6 ml/min で 30 分間灌流し、その後 22.2 mM 含有 KRB buffer に変更して灌流を行った。灌流液は 2 分毎に採取し、インスリンを Insulin RIA kit を用いて測定した。

定量 PCR 法

膝島からの Total RNA の採取は、RNeasy kit (QIAGEN Sciences, Maryland, USA) を用いて行った。RQ1 RNase-free DNase (Promega, Madison, WI) による DNA の除去を行った後に、cDNA を MultiScribe reverse transcriptase (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて合成した。Insulin1, Insulin2 および Cyclophilin 遺伝子の発現量は、ABI Prism 7900 PCR system (Applied Biosystems) を用い、TaqMan quantitative PCR (50°C for 2 min, 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 1 min) により定量した。プライマーおよびプローブは Applied Biosystems 社から購入した。遺伝子発現量は、ハウスキーピング遺伝子である Cyclophilin との発現量比で算出した。

膝島の組織学的評価

単離した膝島を 4 % paraformaldehyde (Wako, Tokyo, Japan) にて 4°C で一晩培養することにより固定した後、パラフィン包埋した。4 μ m の厚みで薄切した後に、シリコーティングされたガラススライド (Matsunami, Tokyo, Japan) に貼り付けた。膝

臓切片を anti-rabbit insulin antibodies (diluted 1:200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) にて免疫染色した。染色画像を CCD カメラ (Olympus, Tokyo, Japan) により撮影した後に, Win ROOF software (Mitani, Chiba, Japan) を用いて解析し, 膵島面積を算出した。動物 1 匹あたり 50 個以上の膵島を用いて解析を行った。

BrdU 取り込みは, BrdU (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を 100 mg/kg で腹腔内に単回投与した 6 時間後に膵臓を採取し, anti-BrdU antibody (diluted 1:200; Dako, Glostrup, Denmark) を用いて免疫染色を行った (26)。BrdU 陽性細胞数は, 全膵 β 細胞数に占める割合から算出した。動物 1 匹あたり 50 個以上の膵島を観察し, 解析を行った。

pimonidazole 染色は, pimonidazole を 60 mg/kg で単回尾静注した 2 時間後に膵臓を採取し, anti-pimonidazole antibody (diluted 1:100; Hypoxyprobe, Burlington, MA) を用いて免疫染色を行った (27)。pimonidazole 陽性細胞数は, 全膵 β 細胞数に占める割合から算出した。動物 1 匹あたり 50 個以上の膵島を用いて解析を行った。

膵臓を用いた灌流実験

実験に使用する動物は, 16 時間前より絶食を行った。ネンブタール麻酔下にて腸間膜および腎動脈を結紮した後に, 大動脈を横隔膜の下で結紮した。灌流液を大動脈に留置したカテーテルから 1 ml/min で流入し, 門脈から回収した (28)。灌流液には, 4.6 % dextran および 0.25 % BSA 含有 KRB HEPES buffer を用い, 95 % O₂ / 5 %

CO₂ ガスを用いて酸素濃度を一定に保った。グルコース濃度を 2.8 mM から 22.2 mM に増加させ、インスリン分泌を評価した。灌流液に含まれるインスリン量は、Insulin RIA kit を用いて測定した。

血流量評価

ネンブタール麻酔下にて、ポリエチレンカテーテルチューブ (PE10; BD, Franklin Lakes, NJ) を右頸動脈と大腿動脈にそれぞれ挿入した。非観血式血圧計 (Muromachi Kikai, Tokyo, Japan) にて血圧を測定し、安定していることを確認した後に直径 10 μm の非放射性カラードマイクロソフィア (Dye-Trak; Triton Technology, Los Angeles, CA) を 10 秒間、右頸動脈に留置したカテーテルから 0.6 ml/min (2.5×10^6 個/ml) にて投与した。マイクロソフィア投与の 5 秒前より 60 秒間、大腿動脈から血液を採取した (~0.50 mL/min)。各臓器を採取して重量を測定した後に暗視野顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いた freeze-thawing technique 法 (29) により腓島に存在するマイクロソフィアの数のカウントした。血液および各組織に含まれるマイクロソフィアの数、血液は 16 N KOH、各組織は 2 % tween80 含有 4 N KOH により溶解させた後にフィルター (GE Healthcare, Tokyo, Japan) を用いてマイクロソフィアを回収してカウントした。各組織における血流量は、以下の計算式で算出した。

$$Q_{org} = Q_{ref} \times N_{org} / N_{ref}$$

Q_{org} は組織の血流量 (mL/min), Q_{ref} は大腿動脈から回収した血液量 (mL/min), N_{org} は組織に残存したマイクロソフィア数, N_{ref} は回収した血液に含まれるマイクロソフィア数を示す。副腎に含まれるマイクロソフィア数をコントロールとし、左右それぞれの副腎に含まれるマイクロソフィア数が 10%以上異なった場合は、マイクロソフィアが適切に全身に循環していなかったと判断し、データとして採用しなかった (29)。

インスリンの膵島血流量に及ぼす影響を測定するため、0.75 U/kg のインスリン (Humulin R) を腹腔内に単回投与し、その 10 分後に膵島血流量を測定した (30)。血糖は、マイクロソフィアを投与する直前に自動血糖測定器 (Glutest Pro, Sanwa Kagaku Kenkyusho, Nagoya, Japan) により測定した。

エナラプリルによる膵島血流量およびグルコース応答性インスリン分泌に対する影響を評価するため、エナラプリル (Wako, Tokyo, Japan) を 100 μ g/kg (0.1 ml/body) で尾静脈に単回投与した。対照群には同量の溶媒 (生理食塩水) を投与した。

レクチン染色による血管の組織学的評価

レクチンは、血管内皮細胞特異的に結合することが知られている。蛍光ラベル化されたレクチン (Lycopersicon Esculentum; Vector, Burlingame, CA) をマウスの尾静脈から単回投与し (1 mg/mL, 0.1 mL/mouse), 3 分間放置した後に膵臓を単離した。4%

paraformaldehyde を用いた 16 時間, 4°C での固定の後, 30 % スクロースにて処置し, 凍結組織切片作製用包埋剤 (SAKURA SEIKI, Tokyo, Japan) を用いて包埋した。15 μm の厚みで薄切を行った後に, シランコーティングされたスライドガラス (Matsunami, Tokyo, Japan) に貼り付けた。画像を蛍光顕微鏡で撮影し (Biozero, KEYENCE, Osaka, Japan), 睥島に含まれる血管面積を, 解析ソフト (Image J) を用いて解析した。動物 1 匹あたり 50 個以上の睥島を観察し, 解析を行った。

統計解析

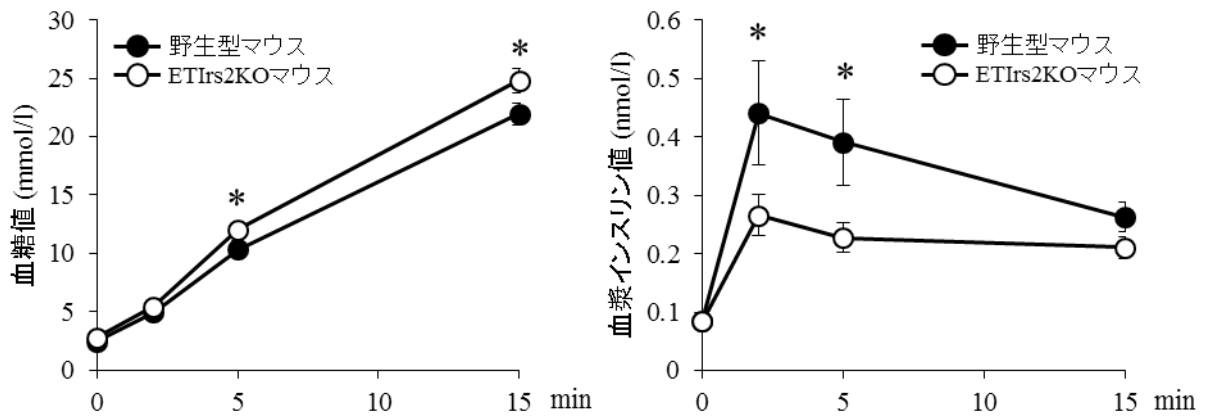
結果は平均±標準誤差 (n) で表した。統計解析は, Statview software system (Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA) を使用し, Student's t-test にて解析した。

4 結果

1) ETIrs2KO マウスはインスリン分泌能が低下している

12 週齢の ETIrs2KO マウスおよび野生型マウスにグルコースを負荷し、耐糖能およびインスリン分泌能の評価を行った。ETIrs2KO マウスは野生型マウスに比して耐糖能異常を示し (図 4-1 左), 糖負荷後 2 分におけるインスリン分泌が有意に低下していることが明らかとなった (図 4-1 右)。

12 週齢時の耐糖能とインスリン分泌



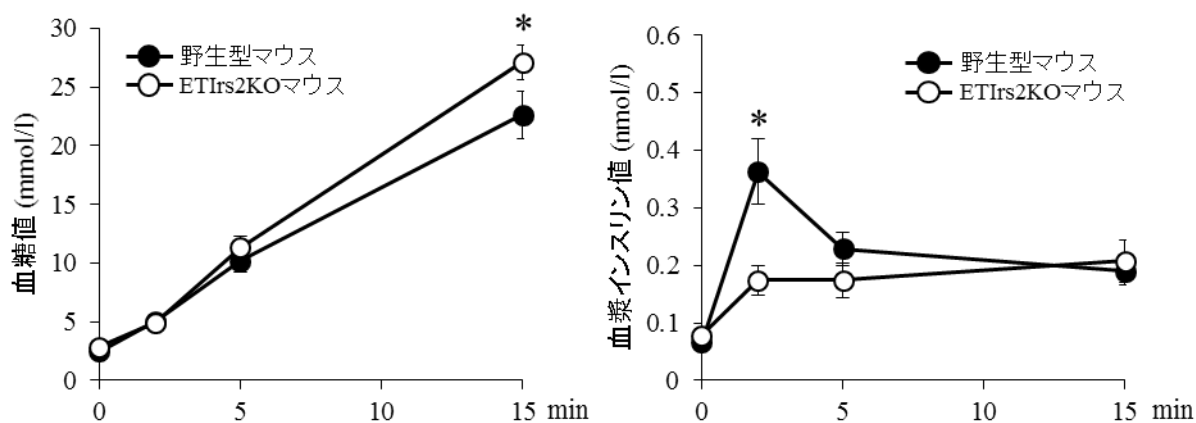
12 週齢の野生型および ETIrs2KO マウスにおける糖負荷後の血糖値 (左図) および血漿インスリン値 (右図) (Means \pm SE, n = 9-10, * : P < 0.05, student's t-test)。

(図 4-1)

続いて 24 週齢の動物を用いて同様の実験を行ったところ、24 週齢においても ETIrs2KO マウスは野生型マウスに比して耐糖能異常 (図 4-2 左) とインスリン分泌

能の低下を認めた (図 4-2 右)。

24 週齢時の耐糖能とインスリン分泌

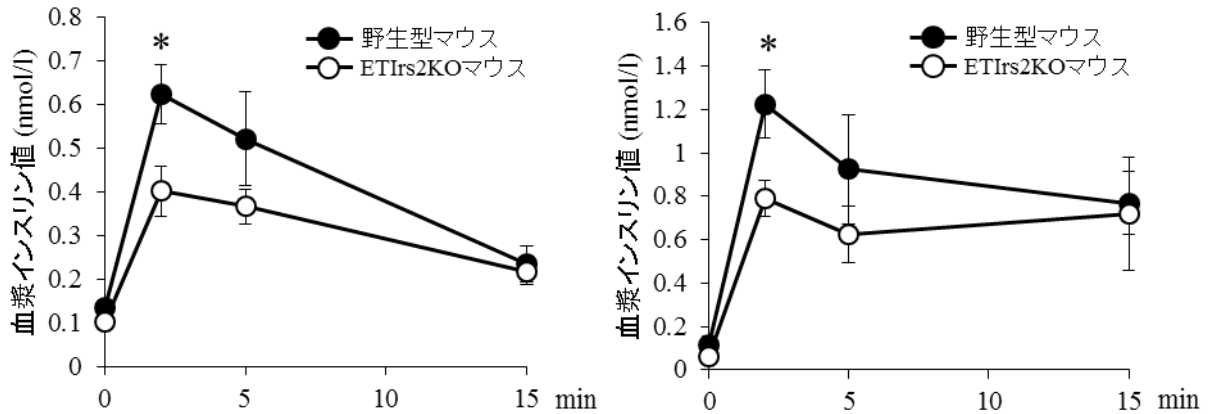


24 週齢の野生型および ETIrs2KO マウスにおける糖負荷後の血糖値 (左図) および血漿インスリン値 (右図) (Means \pm SE, n = 9-10, * : P < 0.05, student's t-test)。

(図 4-2)

続いてインスリン分泌促進作用を有するグルカゴンおよびアルギニンを負荷し、インスリン分泌能の評価を行った。その結果、グルカゴン (図 4-3 左) およびアルギニン (図 4-3 右) によるインスリン分泌が、ETIrs2KO マウスにおいて顕著に低下していることが明らかとなった。

グルカゴンおよびアルギニン刺激によるインスリン分泌



13 週齢の野生型および ETIrs2KO マウスにおけるグルカゴン負荷後の血漿インスリン値 (左図)。14 週齢の野生型および ETIrs2KO マウスにおけるアルギニン負荷後の血漿インスリン値 (右図) (Means \pm SE, n = 9-10, * : P < 0.05, student's t-test)。

(図 4-3)

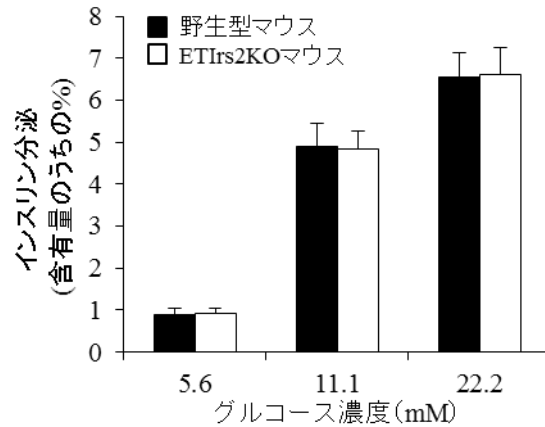
以上の結果から、ETIrs2KO マウスは野生型マウスに比して様々な刺激物質によるインスリン分泌が減弱していることが明らかとなった。

2) ETIrs2KO マウスの膵 β 細胞に異常を認めない

インスリン分泌は、個々の膵 β 細胞のインスリン分泌能力ならびに膵 β 細胞の数の積によって規定されると考えられている。そこで、インスリン分泌が減弱しているメカニズムを明らかとするため、まずは各群のマウスから膵島を単離し、グルコース応答性インスリン分泌に関して検討を行った。

12 週齢の各群のマウスから膵島を単離し、インスリン分泌を評価したところ、2.8 mM および 22.2 mM 何れの条件においても各群に差を認めなかった (図 4-4)。

単離膵島のグルコース応答性インスリン分泌

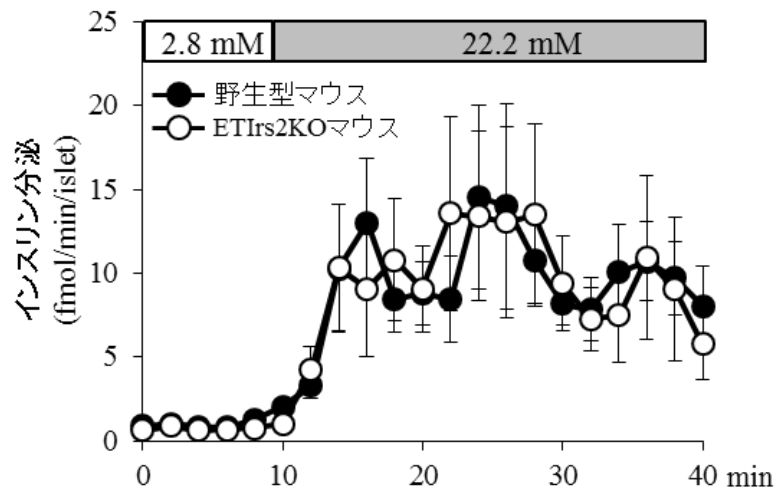


12 週齢の野生型および ETIrs2KO マウスから単離した膵島によるグルコース応答性インスリン分泌 (Means \pm SE, n = 9)。

(図 4-4)

さらに、同様に 12 週齢のマウスから膵島を単離し、膵島灌流実験を行った。22.2 mM グルコース刺激後のインスリン分泌を継時的に測定したが、何れの時間においても両群間に差を認めなかった (図 4-5)。以上の結果から、単離膵島を用いたインスリン分泌においては、ETIrs2KO マウスと野生型マウスとの間に差を認めないことが明らかとなった。

単離膵島を用いた灌流実験

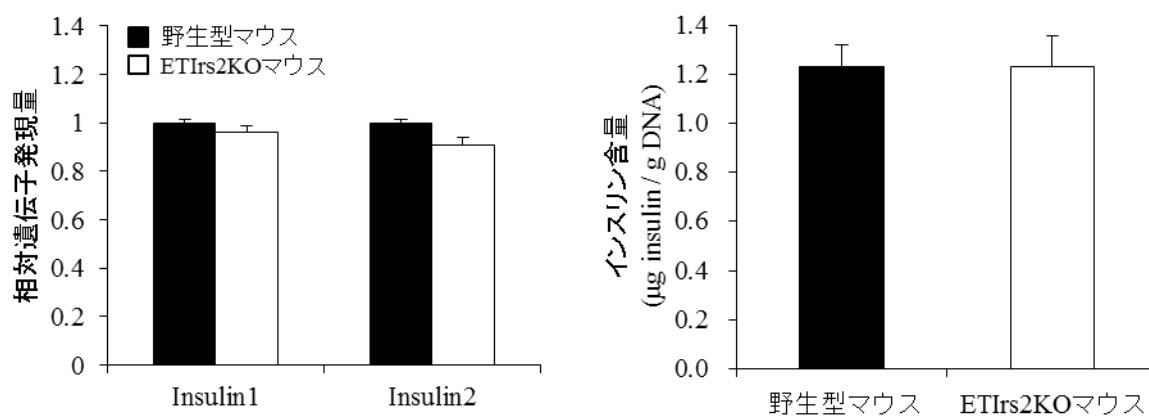


12 週齢の野生型および ETIrs2KO マウスから単離した膵島を用いた灌流実験によるインスリン分泌 (Means \pm SE, n = 8)。

(図 4-5)

続いて、膵 β 細胞のインスリン産生量を調べるために、12 週齢のマウスから膵島を単離し、膵 β 細胞におけるインスリン遺伝子 (Insulin1 および Insulin2) の発現量およびインスリン含量を測定した。その結果、ETIrs2KO マウスと野生型マウス間に遺伝子発現量 (図 4-6 左) およびインスリン含量 (図 4-6 右) に差を認めなかった。以上の結果から、ETIrs2KO マウスの膵島のインスリンの産生量は、野生型マウスと差を認めないことが明らかとなった。

膵島におけるインスリン遺伝子発現量およびインスリン含量

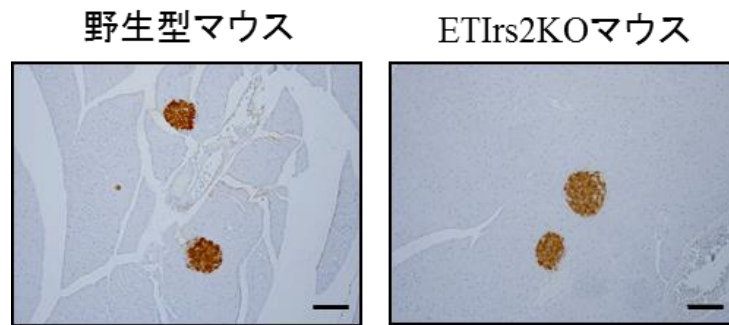


12 週齢の野生型および ETIrs2KO マウスから単離した膵島を用いたインスリン遺伝子 (Insulin1, Insulin2) の発現量 (左図, $n=5$) およびインスリン含量 (右図, $n=8$) (Means \pm SE)。

(図 4-6)

続いて、ETIrs2KO マウスおよび野生型マウスにおける膵島の大きさに関して検討を行った。これまでの検討において、12 週齢においては各群に膵島の大きさに差を認めないことを明らかにしている (22)。そこで、本研究では 24 週齢のマウスから膵臓を採取し、インスリン染色によって膵島の大きさを計測した。しかしながら、両群間に有意な差を認めなかった (図 4-7, 4-8)。

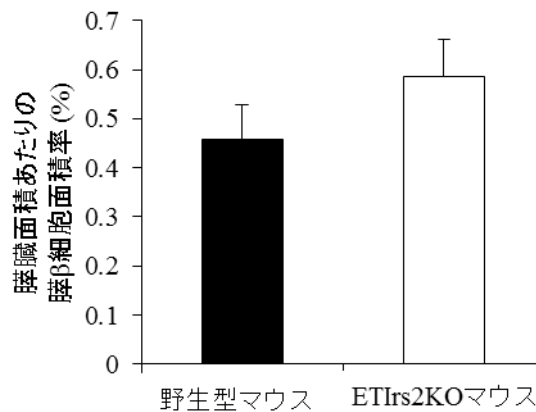
24 週齢における膵組織像 (インスリン染色)



24 週齢の野生型および ETIrs2KO マウスから採取した膵臓を用いたインスリン染色像 (scale bar = 100 μ m)。

(図 4-7)

24 週齢における膵 β 細胞面積

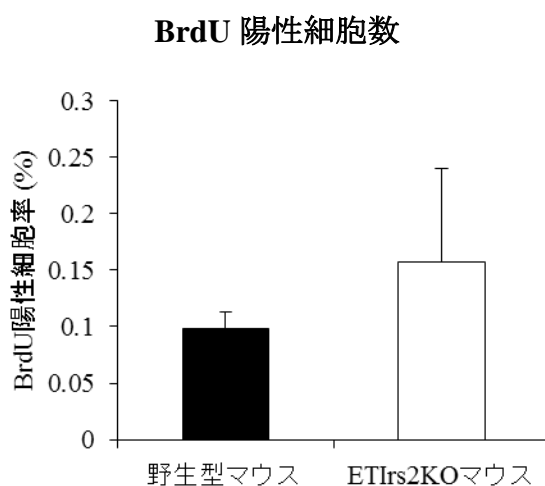


24 週齢の野生型および ETIrs2KO マウスにおける膵臓面積あたりの膵 β 細胞面積率 (Means \pm SE, n = 5)。

(図 4-8)

膵 β 細胞数は、主に増殖とアポトーシスのバランスによって規定されている。そこで、膵 β 細胞の増殖能を評価する目的で、BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) の取り込み能をみる BrdU 染色を行った。BrdU 陽性細胞数は、ETIrs2KO マウスと野生型マ

ウスとの間に有意な差を認めなかった (図 4-9)。



24週齢の野生型およびETIrs2KOマウスの膵β細胞におけるBrdU陽性細胞率 (Means ± SE, n = 7)。

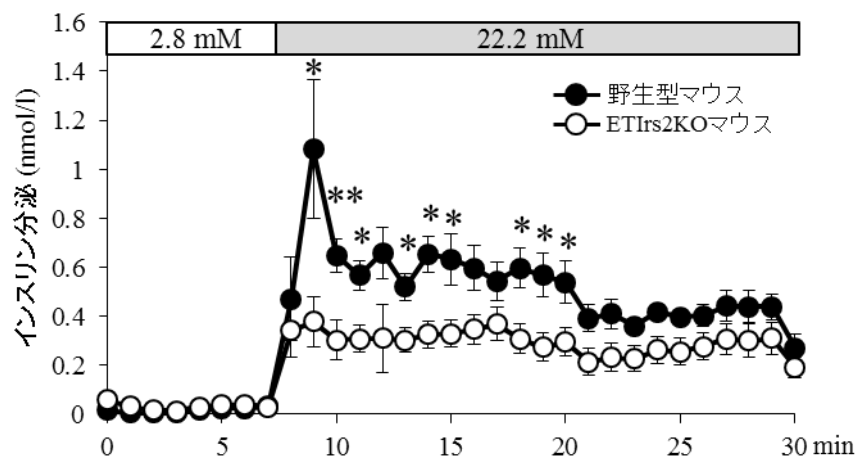
(図 4-9)

膵β細胞の機能異常や数の減少はインスリン分泌不全を呈することが知られているが、以上の結果から、ETIrs2KOマウスにはそのような異常は認められなかった。

3) ETIrs2KOマウスは膵臓灌流実験ではインスリン分泌不全を呈する

次に、12週齢のETIrs2KOマウスおよび野生型マウスの膵臓を用いて膵臓灌流実験を行った。22.2 mMのグルコース刺激後のインスリン分泌を継時的に測定したところ、野生型マウスに比してETIrs2KOマウスではインスリン分泌が顕著に低下していることが明らかとなった (図 4-10)。

膵臓灌流実験における経時的インスリン分泌

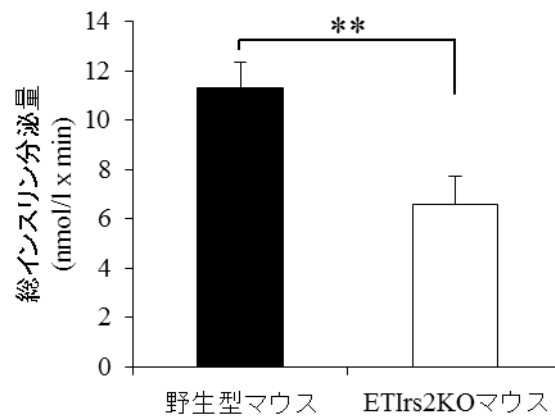


12 週齢の野生型および ETIrs2KO マウスを用いた膵臓灌流実験における経時的インスリン分泌 (Means \pm SE, n = 8, * : P < 0.05, ** : P < 0.01, student's t-test)。

(図 4-10)

また、22.2 mM グルコース刺激後 5 分から 30 分間のインスリン分泌の総量を算出してもインスリン分泌が低下していることが明らかとなった (図 4-11)。

膵臓灌流実験におけるインスリン分泌量 (AUC)



膵臓灌流実験における糖刺激後 5~30 分の総インスリン分泌量 (Means \pm SE, **: P < 0.01, student's t-test)。

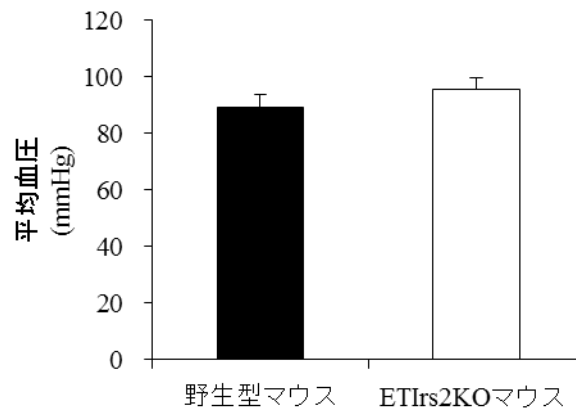
(図 4-11)

以上の結果から、ETIrs2KO マウスで認められたインスリン分泌不全は、膵島そのものの異常ではなく、血管を介した何らかのメカニズムにより引き起こされていることが示唆された。

4) ETIrs2KO マウスの膵島血流量は顕著に低下している

続いて、ETIrs2KO マウスの血管機能を評価するために、血圧の測定を行った。9~12 週齢の動物の平均血圧を測定したが、ETIrs2KO マウスと野生型マウスの間に有意な差を認めなかった (図 4-12)。

野生型および ETIrs2KO マウスにおける平均血圧

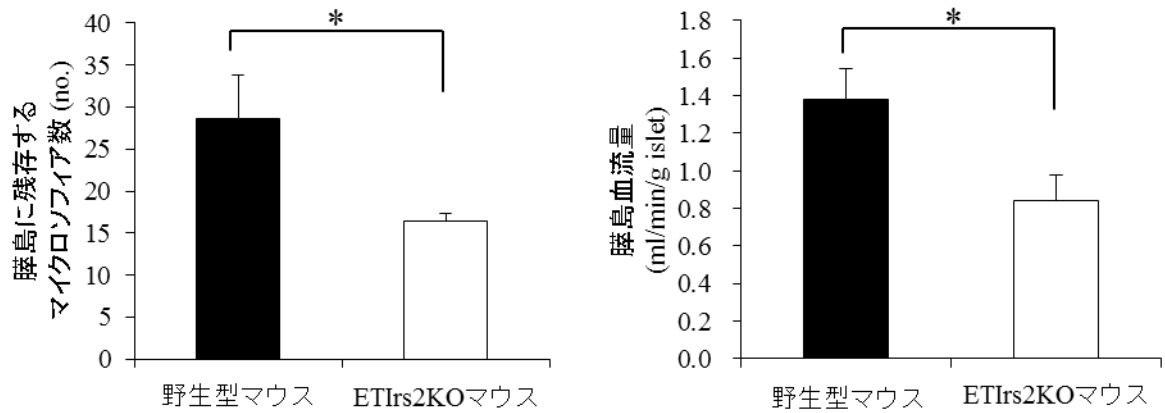


9～12週齢の野生型およびETIrs2KOマウスにおける飽食条件化での平均血圧 (Means ± SE, n = 10)。

(図 4-12)

次に、マイクロソフィア法を用いて脾臓における血流量の評価を実施した。その結果、脾臓に残存するマイクロソフィアの数に ETIrs2KO マウスで有意に低下しており (図 4-13 左)、脾臓血流量が有意に低下していることが明らかとなった (図 4-13 右)。

野生型および ETIrs2KO マウスにおける膵島血流量



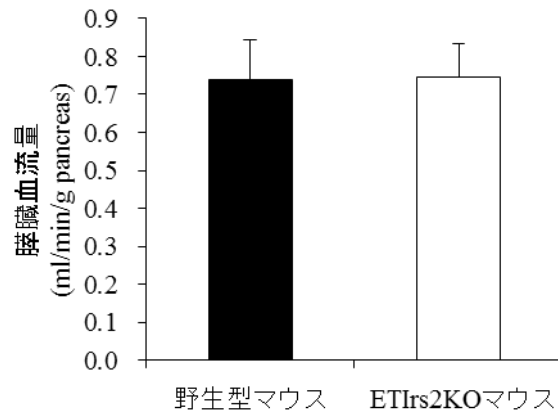
9～12 週齢の野生型および ETIrs2KO マウスにおけるマイクロソフィア投与後の膵島に残存するマイクロソフィア数 (左図) および膵島血流量 (右図)。(Means \pm SE, n = 10, * : P < 0.05, student's t-test)。

(図 4-13)

一方で膵臓における血流量を測定したところ、両群間で有意な差を認めなかった

(図 4-14)。

野生型および ETIrs2KO マウスにおける膵臓血流量

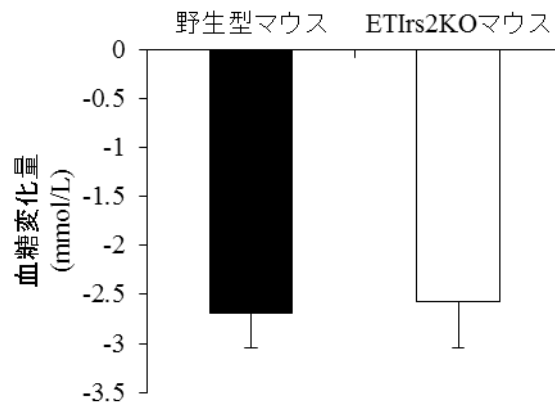


9～12週齢の野生型およびETIrs2KOマウスの飽食条件化における膵臓血流量 (Means ± SE, n = 10)。

(図 4-14)

さらにインスリン刺激下における膵島血流量を調べたところ、インスリンによる血糖低下作用は両群間で差を認めなかったものの (図 4-15)、ETIrs2KO マウスで有意に血流量が低下していることが明らかとなった (図 4-16)。

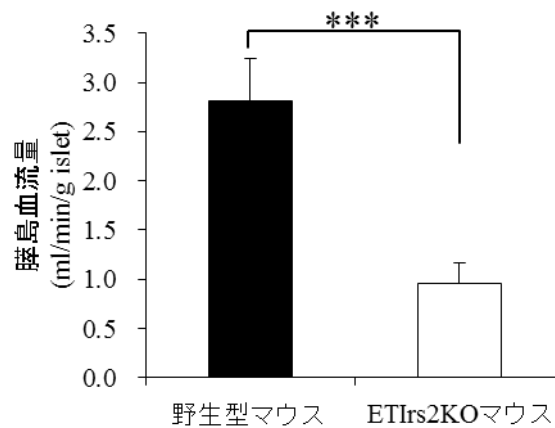
インスリン刺激後の血糖低下量



9 週齢の野生型および ETIrs2KO マウスにおけるインスリン刺激後 10 分の血糖低下量 (Means ± SE, n = 10)。

(図 4-15)

インスリン刺激条件下の膵島血流量



9 週齢の野生型および ETIrs2KO マウスにおけるインスリン刺激条件下における膵島血流量 (Means ± SE, n = 10, *** : P < 0.001, student's t-test)。

(図 4-16)

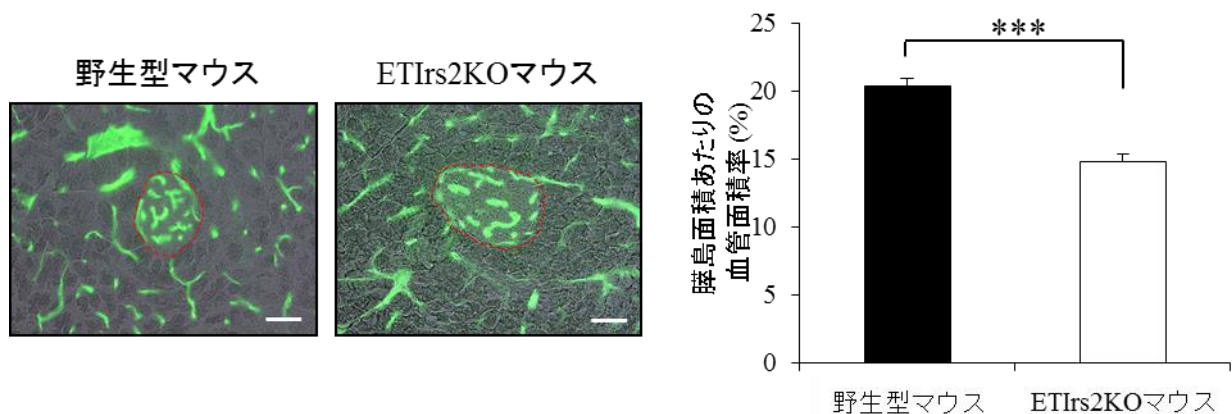
これまでの検討において ETIrs2KO マウスは骨格筋血流量の低下を示すことを明らかにしているが, 今回の結果から ETIrs2KO マウスは膵島に流れ込む血流量も低下

しており、これがインスリン分泌の低下を引き起こす原因となっていることが示唆された。

5) ETIrs2KO マウスは膵島に占める血管の面積が顕著に低下している

レクチンは血管内皮細胞に特異的に結合することが知られている。そこで、FITC でラベルされたレクチンを血管内に投与し、膵島に占める血管の数と面積の評価を行った。膵島に占める血管面積率を算出したところ、12 週齢において ETIrs2KO マウスは野生型マウスに比して顕著に低下していることが明らかとなった (図 4-17)。

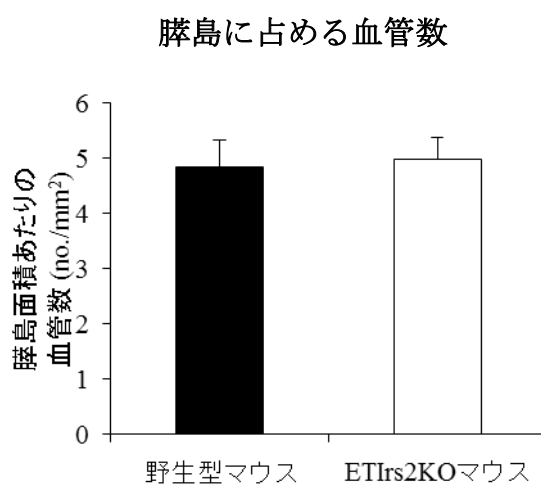
FITC-レクチン投与後の膵組織像と血管面積率



12 週齢の野生型および ETIrs2KO マウスにおける FITC-レクチン投与後の膵組織像 (左図, scale bar = 50 μ m, 赤い点線は膵島のおおよその境界線を示す) と血管面積率 (右図) (Means \pm SE, n = 5, *** : P < 0.001, student's t-test)。

(図 4-17)

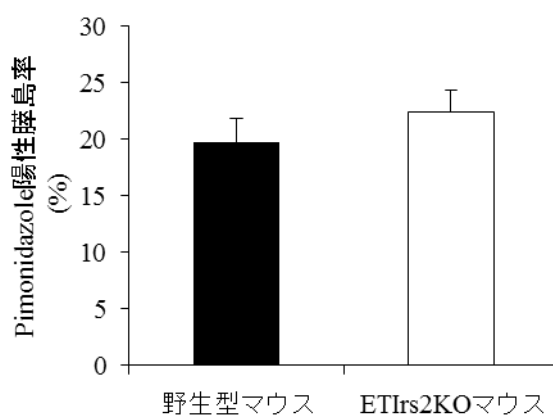
一方で、膵島に占める血管の数を測定したところ ETIrs2KO マウスと野生型マウス
の間に差を認めなかった (図 4-18)。



12 週齢の野生型および ETIrs2KO マウスの膵島に占める血管数 (Means ± SE, n = 5)。
(図 4-18)

膵島に流れこむ血流量が顕著に低下することで、膵β細胞が低酸素状態に陥り、機能が低下している可能性が考えられる。そこで、低酸素マーカーとして用いられる Pimonidazole を使用し、免疫染色によって低酸素状態にある膵島の数を測定した。しかしながら、ETIrs2KO マウスと野生型マウスの間に差を認めなかった (図 4-19)。

12 週齢における pimonidazole 陽性膵島率



12 週齢の野生型および ETIrs2KO マウスの膵島における pimonidazole 陽性膵島率 (Means \pm SE, n = 5)。

(図 4-19)

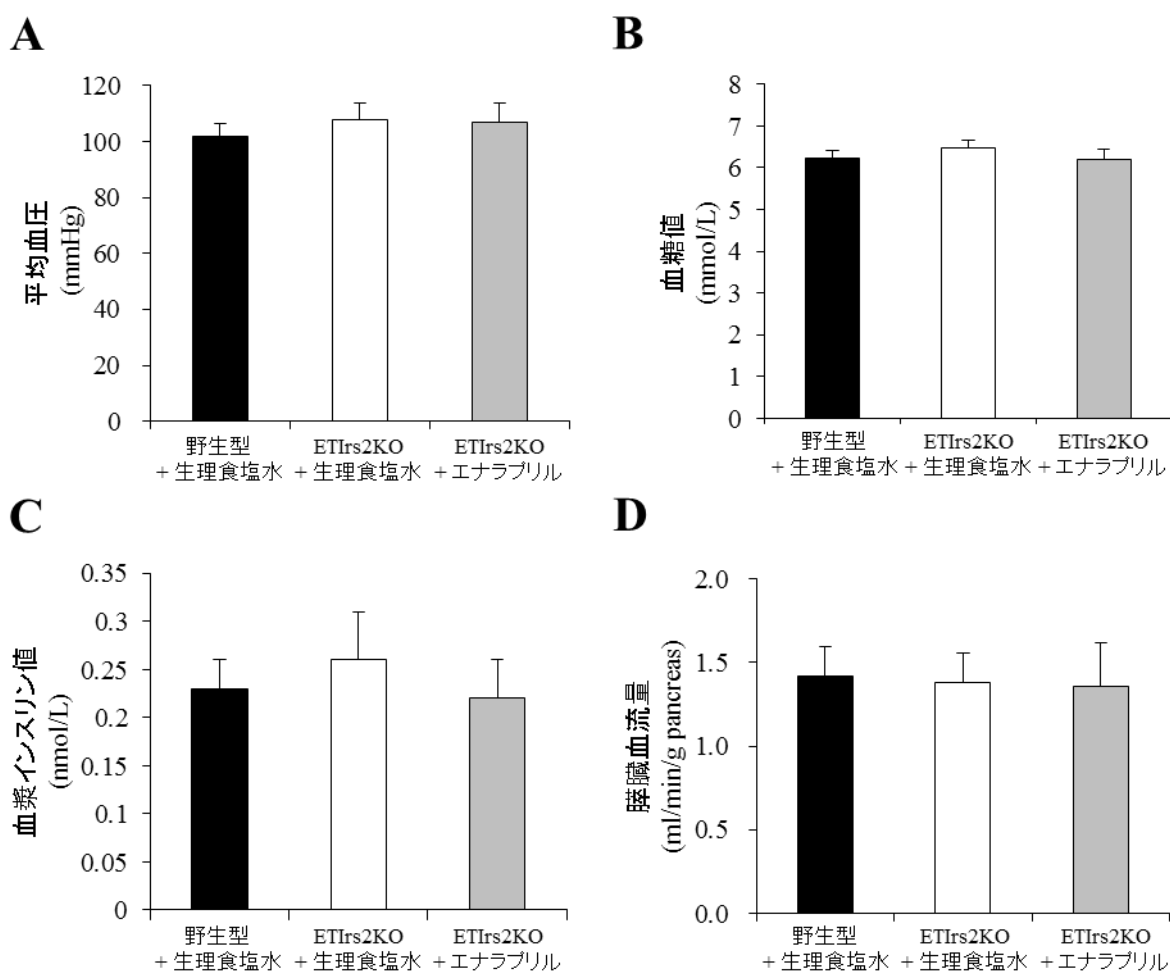
以上の結果から、ETIrs2KO マウスは恒常的な低酸素状態には陥っていないものの、膵島に占める血管面積が低下していることで、膵島に流れ込む血流量が減少しており、インスリン分泌が低下していることが示唆された。

6) ETIrs2KO マウスのインスリン分泌不全は、膵島血流量の低下によって引き起こされている

Carlsson らの報告において、ACE 阻害剤であるエナラプリルを少量投与することで Angiotensin II の産生抑制作用による血管拡張によって膵島血流量を特異的に増加させることが明らかにされている (31)。その文献報告での試験方法を踏襲し、エナラプリルを ETIrs2KO マウスに投与したところ、報告結果と同様に平均血圧、血糖値、

血漿インスリン値，膵臓血流量に差を認めなかったものの（図 4-20 A-D），膵島血流量が顕著に増加し，野生型マウスと同等まで回復することが明らかとなった（図 4-21）。

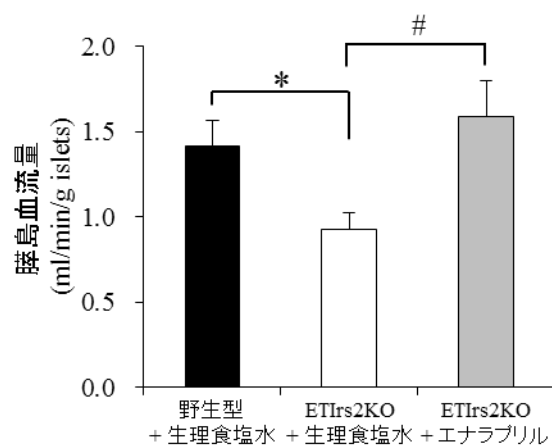
エナラプリルの各種パラメーターに対する効果



9～12 週齢の野生型および ETIrs2KO マウスにおけるエナラプリル投与 10 分後の平均血圧 (A)，血糖値 (B)，血漿インスリン値 (C)，膵臓血流量 (D) (Means \pm SE, n = 10)。

(図 4-20)

膵島血流量に対するエナラプリルの効果

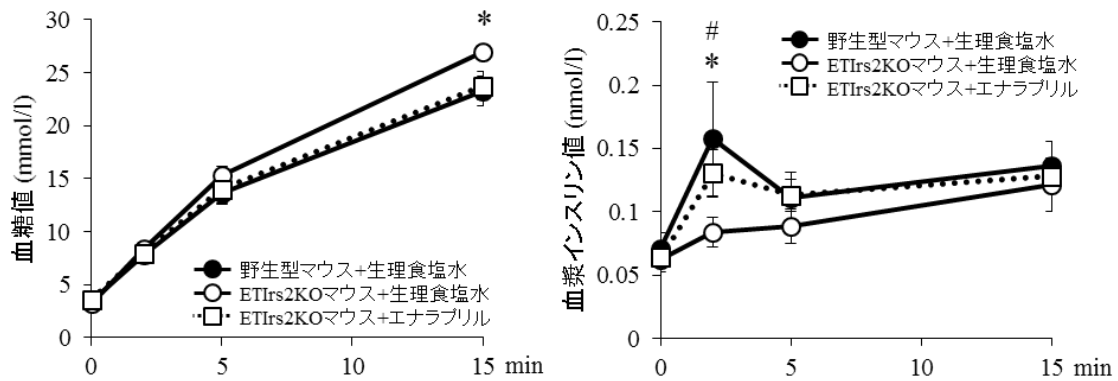


9～12 週齢の野生型および ETIrs2KO マウスにおけるエナラプリル投与 10 分後の膵島血流量 (Means \pm SE, n = 10, *: P < 0.05, 野生型マウス + 生理食塩水 vs. ETIrs2KO マウス + 生理食塩水, student's t-test, #: P < 0.05, 野生型マウス + 生理食塩水 vs. ETIrs2KO マウス + エナラプリル, student's t-test)。

(図 4-21)

さらに、エナラプリル投与下においてグルコース負荷試験を実施したところ、ETIrs2KO マウスのインスリン分泌は野生型マウスと同等のレベルまで回復することが明らかとなった (図 4-22)。

エナラプリル刺激下における糖負荷試験

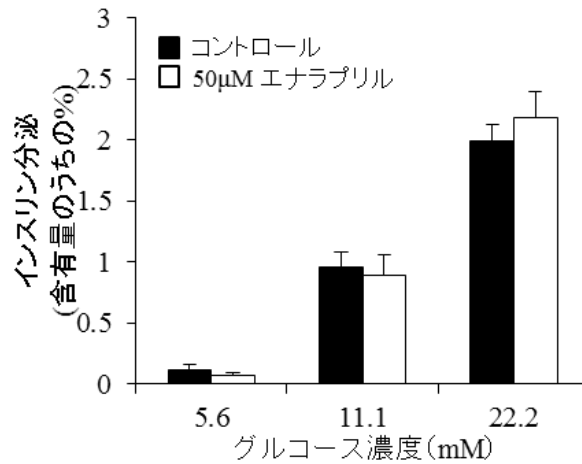


12週齢の野生型および ETIrs2KO マウスのエナラプリル刺激下における糖負荷後の血糖値 (左図) および血漿インスリン値 (右図) (Means \pm SE, n = 11-13, * : P < 0.05, 野生型マウス + 生理食塩水 vs. ETIrs2KO マウス + 生理食塩水, student's t-test, # : P < 0.05, ETIrs2KO マウス + 生理食塩水 vs. ETIrs2KO マウス + エナラプリル, student's t-test)。

(図 4-22)

また、エナラプリルによる膵島への直接的なインスリン分泌促進作用の有無を検証したが、何れのグルコース濃度条件下においてもインスリン分泌促進作用を確認することはできなかった (図 4-23)。

単離膵島を用いたインスリン分泌に対するエナラプリルの作用



12 週齢の C57BL/6J マウスから単離した膵島を用いた各グルコース濃度におけるインスリン分泌に対するエナラプリルの作用 (Means \pm SE, n = 5)。

(図 4-23)

以上の結果から、エナラプリルは膵島血流量の改善を介して ETIrs2KO マウスのインスリン分泌を改善しており、ETIrs2KO マウスのインスリン分泌不全は、膵島血流量が野生型マウスに比して減少していることにより引き起こされていることが明らかとなった。

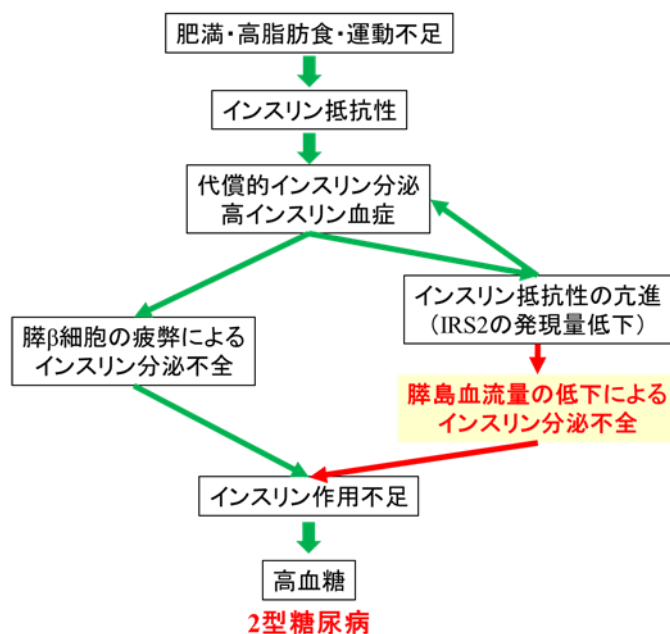
5 考察

我々は以前よりインスリンシグナル伝達機構を担っている **IRS2** に着目しており、全身で **IRS2** を欠損したマウスでは、肝臓におけるインスリン抵抗性に対する膵β細胞の代償性過形成の障害により、糖尿病を発症することを明らかにしている (32)。さらに、膵β細胞特異的に **IRS2** を欠損したマウスでは、インスリン抵抗性がないにも関わらず、膵β細胞の量がコントロールマウスに比べて有意に減少していることを明らかにしている (25)。また、血管内皮細胞特異的 **IRS2** 欠損マウスでは、骨格筋においてインスリンによる糖の取り込みが低下し、インスリン抵抗性を呈することを明らかにしている (22)。本研究において私は、膵β細胞機能に対する血管内皮細胞の **IRS2** の役割に着目し、その検討を行った。in vivo および in vitro の検証により、血管内皮細胞において **IRS2** が欠損することにより、膵島血流量が減少し、それに伴ってインスリン分泌の低下と耐糖能異常を呈することを明らかにした。単離膵島を用いた実験では、インスリン分泌に異常を認めなかったものの、血管系を介する糖負荷試験や膵臓灌流実験ではインスリン分泌不全を認めた。一方で、膵β細胞の大きさや、膵島に占める血管数については、**ETIrs2KO** マウスと野生型マウス間に差を認めなかった。膵β細胞が低酸素状態に陥ると、インスリンの合成や分泌が低下することが知られているが、**ETIrs2KO** マウスではそれらには差を認めなかった。

この結果から、膵島血流量が飽食条件下において 30%程度低下しても（図 4-13）膵β細胞は低酸素状態に陥ることなく、形態や機能には影響しないことが考えられる。

また、本研究結果は、血管内皮細胞の **IRS2** が減少することによって、膵島血流量の低下に伴って膵β細胞の障害を介さずインスリン分泌が低下することを明らかにした。糖尿病の発症・進展メカニズムにおいて、インスリン抵抗性が亢進するとそれを代償するためにインスリンが過剰分泌され、これが膵β細胞の疲弊やインスリン抵抗性のさらなる亢進を招くことで病態が進展すると考えられている。本研究結果は、これまでの考え方に加えて、血管内皮細胞における **IRS2** の発現量低下に伴うインスリンシグナルの低下が膵島血流量を低下させた結果、インスリン分泌不全を誘発することを示唆している（図 5-1）。

糖尿病の発症・進展メカニズムと膵島血流量の関係（仮説）



(図 5-1)

膵β細胞の機能や量の低下は2型糖尿病進展の主要な原因であり、その障害は遺伝素因などの様々な因子が関与していることが知られている。2型糖尿病におけるこの障害メカニズムを解明するべく、これまで多くの研究が行われてきたが、それらの多くはβ細胞やα細胞に関するものが主要であった。一方で、生体内の複雑な環境下では、膵β細胞のような内分泌細胞は、内分泌物質、神経、パラクリンシグナルなどの相互作用によって調節が行われていることが知られている。特に膵β細胞は、隣接する血管内皮細胞とも相互作用をすることで、その機能を維持していることが知られている。例えば、膵β細胞周囲の血管およびその内皮細胞は、膵β細胞

から分泌される高濃度の Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) -A にさらされており、これが血管機能の維持に関与していることが知られている (33, 34)。実際に、膵β細胞特異的に VEGF-A を欠損させたマウスでは、膵島毛細血管網の損失と血管構造の異常を認め、それに伴って耐糖能異常を呈することが知られている (35)。一方で、血管内皮細胞も膵β細胞機能に対して重要な役割を担っており、laminin や thrombospondin-1 などが膵β細胞機能や分化を誘導していることが知られている (12, 36)。本研究では、血管内皮細胞の IRS2 が欠損することで膵島の血流量が低下し、膵β細胞の機能不全を介さずインスリン分泌が低下する、新たな血管内皮細胞と膵β細胞との関係を明らかにした。

本研究結果は、ETIrs2KO マウスは膵島血流量の低下によってインスリン分泌不全を呈することを明らかにした。しかしながら、なぜ血管内皮細胞で発現する IRS2 の発現量が低下することで膵島血流量の低下が起こる原因は明確にできていない。2型糖尿病モデル動物では、糖尿病初期では膵島血流量が増加し、一方で糖尿病末期では低下することが報告されている (37, 38)。膵島血流量は、通常、インスリンの必要量に応じて、細動脈のレベルで調節されている。例えば、高血糖は迷走神経などを介して膵島血流量を増加させることが明らかにされている (39)。また、脂質は、β3-adrenoceptors を介して血流量を増大させることも明らかにされている (40)。2型

糖尿病の初期で認められる膵島血流量の増加は、高インスリン血症に伴う NO 産生亢進を介した血管拡張作用によって起こることが報告されている (41)。NO は、膵島血流量の維持や、高血糖下の迷走神経系を介した膵島血流量の増加の調整因子として極めて重要な役割を担っており、インスリンによりその産生が誘導されることが報告されている (42, 43)。一方で 2 型糖尿病の末期で認められる膵島血流量の低下は、インスリン抵抗性の進展による血管内皮細胞のインスリンシグナルの低下や、糖尿病患者でも認められている膵島毛細血管網の損失が原因であると考えられている (44)。ETIrs2KO マウスの膵島血流量が低下する原因は、2 型糖尿病の末期と同じく血管内皮細胞におけるインスリンシグナルが低下することによる膵島毛細血管網における NO の産生低下が原因であることが考えられる。

本研究結果から、ETIrs2KO マウスは飽食条件下（非インスリン刺激下）であっても、膵島血流量が野生型マウスと比して低値を示すことを明らかにした (図 4-13)。一方で、我々のグループの以前の研究結果では、ETIrs2KO マウスの骨格筋においてはインスリン刺激下でのみ血流量の低下が確認されている (22)。この臓器による反応性の差異が生じる原因は、膵 β 細胞周囲の血管内皮細胞は他の臓器に比して常に高濃度のインスリンにさらされているために、飽食条件下においても IRS2 の欠損による影響が膵島では顕著に現れた可能性が考えられる。

ではなぜ膵島血流量が減少することでインスリン分泌が低下していたのだろうか？以前の研究において我々が明らかにしたように，ETIrs2KO マウスの骨格筋では，Akt のリン酸化の低下に伴い NO の産生が低下しており，これによりインスリンの間質への移行の低下が原因でインスリン抵抗性を呈する (22)。一方で生体内では，臓器ごとに毛細血管の構造が異なっていることが明らかとなっている。毛細血管は，

1. 骨格筋や心筋などに認められる連続性毛細血管
2. 腎糸球体や内分泌腺などに認められる有窓性毛細血管
3. 肝臓や造血組織に認められる洞様毛細血管

の 3 つに分類され，インスリンの様な macromolecular 分子の血中から組織への移行は，臓器によってそのメカニズムが異なっていると考えられている (図 5-2)。膵島に存在する毛細血管は，洞様毛細血管構造であることが知られており，連続性毛細血管を有する骨格筋のようにインスリンシグナルの減弱によるインスリンの組織への移行の低下により，インスリン分泌が減弱したとは考えに難い。膵島血流量低下によるインスリン分泌低下のメカニズムは，以下の 2 点が考えられる (図 5-3)。

1. インスリン分泌刺激物質が膵 β 細胞に十分に届いていない，もしくは届く時間が遅れている。
2. 膵 β 細胞で産生されたインスリンの全身への輸送が十分に行われていない。

毛細血管の種類と構造

連続性毛細血管（骨格筋，心筋など）
閉鎖結合によって内皮細胞が連結された連続的な内皮細胞層を示す。



有窓性（小孔性）毛細血管
（腎糸球体，内分泌腺，外分泌腺など）
内皮の薄膜化した部分に大きさの異なる孔（fenester）がある。



洞様毛細血管（肝小葉，造血組織など）
比較的直径が大きい毛細血管である。
血管壁には有窓性毛細血管と同様な孔と断裂の両方がみられ，細胞成分が血液と組織の間を移動できる。

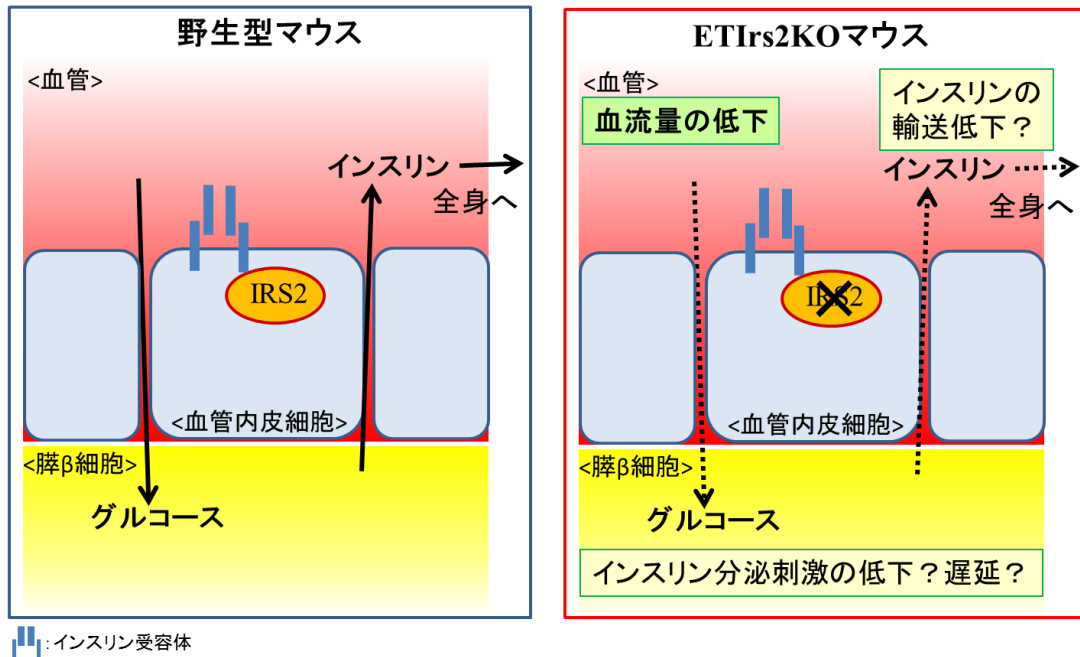


（引用文献 45 より転載）

（図 5-2）

ETIrs2KO マウスのインスリン分泌低下メカニズム

(骨格筋などでは血管から組織へのインスリン移行が血管内皮細胞を介するのに対し、膵β細胞から血管へのインスリン分泌は非常に早く、細胞間隙経路を介していると考えられている。)



(図 5-3)

また、ETIrs2KO マウスは全身の血管内皮細胞における IRS2 の発現量が欠失していることから、膵島以外の臓器における障害が原因でインスリン分泌不全を呈している可能性もある。しかしながら、エナラプリルにより膵島特異的に血流量を改善させることにより、インスリン分泌が改善したことを考えると (図 4-22)、膵島における血流障害がインスリン分泌不全の原因となっていることが考えられる。また、飽食条件下においては、骨格筋 (22) や膵臓 (図 4-14) における血流量が野生型マウスと ETIrs2KO マウスの間に差を認めなかったことを考えると、ETIrs2KO マウス

の表現型が膵島において強く認められ、その膵島血流量の減少がインスリン分泌不全を引き起こしている可能性が示唆される。

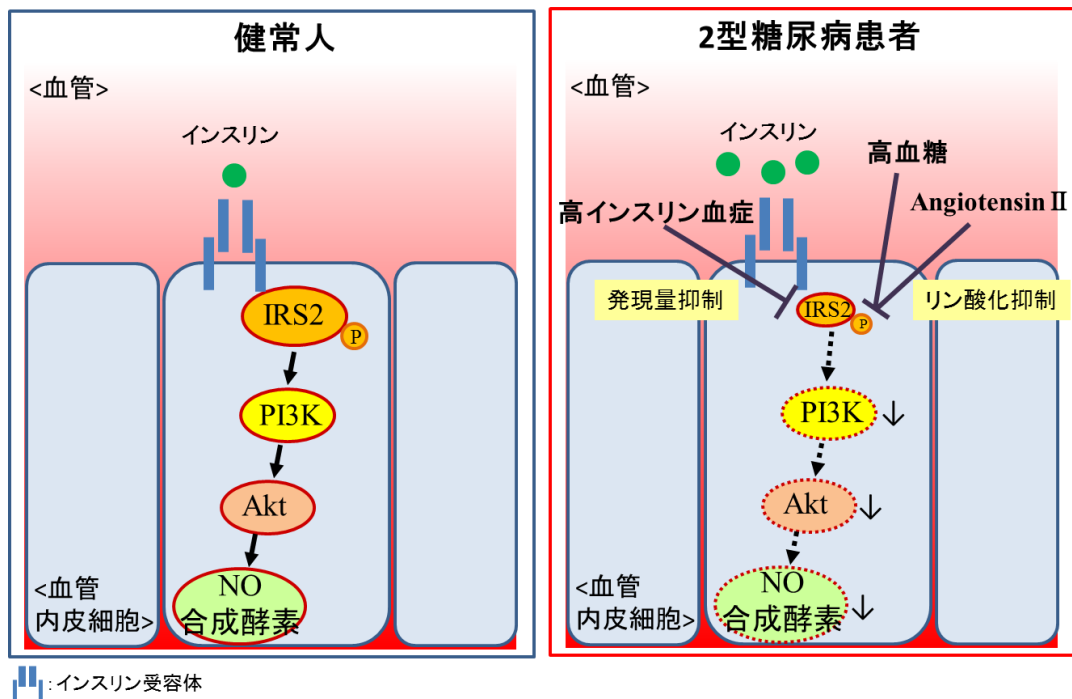
しかしながら、現在得られているデータだけではインスリン分泌不全メカニズムを明確に説明することができない。このメカニズムを明らかにするためには、更なる研究が必要である。

本研究において、ACE 阻害剤であるエナラプリルを ETIrs2KO マウスに投与することで、膵島血流量の改善を介してインスリン分泌を改善することを明らかにした。本試験で用いたエナラプリルの投与量では、膵島毛細血管網特異的に血管拡張することが報告されており (31)、本研究においても膵島でのみ血流増加作用を示すことを確認している (図 4-20, 図 4-21)。このことから、エナラプリルは膵島毛細血管網特異的に血管拡張させることによって、インスリン分泌が改善したことが考えられる。一方で、全身の血管拡張作用を示す降圧剤が 2 型糖尿病の発症・進展を抑制することが報告されている (46-48)。例えば、ラミプリル (ACE 阻害剤)、トランドラプリル (ACE 阻害剤)、バルサルタン (ARB)、カンデサルタン (ARB) では、糖尿病の発症・進展抑制効果に関するメタ解析結果が報告されている (49)。それらの薬剤の作用メカニズムは、カンデサルタンではインスリン感受性の改善であるとの報告もあるが (50)、明確にはなされていない。本研究結果から、これらの血管拡張剤

による膵島血流量の改善が、2型糖尿病の発症・進展抑制作用メカニズムの1つであることが考えられる。

本研究結果は、血管内皮細胞における IRS2 が 2 型糖尿病の治療標的になり得ることを示唆している。IRS2 は、高インスリン血症によってその発現量が低下することが明らかにされている (22)。また、慢性的な高血糖も、血管内皮細胞において IRS2 のチロシンリン酸化を抑制することが報告されている (51)。さらに、2 型糖尿病では RAS が活性化しており (52-54)、angiotensin II が protein kinase C の活性化を介して IRS2 のチロシンリン酸化を抑制し、その結果、Akt のリン酸化と nitric oxide synthase 活性を血管内皮細胞において低下させることが報告されている (51)。つまり、2 型糖尿病では様々なメカニズムにより IRS2 の発現量やリン酸化が低下することが知られており、この IRS2 を介したインスリンシグナルの低下を抑制することが 2 型糖尿病の発症・進展抑制につながると考えられる。

血管内皮細胞における IRS2 を介したインスリン抵抗性メカニズム



(図 5-4)

本研究では、インスリン分泌不全が血管内皮細胞における IRS2 の発現量低下に伴う腓島血流量の低下によって起こるとの仮説を基に研究を実施し、その仮説を実証することができた。既存薬の中に腓島血流量を特異的に増加させる、もしくは、血管内皮細胞における IRS2 の発現量を増加させることのできる作用を有する薬剤は存在しない。今後、これらに関わる因子をターゲットとした研究が、2 型糖尿病の画期的な治療法の開発に結実するものと強く期待している。

6 謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるに当たり、多くのご支援とご指導を賜りました。指導教官である東京大学大学院医学系研究科 糖尿病・代謝内科 門脇孝教授ならびに窪田直人准教授に深く感謝しております。本研究を遂行するに当たり、日々の研究だけではなく多岐にわたりご指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科 糖尿病・代謝内科 高本偉碩先生には深く感謝しております。本論文作成に当たり、審査委員として多くのご助言を頂きました。黒川峰夫教授、池田均准教授、藤井知行教授、小川純人准教授、吉内一浩准教授に深く感謝いたします。

最後に、どのような状況においても応援してくれた家族に対して深い感謝の意を表して謝辞といたします。

7 引用文献

1. Kadowaki T, Miyake Y, Hagura R, Akanuma Y, Kajinuma H, Kuzuya N, Takaku F, Kosaka K. Risk factors for worsening to diabetes in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetologia*. 26, 44-49 (1984). PMID: 6368299
2. Kadowaki T. Insights into insulin resistance and type 2 diabetes from knockout mouse models. *J Clin Invest*. 106, 459-465 (2000).
3. Bonner-Weir S. Perspective: Postnatal pancreatic beta cell growth. *Endocrinology*. 141, 1926-1929 (2000).
4. Reaven GM. HOMA-beta in the UKPDS and ADOPT. Is the natural history of type 2 diabetes characterised by a progressive and inexorable loss of insulin secretory function? Maybe? Maybe not? *Diab Vasc Dis Res*. 6, 133-138 (2009).
5. Lebovitz HE. Insulin secretagogues: old and new. *Diabetes Reviews*. 7, 139-153 (1999).
6. Lifson N, Lassa CV, Dixit PK. Relation between blood flow and morphology in islet organ of rat pancreas. *Am J Physiol*. 249, E43-E48 (1985).
7. Carlsson PO, Liss P, Andersson A, Jansson L. Measurements of oxygen tension in native and transplanted rat pancreatic islets. *Diabetes*. 47, 1027-1032 (1998).

8. Carlsson PO, Palm F, Andersson A, Liss P. Markedly decreased oxygen tension in transplanted rat pancreatic islets irrespective of the implantation site. *Diabetes*. 50, 489-495 (2001).
9. Hellerström C. Effects of carbohydrates on the oxygen consumption of isolated pancreatic islets of mice. *Endocrinology*. 81, 105-112 (1967).
10. Hutton JC, Malaisse WJ. Dynamics of O₂ consumption in rat pancreatic islets. *Diabetologia*. 18, 395-405 (1980). PMID: 6775999
11. Johansson M, Mattsson G, Andersson A, Jansson L, Carlsson PO. Islet endothelial cells and pancreatic beta-cell proliferation: studies in vitro and during pregnancy in adult rats. *Endocrinology*. 147, 2315-2324 (2006).
12. Nikolova G, Jabs N, Konstantinova I, Domogatskaya A, Tryggvason K, Sorokin L, Fässler R, Gu G, Gerber HP, Ferrara N, Melton DA, Lammert E. The vascular basement membrane: a niche for insulin gene expression and beta cell proliferation. *Dev Cell*. 10, 397-405 (2006). PMID: 16516842
13. Iwase M, Nakamura U, Uchizono Y, Nohara S, Sasaki N, Sonoki K, Iida M. Nateglinide, a non-sulfonylurea rapid insulin secretagogue, increases pancreatic capillary blood volume in the islet in rats. *Eur J Pharmacol*. 518, 243-250 (2005).
14. Pollare T, Lithell H, Berne C. A comparison of the effects of hydrochlorothiazide and

- captopril on glucose and lipid metabolism in patients with hypertension. *N Engl J Med.* 321, 868-873 (1989).
15. Haenni A, Andersson PE, Lind L, Berne C, Lithell H. Electrolyte changes and metabolic effects of lisinopril/bendrofluazide treatment. Results from a randomized, double-blind study with parallel groups. *Am J Hypertens.* 7, 615-622 (1994).
 16. Santoro D, Natali A, Palombo C, Brandi LS, Piatti M, Ghione S, Ferrannini E. Effects of chronic angiotensin converting enzyme inhibition on glucose tolerance and insulin sensitivity in essential hypertension. *Hypertension.* 20, 181-191 (1992).
 17. Huang Z, Jansson L, Sjöholm A. Vasoactive drugs enhance pancreatic islet blood flow, augment insulin secretion and improve glucose tolerance in female rats. *Clin Sci (Lond).* 112, 69-76 (2007).
 18. Nyström T, Ortsäter H, Huang Z, Zhang F, Larsen FJ, Weitzberg E, Lundberg JO, Sjöholm Å. Inorganic nitrite stimulates pancreatic islet blood flow and insulin secretion. *Free Radic Biol Med.* 53, 1017-1023 (2012).
 19. Svensson AM, Ostenson CG, Jansson L. Age-induced changes in pancreatic islet blood flow: evidence for an impaired regulation in diabetic GK rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 279, E1139-E1144 (2000).
 20. Carlsson PO, Andersson A, Jansson L. Influence of age, hyperglycemia, leptin, and

- NPY on islet blood flow in obese-hyperglycemic mice. *Am J Physiol.* 275, E594-E601 (1998).
21. Bonner-Weir S, Orci L. New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat. *Diabetes.* 10, 883-889 (1982).
22. Kubota T, Kubota N, Kumagai H, Yamaguchi S, Kozono H, Takahashi T, Inoue M, Itoh S, Takamoto I, Sasako T, Kumagai K, Kawai T, Hashimoto S, Kobayashi T, Sato M, Tokuyama K, Nishimura S, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Yamazaki T, Ezaki O, Kawamura K, Masuda H, Moroi M, Sugi K, Oike Y, Shimokawa H, Yanagihara N, Tsutsui M, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R, Kamata K, Inoue K, Kodama T, Ueki K, Kadowaki T. Impaired insulin signaling in endothelial cells reduces insulin-induced glucose uptake by skeletal muscle. *Cell Metab.* 13, 294-307 (2011).
23. Ide T, Shimano H, Yahagi N, Matsuzaka T, Nakakuki M, Yamamoto T, Nakagawa Y, Takahashi A, Suzuki H, Sone H, Toyoshima H, Fukamizu A, Yamada N. SREBPs suppress IRS-2-mediated insulin signalling in the liver. *Nat Cell Biol.* 6, 351-357 (2004).
24. Zhang J, Ou J, Bashmakov Y, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL. Insulin inhibits transcription of IRS-2 gene in rat liver through an insulin response element (IRE) that resembles IREs of other insulin-repressed genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98,

3756-3761 (2001)

25. Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Yano W, Suzuki R, Ueki K, Takamoto I, Satoh H, Maki T, Kubota T, Moroi M, Okada-Iwabu M, Ezaki O, Nagai R, Ueta Y, Kadowaki T, Noda T. Insulin receptor substrate 2 plays a crucial role in beta cells and the hypothalamus. *J Clin Invest.* 114, 917-927 (2004).
26. Terauchi Y, Takamoto I, Kubota N, Matsui J, Suzuki R, Komeda K, Hara A, Toyoda Y, Miwa I, Aizawa S, Tsutsumi S, Tsubamoto Y, Hashimoto S, Eto K, Nakamura A, Noda M, Tobe K, Aburatani H, Nagai R, Kadowaki T. Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *J Clin Invest.* 117, 246-257 (2007).
27. Olsson R, Carlsson PO. A low-oxygenated subpopulation of pancreatic islets constitutes a functional reserve of endocrine cells. *Diabetes.* 60, 2068-2075 (2011).
28. Miki T, Minami K, Shinozaki H, Matsumura K, Saraya A, Ikeda H, Yamada Y, Holst JJ, Seino S. Distinct effects of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-1 on insulin secretion and gut motility. *Diabetes.* 54, 1056-1063 (2005).
29. Jansson L, Hellerström C. A rapid method of visualizing the pancreatic islets for studies of islet capillary blood flow using non-radioactive microspheres. *Acta Physiol*

- Scand. 113, 371-374 (1981).
30. Sparrow RA, Beckingham IJ. Islet blood flow following insulin administration. *J Anat.* 163, 75-81 (1989).
 31. Carlsson PO, Berne C, Jansson L. Angiotensin II and the endocrine pancreas: effects on islet blood flow and insulin secretion in rats. *Diabetologia.* 41, 127-133 (1998).
 32. Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Eto K, Yamauchi T, Suzuki R, Tsubamoto Y, Komeda K, Nakano R, Miki H, Satoh S, Sekihara H, Sciacchitano S, Lesniak M, Aizawa S, Nagai R, Kimura S, Akanuma Y, Taylor SI, Kadowaki T. Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes.* 49, 1880-1889 (2000).
 33. Brissova M, Shostak A, Shiota M, Wiebe PO, Poffenberger G, Kantz J, Chen Z, Carr C, Jerome WG, Chen J, Baldwin HS, Nicholson W, Bader DM, Jetton T, Gannon M, Powers AC. Pancreatic islet production of vascular endothelial growth factor-a is essential for islet vascularization, revascularization, and function. *Diabetes.* 55, 2974-2985 (2006).
 34. Yao VJ, Ozawa MG, Trepel M, Arap W, McDonald DM, Pasqualini R. Targeting pancreatic islets with phage display assisted by laser pressure catapult microdissection. *Am J Pathol.* 166, 625-636 (2005).

35. Lammert E, Gu G, McLaughlin M, Brown D, Brekken R, Murtaugh LC, Gerber HP, Ferrara N, Melton DA. Role of VEGF-A in vascularization of pancreatic islets. *Curr Biol.* 13, 1070-1074 (2003).
36. Olerud J, Mokhtari D, Johansson M, Christoffersson G, Lawler J, Welsh N, Carlsson PO. Thrombospondin-1: an islet endothelial cell signal of importance for β -cell function. *Diabetes.* 60, 1946-1954 (2011).
37. Svensson AM, Ostenson CG, Jansson L. Age-induced changes in pancreatic islet blood flow: evidence for an impaired regulation in diabetic GK rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 279, E1139-E1144 (2000).
38. Carlsson PO, Andersson A, Jansson L. Influence of age, hyperglycemia, leptin, and NPY on islet blood flow in obese-hyperglycemic mice. *Am J Physiol.* 275, E594-E601 (1998).
39. Carlsson PO, Olsson R, Källskog O, Bodin B, Andersson A, Jansson L. Glucose-induced islet blood flow increase in rats: interaction between nervous and metabolic mediators. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 283, E457-E464 (2002).
40. Lai E, Pettersson U, Verdugo AD, Carlsson PO, Bodin B, Källskog Ö, Persson AE, Sandberg M, Jansson L. Blood lipids affect rat islet blood flow regulation through β_3 -adrenoceptors. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 307, E653-E663 (2014).

41. Dai C, Brissova M, Reinert RB, Nyman L, Liu EH, Thompson C, Shostak A, Shiota M, Takahashi T, Powers AC. Pancreatic islet vasculature adapts to insulin resistance through dilation and not angiogenesis. *Diabetes*. 62, 4144-4153 (2013).
42. Moldovan S, Livingston E, Zhang RS, Kleinman R, Guth P, Brunicardi FC. Glucose-induced islet hyperemia is mediated by nitric oxide. *Am J Surg*. 171, 16-20 (1996).
43. Lai EY, Jansson L, Patzak A, Persson AE. Vascular reactivity in arterioles from normal and alloxan-diabetic mice: studies on single perfused islets. *Diabetes*. 56, 107-112 (2007).
44. Li X, Zhang L, Meshinchi S, Dias-Leme C, Raffin D, Johnson JD, Treutelaar MK, Burant CF. Islet microvasculature in islet hyperplasia and failure in a model of type 2 diabetes. *Diabetes*. 55, 2965-2973 (2006).
45. 窪田 哲也, 窪田 直人, 門脇 孝. 血管内皮機能とインスリン抵抗性, *日本薬理学雑誌* 2, 85-88 (2008).
46. Zanchetti A, Ruilope LM. Antihypertensive treatment in patients with type-2 diabetes mellitus: what guidance from recent controlled randomized trials? *J Hypertens*. 20, 2099-2110 (2002).
47. Suzuki K, Nakagawa O, Aizawa Y. Improved early-phase insulin response after

- candesartan treatment in hypertensive patients with impaired glucose tolerance. *Clin Exp Hypertens.* 30, 309-314 (2008).
48. Jandeleit-Dahm KA, Tikellis C, Reid CM, Johnston CI, Cooper ME. Why blockade of the renin-angiotensin system reduces the incidence of new-onset diabetes. *23*, 463-473 (2005).
49. Elliott WJ, Meyer PM. Incident diabetes in clinical trials of antihypertensive drugs: a network meta-analysis. *369*, 201-207 (2003).
50. Yusuf S, Ostergren JB, Gerstein HC, Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Olofsson B, Probstfield J, McMurray JV; Candesartan in Heart Failure-Assessment of Reduction in Mortality and Morbidity Program Investigators. Effects of candesartan on the development of a new diagnosis of diabetes mellitus in patients with heart failure. *112*, 48-53 (2005).
51. Park K, Li Q, Rask-Madsen C, Mima A, Mizutani K, Winnay J, Maeda Y, D'Aquino K, White MF, Feener EP, King GL. Serine phosphorylation sites on IRS2 activated by angiotensin II and protein kinase C to induce selective insulin resistance in endothelial cells. *Mol Cell Biol.* 33, 3227-3241 (2013).
52. Lau T, Carlsson PO, Leung PS. Evidence for a local angiotensin-generating system and dose-dependent inhibition of glucose-stimulated insulin release by angiotensin II

in isolated pancreatic islets. *Diabetologia*. 47, 240-248 (2004).

53. Tikellis C, Wookey PJ, Candido R, Andrikopoulos S, Thomas MC, Cooper ME.

Improved islet morphology after blockade of the renin- angiotensin system in the ZDF rat. *Diabetes*. 53, 989-997 (2004).

54. Chu KY, Lau T, Carlsson PO, Leung PS. Angiotensin II type 1 receptor blockade

improves beta-cell function and glucose tolerance in a mouse model of type 2 diabetes.

Diabetes. 55, 367-374 (2006).