

原著

Spontaneously Diabetic Torii (SDT) ラットにおける セルレイン誘導急性浮腫性膵炎と Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) の発現

佐藤江里¹⁾ 田村綾女¹⁾ 丹藤雄介¹⁾
須田俊宏¹⁾ 中村光男²⁾ 山岸昌一³⁾

抄録 病歴の長い糖尿病患者において、アミラーゼ分泌の低下や膵萎縮・線維化を呈する症例があることが報告されている。しかしこのような病態の動物モデルは現在確立されていない。また、終末糖化産物 AGE, その受容体である RAGE は糖尿病血管合併症に関与しているとされているが、膵への影響は不明である。糖尿病における膵外分泌障害とその機序を明らかにするため、加齢により膵ラ氏島の線維化を生じる自然発症 2 型糖尿病モデル、Spontaneously Diabetic Torii (SDT) ラットに caerulein 急性膵炎を発症させ、糖尿病の発症および程度、膵の線維化に変化を生じるか否か、同時に、RAGE の発現を RT-PCR により検討した。結果、膵炎による糖尿病発症および膵の線維化、糖尿病発症前後および膵炎の有無による RAGE の発現に変化は認めず、糖尿病ラットモデルにおける膵障害と RAGE の関連は明らかではなかった。

弘前医学 59:110-117, 2008

キーワード：糖尿病；セルレイン膵炎；SDT ラット；RAGE；膵線維化。

ORIGINAL ARTICLE

CAERULEIN INDUCED PANCREATITIS AND EXPRESSION OF RECEPTOR FOR ADVANCED GLYCATION ENDPRODUCTS IN SPONTANEOUSLY DIABETIC TORII RAT

Eri Sato¹⁾, Ayame Tamura¹⁾, Yusuke Tando¹⁾,
Toshihiro Suda¹⁾, Teruo Nakamura²⁾, and Shoichi Yamagishi³⁾

Abstract Patients with chronic pancreatitis are not only suffered from pancreatic exocrine but also endocrine deficiency. Also, in diabetic patients with long duration, there are some patients with impaired amylase secretion and pancreatic atrophy or fibrosis. Recently, advanced glycation endproducts (AGE) and receptor for AGE (RAGE) are reported as one of causes of diabetic vascular complications such as neuropathy, retinopathy, nephropathy and macroangiopathy. Relationship of diabetes with pancreatic exocrine deficiency and AGE-RAGE is unknown. So we investigated whether there exist "diabetic pancreatopathy" and effects of RAGE on the diabetic pancreas using an animal model. Spontaneously Diabetic Torii (SDT) rat reveals insulin deficiency and fibrosis of islets of Langerhans. We induced recurrent acute pancreatitis in the SDT rat with repeated caerulein injection and investigated the severity of diabetes and pancreatic fibrosis. Also we examined RAGE-mRNA expression before and after diabetes onset and pancreatitis by RT-PCR. As results, the onset of diabetes and its severity as well as, pancreatic fibrosis were not altered with or without pancreatitis. Expression of RAGE-mRNA was low in the pancreas, and was not altered after the onset of diabetes and pancreatitis. In conclusion, different mechanisms for fibrosis may operate in the islets of Langerhans and in pancreatic lobules.

Hirosaki Med. J. 59:110-117, 2008

Key words: Diabetes mellitus; caerulein induced pancreatitis;
Spontaneously Diabetic Torii (SDT) rat; RAGE; pancreatic fibrosis.

¹⁾ Department of Endocrinology and Metabolism,
Hirosaki University Graduate School of Medicine
²⁾ Department of Health Science, Hirosaki University
School of Medicine

³⁾ Department of Internal Medicine, Division of
Cardio-vascular Medicine, Kurume University
School of Medicine

Correspondence: E. Sato

Received for publication, December 5, 2007

Accepted for publication, December 28, 2007

¹⁾ 弘前大学大学院医学研究科内分泌代謝内科学講座

²⁾ 同 保健学科

³⁾ 久留米大学心臓血管内科
別刷請求先：佐藤江里
平成19年12月5日受付
平成19年12月28日受理

緒 言

線維化の進行した非代償期の慢性膵炎では膵外分泌、内分泌の双方が障害され、消化吸収障害だけでなく、インスリン分泌の低下による膵性糖尿病を合併する¹⁾。また、病歴の長い糖尿病患者において²⁾、膵外分泌障害を合併し、アミラーゼ分泌の低下や膵萎縮、膵線維化を呈する症例もあることが報告されている^{3,4)}。このような病態の動物モデルは現在確立されておらず、この分野の研究に支障をきたしている。

Cholecystokinin (CCK) の analogue であるセルレイン (caerulein) をラットに大量に投与すると急性浮腫性膵炎が惹起される^{5,6)} ことが知られているが、その炎症反応は1週間程度で回復し、慢性膵炎に移行して線維化を呈することはないとされている^{7,8)}。

今回われわれは、加齢とともに膵ランゲルハンス島が線維化する自然発症2型糖尿病モデルラット、Spontaneously Diabetic Torii (SDT) ラット⁹⁻¹¹⁾の腹腔内に caerulein を反復投与することにより急性膵炎を発症させ、糖尿病発症と膵における線維化に変化を認めるか否かについて血糖値、インスリン濃度および膵病理組織の経時的变化を検討した。同時に、糖尿病患者における血管合併症の発症進展機序に関与するとされる終末糖化産物 (Advanced Glycation Endproducts ; AGE)¹²⁾ の受容体のひとつである Receptor for AGE (RAGE)¹³⁾ の膵における発現が、糖尿病発症前後、膵炎の有無、または AGE 刺激後培養膵で変化するか否かについても検討した。

材料および方法

実験動物

すべての実験には明暗12時間サイクル、室温22℃で調節した部屋で通常食で飼育した雄性SDTラット(日本クレア社)を用いた。なお、プラスチックケージで1ケージあたり2-3匹で飼育した。なお、AGE刺激RAGE発現のため12週齢のSDラットの膵を用いた。

本実験は弘前大学動物実験指針に沿って行われた。

方 法

実験動物は caerulein 投与 SDT ラット群 (n=7) とコントロール群 (caerulein 非投与 SDT ラット : n=7) の2群に無作為に分けた。caerulein 投与群には飽食状態で caerulein (CAERULEIN: SIGMA 社) を体重あたり 20 μ g/kg を1時間毎に計4回腹腔内注射し¹⁴⁾、第1回目の注射から1、3時間後に尾静脈より採血して血清アミラーゼ活性を測定した。コントロール群には同量の生理食塩水を同様に腹腔内注射した。ラット生後10、11、12、13週齢にこの処置を計4回繰り返し行った。また、12週齢以降の caerulein 投与群、コントロール群の両群に、経口糖負荷試験 (OGTT) を行い、すべてのラットが糖尿病を発症するまで2週間毎に繰り返し施行した (Fig.1)。OGTTは18時間の絶食後に行い、体重あたり2g/kgのブドウ糖を胃ゾンデを用いて経口投与し、0、60、120分後に尾静脈より採血して血糖値とインスリンを測定した。なお、糖尿病は糖負荷120分後の血糖値200mg/dl以上とした。

病理組織学的検討は、12、30週齢の caerulein 投与群、コントロール群のラットで行った。なお、12週齢の caerulein 投与群ラットの膵は、caerulein 投与24時間後のものとした。エーテル深麻酔下で脱血死させ、膵臓を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、常法に従ってパラフィン包埋を行った。薄切後、Hematoxylin-Eosin 染色、Masson-Trichrome 染色を行った。

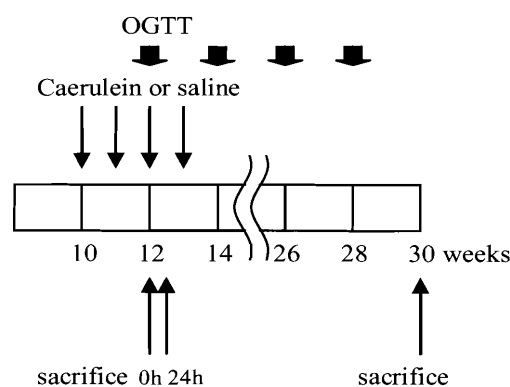


Fig.1 Experimental protocol.

アミラーゼ, 血糖値, インスリンの測定

血清アミラーゼ活性はヨード澱粉法 (アミラーゼテストワコー: 和光純薬工業株式会社) で測定した. 血糖値は酵素電極法 (グルコカード TMG メーター: アークレイ株式会社) で測定した. 血清インスリン濃度はラット標準インスリンを用いた酵素抗体法 (RatInsulin ELISA: Mercodia) により測定した.

RAGE の発現は, 今回使用した SDT ラットの糖尿病発症前 (10 週齢), 発症後 (20 週齢) の腭で検討し, また, コントロール群と caerulein 投与群において発現に相違がないかを検討した. また, RAGE のリガンドである AGE 刺激で培養膵細胞の RAGE 発現が変化するか否かについても検討した. なお, 生理的な条件下で最も発現が強いとされる肺組織^{13, 15)} を比較対照とした.

培養膵での RAGE-mRNA 発現

SDT ラットと同様に SD ラットを脱血死させ膵を摘出した. 摘出した膵は細切し, AGE 濃度が 10 mg/ml の培養液中で 45 分間 (37 度) 培養した. AGE は久留米大学医学部 山岸昌一先生のご好意により, 分与して頂いた¹⁶⁾.

RT-PCR

QIAshredder, RNeasy Midi Kit (QIAGEN) を使って肺および膵の TotalRNA を抽出した. RT-PCR は Onestep RT-PCR Kit (QIAGEN) を用い, RAGE のプライマーは 5'-CAACCCAGACTCGAGGAGAG-3', 5'-AGAAAGTGGCTCGAGGTTGA-3', GAPDH のプライマーは 5'-GGTGAAGGTCGGTGTGAACGGA-3', 5'-TGTTAGTGGGGTCTCGCTCCTG-3' とした. TaKaRa Thermal CyclerMP (TaKaRa BIOMEDICALS) を用いて, アニーリングは 67°C, 30 サイクルの RT-PCR を行い, 電気泳動にて mRNA の発現を確認した. mRNA 発現は, CSAnalyzer (アトー株式会社) を用いて, それぞれ GAPDH との蛍光強度の比によって検討した.

統計学的解析

測定値は平均値 ± 標準誤差 (SE) で表記し, 本

実験で得られた結果の有意差検定には Student's non-parametric t-test を用いて行い, 危険率 5% 未満または 1% 未満を有意差ありとした.

結 果

血清アミラーゼ活性

10, 11, 13 週齢において, 血清アミラーゼ活性は caerulein 投与直後より有意 ($p < 0.01$) に上昇し, 最初の caerulein 投与から 3 時間後には約 3 倍程度まで増加した (Fig.2).

体重変化

caerulein 投与群, コントロール群で体重は 24 週齢ころまで増加し, それ以降は徐々に減少した. 両群の体重増加率, 減少率に有意差は認められなかった (Fig.3).

糖尿病発症

コントロール群では 14 週齢から, caerulein 投与群では 18 週齢から糖尿病の発症が確認された. 20 週齢では両群ともに半数以上が糖尿病を発症し, 28 週齢では両群すべてのラットが糖尿病となった (Fig.4).

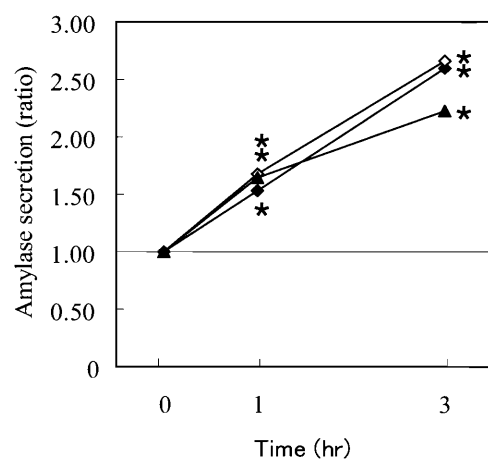


Fig.2 Time-course of serum amylase activity in SDT rats treated with four intraperitoneal injections of 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight of caerulein. (◆) 20 weeks, (◇) 11 weeks, (▲) 13 weeks. * Significant difference ($p < 0.01$) between control (0 h) and caerulein-treated rats.

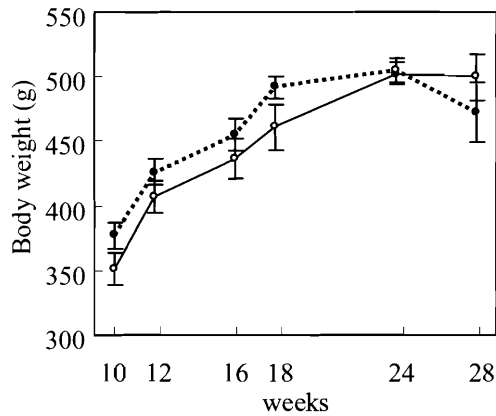


Fig.3 Body weight in SDT rats from 10 to 28 weeks of age. (●) caerulein group, (○) control group.

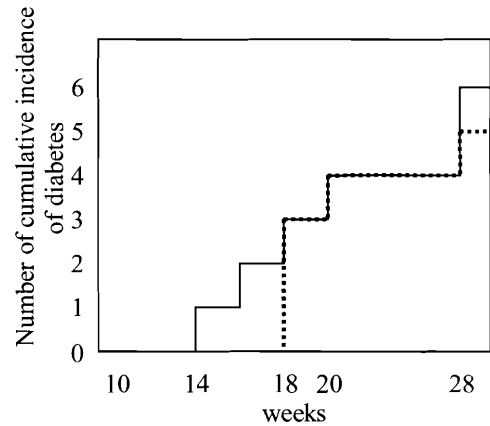


Fig.4 Cumulative incidence of diabetes in SDT rat. A dotted line: caerulein group, a solid line: control group.

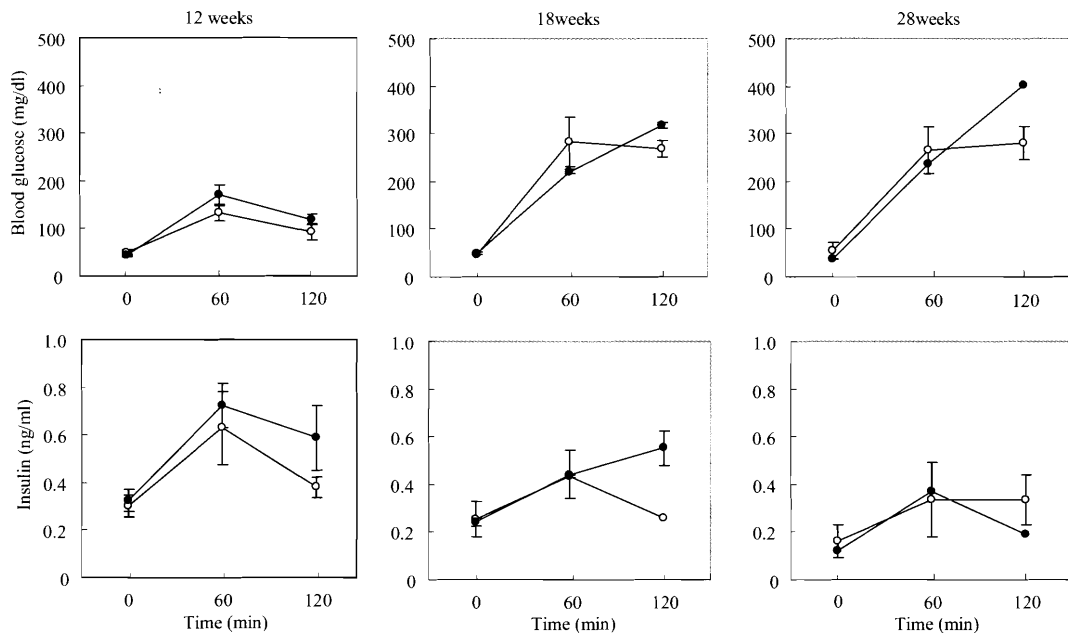


Fig.5 Changes in blood glucose and insulin concentrations during oral glucose tolerance tests (2 g/kg body weight) in SDT rats. (●) caerulein group; (○) control group. Values are expressed as means \pm SE.

経口糖負荷試験 (OGTT)

12週齢, 18週齢, 28週齢における caerulein 投与群, コントロール群の血糖値と血清インスリン濃度を比較した. 空腹時血糖値は12週齢, 18週齢, 28週齢において caerulein 投与群とコントロール群で有意差は認められなかった. 18週齢から60分後, 120分後の血糖値が高値となり, 過大遅延反応を示したが, 18週齢, 28週齢のい

れでも caerulein 投与群とコントロール群において有意差は認められなかった. 血清インスリン濃度は週齢を追うごとに減少する傾向にあったが, いずれの週齢でも caerulein 投与群とコントロール群において有意差は認められなかった (Fig.5).

組織学的変化

12週齢のコントロールラットにおいて, ラ

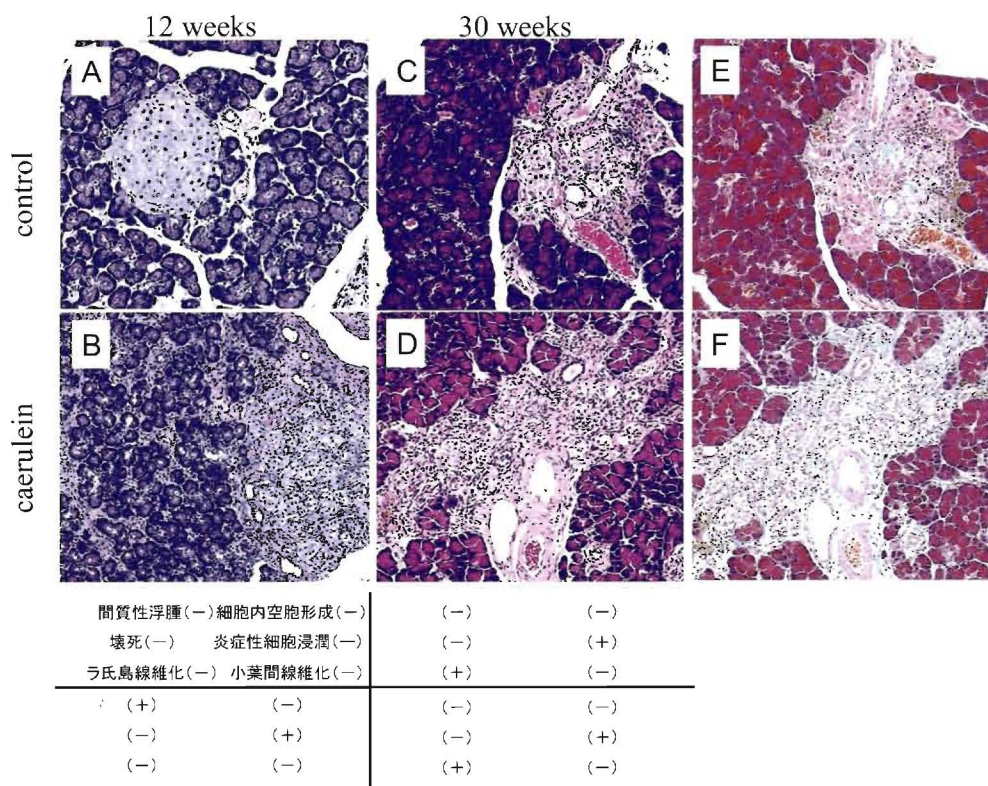


Fig.6 Histological changes in the pancreas of male SDT rat, (A) No abnormalities were observed in control rat (H&E, 12 weeks). (B) Interstitial edema and inflammatory cell infiltration can be observed at 24 h after the first caerulein injection (H&E, 12 weeks), (C,E) Hemorrhage, inflammatory cell infiltration, fibrosis and hemosiderin deposition around the islets can be observed in control rat (H&E, Masson-Trichrome, 30 weeks) and (D,F) caerulein treated rat (H&E, Masson-Trichrome, 30 weeks). ×200

ランゲルハンス島の構造に異常を認めなかった (Fig.6A). 12週齢の caerulein 投与 24 時間後のラットでは、膵小葉での壊死や空胞化は認めないものの、間質の浮腫と炎症性細胞の浸潤を認めた (Fig.6B). 30 週齢のコントロールラットでは、ランゲルハンス島内部および周辺に炎症性細胞の浸潤と線維化、ヘモジデリンの沈着を認めた (Fig.6C, 6E). この変化は 30 週齢の caerulein 投与ラットでも同様で、コントロールラットに比してランゲルハンス島周辺の線維化はわずかに強い傾向にあった (Fig.6D, 6F).

RT-PCR における RAGE-mRNA の発現

RAGE-mRNA は肺において強く発現していた (Fig.7, 8). 膵における RAGE の発現は弱く、AGE 添加培養後の膵でも発現の増強は認められず (Fig.7), 糖尿病の発症前後, caerulein 膵

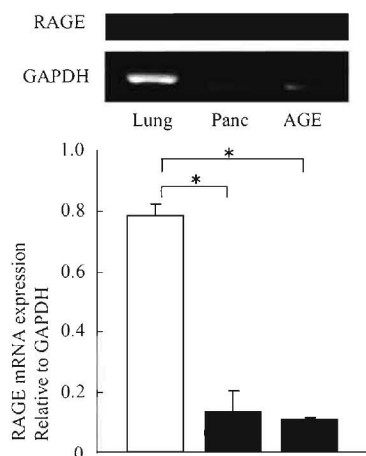


Fig.7 Effect of AGE on RAGE expression determined by RT-PCR. RAGE mRNA level was much higher in lung and was low in pancreas of SD rat. Even after incubating with AGE, RAGE mRNA level was not altered and low in pancreas. Values are expressed as means ±SE. Asterisks indicate statistical differences (p<0.01).

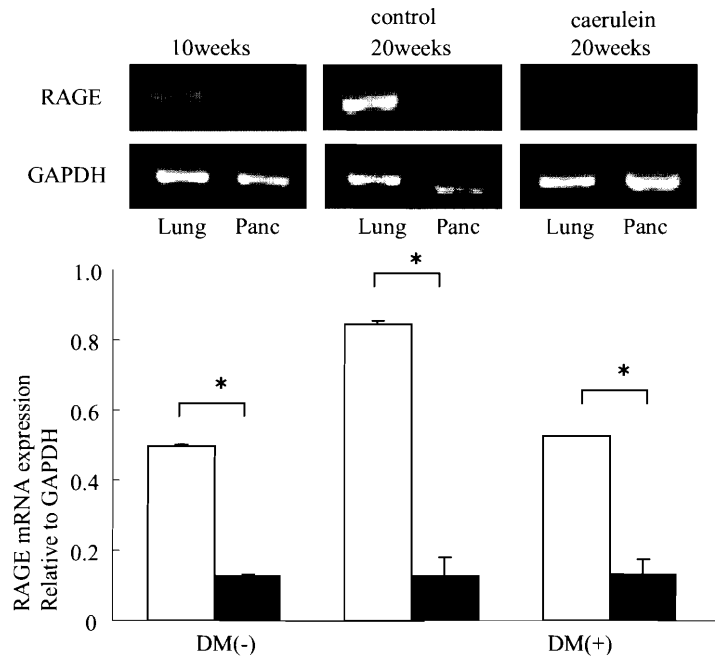


Fig.8 Effect of diabetes and caerulein-induced pancreatitis on RAGE expression determined by RT-PCR. RAGE mRNA level was much higher in lung and was low in pancreas both of 10 and 20 weeks of ages in SDT rat. Values are expressed as means \pm SE. Asterisks indicate statistical differences ($p < 0.01$) to lung.

炎の有無によつての変化も明らかではなかつた (Fig.8).

考 察

Spontaneously Diabetic Torii (SDT)ラットは、1997年に確立された自然発症2型糖尿病モデルラットで、雄性では生後20週齢頃から糖尿病を発症するラットである⁹⁻¹¹⁾。SDTラットは肥満を呈さず、高血糖の機序はインスリン抵抗性ではなくインスリン分泌の減少にあり、加齢とともにインスリン分泌が減少するとされている。

病理組織像では、10週齢頃から膵ランゲルハンス島における毛細血管からの出血、炎症性細胞の浸潤と線維化、25週齢からランゲルハンス島内部および周辺における線維化の進行とヘモジデリン沈着が見られ、40週齢以降からランゲルハンス島の萎縮性変化と数の減少、結合組織による置換が見られるとされている。

最近では、9週齢のSDTラットで一過性の高IL-18血症があり、それによつて10週齢以降に出現する膵障害が引き起こされている可能性が

あることも報告されている (浜口朋也, 兵庫医大, 私信)。また, caeruleinによる急性膵炎誘導はこれまで多数の報告があり, 1回のcaerulein腹腔内投与で急性膵炎が発症することが知られている。caeruleinの反復投与のみで膵の線維化を誘導した報告はないが, 4週間にわたる super oxide dismutase (SOD) やエタノールの併用により膵の線維化を観察している報告がある。そのため, 今回われわれはcaeruleinの投与を10週齢から13週齢まで4週間にわたって行い, また, caeruleinによつてSDTラットにおける膵の線維化がより重症化し, 早期から出現するか否かを検討するため, 組織学的観察を30週齢の時点で行った。結果は, 18週齢ころから高血糖と体重減少, インスリン分泌の低下を認め, これまでの報告と同様であった。caerulein投与群のラットも同様の経過を示し, コントロール群と比して有意な差は認められなかつた。病理組織像は, 30週齢でコントロール群, caerulein投与群の両群でランゲルハンス島内部と周辺の線維化を認めたものの, 両群間の相違はなく, 慢性膵炎に特

微的な腺房細胞間の線維化は認められなかった。caerulein 投与 24 時間後の 12 週齢のラットの膵では間質の浮腫を認め、急性浮腫性膵炎の発症を確認できたが、caerulein による急性膵炎を 4 回繰り返し発症させた 30 週齢のラットの膵でも小葉間の線維化は見られず、慢性膵炎の所見^{17, 18)}は認められなかった。

本実験では、10 週齢から 13 週齢にかけて計 4 回の caerulein 投与を行ったが、13 週齢におけるアミラーゼの上昇率は 10 週齢、11 週齢と比べると有意ではないが平均 16%低下していた。糖尿病発症以前ではあるものの、これまでの報告¹⁹⁾にあるように、糖尿病に伴う caerulein 刺激に対するアミラーゼ分泌の低下である可能性が示唆された。糖尿病患者の組織・病変部に蓄積される終末糖化産物 AGE²⁰⁾、AGE の受容体である RAGE¹⁵⁾ が、糖尿病血管合併症である網膜症²¹⁾・腎症²²⁾・神経障害²³⁾ および動脈硬化^{24, 25)} に関与していることはこれまでに報告されているが、AGE、RAGE を介した糖尿病の膵に対する関与については不明である。今回のわれわれの実験では、RAGE の膵における発現は弱く、それは糖尿病発症前後でも変化が認められなかった。SDT ラットの膵組織像および RT-PCR の結果からは、糖尿病における膵の障害はランゲルハンス島中心のものであり、外分泌腺には及ばず、またそれは RAGE を介するものではないと考えられた。

結 語

自然発症 2 型糖尿病モデルラット、SDT ラットに caerulein 急性浮腫性膵炎を発症させ、糖尿病発症時期、糖尿病の程度に相違はあるか、また、膵線維化に変化はあるかどうか検討した。コントロールラットと caerulein 膵炎ラットの糖尿病発症に相違はなく、血糖値、インスリン濃度にも明らかな相違は認められなかった。病理組織学的検討では、両者ともランゲルハンス島の線維化を呈したものの、慢性膵炎の診断基準とされる小葉間における線維化は認めることができなかった。RT-PCR により膵における RAGE-mRNA の発現を確認したが、発現は非常に弱く、糖尿病発症後も変化が認められなかったことより、糖尿病患者における膵障害への RAGE の関与は否定的と考

えられた。

謝 辞

本研究において、SDT ラットの情報提供および入手、病理組織標本の作製にご協力して下さった分子病態病理学講座 和田龍一先生ならびに病理生命科学講座 楠美智巳先生に深謝いたします。

参考文献

- 1) Nakamura T, Takeuchi T, Tando Y. Pancreatic dysfunction and treatment options. *Pancreas* 1998;16:329-36.
- 2) Frier BM, Saunders JHB, Wormsley KG, Bouchier IAD: Exocrine pancreatic function in juvenile-onset diabetes mellitus. *Gut*. 1976;17:685-91.
- 3) 中村光男, 山田尚子. 糖尿病患者の膵外分泌機能. 胆と膵 1995;16:651-6.
- 4) Dandona P, Freedman DB, Foo Y, Perkins J, Katrak A, Mikhailidis DP, Rosalki SB, et al : Exocrine pancreatic function in diabetes mellitus. *J Clin Pathol*.1984;37:302-6.
- 5) Lampel M, Kern HF. Acute intestinal pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch A Path Histol*. 1977;373:97-117.
- 6) Niederau C, Ferrell LD, Grendell JH. Caerulein-induced acute necrotizing pancreatitis in mice: protective effects of proglumide, benzotript, and secretin. *Gastroenterology*. 1985;88:1192-204.
- 7) 谷 聡, 大槻 眞, 藤井正俊, 他. ラットにおける caerulein 皮下投与における実験的急性浮腫性膵炎の経時的変化. *膵臓* 1986;1:243-9.
- 8) 尾野秀樹, 眞 重雄, 新川淳一, 他. ラットにおける実験的セルレイン急性膵炎—セルレイン投与量, 膵炎重症度および膵腺房細胞再生の関連について—. *膵臓* 1987;2:76-85.
- 9) Shinohara M, Masuyama T, Shoda T, Takahashi T, Katsuda Y, Komeda K, Kuroki M, et al: A new spontaneously diabetic non-obese Torii rat strain with severe ocular complications. *Int J Exp Diabetes Res*, 2000;1:89-100.
- 10) Masuyama T, Komeda K, Hara A, Noda M.

- Shinohara M, Oikawa T, Kanazawa Y, et al: Chronological characterization of diabetes development in male Spontaneously Diabetic Torii rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004;314:870-7.
- 11) 篠原雅巳, 正田俊之, 及川寿浩, 他. 自然発症2型糖尿病モデル雄性SDTラットの糖尿病病態について. *糖尿病* 2004;47:111-6.
 - 12) Yamagishi S, Imaizumi T. Diabetic vascular complications; pathophysiology, biochemical basis and potential therapeutic strategy. *Curr Pharm Des* 2005;12:2279-99.
 - 13) Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, Esposito C, et al. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem* 1992;267:14987-97.
 - 14) 谷 聡, 大槻 眞, 馬場茂明, 他. Caerulein 大量投与による実験的急性浮腫性膵炎の作成. *日消会誌* 1986;83:2043-9.
 - 15) Soulis T, Thallas V, Youssef S, Gilbert RE, McWilliam BG, Murray-McIntosh RP, Cooper ME. Advanced glycation end products and their receptors co-localise in rat organs susceptible to diabetic microvascular injury. *Diabetologia*. 1997;40:619-28.
 - 16) Yamagishi S, Yonekura H, Ooka H, Yamamoto Y, Katsuno K, Sato F, Mita I, et al. Advanced glycation end products-driven angiogenesis in vitro. Induction of the growth and tube formation of human microvascular endothelial cells through autocrine vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1997;272:8723-30.
 - 17) 日本膵臓学会: 慢性膵炎臨床診断基準 2001. *膵臓* 2001;16:560-1.
 - 18) Martin E. Different pathomorphological aspects of pancreatic fibrosis, correlated with etiology: anatomical study of 300 cases. In: Gyr K, Singer M, Sarles H, eds. *Pancreatitis-concepts and classification*. Elsevier, Amsterdam, 1984:77-82.
 - 19) Otsuki M, Williams JA. Effect of diabetes mellitus on the regulation of enzyme secretion by isolated rat pancreatic acini. *J Clin Invest* 1982;70:148-56.
 - 20) Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. Increased accumulation of the glycooxidation product N^ε-(carboxymethyl) lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest* 1997;99:457-68.
 - 21) Lu M, Kuroki M, Amano S, Tolentino M, Keough K, Kim I, Bucara R et al. Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression. *J Clin Invest* 1998;101:1219-24.
 - 22) Chen S, Cohen MP, Lautenslager GT, Shearman CW, Ziyadeh FN. Effects of glycated albumin on mesangial cells: evidence for a role in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2001;59:673-81.
 - 23) Sugimoto K, Nishizawa Y, Horiuchi S, Yagihashi S. Localization in human diabetic peripheral nerve of N^ε-carboxymethyllysine-protein adducts, an advanced glycation endproduct. *Diabetologia* 1997; 40:1380-7.
 - 24) Yamagishi S, Fujimori H, Yonekura H, Yamamoto Y, Yamamoto H. Advanced glycation endproducts inhibit prostacyclin production and induce plasminogen activator inhibitor-1 in human microvascular endothelial cells. *Diabetologia* 1998; 41:1435-41.
 - 25) Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest* 1991;87:432-8.