

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19591030  
 研究課題名(和文) 内皮細胞活性化因子 S1P を標的とした糖尿病合併症の  
 実験的分子標的治療  
 研究課題名(英文) Experimental therapy for diabetic complication targeting  
 endothelium activating factor, sphingosine-1-phosphate  
 研究代表者  
 和田 龍一 (WADA RYUICHI)  
 弘前大学・大学院医学研究科・准教授  
 研究者番号：20260408

## 研究成果の概要：

血管内皮細胞活性化因子であるスフィンゴシン 1 リン酸(S1P)を中心に、糖尿病における細小血管障害の病態の解明し分子標的治療としての可能性を模索した。糖尿病ラットの血小板では CD62 の発現増強とともに、S1P を産生するスフィンゴシンキナーゼ(SPHK)の発現が増加しており、糖尿病では血小板の活性化とともに S1P シグナルの亢進が示唆された。網膜、腎臓、末梢神経の血管内皮細胞には S1P のレセプター Edg1 が発現していたが、糖尿病ラットでの発現程度は糖尿病が長期に及んでも正常対照ラットと同等であった。SPHK は血小板ばかりではなく内皮細胞や実質細胞にも発現を認めたため、S1P の分子標的治療は血小板特異性が必要と考えられた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：糖尿病、細胞・組織、生体分子、生理活性、スフィンゴ脂質

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病は、その予備軍を含め約 1200 万人が罹患する慢性疾患である。糖尿病は網膜症、腎症、末梢神経障害といった糖尿病合併症をきたし、進行すると失明や人工透析、また下肢の壊疽や切断に至り、患者さんの QOL は著しく阻害される。このような合併症の発症を抑制するために、糖代謝の是正とともにアルドース還元酵素の阻害などの治療が行われるが、現在のところ効果的な治療法はない。

糖尿病合併症の病理発生には、代謝因子と細小血管障害の二つが深く関与していると考えられている。糖尿病状態では血管内皮細胞が異常活性化していることが知られている。このような内皮細胞の異常活性化には、内皮細胞自体の代謝異常、後期糖化生成物の生成とともに、内皮細胞と相互作用のある血小板の機能亢進が関与している可能性がある。したがって、血管内皮細胞と血小板機能に関連する分子が、細小血管障害の病理発生、ひいては糖尿病合併症の病理発生を抑制し、新しい糖尿病合併症の治療薬となる可能性がある。

スフィンゴシン 1 リン酸(S1P)は、生理活性作用を有するスフィンゴ脂質である。血管内皮細胞に対して、内皮細胞の増殖や遊走、管腔形成、そして血管新生といった内皮細胞活性化因子としての作用を示し、生体内では血管の安定化に関与していると考えられている。S1P はセラミドの代謝産物であるスフィンゴシンに、スフィンゴシンキナーゼ (SPHK) によりリン酸が付加されて生成される。生体内では血小板に多く蓄積されており、凝固の亢進に伴って、活性化血小板から放出される。一方、血管内皮細胞は S1P をリガンドとする G 蛋白質共役受容体である Edg レセプターを発現している。この内皮細胞に発現する Edg レセプターを介して、S1P が内皮細胞の増殖や遊走、血管新生といった作用を惹起すると考えられている。

糖尿病においても、内皮細胞の機能亢進、基底膜成分の産生亢進、血管新生などの細小血管障害が認められるが、S1P を介した血小板と血管内皮細胞の相互作用が、このような細小血管障害の病理発生に何らかの役割を果たしている可能性がある。そこで、糖尿病合併症に対する治療として、血小板と内皮細胞の相互作用に関わる S1P を標的とした分子標的治療が有効ではないかと考えるに至った。

## 2. 研究の目的

糖尿病における S1P を介した細小血管障

害の病理発生について、次のような作業仮説を設定した。糖尿病状態においては血小板の活性化に伴い、S1P の放出が亢進する。血管内皮細胞では、血小板から放出される S1P が内皮細胞に発現する Edg1 を介して内皮細胞が活性化され、糖尿病の細小血管障害として特徴的な、血管透過性の亢進、血管新生、基底膜成分の生成亢進が惹起される。このような S1P を介したシグナル異常が細小血管障害の病理発生に関与している病態モデルを設定した。

本研究の目的は、糖尿病合併症の病理発生に深く関与する細小血管障害における S1P シグナルの果たす役割を明らかにし、細小血管障害に対する、効果的な標的分子を探索し、新たな分子標的治療の可能性を探ることにある。

## 3. 研究の方法

研究には糖尿病モデル動物として、ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットを用いた。糖尿病における血小板機能については、洗浄血小板を調整し、活性化状態や S1P シグナル関連分子の検討を行った。また、糖尿病合併症をきたす臓器における内皮細胞と実質細胞については、組織学的に S1P シグナル関連分子の発現について検討を行った。また、糖尿病合併症は糖尿病期間が長くなるにつれその重症度が増していく。そこで、S1P シグナル関連分子の局在や発現について、経時的な観点からも検討を行った。

### (1) 糖尿病モデルの作製

糖尿病モデル動物として、ストレプトゾトシン(STZ)誘発糖尿病ラットを用いた。生後 8 週齢の雄性 Wistar ラットに、STZ 40 mg/kg を尾静脈から注射して糖尿病を誘発した。STZ 注射 1 週間後に空腹時血糖を測定し、空腹時の血糖値が 300 mg/dl 以上のラットを糖尿病ラットとして検討に用いた。正常対照ラットとして同週齢の雄性 Wistar ラットを用いた。

糖尿病誘発後 8 週間と 16 週間糖尿病状態で飼育し、検討に用いた。

### (2) 洗浄血小板の調整

ネブタール麻酔下で、糖尿病および正常対照ラットの左心室からヘパリン採血をした。まず、150 G で 10 分 4°C で遠心し血小板豊富分画を分離し、さらにこの分画を 500 G で 15 分 15°C で遠心して得られた血小板をヘパリン加リン酸緩衝液に浮遊させ洗浄血小板を調整した。得られた洗浄血小板は 1%

SDS/50 mM Tris-HCl (pH 7.6)で溶解し、Western blot 用の試料として調整した。

### (3) 組織学的検討

ネンブタール過麻酔下で、ラットから眼球、腎臓、末梢神経、大動脈を摘出し、10%緩衝ホルマリンにて固定した。その後脱水し、パラフィンブロックに包埋した。4  $\mu$ m 厚のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色を行い、細小血管障害の程度と合併症の形態学的変化について検討を行った。

### (4) Western blot 解析

調整したサンプルを、10%ポリアクリルアミドゲルを用いて 0.1%SDS/Tris-Glycin 緩衝液で泳動した。続いて泳動した蛋白質を20%メタノール/Tris-Glycin 緩衝液でニトロセルロース膜に転写した。用いた抗体は抗スフィンゴシンキナーゼ(SPHK)抗体、抗 Edg1 抗体、抗 CD62 で、ペルオキシダーゼ標識二次抗体で処置した後、化学発光法で検出した。

### (5) 免疫組織学的検討

免疫組織学的検討には、4  $\mu$ m 厚のパラフィン切片を用いた。脱パラした後、内因性のペルオキシダーゼをブロックし、抗 SPHK 抗体、抗 Edg1 抗体で一晩インキュベートした。検出にはストレプトアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ法を用いて、ジアミノベンチジンで発色した。

## 4. 研究成果

### (1) 血小板の活性化状態と S1P シグナル関連分子の発現について

Western blot 法で糖尿病ラットと正常対照ラットの血小板の活性化状態と、SPHK と Edg1 の発現について検討した。その結果、糖尿病ラットの血小板では、CD62 の発現が正常対照ラットの血小板に比較して増加していた。SPHK の発現は糖尿病ラットで増加していたが、Edg1 の発現は糖尿病ラットの血小板で正常対照に比較して低下していた。

糖尿病ラットの血小板は活性化しているとともに、SPHK の発現増加から、S1P の生成が亢進している可能性が考えられた。一方で、Edg1 の発現は低下しており、血小板内における S1P シグナルは不均衡な状態にある可能性が考えられた。

### (2) 糖尿病ラットの各臓器における S1P シグナル関連分子の発現の局在について

免疫染色法により、糖尿病ラットと正常対照ラットの網膜、腎臓、末梢神経、大動脈における SPHK と Edg1 の発現について検討を行った。その結果、Edg1 は大動脈の内皮細胞を始めとして、網膜に分布する血管の内皮細胞、腎糸球体の血管内皮細胞、神経鞘内

の血管内皮細胞など、各臓器の細小血管の内皮細胞に発現していた。糖尿病ラットと正常対照ラット間で、Edg1 の発現の局在に差を認めなかった。

一方、SPHK の発現は、Edg1 と同様に細小血管の内皮細胞に発現を認めるのに加え、血管平滑筋、さらに腎臓では腎尿細管上皮、網膜では虹彩、末梢神経では神経鞘内血管の平滑筋や軸索にも発現を認め、血管ばかりではなく各臓器の実質細胞にも発現していた。これらの実質細胞における SPHK の発現の局在は、糖尿病ラットと正常対照ラットとの間で差を認めなかった。

SPHK と Edg1 は細小血管の内皮細胞に分布しており、糖尿病状態下でその分布は変化していないことが確認された。一方で、SPHK は実質細胞でも発現が認められており、糖尿病合併症の発症と進展に対する意義についてはさらに検討を要すると思われた。

### (3) 糖尿病期間と S1P 関連分子の発現程度について

糖尿病合併症は糖尿病が長期化すると、発症率が増加するとともに、重症度も増す。そこで糖尿病期間が8週間と短期のもの、16週と長期のラットにおいて、糖尿病合併症をきたす臓器における、Edg1 と SPHK の発現程度について検討した。

Edg1 と SPHK の発現程度は、糖尿病ラットにおいて糖尿病期間が長くなってもその発現程度に明らかな変化は認められず、正常対照ラットと比較しても差は認められなかった。

以上の結果から、

(1) 糖尿病ラットにおいて、血小板の活性化に伴って、SPHK の発現が増加している。

(2) 糖尿病合併症をきたす臓器である網膜、腎臓、末梢神経の細小血管の内皮細胞において Edg1 と SPHK が発現している。

(3) Edg1 と SPHK は、糖尿病状態による発現程度の変化、また、糖尿病期間による発現の変化は認められないことが明らかにされた。

これらのことから、糖尿病状態においては凝固異常などに伴って、活性化された血小板から S1P が末梢循環で局所的に多量に放出されることが予想される。一方、S1P のレセプターである Edg1 を発現する血管内皮細胞は、S1P のシグナルを過剰に受け、内皮細胞の異常活性化、そして何らかの機能異常が惹起されていることが予想される。

このような S1P を中心とした血小板と内皮細胞の相互作用に注目して分子標的治療を考えるといくつかの治療ポイントが考えられる。血小板における CD62 の発現の増加から示されるように、血小板自体が活性化さ

れた状態にあり、血小板の活性化自体を抑制する薬物治療による可能性が第一に考えられる。第二に、S1Pの生成とレセプターへの受容という経路を考えた場合、血管内皮細胞に発現するEdg1の阻害が考えられる。しかしながら、Edg1は血管の透過性を維持している可能性があり、完全な阻害は逆に副作用として血管透過性の亢進や出血などを引き起こしてしまう可能性がある。第三に、血小板のSPHKの発現が増加していることから、SPHKの阻害、S1Pの生成抑制といった戦略が考えられる。この治療戦略は、Edg1の生理的機能を阻害せず、特異的にS1Pシグナルを正常状態化できる可能性がある。注意が必要なのは、今回の免疫染色による検討から明らかにされたように、SPHKは血小板のみならず組織の内皮細胞や実質細胞にも発現しており、この標的治療を実用化するためには、血小板のSPHKを特異的に阻害する、細胞・組織特異的な治療戦略が必要であると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Yamagishi S, Ogasawara S, Mizukami H, Yajima N, Wada R, Sugawara A, Yagihashi S: Correction of protein kinase C activity and macrophage migration in peripheral nerve by pioglitazone, peroxisome proliferator activated-gamma-ligand, in insulin-deficient diabetic rats. *J Neurochem* 104:491-9, 2008、査読有
- ② 和田龍一、八木橋操六：基礎講座 糖尿病モデル動物 I 神経障害. *Diabetes Frontier* 18:391-398, 2007、査読無

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 龍一 (WADA RYUICHI)

弘前大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20260408

(2) 研究分担者

八木橋 操六 (YAGIHASHI SOROKU)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40111231

矢嶋 信久 (YAJIMA NOBUHISA)

弘前大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30443980

(3) 連携研究者