

新しい非肥満性2型糖尿病モデル Spontaneously Diabetic Torii (SDT) ラット

益山 拓

要 約

Spontaneously Diabetic Torii (SDT) ラットは非肥満性糖尿病を自然発症する新しい近交系ラットである。本研究では、SDTラットにおける糖尿病の成因について、遺伝学的ならびに病態生理学的に検討した。その結果、SDTラットの糖尿病は、少なくとも3つの量的形質遺伝子座に支配されており、膵島内毛細血管異常を契機とした進行性の線維化と β 細胞の脆弱性の、両者が関与しているものと思われる膵インスリン分泌能力の減少に起因することが示唆された。これらはSDTラットがヒト非肥満性2型糖尿病の成因解明のための新しいモデル動物として有用であることを示していた。

キーワード：インスリン，膵島，糖尿病，モデル動物，量的形質遺伝子座

はじめに

2型糖尿病はインスリンの分泌と感受性におけるバランスの欠落によって起こる慢性高血糖を主徴とする疾患である [9]。近年社会問題にもなっている通り、その発症には生活習慣に影響するところが大きいものの、その感受性については複数の遺伝的要因が複雑に関与していると考えられている [2]。2型糖尿病の病態ならびに成因を解明するためのツールとして、遺伝因子および環境因子を人為的に統御できる実験動物がよく用いられている。本稿では日本人に多く見られるような肥満を伴わない2型糖尿病のモデル動物として、著者らによって開発されたSpontaneously Diabetic Torii (SDT) ラットについて紹介する。

SDTラット開発の経緯

1988年、鳥居薬品(株)研究所において、生後約1年時時のSprague-Dawley系 (SD) ラットに多飲、多尿、尿糖を伴う雄ラットが発見された。この雄ラットを起源として得た子孫をもとに兄妹交配を20世代以上繰り返し、発見からおよそ10年を経て新たな近交系統SDTを確立した [8]。兄妹交配の過程において糖尿病発現率の上昇が見られるなど、本糖尿病形質が複数の遺伝的要因に支配されていることが示されていた。兄妹交配20世代以降は比較的安定した形質が保持されている。

SDTラットの糖尿病病態

SDTラットの糖尿病発症は雄で生後20週齢頃から認められ、40週齢までに100%が発症する (図1 A) [6–8]。一方、雌では65週齢ま

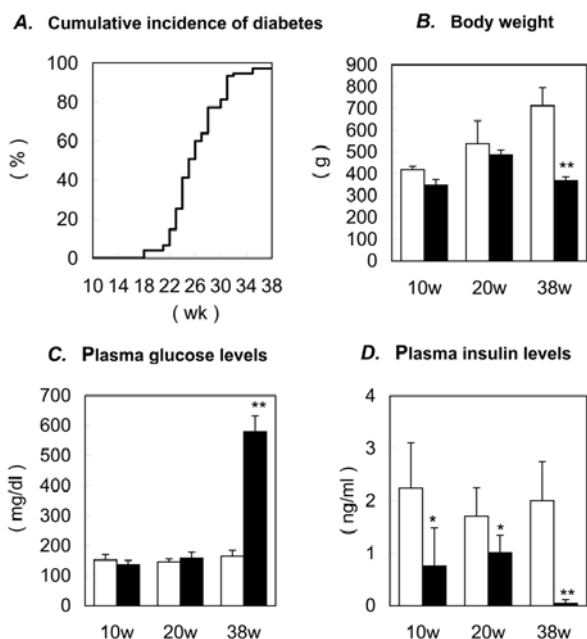


図1 雄性SDTラットの累積糖尿病発症率 (A) および糖尿病発症前後の体重 (B)、空腹時血漿中グルコース (C) およびインスリン濃度 (D)

(A) $n=75$, (B-D) □: 対照SDラット, ■: SDTラット, 10および20週齢のSDTラットは非糖尿病, 38週齢のSDTラットは糖尿病を発症していた。データは平均値±標準偏差 (各群 $n=5$) を示す。アスタリスク (*) は, SDラットおよびSDTラット間の統計学的有意差 (* : $P<0.05$, ** : $P<0.01$) を示す。

で33%程度にとどまり, 明らかな性差がある [8]。糖尿病発症における性差は他のモデル動物でも報告されているが, 現時点でその原因は明らかとなっていない。

雄のSDTラットの体重は20週齢 (糖尿病を発症する前) まで正常SDラットとほぼ同等であるが, 糖尿病を発症した後 (38週齢時) 減少する (図1 B)。肥満指数 (BMI) も同様の傾向を示し, 生涯に亘って肥満を呈することはない [6, 7]。空腹時血漿中グルコース濃度は20週齢ごろまでは正常SDラットと同等であるが, その後加齢とともに増加し, 高血糖ならびに尿糖を呈し, いわゆる糖尿病を呈する (図1 C)。発症後は著しい高血糖 (600mg/dl以上) とともに尿糖陽性の著しい多尿, 多飲を認めるようになる [7, 8]。血中インスリン濃度は糖尿病発症前から正常ラットに比べ低く, 高血

糖発症後は著明な低インスリン血症を呈する (図1 D)。すなわち, SDTラットの糖尿病は末梢におけるインスリン抵抗性よりも, 血漿中インスリン濃度の減少に依存しているものといえ, 糖尿病発症後はインスリン依存性糖尿病と類似した臨床症状が見られる [7, 8]。

SDTラットにおける耐糖能低下

2型糖尿病はその発症前に耐糖能が低下することが知られている [1]。そこで生後8週齢から糖尿病を呈した24週齢まで経時的に経口糖負荷試験を実施し, 耐糖能ならびにインスリン分泌能を評価した (図2) [7]。SDTラットにおいても糖尿病が顕在化する2ヶ月以上前 (14週齢ごろ) には, 明らかな耐糖能低下を示し, 加齢とともに糖負荷後血糖曲線の上昇が見られる (図2 上段)。一方, 耐糖能低下とともに糖負荷後のインスリン分泌反応の低下が認められ, 糖尿病発症後では空腹時血漿インスリン濃度の低下とともに, 糖負荷後の血漿インスリン増加もほとんど認められなかった (図2 下段)。これらのことから, SDTラットの耐糖能低下はインスリン分泌不足に起因するものといえる。さらに糖負荷後の血糖曲線下面積 (glucose AUC) を耐糖能の指標として, 糖尿病発症前との関係を個体別に調査すると, 糖尿病発症前のglucose AUC値は糖尿病発症前と強い負の相関を示すことが明らかとなった (図3) [6]。これはSDTラットにおいて耐糖能低下の先に糖尿病の発症があることを示しており, 耐糖能低下と糖尿病発症の強い関連性を示唆している [6]。

SDTラット膵臓における組織学的変化

前述したとおり, SDTラットの高血糖の発症はインスリン分泌低下に依存する。では, インスリンを分泌する膵臓ランゲルハンス島 (膵島) では何が起きているのであろうか。

病理学的な変化として, 膵島内におけるうっ

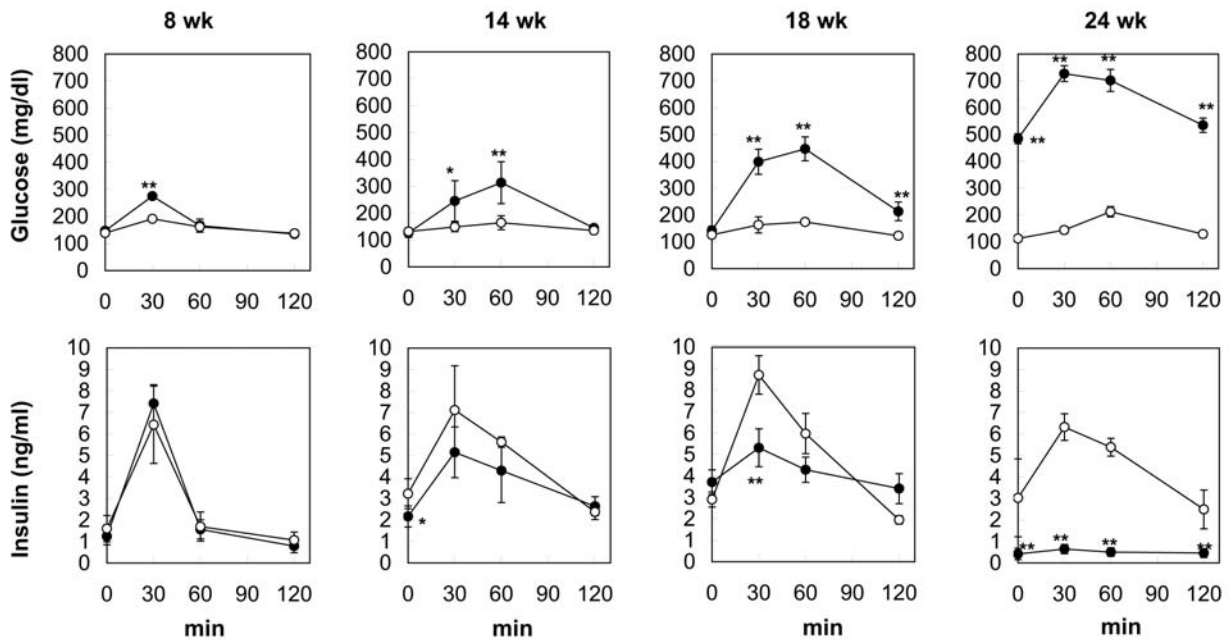


図2 雄性SDTラットにおける経口糖負荷試験
 絶食したラットに体重1 kgあたり2 gのグルコースを強制経口投与した。○：対照SDラット，●：SDTラット。上段に血漿中グルコース濃度，下段に血漿中インスリン濃度を示した。データは平均値±標準偏差（各群n = 6）を示す。アスタリスク（*）は，SDラットおよびSDTラット間の統計学的有意差（*：P<0.05，**：P<0.01）を示す。

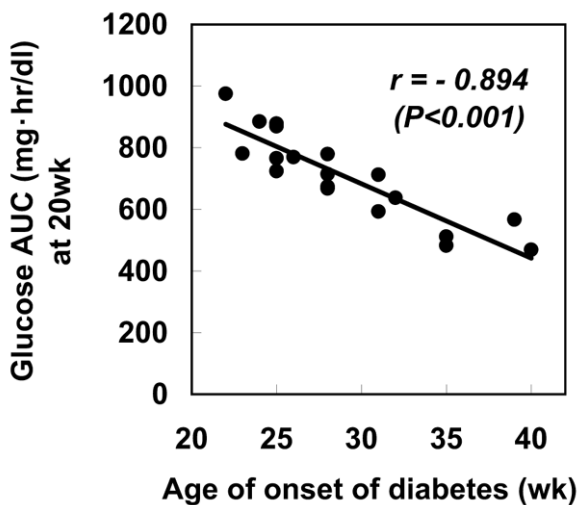


図3 雄性SDTラットにおける20週齢時の耐糖能と糖尿病発症週齢の相関分析
 耐糖能の指標として経口糖負荷試験（図2 説明文参照）における血糖曲線下面積（glucose AUC）を用いた。糖尿病発症前の20週齢時のglucose AUC値は，糖尿病発症週齢と強い負の相関を認めた。

血ならびに毛細血管の拡張，出血（図4 A）などを契機とした膵島内もしくは膵島周囲における浮腫，炎症性細胞の浸潤（図4 B），ヘモジデリンの沈着，線維化などが認められる（図4 C）。これら病変は10週齢頃から散発的に見ら

れるようになり，耐糖能低下とともに拡大し，20週齢時ではほとんど全ての膵島において線維化が見られるようになる。インスリンを分泌するβ細胞は線維化の進展とともに明らかに減少する。糖尿病を発症したSDTラットの膵島は，ほとんど結合組織に置換されて萎縮し，β細胞はほとんど消失する。β細胞の消失に至る過程において，1型糖尿病で見られるようなリンパ球浸潤などは認められなかったことから，自己免疫によるものではないことが推察される [9]。膵島に局限した出血を契機とした一連の炎症性変化と，β細胞マスの減少に深い関連があることが示唆されるが，それらのメカニズムは明らかになっていない。SDTラットにおける膵島の微小循環異常と糖尿病の関連性を明らかにすることは，ヒト糖尿病の発症要因を解明する上で，非常に意義深いものと思われる。

通常，β細胞は肥満，インスリン抵抗性もしくは膵実質における傷害などにより負荷が増大したとき，代償性に増殖もしくは分化する [1, 3] ことから，β細胞マスの減少は近年ヒト糖

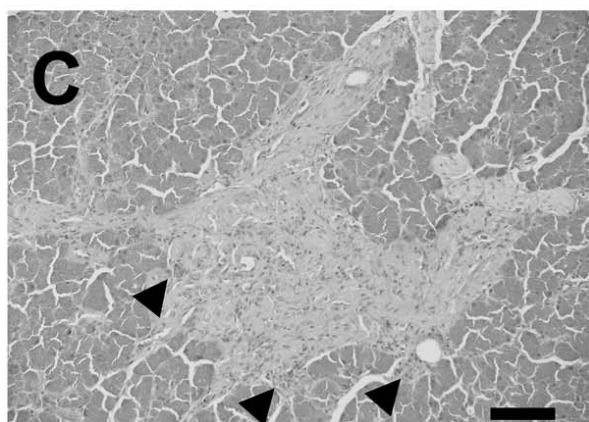
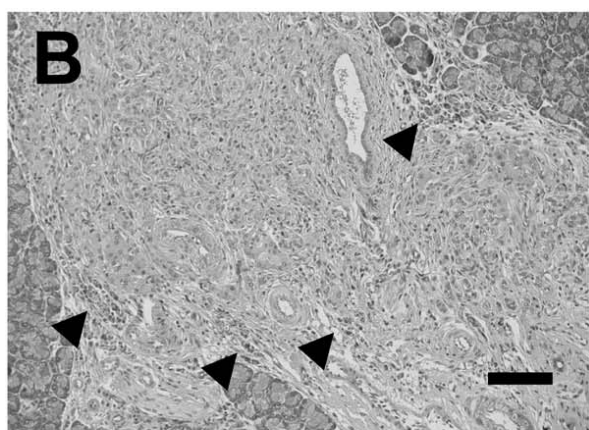
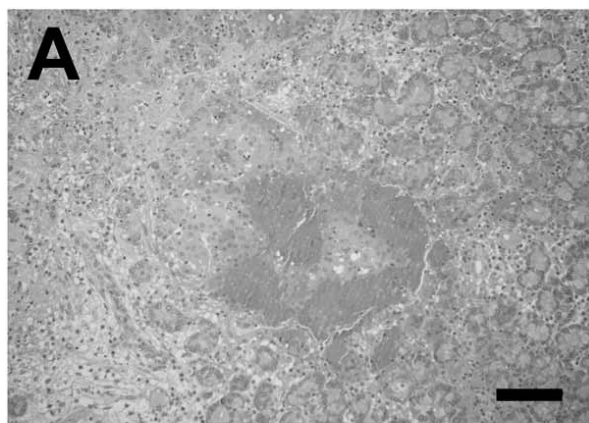


図4 雄性SDTラット膵島の組織学的変化
 (A) 膵島に限局した出血性変化が認められる。(10週齢, H & E)
 (B) 20週齢(糖尿病発症前)では、膵島の線維化およびヘモジデリンの沈着(矢頭)がほぼすべての膵島で観察される。膵島細胞(内分泌細胞)は存在するが、膵島内に進入した線維によって分断され正常な配列を失っている。(20週齢, H & E)
 (C) 38週齢(糖尿病発症後)時の膵島は線維成分に置換され萎縮した。ヘモジデリンの沈着(矢頭)をわずかに認め、膵島細胞はほとんど消失していた。(38週齢, H & E)

表1 膵島およびβ細胞マス

	正常SDラット	SDTラット
Pancreas weight [mg]	1180±94.6	850±91 **
%Pancreatic islets pancreas	1.37±0.27	0.73±0.29 *
%β cells in pancreas	0.87±0.23	0.44±0.15 *
β cell mass [mg/pancreas]	10.4±2.3	3.8±1.5 **
[μg/g bodywt]	24.5±5.2	11.1±4.1 *

データは、各群5匹の平均値±標準偏差(S.D.)として表した。アスタリスク(*)は、SDTラットおよび対照SDラット間のstudent's t-testにおける統計学的有意差(*P<0.05, **P<0.01)を示す。

尿病でも注目を集めている糖尿病発症要因のひとつである[3]。そこで炎症性変化の生じていないSDTラットの膵島ならびにβ細胞マスについて形態計測を行なった。その結果、SDTラットでは正常SDラットと比べて明らかな膵島ならびにβ細胞マスの低下を認め、正常ラットの4~5割程度しかなかった(表1)[7]。β細胞マスの減少はSDTラットの糖尿病感受性に大きく関与していることが考えられ、この要因を解明することの意義は極めて大きいものと思われる。

SDTラットの糖尿病の遺伝学的解析

著者らは、SDTラットの糖尿病発症を支配する遺伝子を明らかにするため、SDTラットと正常ラット(Brown Norway (BN)ラット)との交配実験を行い、戻し交雑仔を用いた量的形質遺伝子座(QTL; quantitative trait locus)解析[4]を実施した[6]。QTL解析は作出した350匹の戻し交配仔について、全ゲノム領域を対象にした200個のマイクロサテライトDNAマーカーの遺伝子型と表現型の連鎖を、統計処理ソフトMap Manager/QTX[5]を用いて実施した。その結果、SDTラットの糖尿病ならびに耐糖能低下が、劣性遺伝様式に従った複数の遺伝子によって支配されること、およびその主要なQTLは図5に示すようにラット第1, 2, X染色体に存在することを明らかにした[6]。各QTLはそれぞれGisdt 1 (Glucose

表2 SDTラットにおける糖尿病（耐糖能低下）の量的形質遺伝子座とそのマウス・ヒト相同領域

Locus name	Rat Chr.	Position	Max. LRS (LOD score) ^a	Orthologous regions estimated ^b	
				Mouse	Human
Gisdt 1	1	<i>D 1 Mit 3 – D 1 Wox52</i>	27.8 (6.0)	MMU 7 (40–52.5cM)	HSA15q26-qter HSA11p15.1, 11q11.2-14.1
Gisdt 2	2	<i>D 2 Got147–D 2 Rat156</i>	36.3 (7.9)	MMU 3 (around55cM)	HSA1p13-p21, 4q22-q31
Gisdt 3	X	<i>DXWox20–D 2 Rat83</i>	24.7 (5.4)	MMU 3 (around36cM)	HSAXp11-q11

^a LODスコア（概算値）はMap Manager/QTXで得られたLRS値を係数4.61（10の自然対数の2倍）で割った値に相当する。

^b マウスおよびヒトの相同領域は比較遺伝子地図をもとに推定される領域を示した。

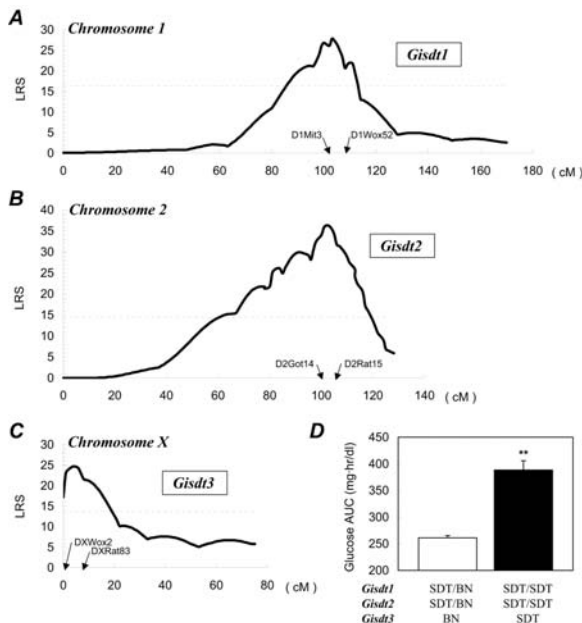


図5 SDTラット糖尿病（耐糖能低下）の量的形質遺伝子座（QTL）解析

- (A) 第1番染色体に存在するQTL(Gisdt 1)のLRSプロット図
- (B) 第2番染色体に存在するQTL(Gisdt 2)のLRSプロット図
- (C) 第X番染色体に存在するQTL(Gisdt 3)のLRSプロット図

LRS (Likelihood Ratio Statistics) スコアおよび遺伝的距離 (cM, センチモルガン) はMap Manager QTXを用いて計算した。図中の破線は、有意水準 ($P < 0.001$) を示し、LRSスコアのピーク値付近に表現型（この場合glucose AUC値）との強い連鎖があること（原因遺伝子が存在する可能性）を示す。各QTLに最も近接するマーカー遺伝子座は図中に示した。

- (D) 3つのQTLsの耐糖能に及ぼす効果の検証

各QTLの遺伝子型は、それぞれに最も近接したマーカー (Gisdt 1 : *D 1 Mit 3*, Gisdt 2 : *D 2 Got147*, Gisdt 3 : *DXWox20*) を用いて決定した。平均値±標準偏差, アスタリクス (*) はStudent's t-testによる統計学的有意差 (** : $P < 0.01$) 示す。

intolerance in SDT rat, 1), Gisdt 2, Gisdt 3と名付けられた (図5 A-C)。

いずれのQTLとも経口糖負荷試験における糖負荷後60分時点の血糖値およびglucoseAUC値に対して強い連鎖を示した。すなわち各QTLのSDTアレルがホモ接合体になるとき、高血糖（糖尿病）発症のリスクが顕著に高まることを示している。実際、350匹の戻し交雑仔における各QTLの遺伝子型と糖負荷後の血糖値の関係をみると、3つのQTL間における相互作用 (epistasis) により、相乗的に耐糖能不全が増悪されることが判明した (図5 D) [6]。これはヒト糖尿病の遺伝学的基礎を理解する上で、極めて興味深い知見である。

さらに著者らはラットーマウスーヒト間の比較遺伝子地図を構築し、これらのQTL (Gisdt 1~3) のマウスおよびヒト染色体上の位置を推定した (表2)。これらの推定相同領域には既知の糖尿病原因遺伝子の報告はないものの、糖代謝に関連したいくつかの候補遺伝子と、多数の生理学的機能の不明な遺伝子がマップされている [6]。SDTラットの糖尿病原因遺伝子を決定するにはまだ相当の時間を要するものと思われるが、コンジェニック系統の構築による責任領域の絞込みに加え、公開されたヒト、マウスおよびラットの全遺伝子塩基配列解析情報などを利用して、解明を進めている。

【引用文献】

- [1] Cavaghan MK, Ehrmann DA, Polonsky KS : J Clin Invest, 106, 329-333 (2000)
- [2] Kahn CR, Vicent D, Dorin A : Annu Rev Med, 47, 509-531 (1996)
- [3] Kahn SE : Am J Med, 108 (6 A), 2 S - 8 S . (2000)
- [4] Lander E, Kruglyak L : Nat Genet, 11, 241-247 (1995)
- [5] Manly KF, Cudmore RH, Meer JM : Mamm Genome, 12, 930-932 (2001)
- [6] Masuyama T, Fuse M, Yokoi N, Shinohara M, Tsujii H, Kanazawa M, Kanazawa Y, Komeda K, Taniguchi K : Biochem Biophys Res Commun, 304, 196-206 (2003)
- [7] Masuyama T, Komeda K, Hara A, Noda M, Shinohara M, Oikawa T, Kanazawa Y, Taniguchi K : Biochem Biophys Res Commun, 314, 870-877 (2004)
- [8] Shinohara M, Masuyama T, Shoda T, Takahashi T, Katsuda Y, Komeda K, Kuroki M, Kakehashi A, Kanazawa Y : Int J Exp Diabetes Res, 1, 89-100 (2000)
- [9] The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus : Diabetes Care, 20, 1183-1197 (1997)

文献抄録

犬星状膠細胞腫における形態学、免疫組織化学及び遺伝的变化

Stoica G, Kim H-T, Hall D G, Coates J R
(テキサスA&M, *Vet Pathol*, 41 10-19, 2004)

3ヵ所の獣医学研究室から入手した31例の犬星状膠細胞腫を表現型（形態学的及び免疫組織化学的）、解剖学的位置、犬種別発生率によって分類した。形態学的には星状膠細胞腫12例（細分類：繊維性、原形質性、大円形細胞性、毛様細胞性）、退形成性星状膠細胞腫5例、多形膠芽腫12例ならびに星状芽細胞腫2例が認められた。このうち毛様細胞性星状膠細胞腫と星状芽細胞腫は最新の家畜中枢神経腫瘍WHO分類にないものであった。19例（60%）が雌にみられ、平均発症年齢は8歳（1-18歳）、ボクサー（7例、21%）での発生率が高かった。発生部位はほとんどが大脳半球であったが、1例で脊髄にも認められた。免疫組織化学的検索では35%の星状膠細胞腫においてp53の遺伝的変

異に対する免疫標識で陽性反応が認められ、23%で上皮成長因子受容体遺伝子の変異の陽性反応が認められた。12例の犬のDNA試料を分析して1例の犬で1ヵ所のp53変異が検出された。犬における星状膠細胞腫の形態学的パターンは、人の星状膠細胞腫と類似しており、遺伝的変異は悪性型と関連していた。中枢神経の星状膠細胞腫の顕微鏡的、遺伝的变化についての今回の研究結果は、おそらく生物学的挙動や新しい治療法に対する反応をよりよく反映するための分類方法の確立に寄与するものと思われる。

(岩手大学獣医病理学研究室)