

肥満と糖尿病対策のための細胞増殖防止と促進機構に関する研究

私たちは長年、視床下部性肥満の研究を行ってきましたが、視床下部の腹内側核 (VMH) を破壊いたしますと、脂肪細胞だけでなく、表1のように、迷走神経が密に分布している腹部臓器 (肝、膵、胃、小腸、大腸) の組織の重量が重くなるということがわかりました。VMH破壊を施しますと迷走神経が刺激状態になります。それで、重量が重くなるというのは、単にこれらの臓器に脂肪がたまっただけではないのではないか、と考へて、組織細胞増殖の有無をみるため、これら臓器のDNAを測りました。

そうするとDNAは表2のようにやはり多くなっていました。肝、膵、胃、小腸と大腸のDNAが増加しております。このことから、VMHを破壊すると、脂肪組織だけでなく腹部臓器組織に細胞増殖が起こるということがわかりました。

図1は小腸の絨毛ですが、下段はコントロールで、上段が1週間後のVMH破壊ラットのもので、このようにVMH破壊ラットでは1週間で大体2倍位に細胞増殖のため小腸の絨毛の高さが大きくなっています。この増殖像の特徴は正常の組織像が保持されているということです。こうした増殖がどのようなメカニズムで起こるかということをも研究しました。

表3にはVMH破壊後の組織細胞増殖の原因の候補因子をあげました。小腸細胞は小腸内に食べ物が入ると増殖します (小腸切断手術後食べ物が入ると残存小腸組織細胞が増殖を起こします) それからインスリンは色々な細胞の細胞増殖因子だということがわかっております。ま



国立健康・栄養研究所
老人健康・栄養部 部長
井上 修二

表 1

Tissue	Time	Tissue weight (g)	
		Sham operation	VMH lesion
Liver	0 week	8.79±0.31	9.30±0.19
	1 week	9.29±0.14	11.83±0.35 † † †
	4 week	9.22±0.39	11.08±0.42 † † †
Pancreas	0 week	0.63±0.06	0.65±0.04
	1 week	0.67±0.11	0.85±0.05 † † †
	4 week	0.71±0.07	0.92±0.05 † † †
Small Intestine	0 week	8.41±0.17	8.13±0.15
	1 week	8.22±0.32	11.40±0.24 † † †
	4 week	8.98±0.42	10.60±0.26 † † †
Large Intestine	0 week	3.23±0.19	3.25±0.15
	1 week	3.42±0.31	3.91±0.08
	4 week	3.38±0.27	3.61±0.12
Spleen	0 week	0.54±0.04	0.65±0.03
	1 week	0.61±0.09	0.60±0.03
	4 week	0.50±0.07	0.48±0.03
Kidney	0 week	1.81±0.06	1.74±0.04
	1 week	1.79±0.11	1.72±0.07
	4 week	1.89±0.19	1.97±0.10
Heart	0 week	0.84±0.02	0.86±0.01
	1 week	0.83±0.04	0.91±0.01
	4 week	0.92±0.06	0.93±0.03

表 2

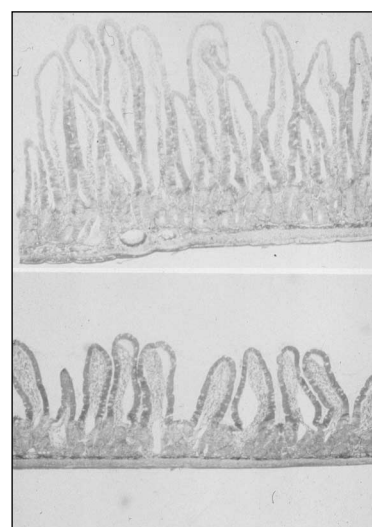
Tissue	Time	DNA content (g/100mg)			
		Control	High fat diet	Sham operation	VMH lesion
Liver (x 10 ⁻³)	0 week	3.15±0.07	3.16±0.07	3.12±0.09	3.20±0.09
	1 week	3.03±0.10	3.50±0.35	3.21±0.11	6.22±0.44††
	4 week	2.71±0.15	3.11±0.41	3.09±0.20	6.29±0.61††
Pancreas (x 10 ⁻³)	0 week	3.01±0.09	3.01±0.10	3.12±0.08	3.05±0.09
	1 week	2.96±0.16	3.45±0.15	3.26±0.21	8.96±0.77††
	4 week	2.46±0.19	3.45±0.43	2.96±0.26	8.13±1.05††
Small intestine (x 10 ⁻³)	0 week	3.03±0.11	3.89±0.13	4.01±0.14	3.95±0.12
	1 week	3.79±0.37	4.52±0.26	4.44±0.14	9.16±0.91††
	4 week	3.82±0.26	5.46±0.50††	3.92±0.42	8.03±0.89††
Large intestine (x 10 ⁻³)	0 week	1.32±0.12	1.31±0.14	1.62±0.08	1.56±0.13
	1 week	1.38±0.24	1.34±0.15	1.39±0.27	3.01±1.18††
	4 week	1.18±0.09	1.13±0.19	1.26±0.15	2.52±0.79††
Spleen (x 10 ⁻³)	0 week	1.19±0.06	1.20±0.06	0.97±0.11	1.30±0.05
	1 week	1.26±0.06	1.16±0.06	1.16±0.09	1.12±0.05
	4 week	0.89±0.12	0.90±0.09	1.22±0.14	1.05±0.09
Kidney (x 10 ⁻³)	0 week	1.03±0.05	1.04±0.06	1.07±0.04	1.03±0.08
	1 week	1.01±0.13	0.87±0.05	0.89±0.11	1.22±0.05
	4 week	0.94±0.04	0.88±0.08	0.99±0.09	1.34±0.22
Heart (x 10 ⁻³)	0 week	2.51±0.06	2.56±0.06	2.76±0.09	2.52±0.07
	1 week	2.58±0.28	2.44±0.08	2.47±0.15	3.28±0.25
	4 week	2.04±0.41	2.87±0.52	2.11±0.39	3.32±0.39

表 3

VMH破壊動物の腹部臓器細胞増殖に寄与する因子

- 1, 過食
- 2, 高インスリン血症
- 3, 迷走神経活動上昇
- 4, レプチン

図 1



たVMHを破壊しますと迷走神経が活動上昇を起こします。先ほども述べましたように、迷走神経が密に分布している臓器だけが細胞増殖を起こしております。

もう一つはレプチンで、今注目されている肥満遺伝子で作られ、食欲を抑制する作用のある物質です。レプチンのレセプターはVMHに濃密にありますから、VMHを破壊しますと中枢のレプチンレセプターが働かないので、VMH破壊直後に、普通のコントロールに比べて5倍ぐらい血中レプチンが上昇します。このレプチンは中枢の食欲抑制作用だけではなくて、末梢で膵のインスリンの分泌を刺激する作用とか、骨髄でリンパ球を増殖する作用があるということが言われておりますので、レプチンの末梢作用によってこれら臓器の細胞増殖が起こるかどうかを検討いたしました。

最初にVMHを破壊した後のDNA量とDNA合成の時間経過を実験しました。この実験では同量摂食という方法を取り入れて、VMH破壊ラットにコントロールと同じ量を食べさせ、過食の因子を検討しました。次に、横隔膜の下で迷走神経を切断して、迷走神経の刺激状況を取り除く実験、更に、アトロピンによるムスカリンレセプターのブロック実験を行いました。それからインスリン抗体を投与して、インスリンの動きを抑えたときの細胞増殖を検討しました。

今回は膵組織の実験成績を示します。図2の上段は膵の重量の時間経過ですが、VMH破壊ラットの膵重量は時間とともに増えます。

中段のDNAの量もVMH破壊ラットでは時間とともにやはり増えます。上の直線は自由摂食群です。真ん中の直線が同量摂食群で過食を取り除いたVMH破壊ラットです。このようにVMH破壊ラットでは過食を取り除いてもDNA量は増えます。

下段のDNAの合成を見ますと、これはチミジン取り込みで見た成績ですが、VMHを破壊するとすぐ増殖を始めて、3日でピークになり、それから1週間後位で元に戻るような動きをします。いつまでも増えているわけではないのが特徴です。過食を取り除いた同量摂食群でも同様の経過を示しますので、過食で細胞増殖が起こっているのではないということがわかりました。

図3はVMH破壊3日後の横隔膜の下での迷走神経切断実験の成績です。VMH破壊ラットで起こったDNA量とDNA合成の亢進が完全にコントロー

図2

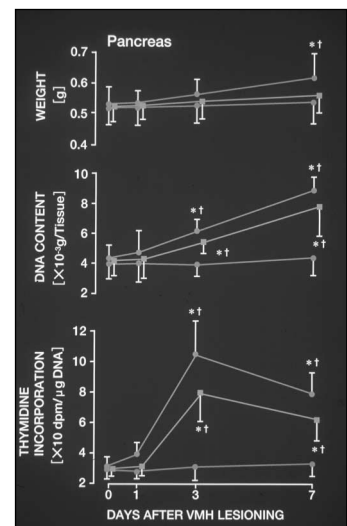


図3

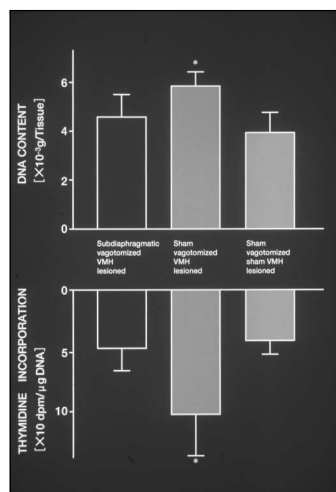
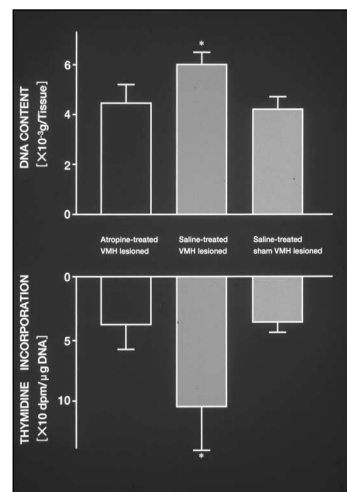


図4



ルと同じ状態に戻っています。

図4はアトロピンによってムスカリンレセプターを遮断した成績ですが、VMH破壊ラットのDNA量とDNA合成は、やはりほとんどコントロールと同じ状態に戻っています。

ところが、図5のようにインスリン抗体の投与では、DNA量とDNA合成は影響を受けません。この細胞増殖、特に膵臓組織細胞増殖においてどのような増殖因子が作用しているかということを検討する目的で、日米の共同研究を組ませてもらったわけです。

表4のように、膵臓の他に肝臓と胃と小腸、大腸など、迷走神経が密に分布している臓器においては、同じようなメカニズムで細胞増殖が起こっているということがわかりました。

膵臓には外分泌細胞と内分泌細胞があります。そこで外分泌細胞と内分泌細胞のどちらが増殖しているかを検討いたしました。表5のようにPCNA染色法によると、表2のように両方の細胞が増殖していることがわかりました。

膵臓の内分泌細胞のラ氏島には主な細胞として、インスリンを分泌する細胞、グルカゴンを分泌する細胞とソマトスタチンを分泌するD細胞がありますが、PCNAとインスリン抗体、グルカゴン抗体、ソマトスタチン抗体の二重染色を行いますと、興味あることには細胞は二重染色されましたが(図6)、細胞とD細胞は二重染色はされませんでした(図7)、VMHを破壊して迷走神経刺激によって、なぜ、細胞だけが増殖を起こすか。この原因については、おそらく迷走神経の活動上昇に対する細胞の感受性の差ではないかと考えているのですが、以上のように

図5

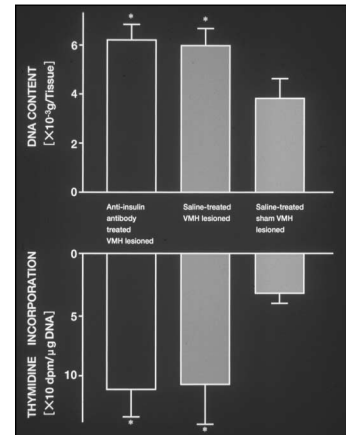


表4

VMH破壊による腹部臓器細胞増殖器官と各種処置の効果

器官	過食除去	迷走神経切断	アトロピン投与	インスリン抗体投与
肝	-	++	+	-
胃	-	++	++	-
小腸	-	++	+	-
大腸	-	+	++	-
膵	-	++	++	-

++ 著明効果 (ほぼ完全阻止)
+ 有意効果
- 効果なし

表5

Table 2. Time course of mitotic labeling indices of islet cells and acinar cells after VMH lesioning

Days after VMH lesioning	sham VMH lesions		VMH lesions	
	islet cells	acinar cells	islet cells	acinar cells
0 day	0.49% (5/1010)	0.18% (2/1114)	0.59% (6/1018)	0.20% (2/1050)
1 day	0.54% (6/1121)	0.24% (3/1251)	7.75% (89/1148)	5.04% (54/1072)
3 day	0.41% (4/987)	0.17% (2/1184)	33.0% (339/1028)	63.0% (550/873)
7 day	0.45% (5/1112)	0.20% (2/987)	12.2% (131/1074)	6.52% (80/1227)

図6

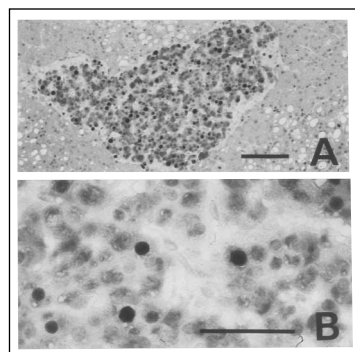
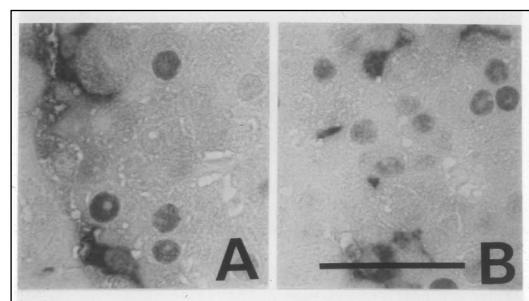


図7



なことから、細胞の増殖のメカニズムに寄与する因子が見つかるのではないかという希望を持ったわけです。

ここまですと、表6のように腹部臓器の細胞増殖はVMH破壊後の迷走神経の活動上昇による。この現象は主としてムスカリンレセプターを介している。(脂肪細胞については時間が無いので本日は省略させていただきますが、高インスリン血症と過食がこの脂肪細胞の増殖を起こしているということを見出してあります。)

次に、このような細胞増殖能が再生能に結びつくかどうかという問題があります。図8は膵臓を40%切除して、VMHを破壊したラットの糖負荷試験における血糖と血中インスリン変動の成績です。膵切除VMH破壊ラットではインスリン分泌能が回復しています。このことをはっきりさせるために、インスリンの全分泌量を比較したのが図9です。

図9のようにインスリン総分泌量はコントロール膵臓摘除ラットでは、コントロールラットに比べ低下しています。一方、VMH破壊ラットではコントロールよりもはるかに増えています。膵摘除VMH破壊ラットでもコントロールよりも増えています。このことから、VMH破壊ラットにおける膵細胞増殖能の亢進は再生能亢進に結びついていることがわかり

図8

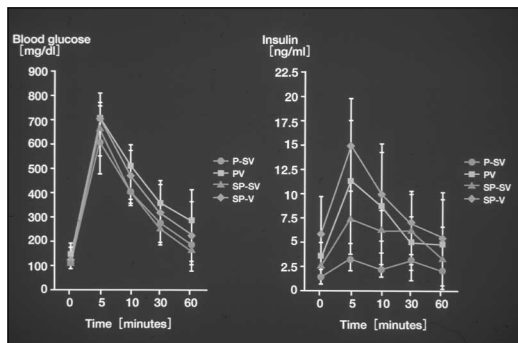
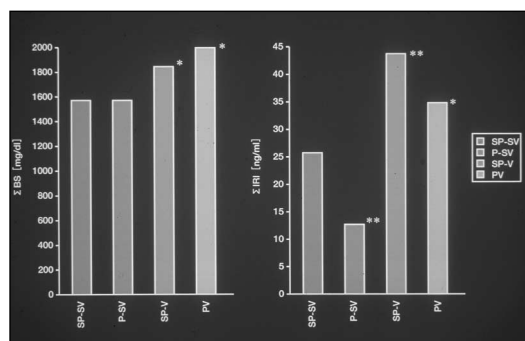


表6

視床下部VMH破壊ラットの組織細胞増殖機序	
・腹部臓器細胞	迷走神経活動上昇 ムスカリンレセプター
・脂肪細胞	高インスリン血症 過食

図9



ました。現在は、この現象に関係している増殖因子を見つければ、糖尿病の治療に結びつくような所見が見つかるのではないかという観点から、研究を進めています。

表7は膵部分摘除ラットにおけるPCNA陽性細胞の成績で、膵を40%取ってもやはりVMHを破壊すれば膵組織細胞は増殖を起こしているということを確認いたしました。

レプチンの作用は視床下部の満腹中枢に働いて食欲を抑制して肥満を防ぐのですが、肥満者ではレプチンの作用が低下していて過食を防げないと考えられています。そのメカニズム

表7

Comparison of islet cell area and positive cell number by PCNA staining		
group	islet cell area (μm^2)	PCNA positive cell number
SP-SV	9.8 \pm 5.6	9.7 \pm 3.8
P-SV	7.0 \pm 4.7	10.9 \pm 4.8
SP-V	15.8 \pm 9.4 *	22.0 \pm 5.0 **
P-V	14.2 \pm 10.3 *	20.5 \pm 12.3 **

としてレプチンの構造異常とか、レプチンのレセプター異常の動物が見つっているわけですが、図10のように視床下部ではVMHと弓状核にレプチンのレセプターが一番多いということを我々の共同研究者は見つけております。従ってVMH破壊ラットでは視床下部では働かないのですが、先ほどいいましたように、レプチンは末梢で組織細胞の増殖作用をもつ可能性が言われておりましたので、レプチンをAlzetのポンプで1週間連続投与して膵組織細胞の増殖に対する効果をみました。

レプチンの4.4mg/kg/dayの投与量でコントロールのラットでは摂食量は有意に落ちて体重も落ちました。この投与量によって膵臓の組織細胞に増殖が起こるかどうかが見ました。

ところがこれは予期に反して、図11のように、レプチンによってVMH破壊ラットでは膵組織細胞の増殖が抑制されることがわかりました。従って、VMH破壊ラットのレプチンの血中上昇は細胞増殖に作用しないということがわかりました。

現在、膵組織細胞増殖に寄与する因子の検索を行なっています。表8に示すような、現在わかっている成長因子のプライマーを37作りまして、PCR法にて探索いたしました。

現在、見つかった遺伝子発現が増加している因子はトレホイルペプチド(trefoil peptide)

あるいはトレポイドファクター(trefoil factor)といわれるもので、VMH破壊ラットの胃組織細胞では、コントロールに比べて20倍くらい増えています。もしかしたらこのペプチドが成長因子の一つの候補になっているのではないかと考えていますが、未知の成長因子が関係している可能性も大きいと考えています。そうなりますと、増殖した細胞をディファレンシャルDNAディスプレイという方法や推定アミノ酸配列同定法を使用して、異常バンドを見つけて、その異常バンドから成長因子(タンパク)を見つけなければいけないこととなります。これは大変な困難な仕事ですが、現在アメリカの方でそういう研究もセットアップできるのではないかと、その可能性を検討しているところです。

図10

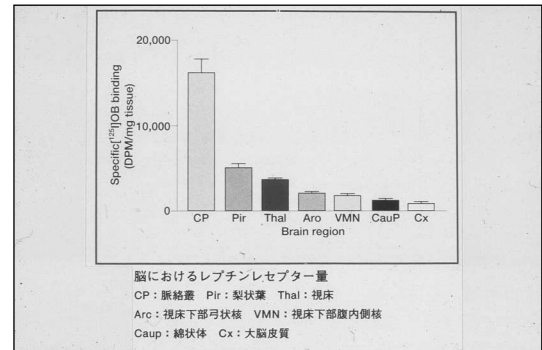


図11

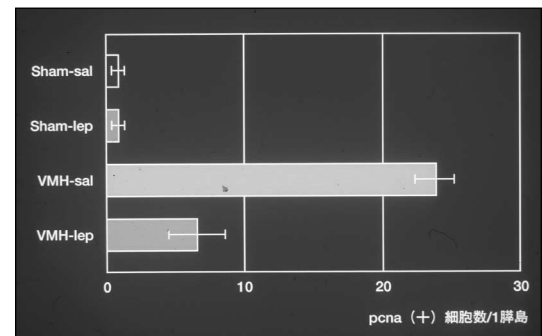


表8

neurotrophins	δ-PPT
NGF (nerve growth factor)	γ-PPT
BDNF (brain-derived neurotrophic factor)	galanin
NT-3 (neurotrophin-3)	gastrin
NT-4 (neurotrophin-4)	CCK
	gastrin releasing peptide
CNTF	neuropeptide receptor
neurotrophin receptors	galanin receptor
LNGFR (low affinity nerve growth factor receptor)	gastrin releasing peptide receptor
trkA	growth factor
trkB	IGF-I
trkC	IGF-II
	TGF-α
neuropeptides	
NPY	cytokine
VIP	IL6
α-CGRP	
β-CGRP	Trefoil factors
α-PPT	Intestinal Trefoil Factor
β-PPT	Pancreatic Spasmolytic Polypeptide