

血管内皮細胞特異的 IRS1 過剰発現は 血管芽細胞の分化を促進し糖尿病および インスリン抵抗性による創傷治癒遅延を改善する

片桐 さやか

東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 歯周病学分野

要旨

糖尿病患者での創傷治癒遅延が問題になっており、インスリン作用の増強が血管新生および創傷治癒の改善に与える影響について研究されている。本研究では、ve-cadherin プロモーターにて insulin receptor substrate 1 (IRS1) を血管内皮細胞特異的に過剰発現させたトランスジェニックマウス (ECIRS1) を用い、血管内皮細胞での IRS1 の過剰発現によって創傷部の肉芽組織での Akt リン酸化の亢進、VEGF、Flk1、VE-cadherin の発現上昇が起こることを確認した。普通食 ECIRS1 マウスおよび高脂肪食による ECIRS1 糖尿病モデルマウスにおいては、マウス背部の全層弁での創傷の閉鎖、上皮化、血管新生の促進が認められたが、インスリン欠乏性 ECIRS1 糖尿病モデルマウスではこれら創傷治癒の改善は認められなかった。ECIRS1 マウスの肉芽組織では、血管芽細胞および血管内皮細胞数の増加が認められたが、この増加は、全身からの未分化細胞の取り込みではなく、肉芽組織局所での増殖の増加によることが明らかになった。高脂肪食糖尿病モデルマウスの肉芽組織では、普通食マウスと比較して、血管芽細胞数は変化がないものの血管内皮細胞数が減少した。ECIRS1 マウスでは WT マウスと比較して、インスリンによる血管芽細胞の Akt リン酸化に有意な差は認められないものの、血管内皮細胞の Akt リン酸化は上昇した。また、高脂肪食の負荷により、血管芽細胞の VEGF による Akt リン酸化は有意に低下した。

以上の結果より、高脂肪食による糖尿病モデルマウスでは、肉芽組織でのインスリンシグナルが減少し、血管芽細胞から血管内皮細胞への分化が妨げられ、血管新生が障害されていることが明らかになった。血管内皮細胞へのインスリン作用を増強することによって、糖尿病患者や肥満患者の創傷治癒を改善できる可能性が示唆された。

内容

(背景と目的)

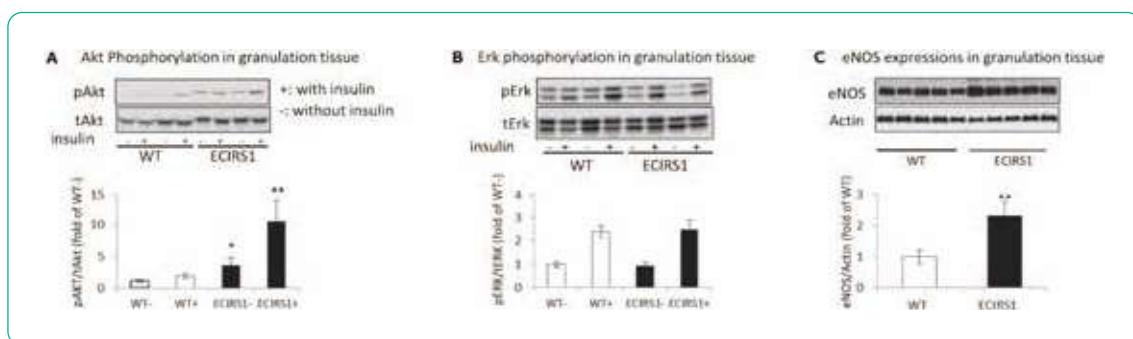
糖尿病患者では創傷治癒が遅延することが知られている¹。創傷治癒は、好中球の活性化、纖維芽細胞の増殖、血管新生などの様々な過程を経ているが、高血糖ではどのようにその過程が障害されているか、具体的なメカニズムに関しては不明な点が多い^{2,3}。本研究では、肉芽組織でのインスリン抵抗性および VEGF を介した血管新生⁴に着目し、血管芽細胞から血管内皮細胞への分化におけるインスリンシグナルの役割について検討した。

(方法)

野生型(WT) C57BL/6Jマウスおよびve-cadherinプロモーターで血管内皮細胞特異的にIRS1を過剰発現させたトランスジェニックマウス(ECIRS1)⁵を用いた。Obesity Induced Diabetes モデルとして、高脂肪食(HF)を10週間与えたマウス(WTHF、ECIRS1HF)および、インスリン欠乏型糖尿病モデルとしてストレプトゾトシン(STZ)を腹腔内注射したマウス(STZWT、STZHF)を用いた。

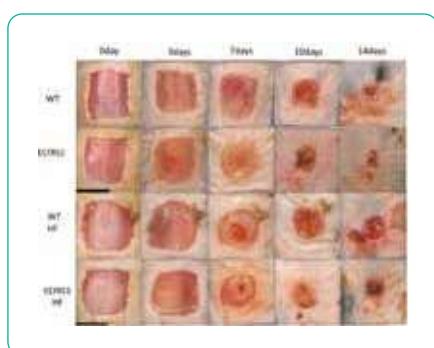
創傷治癒モデルとして、マウス背部に皮膚および皮筋層を除去した全層弁での1.0cm²の傷を作製し、治癒中の開放創率、収縮率、上皮化率を評価した^{6,7}。肉芽組織の遺伝子発現はqPCR法にて、タンパク発現およびリン酸化の評価はウェスタンブロッティング法にて行った。肉芽組織切片中の血管内皮細胞の組織学的評価を免疫染色(抗CD31抗体)によって行った。Flow Cytometry を用いて、肉芽組織中の血管芽細胞数および血管内皮細胞数の計測、細胞毎のAktのリン酸化の評価を行うとともに、BrdUを用いた増殖の評価⁸、GFPマウスの骨髄細胞を移植することによる未分化細胞の取り込みの評価^{9,10}を行った。

結果



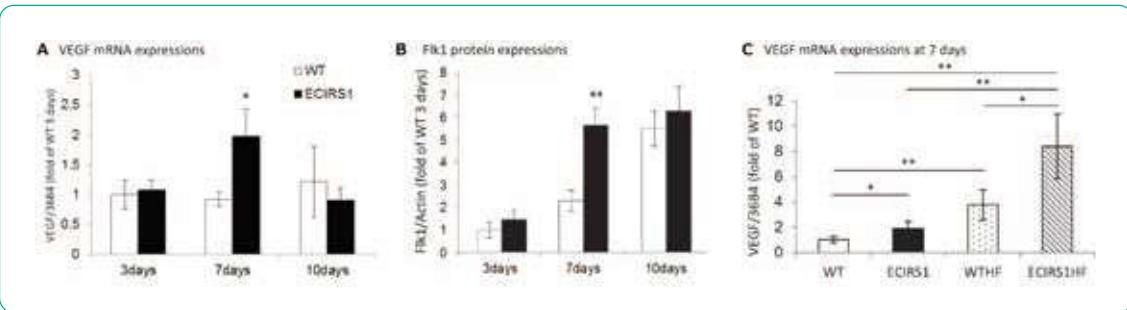
血管内皮細胞特異的な IRS1 の過剰発現は肉芽組織における Akt のリン酸化を促進する (図 1)

創傷作製後7日目のWTおよびECIRS1マウスに対し、1U/kgのインスリンを静脈内注射することにより、肉芽組織におけるAktとErkのリン酸化を評価した。ECIRS1マウスではpAkt/Aktの有意な上昇が認められた(図1A)が、pErk/tErkには有意な変化は認められなかった(図1B)。ECIRS1マウスではeNOSの上昇も認められ、IRS1/PI3K/pAkt経路の活性化によって血管新生が促進している可能性が示された(図1C)。



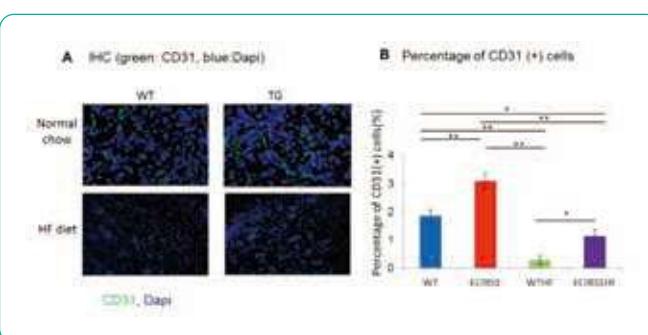
マウス背部に開放創を作製し、創傷治癒の評価を行った。ECIRS1、ECIRS1HFではそれぞれWT、WTHFと比較して、開放創率と上皮化率の改善が認められた(図2)。インスリン欠乏型糖尿病モデルであるSTZWTとSTZECIRS1では、創傷治癒に有意な違いは認められなかった。

血管内皮細胞特異的な IRS1 の過剰発現は Obesity Induced Diabetes での創傷治癒を促進する (図 2)

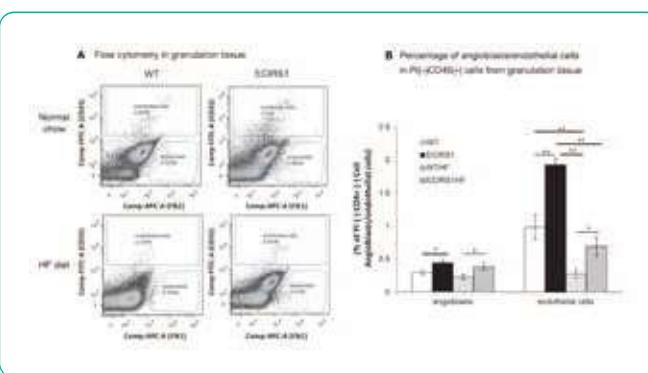


血管内細胞皮特異的な IRS1 の過剰発現は肉芽組織での VEGF および Flk1 発現を上昇させる (図 3)

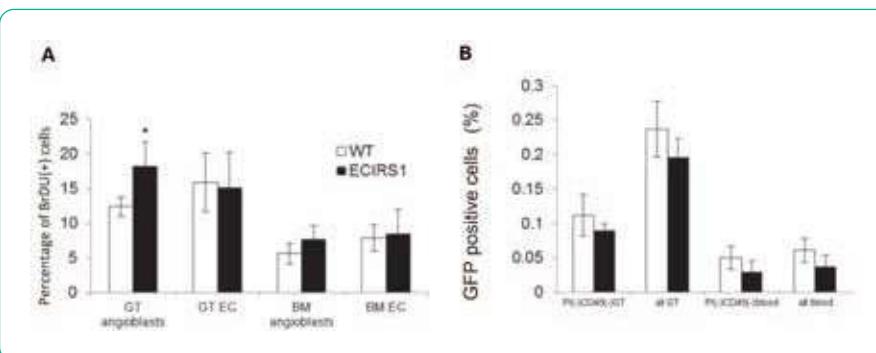
ECIRS1 マウスの肉芽組織では WT と比較して、創傷 7 日目での VEGF および VE-cadherin mRNA が上昇していた(図 3A、B)。肉芽組織での VEGF mRNA の発現は、高脂肪食の負荷により上昇していた(図 3C)。



血管内皮細胞特異的な IRS1 の過剰発現は肉芽組織での血管新生を促進する (図 4)

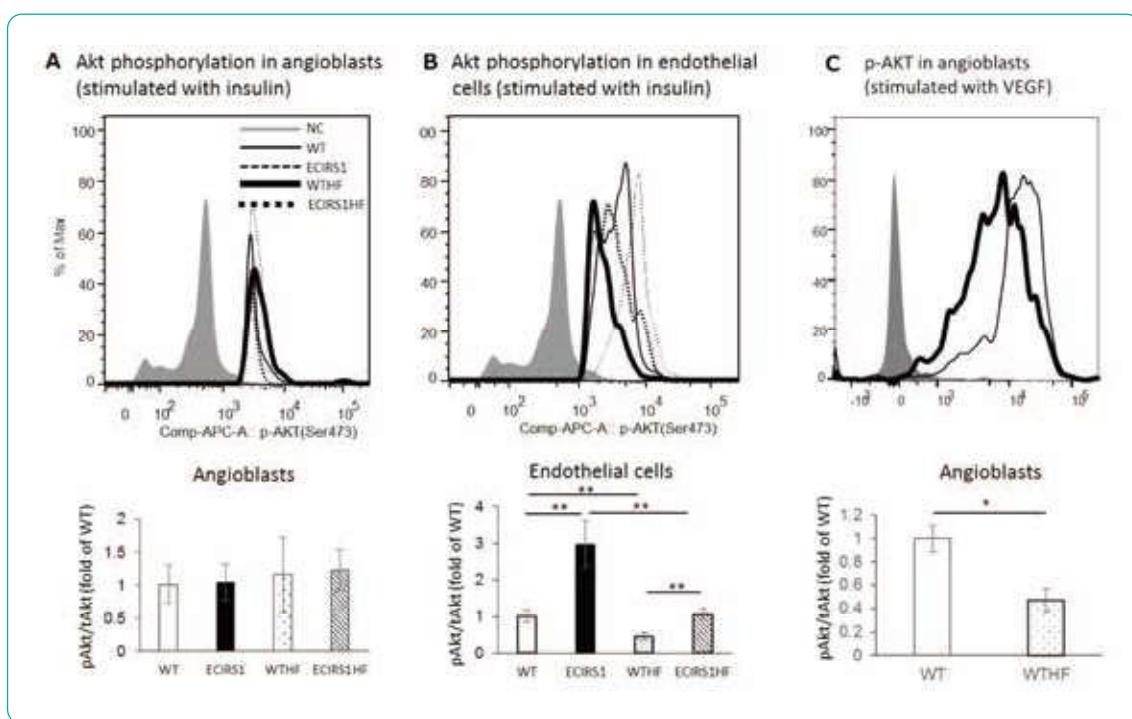


血管内皮細胞特異的な IRS1 の過剰発現は肉芽組織での血管芽細胞および血管内皮細胞を上昇させる (図 5)



血管内皮細胞特異的な IRS1 過剰発現は肉芽組織での血管芽細胞の増殖を上昇させる (図 6)

創傷7日目のECIRS1マウスでは、肉芽組織(granulation tissue: GT)におけるBrdU陽性の血管芽細胞数が有意に増加していたが、BrdU陽性血管内皮細胞数には有意な差は認められなかつた。骨髓(bone marrow: BM)中の血管芽細胞、血管内皮細胞では、BrdU陽性細胞数の変化は認められなかつた(図6A)。さらに、GFPマウスの骨髄細胞を移植し、細胞の取り込みを評価した。血液中、肉芽組織とともにECIRS1マウスとWTマウスの間でGFP陽性細胞数の有意な差は認められなかつた(図6B)。したがつて、ECIRS1マウスでの肉芽組織中での血管芽細胞の増殖は、細胞の取り込みではなく、肉芽組織局所での増殖の増加によることが示された。



高脂肪食負荷により、血管芽細胞のVEGFによるAktリン酸化は低下する(図7)

VE-cadherinは血管芽細胞では発現しておらず、ECIRS1マウスの血管芽細胞でのインスリンによるAktリン酸化の有意な変化は認められなかつた(図7A)が、血管内皮細胞ではインスリンによるAktリン酸化は亢進していた(図7B)。高脂肪食の負荷により、VEGFによる血管芽細胞のAktリン酸化は低下した(図7C)。

まとめ

糖尿病では、Aktのリン酸化に関連して血管芽細胞から血管内皮細胞への分化が阻害されてゐるために、創傷治癒遅延が起こつてゐることが示された。血管内皮細胞でのIRS1/PI3K/pAkt経路の活性化が、創傷治癒のターゲットになる可能性が示唆された。

参考文献

1. Brem, H. & Tomic-Canic, M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *The Journal of clinical investigation* 117, 1219-1222, doi:10.1172/JCI32169 (2007).
2. ouldton, A. J., Vileikyte, L., Ragnarson-Tennvall, G. & Apelqvist, J. The global burden of diabetic foot disease. *Lancet* 366, 1719-1724, doi:10.1016/S0140-6736(05)67698-2 (2005).
3. Falanga, V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet* 366, 1736-1743, doi:10.1016/S0140-6736(05)67700-8 (2005).
4. Miele, C., Rochford, J. J., Filippa, N., Giorgetti-Peraldi, S. & Van Obberghen, E. Insulin and insulin-like growth factor-I induce vascular endothelial growth factor mRNA expression via different signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* 275, 21695-21702, doi:10.1074/jbc.M000805200 (2000).
5. Park, K. et al. Insulin decreases atherosclerosis by inducing endothelin receptor B expression. *JCI insight* 1, doi:10.1172/jci.insight.86574 (2016).
6. Pietramaggiori, G. et al. Quiescent platelets stimulate angiogenesis and diabetic wound repair. *J Surg Res* 160, 169-177, doi:10.1016/j.jss.2008.09.010 (2010).
7. Pietramaggiori, G. et al. Trehalose lyophilized platelets for wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 15, 213-220, doi:10.1111/j.1524-475X.2007.00207.x (2007).
8. Seth, A. K., De la Garza, M., Fang, R. C., Hong, S. J. & Galiano, R. D. Excisional wound healing is delayed in a murine model of chronic kidney disease. *PLoS one* 8, e59979, doi:10.1371/journal.pone.0059979 (2013).
9. Song, G. et al. Use of the parabiotic model in studies of cutaneous wound healing to define the participation of circulating cells. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 18, 426-432, doi:10.1111/j.1524-475X.2010.00595.x (2010).
10. Rao, T. N. et al. High-level Gpr56 expression is dispensable for the maintenance and function of hematopoietic stem and progenitor cells in mice. *Stem cell research* 14, 307-322, doi:10.1016/j.scr.2015.02.001 (2015).

発表業績一覧

論文

Overexpressing IRS1 in Endothelial Cells Enhances Angioblast Differentiation and Wound Healing in Diabetes and Insulin Resistance.

Katagiri S, Park K, Maeda Y, Rao TN, Khamaisi M, Li Q, Yokomizo H, Mima A, Lancerotto L, Wagars A, Orgill DP, King GL.

Diabetes 65(9):2760-71, 2016.

PKC δ inhibition normalizes the wound-healing capacity of diabetic human fibroblasts.
Khamaisi M, Katagiri S, Keenan H, Park K, Maeda Y, Li Q, Qi W, Thomou T, Eschuk D, Tellechea A, Veves A, Huang C, Orgill DP, Wagers A, King GL.
J Clin Invest. 126(3):837-853, 2016.

Insulin decreases atherosclerosis by inducing endothelin receptor B expression.
Park K, Mima A, Li Q, Rask-Madsen C, He P, Mizutani K, Katagiri S, Maeda Y, Wu I, Khamaisi M, Preil SR, Maddaloni E, Sørensen D, Rasmussen LM, Huang PL, King GL.
JCI Insight. 1(6), pii:e86574, 2016.

Obesity-associated Gingival Vascular Inflammation and Insulin Resistance. Mizutani K, Park K, Mima A, Katagiri S, G.L. King.
Journal of Dental Research 93(6): 596-601; 2014.

学会発表

第22回日本歯科医学会総会 (2012.11)
片桐さやか、新田浩、長澤敏行、泉山肇、内村功、野口俊英、菊池毅、稻垣幸司、松原達昭、成瀬桂子、金澤真雄、松尾朗、千葉博茂、大迫文重、金村成智、福井道明、中村直登、井上修二、和泉 雄一。
歯周炎に罹患した2型糖尿病患者における歯周病治療および糖尿病治療による多施設介入研究

第22回日本歯科医学会総会 (2012.11)
新田浩、片桐さやか、長澤敏行、和泉雄一、金澤真雄、松尾朗、千葉博茂、宮崎滋、宮内孝、大迫文重、金村成智、福井道明、中村直登、安藤雄一、花田信弘、井上修二。
糖尿病・肥満患者における口腔に関する多施設疫学研究

74th Scientific Sessions, American Diabetes Association. San Francisco, USA (2014.6)
Katagiri S, Maeda Y, Park K, Li Q, Khamaisi M, Lancerotto L, D.P.Orgill, G.L. King.
Demonstration of insulin's critical role in angioblasts formation and re-vascularization in wound healing with and without diabetes.

74th Scientific Sessions, American Diabetes Association. San Francisco, USA (2014.6)
Khamaisi M, Wu I, Katagiri S, Hastings S, H.A.Keenan, D.P. Orgill, G.L.King.
Persistent Activation of PKC d and Inhibition of Insulin Actions in Fibroblasts from Type 1 Diabetes with CVD Impaired Wound Healing.

特許出願 なし