

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08597

研究課題名(和文) インスリン由来アミロイドーシスの病態と発症メカニズムおよび構造と毒性の研究

研究課題名(英文) Pathophysiology and developing mechanism, and structure and toxicity of insulin-derived amyloidosis

研究代表者

永瀬 晃正 (Terumasa, Nagase)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10408114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)： インスリン由来アミロイドーシスは、インスリン療法の皮膚合併症であり、注射されたインスリンがアミロイド蛋白となり注射部位に沈着する。本研究では、インスリン由来アミロイドーシスの臨床的特徴と長期予後を明らかにした。また、インスリン治療中の糖尿病患者のインスリン注射部位をMRIによってスクリーニングしてインスリン由来アミロイドーシスの頻度を調べた。さらに、インスリン由来アミロイドーシスの構造と毒性について研究した。本研究によりインスリン由来アミロイドーシスの病態がより明らかとなり、インスリン療法の向上に貢献した。

研究成果の概要(英文)： Insulin-derived amyloidosis is a skin-related complication of insulin therapy. The amyloid fibril protein is derived from the injected insulin and forms an amyloid deposit at the injection site. The present study showed the clinical characteristics and long-term prognosis of insulin-derived amyloidosis. Additionally, the study investigated the prevalence of insulin-derived amyloidosis by screening insulin injection sites using MRI in patients with insulin-treated diabetes. Moreover, this study indicated the structure and toxicity of insulin-derived amyloidosis. Thus, the present study showed the pathophysiology of insulin-derived amyloidosis more clearly, and contributed to the improvement in insulin therapy.

研究分野：代謝内分泌学

キーワード：インスリン アミロイドーシス 病態 MRI 予後 構造 毒性

1. 研究開始当初の背景

インスリン由来アミロイドーシスは、インスリン療法の皮膚合併症であり、注射されたインスリンがアミロイド蛋白となり注射部位に沈着する。研究代表者らは、インスリン由来アミロイドーシスがインスリンの皮下吸収を低下させ、血糖コントロール悪化及びインスリン量増加の原因となることを報告してきた [1, 2]。

一方、インスリン由来アミロイドーシスの臨床的特徴や長期予後及びその頻度などの病態は不明な点が多く、またその発症メカニズムは明らかでなかった。さらに、インスリン由来アミロイドーシスのアミロイド蛋白としての構造や毒性に関しては報告がみられていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、インスリン由来アミロイドーシスの病態を明らかにしてその発症メカニズムを解明することであり、またそのアミロイド蛋白としての構造や毒性を明らかにすることである。これによってインスリン由来アミロイドーシスの予防法や治療法を確立し、インスリン療法を改善させることを目標としている。

3. 研究の方法

(1) 臨床的特徴と長期予後

これまで経験したインスリン由来アミロイドーシス 16 症例を対象として、その臨床的特徴や、血糖コントロール、インスリン量、MRI 像などの長期予後を検討した。

(2) インスリン由来アミロイドーシスの頻度

インスリン由来アミロイドーシスの頻度を知るために、インスリン治療中の糖尿病患者 182 名を対象として、インスリン注射部位の MRI を施行した。MRI でアミロイド沈着が疑わしい場合には適宜生検を行い病理学的にアミロイドであることを証明し、さらに免疫組織学的にインスリン由来であることを証明する。

(3) 構造と毒性

インスリン由来アミロイドーシスの 5 症例において、診断のために皮膚生検を行い、採取した検体の一部をホルマリン固定し、残りを冷凍保存した。ホルマリン固定した検体は病理学的及び免疫組織学的検討を行った。一方、冷凍保存した検体は切片化し、コンゴレッド染色をガイドとして陽性部分をアミロイド組織として切り出した。また残りの表皮、真皮、皮下組織をコントロールとして切り出した。

アミロイド組織とコントロールの細胞毒性は、HEK293T 及び HeLa 細胞株を用い、水溶性テトラゾリウム塩 (WST-8) を発色試薬とした生細胞数測定キットにより調べた。

アミロイド組織のアミロイド構造は、透過型電子顕微鏡を用いた免疫電子顕微鏡法によって観察した。

4. 研究成果

(1) 臨床的特徴と長期予後

インスリン由来アミロイドーシスの 16 症例中 14 症例において、インスリン注射部位に腫瘍性病変がみられた。一方、2 症例においてはインスリン注射部位に触知可能な腫瘍はみられなかった。これら 2 症例では、インスリン注射部位の変更に血糖コントロールが改善しインスリンが顕著に減量できたことからアミロイド沈着が疑われた。その後の MRI でさらにアミロイド沈着が疑われ、生検によってインスリン由来アミロイドーシスと判明した。最近の総説では、インスリン由来アミロイドーシスの症例の大半 (96.5%; n=86) は身体診察で観察できる腫瘍性病変と報告されている [3]。本研究により、腫瘍を形成しないインスリン由来アミロイドーシスが稀ならず存在し、その場合も血糖コントロール悪化及びインスリン量増加の原因となることが明らかとなった。また腫瘍を形成する症例と形成しない症例で MRI 像が異なる可能性が示唆された。

また、インスリン由来アミロイドーシスの 16 症例中 6 例は 1 型糖尿病 (男 4, 女 2) で、10 例は 2 型糖尿病 (男 7, 女 3) であった。この 1 型糖尿病の 6 例と 2 型糖尿病の 10 例において、年齢、性別比、糖尿病歴、インスリン歴、HbA1c 及びインスリン量を比較すると、2 群間で有意差はみられなかった。このようにインスリン由来アミロイドーシスの臨床的特徴は、1 型糖尿病と 2 型糖尿病で変わりがなかったことが示された。

さらに、8 症例において HbA1c やインスリン量などの臨床的指標の長期予後 (6 ± 3 年後) を検討した。図 1 に示すように、HbA1c 及び 1 日インスリン量はインスリン由来アミロイドーシスが発見された時点では上昇していたが (図 1 の前)、注射部位をアミロイドーシス部位から正常部位に変更後は有意に低下し、さらに長期のフォローアップ後にも上昇はみられなかった (6 ± 3 年後)。すなわち、

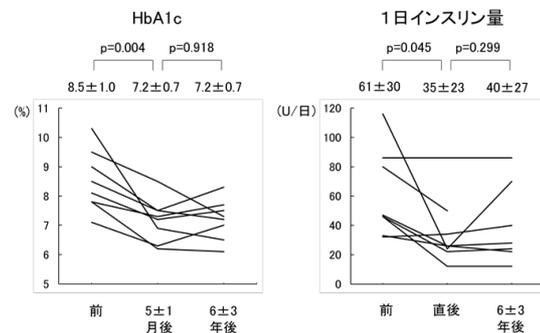


図 1. インスリン由来アミロイドーシス患者における HbA1c 及び 1 日インスリン量の長期予後

インスリン由来アミロイドーシス症例において臨床的指標は、長期的に悪化はみられていなかった。

また、6症例においてMRI像の長期予後(7±3年後)を検討した。その結果、5症例ではインスリン由来アミロイドーシスの腫瘍の大きさは不変もしくは軽度の縮小を示したが、1症例では腫瘍が増大していた。このように大半の症例では、長期的にMRI上で腫瘍は不変もしくは軽度縮小することが示された。増大した症例では、インスリン由来アミロイドーシス部位に注射を継続していた。

これらの検討によって、インスリン由来アミロイドーシスの臨床的特徴及び長期予後が明らかとなった。

(2) インスリン由来アミロイドーシスの頻度

インスリン治療中の糖尿病患者182名を対象として、インスリン注射部位の視診及び触診を行い、さらに同部位をMRIで撮影した。その結果、MRIでアミロイド沈着が強く疑われた例は28例(15.4%)であった。その28例の中で15例は触診で腫瘍を触知したが、13例は腫瘍を触知しなかった。

現在、この28例の中で同意が得られた対象者に対して、皮膚生検または針生検を実施して病理学的にアミロイド沈着であることを確認している。今後、これらの結果を踏まえて、インスリン由来アミロイドーシスの頻度を明らかにする。さらに、同時に採血も行っていて、インスリン由来アミロイドーシスの発症に関与する因子を検討する。

(3) 構造と毒性

対象の5症例においてはインスリン注射部位に腫瘍性病変が存在した。そのうち1症例では生検時に腫瘍の周囲に壊死組織がみられたが、その他の4症例では壊死組織はみられなかった。病理学的検討では5症例すべて腫瘍はアミロイド沈着であり、上記の1症例では周囲壊死が病理学的に確認された。免疫組織学的検討では、アミロイド沈着は抗インスリン抗体に反応し、インスリン由来アミロイドーシスと判明した。

図2に示すようにHEK293T細胞に対する、

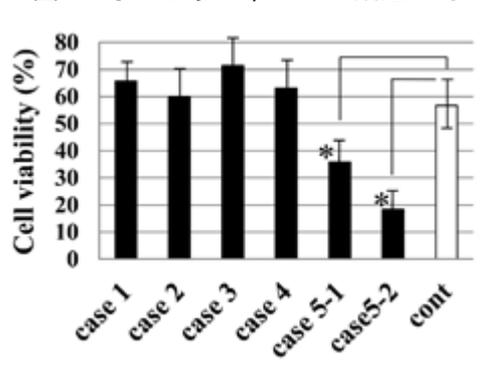


図 2. インスリン由来アミロイドーシスの HEK293T 細胞に対する毒性

細胞毒性の検討では、Case 5 のアミロイド組織(Case 5-1 と Case 5-2)が有意に細胞毒性を示したが、他の4例のアミロイド組織は毒性を示さなかった。このCase 5は周囲に壊死を伴った症例であった。同様な結果がHeLa細胞を用いた検討でも得られた。

透過型電子顕微鏡による観察では、壊死を伴わない4症例ではアミロイド組織は微細線維状構造を示したが、壊死を伴う1症例ではアミロイド組織は非線維状構造を示した。

本研究によって、インスリン由来アミロイドーシスは細胞毒性を有する可能性があることが明らかとなった。また、毒性のあるインスリン由来アミロイドーシスは、毒性のないものとアミロイド構造が異なり、さらに、周囲組織の壊死の原因となる可能性が示唆された。

<引用文献>

- [1] Nagase T, Katsura Y, Iwaki Y, et al. The insulin ball. Lancet 2009;373:184.
- [2] Nagase T, Iwaya K, Iwaki Y, et al. Insulin-derived amyloidosis and poor glycemic control: a case series. Am J Med 2014;127:450-454.
- [3] Nilsson MR. Insulin amyloid at injection sites of patients with diabetes. Amyloid 2016;23:139-147.

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計4件)

- Dong J, Fujita R, Zako T, Ueda H. Construction of Quenchbodies to detect and image amyloid oligomers. Analytical Biochemistry. 2018; 550: 61-67. DOI: 10.1016/j.ab.2018.04.016 査読有
- Yohei Misumi, Mitsuharu Ueda, Taro Yamashita, Teruaki Masuda, Yumiko Kinoshita, Masayoshi Tasaki, Terumasa Nagase, Yukio Ando, Novel screening for transthyretin amyloidosis by using fat ultrasonography. Annals of Neurology. 2017; 81: 604-608. DOI: 10.1002/ana.24914 査読有
- Tong Bu, Tamotsu Zako, Mizuo Maeda. Dark Field Microscopic Sensitive Detection of Amyloid Fibrils Using Gold Nanoparticles Modified with Antibody. Analytical Sciences. 2016; 32: 307-311. DOI: 10.2116/analsci.32.307 査読有
- Jozawa Hiroki, Kabir Md. Golam, Zako Tamotsu, Maeda Mizuo, Chiba Kazuhiro, Kuroda Yutaka. Amorphous protein aggregation monitored using fluorescence self-quenching. FEBS Letters. 2016; 590: 3501-3509. DOI: 10.1002/1873-3468.12439 査読有

〔学会発表〕(計9件)

永瀬晃正, 岩屋啓一, 座古保, 小高以直, 小暮晃一郎, 三井雅子, 根本洋子, 則武昌之, 桂善也. 腫瘍を触知しないインスリン由来アミロイドーシスの臨床的影響と画像. 第61回日本糖尿病学会年次学術集会. 東京, 2018, 5/25.

桂善也, 永瀬晃正, 小暮晃一郎, 小高以直, 根本洋子, 則武昌之, 三井雅子, 小佐野博史. インスリンアナログ製剤内のアミロイド線維形成に対する温度負荷の影響について. 第61回日本糖尿病学会年次学術集会. 東京, 2018, 5/25.

Terumasa Nagase, Keiichi Iwaya, Tamotsu Zako, Tomotada Odaka, Kouichiro Kogure, Yoko Nemoto, Yohei Misumi, Masayuki Noritake, Yukio Ando, Yoshiya Katsura. Clinical and MRI characteristics and follow-up studies of insulin-derived amyloidosis. The XVIth International Symposium on Amyloidosis. 熊本, 2018, 3/27.

福永隼大, 永瀬晃正, 岩屋啓一, 座古保. インスリンボールの毒性と構造及びミノサイクリンによる影響の調査. 第17回日本蛋白質科学会年会. 仙台, 2017, 6/21.

永瀬晃正, 小高以直, 柿崎雄介, 岩城祥樹, 三井雅子, 根本洋子, 則武昌之, 座古保, 岩屋啓一, 桂善也. インスリン由来アミロイドーシス(インスリンボール)の臨床的影響と長期予後. 第60回日本糖尿病学会年次学術集会. 名古屋, 2017, 5/18.

桂善也, 永瀬晃正, 柿崎雄介, 根本洋子, 則武昌之, 三井雅子, 小高以直, 岩城祥樹, 嶋田新, 小佐野博史. 患者使用プレフィルドアナログインスリン製剤内でのアミロイド線維形成について. 第60回日本糖尿病学会年次学術集会. 名古屋, 2017, 5/19.

岩屋啓一, 永瀬晃正, 座古保, 伊藤喜之, 桂善也. インスリンボールの超微形態. 第106回日本病理学会総会. 東京, 2017, 4/29.

永瀬晃正, 岩屋啓一, 岩城祥樹, 小高以直, 柿崎雄介, 根本洋子, 則武昌之, 座古保, 桂善也. インスリン由来アミロイドーシス(インスリンボール)は血糖コントロール悪化及びインスリン量増加の原因となる. 第4回アミロイドーシス研究会学術集会. 東京, 2016, 8/19.

永瀬晃正, 岩屋啓一, 座古保, 内田龍志, 小高以直, 岩城祥樹, 三井雅子, 根本洋子, 則武昌之, 桂善也. インスリン由来アミロイドーシス(インスリンボール)の細胞毒性とアミロイド構造. 第59回日本糖尿病学会年次学術集会. 京都, 2016, 5/21.

〔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〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永瀬 晃正 (NAGASE TERUMASA)
東京医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 10408114

(2) 研究分担者

岩屋 啓一 (IWAYA KEIICHI)
公益財団法人佐々木研究所・附属研究所・
研究員
研究者番号: 50312012

座古 保 (ZAKO TAMOTSU)
愛媛大学・理工学研究科・教授
研究者番号: 50399440

(3) 連携研究者

桂 善也 (KATSURA YOSHIYA)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90266487

(4) 研究協力者

なし