

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19507

研究課題名(和文) ヒト膵臓組織を用いた糖尿病発症機序の解明に関する研究

研究課題名(英文) Elucidation of the underlying mechanism of diabetes onset using human pancreas samples

研究代表者

坊内 良太郎 (Bouchi, Ryotaro)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・室長/常勤医師

研究者番号：60596328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：膵部分切除術には膵頭十二指腸切除；PD、膵体尾部切除；DPがあり、PDおよびDP後の糖尿病の発症を検討した。約2年の経過中にPD4%、DP48%に糖尿病の発症を認めた。インスリン分泌はDPで低下を認めたが、PDでは保持されていた。インスリン分泌を刺激する腸管ホルモンであるGLP1の分泌はPDがDPより高かった。インスリン分泌細胞の脱分化(成熟細胞から未熟な細胞へ戻ること)の指標が高い患者で耐糖能が悪いことが判明した。手術前後の腸内細菌叢を比較したところ、PDの術前後で菌叢の顕著な変化を認め、無菌マウスへの移植実験で膵切除による腸内細菌叢の変化が糖尿病の発症に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We first investigated the incidence of diabetes after pancreatectomy (pancreatoduodenectomy; PD, distal pancreatectomy; DP). 4% and 48% of PD and DP developed diabetes 2 years after the surgery. Insulin secretion was decreased in DP but not in PD. GLP1 (hormone secreted from enteroendocrine L cells that can stimulate insulin secretion from beta cells) was robustly increased after PD. Patients with impaired glucose tolerance showed higher levels of histological markers for dedifferentiation of beta cells than those with normal glucose tolerance. Gut microbiota dramatically changed after PD. When stools obtained from the patients before and after PD were separately transplanted to germ-free mice, a significant difference was observed in glycemic control between the two groups.

研究分野：Internal Medicine

キーワード：diabetes

1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病は膵β細胞からのインスリン分泌の低下および筋肉、肝臓、脂肪におけるインスリン感受性の低下によって引き起こされるインスリンの作用不足により生じる慢性の高血糖を主体とする代謝症候群である。慢性ストレスに応答してβ細胞が疲弊し、アポトーシスによる細胞死を起こした結果、β細胞量が減少することがβ細胞の機能不全の病態とされてきた。しかしながら近年、代謝ストレスにさらされた膵β細胞が、β細胞としての性格を失いインスリン合成を停止して未分化内分泌細胞へと脱分化し、さらに、一部の細胞は、グルカゴン産生細胞(α細胞)へ形質転換することが報告され、β細胞の脱分化や形質転換がβ細胞機能不全に関わる新たな機序として注目されている。本研究の報告者らは、2 型糖尿病患者の膵臓組織における免疫組織学的検査により、β細胞の脱分化が2型糖尿病の膵島に高率に認められることを見いだした。しかしながらヒトにおける糖尿病発症にβ細胞脱分化が及ぼす影響については明らかでない。加えて、膵切除後の糖尿病発症機序についても明らかでない。

2. 研究の目的

膵臓手術により得られるヒト膵臓組織と周術期の糖代謝の臨床像の詳細な解析により、膵臓手術後の糖尿病の発症機序の解明を目的とする。内分泌学的検査および単離膵島の培養系により得られた術前耐糖能とβ細胞脱分化との関連を検討し、耐糖能障害の評価としてのβ細胞脱分化の有用性を確立し、術後の糖尿病発症におけるβ細胞脱分化の関与を明らかにする。また、膵切除術前後で腸内細菌叢の解析、胆汁酸および短鎖脂肪酸解析を実施し、膵切除後糖尿病発症との関連について検討する。

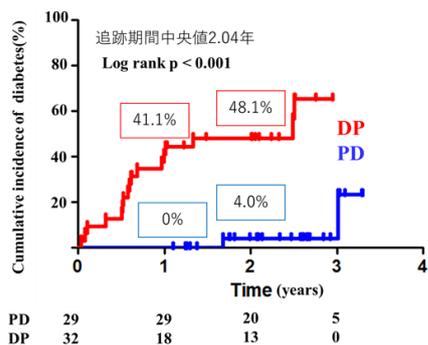
3. 研究の方法

①膵臓手術(膵頭十二指腸切除; PD および膵体尾部切除; DP) 予定の症例をリクルートし、文書による同意を取得する。②術前の内分泌学的検査: 外来受診時の血糖、HbA1c、病歴聴取から糖尿病の有無を確認する。非糖尿病患者には75gブドウ糖負荷試験(OGTT)、24時間蓄尿におけるC-peptide測定、糖尿病患者にはグルカゴン負荷試験、24時間蓄尿におけるC-peptide測定を行い、内因性インスリン分泌能、インスリン抵抗性、インクレチン分泌を評価する。③摘出膵を用いた免疫組織学的検査: 手術で摘出した膵臓の正常部位から免疫染色用の組織ブロックを作成する。作成したブロックは直ちに包埋し、-80度にて保存する。保存ブロックから凍結切片を作成し、蛍光免疫染色により単位面積あたりの膵島面積、膵島面積あたりのインスリンおよびグルカゴン陽性細胞数、脱分化したβ細胞や他の内分泌細胞への形質転換を起こしたβ

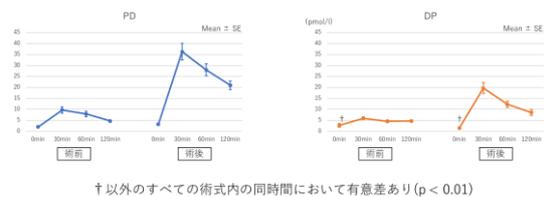
細胞の割合を評価する。④術後の糖尿病発症率の評価: 非糖尿病患者においては、術後の糖尿病発症率を評価する目的で、75gブドウ糖負荷試験を術直後および退院後6か月毎に実施する。⑤周術期の内分泌学的検査および膵臓組織検査と術後耐糖能の変化との関連についての検討を行う。⑥膵切除前および退院直前、6ヶ月後の糞便を採取、腸内細菌叢解析、胆汁酸および短鎖脂肪酸解析を実施する。膵切除前および術後6ヶ月の糞便を10週齢の無菌マウスに移植し、高脂肪食で4週間飼育、経口ブドウ糖負荷試験、インスリン負荷試験、肝臓・精巣周囲脂肪重量、腸管長、肝臓組織学的検査、炎症関連遺伝子発現の評価を実施する。

4. 研究成果

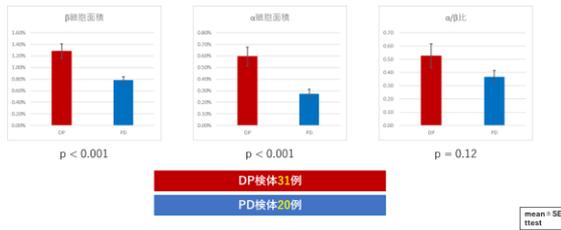
研究期間中に123名の膵臓切除術予定者が登録され、8名が除外基準に該当、最終的に115名が解析対象となった。術前に糖尿病を認めたものが26名、非糖尿病が86名であった。非糖尿病例に75gOGTTを実施したところ正常型38例、境界型39例、糖尿病型9例であった。追跡可能であった非糖尿病61例(PD29例、DP32例)の糖尿病の2年累積発症率はPD4.0%、DP48.1%と顕著な違いを認められた。



75gOGTTでの血糖曲線下面積(AUC)は術後6ヶ月で2群間に有意差を認めた(PD<DP)。インスリンのAUCはPD群で有意に高かった。PDは術後にOGTT後にGLP-1分泌が急激に増加、PDとDPにおけるGLP-1のAUCに有意差を認めた。一方、GIP分泌は両群とも術前後で有意な変化を認めなかった。

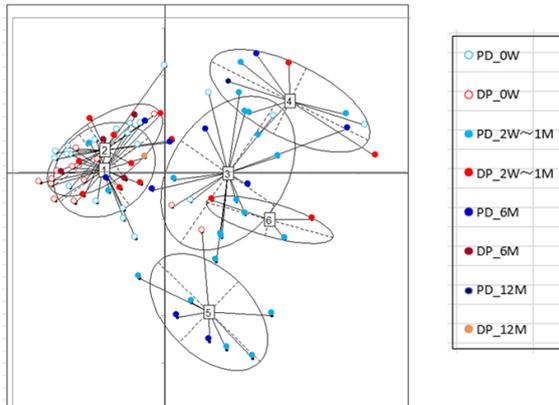


膵組織学的解析において、DP患者はβ細胞面積、α細胞面積がPD患者より有意に大きく、α/β比が高い傾向を認めた。



DP 患者における糖尿病発症の予測因子を検討したところ、 $\beta$ 細胞面積および $\alpha$ 細胞面積は有意な予測因子であった。脱分化 $\beta$ 細胞の指標や他の内分泌細胞面積 (somatostatin/pancreatic polypeptide) と膵切除後の糖尿病発症の関連については今後検討予定である。

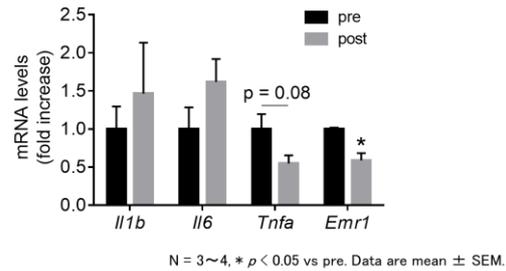
膵切除後の糖尿病発症リスクが PD および DP で大きく異なる原因の解明を目的とし、各術式の術前および術直後、6 ヶ月、1 年後の糞便を採取、腸内細菌叢解析を実施した。



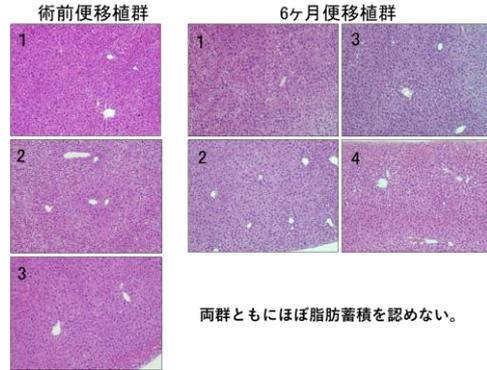
DP 症例では術前後で腸内細菌叢の大きな変化は認めなかったものの、PD 症例では術直後 (2 週から 4 週後) から腸内細菌叢の劇的な変化を認め、その変化は 6 ヶ月後まで維持された。4 大門 (Firmicutes、Bacteroidetes、Actinobacteria、Proteobacteria) の中では、Proteobacteria の割合が PD 術後に劇的に増加していた。また、術後の腸内細菌の多様性が保たれる症例ほど、インスリン抵抗性が改善することを見いだした。

さらに 75gOGTT における各ポイントの短鎖脂肪酸および胆汁酸の血中濃度を探索的に測定した。解析症例数が PD3 例、DP3 例と少なかったためか、酢酸などの短鎖脂肪酸および胆汁酸の血中レベルには PD、DP とも術前後で有意な変化を認めなかった。

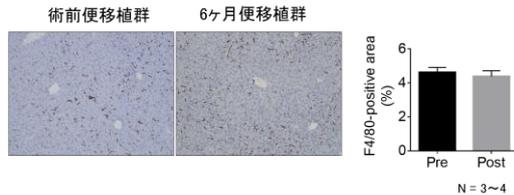
PD 症例の術後の腸内細菌叢の変化が、膵切除後糖尿病の発症抑制に寄与しているかを検討するため、PD 術前および 6 ヶ月後の糞便を約 10 週齢の無菌マウス (C57BL/6) に移植し、60% 高脂肪食で 4 週間飼育した後、体重、OGTT、ITT、各臓器重量・組織について評価を行った。PD 術前および 6 ヶ月後の糞便を移植したマウスの中で、耐糖能レベルに有意差を認めた。肝臓の遺伝子解析では、炎症マーカー (*Tnfa*) の減少傾向、マクロファージマーカー (*Emr1*) の有意な低下を認めた。



一方、肝臓組織学的解析では脂肪沈着やマクロファージ浸潤には有意差を認めなかった。



#### F4/80染色



肝内マクロファージに差は認めなかった

以上より、膵切除後の糖尿病発症の術式による違いは、腸管インクレチン (GLP1) 分泌の変化および腸内細菌叢の変化が関与している可能性が示唆された。 $\beta$ 細胞の脱分化の膵切除後の糖尿病発症の病態における役割についてはさらに詳細な検討が必要である。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

竹内 崇人, 坊内 良太郎, 大原 徳彦, 中野 雄二郎, 村上 正憲, 浅川 雅博, 笹原 由梨子, 南 勲, 橋本 貢士, 泉山 肇, 吉本 貴宣, 光法 雄介, 工藤 篤, 田邊 稔, 小川 佳宏, 膵切除術式別にみた耐糖能の推移の詳細な検討, 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

UMIN-CTR 臨床試験登録

[https://upload.umin.ac.jp/cgi-open-bin/ctr/ctr\\_view.cgi?recptno=R000017793](https://upload.umin.ac.jp/cgi-open-bin/ctr/ctr_view.cgi?recptno=R000017793)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坊内 良太郎 (Bouchi Ryotaro)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター 糖尿病情報センター臨床情報研究室・室長/糖尿病内分泌代謝科・常勤医師  
研究者番号：60596328

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )