

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09830

研究課題名(和文) 糖尿病治療を目指した膵 細胞分化転換機構の解明・ARX阻害低分子化合物の探索

研究課題名(英文) Elucidation of human pancreatic alpha-cell transdifferentiation mechanism for treatment of diabetes. Search for low molecular weight compounds inhibiting ARX

研究代表者

小澤 純二 (Junji, Kozawa)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：80513001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：当院外科膵切除症例の組織学的検討から、長期経過2型糖尿病患者において膵 細胞の増殖および 細胞に対する 細胞面積率の増加がみられた。一方で、膵 細胞量の低下は、膵 細胞におけるARX発現率の低下、NKX6.1の発現率の増加と関連していた。以上は、糖尿病病態悪化過程において、膵 細胞が増殖し、ARX発現の低下、NKX6.1発現の増加を介して膵 細胞へ分化転換することで代償しようとしている可能性が考えられた。さらにこれら糖尿病病態進展において膵脂肪化と炎症が関与していることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦において、糖尿病患者は増加の一途を辿り、糖尿病治療薬の開発は進んでいるが、未だ膵 細胞量の減少に対する根治的な治療法は開発されていない。膵 細胞のARXを中心とする転写因子発現変化が膵 細胞への分化転換へつながる可能性、今後の膵 細胞におけるARX発現調節を介した膵 細胞再生療法への組織学的な基盤が示された。

研究成果の概要(英文)：In pancreatic histological analyses in patients who underwent pancreatectomy in Osaka university hospital, pancreatic alpha-cell proliferation and the area ratio of alpha cell/beta cell increased in patients with long-standing type 2 diabetes. The reduced beta-cell mass was associated with the reduced expression of ARX and the increased expression of NKX6.1 in alpha cell. This suggested that the compensation for the reduced beta-cell mass through proliferation and transdifferentiation of alpha cell. In addition, the progression of diabetes intolerance was associated with pancreatic fatty infiltration and islet inflammation.

研究分野：糖尿病

キーワード：膵 細胞 膵 細胞 分化転換 再生療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト2型糖尿病は、血糖調節の恒常性が破綻、高血糖を来した状態であり、主たる病態に膵細胞からのインスリン分泌不全が存在する。近年、インスリン分泌不全の本態が細胞量の減少であることが明らかとなったが、動物モデルでは膵島細胞が可塑性を持ち、膵細胞から膵細胞、膵細胞から膵細胞への分化転換が示されている。そして、これら分化転換において膵細胞特有の転写因子である ARX(aristaless-related homeobox)の発現調節が鍵となっていることも示されている。近年、創薬を目指して、標的蛋白質と相互作用を有する低分子化合物のスクリーニング法が開発されている。

2. 研究の目的

詳細に耐糖能区分されたヒト膵島組織の形態学的検討により、ヒト膵島細胞における ARX を中心とする膵島細胞の発生・分化に関連する転写因子群の発現パターンを示し、膵島細胞の分化転換および膵島構造異常との関連を明らかにする。その上で低分子化合物アレイを用いて ARX 標的物質を探索、ARX を介した分化転換機構を制御し、膵島構造異常および耐糖能異常を改善、新たな糖尿病治療への可能性を見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 耐糖能異常進展過程における膵島構造異常の形態学的検討

当研究室で保管中の約50名の膵切除例の膵組織標本を用い、膵島ホルモン、ARXを中心とする膵細胞の発生分化に関わる転写因子の多重染色を行う。膵切除例は術前に耐糖能を正常型(NGT)、境界型(IGT)、新規診断糖尿病型(新規DM型)、長期罹病2型糖尿病型(長期DM型)と4病期に区分する。膵細胞および細胞面積率、これら面積率比を計測し、臨床背景との関連を検討することで、耐糖能異常進展過程における膵島構造変化を明らかにする。

(2) ARX発現を介した分化転換の形態学的検討

病期別のARXを含む転写因子群の発現形式を検討する。患者臨床背景と同発現様式の関連を検討する。以上より、耐糖能異常進展過程でみられる膵島構造異常に対するARX発現を介した分化転換機構の寄与を検討する。

(3) ARXを標的とする低分子化合物のスクリーニング

膵島細胞におけるARX発現制御を行い膵細胞への誘導が可能かを検討する。化合物アレイを用い、化合物ライブラリーからARXを標的タンパク質として結合する低分子化合物をスクリーニングする。スクリーニングされた低分子化合物群を膵島細胞の分化転換の有無、形質変化の有無を形態学的、細胞生物学的に検討し、リード化合物を同定する。

4. 研究成果

(1) 耐糖能異常進展過程での膵島構造変化

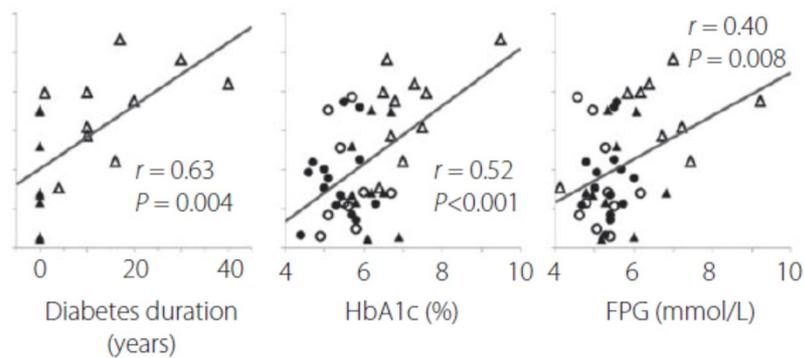
(2) 膵島構造変化における ARX 発現を介する分化転換の寄与

につき成果が得られた。

(1) 耐糖能異常進展過程での膵島構造変化

2017年度は詳細に耐糖能区分(正常型、境界型、新規診断糖尿病、長期経過2型糖尿病の4群)された43例の膵臓切除症例を対象として膵組織学的検討を行い、長期経過2型糖尿病群で膵細胞面積率に対する膵細胞面積率が他群と比較して優位に増加、罹病期間が長く、HbA1c、空腹時血糖値が高いほど増加していること(図1)、この増加は膵細胞の増殖促進が関与することを示した。さらにARXの発現がみられず、膵細胞特有の転写因子NKX6.1を発現するグルカゴン陽性細胞、膵細胞特有の転写因子NKX6.1がみられず、ARXを発現するインスリン陽性細胞が存在し、膵島構造異常において膵島細胞の脱分化・分化転換が存在する可能性を示した。本結果を学会(藤田有可里、小澤純二、第61回日本糖尿病学会年次学術集会、2018年、東京)論文(Fujita Y, Kozawa J, et al. J Diabetes Investig, 2018)にて報告した。

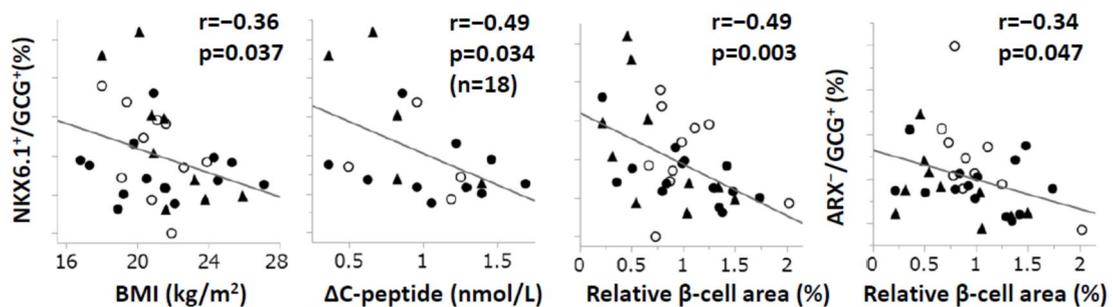
図1) 膵 細胞面積に対する 細胞面積比と罹病期間、HbA1c、空腹時血糖値 (FPG) の関連



(2) 膵島構造変化における分化転換の寄与

2018年度は全43例において膵 細胞および膵 細胞におけるARX陽性率の形態計測を完了、年齢が高く、罹病期間が長くなる程、内因性インスリン分泌が低下する程、膵 細胞のARX陽性率が減少していることを見出した。本結果を学会(藤田有可里、小澤純二、他。第62回日本糖尿病学会年次学術集会、2019年、仙台市)にて報告した。2019年度にはBMIの低下、内因性インスリン分泌能の低下、 細胞量の低下が膵 細胞におけるNKX6.1陽性率の増加とも関連すること、 細胞量の低下がARX発現率の低下を伴っていることを見出した(図2)。

図2) 膵 細胞のNKX6.1陽性率およびARX陰性率と臨床背景の関連



なお、当初予定していた膵島細胞におけるARX発現制御による膵 細胞への分化転換の誘導、ARXを標的タンパク質として結合する低分子化合物のスクリーニング、リード化合物の同定については、上記ARXの分化転換に対する寄与の形態学的検討において、染色手技等の問題の解決に時間を要したため、 細胞株におけるARX発現制御に着手したところで期間終了となっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishibashi C, Kozawa J, Fujita Y, Yoneda S, Uno S, Kimura T, Fukui K, Nojima S, Morii E, Eguchi H, Iwahashi H, Imagawa A, Shimomura I.	4. 巻 47
2. 論文標題 Glucose Intolerance After Pancreatectomy Was Associated With Preoperative Hemoglobin A1c, Insulin Resistance, and Histological Pancreatic Fatty Infiltration.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pancreas	6. 最初と最後の頁 e48-e50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPA.0000000000001109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujita Y, Kozawa J, Iwahashi H, Yoneda S, Uno S, Eguchi H, Nagano H, Imagawa A, Shimomura I	4. 巻 9
2. 論文標題 Human Pancreatic Alpha- to Beta-Cell Area Ratio Increases After Type 2 Diabetes Onset.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 1270-1282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.12841	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤田有可里、小澤純二、米田 祥、江口英利、岩橋博見、下村伊一郎
2. 発表標題 ヒト成体膵島におけるARX (Aristalessrelatedhomeoboxgene) 発現様式の検討
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石橋千咲、小澤純二、藤田有可里、米田祥、宇野彩、木村武量、福井健司、野島聡、森井英一、江口英利、今川彰久、岩橋博見、下村伊一郎
2. 発表標題 膵切除後の耐糖能悪化を予測する術前臨床背景および組織学的因子の検討
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田有可里、小澤純二、米田 祥、宇野彩、江口英利、岩橋博見、今川彰久、下村伊一郎
2. 発表標題 膵 細胞に対する 細胞面積比の臨床的意義
3. 学会等名 第60回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤田有可里、小澤純二、米田 祥、宇野彩、江口英利、岩橋博見、今川彰久、下村伊一郎
2. 発表標題 成体膵島におけるARX(Aristaless-related homeobox gene)発現様式の 検討～第2報～
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岩橋 博見 (Iwahashi Hiromi) (60397627)	大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授 (14401)	異動にて2019年3月25日に削除
研究分担者	福井 健司 (Fukui Kenji) (60513009)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	
研究分担者	木村 武量 (Kimura Takekazu) (70770171)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	