

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590440

研究課題名(和文) 組織Q-FISH法による膵細胞の同定と糖尿病における細胞のテロメア短縮の証明

研究課題名(英文) Identification of the beta cells and demonstration of telomere shortening in diabetes mellitus by the tissue Q-FISH method

研究代表者

相田 順子 (Aida, Junko)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京と健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：80425678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病では、細胞が減少し膵島の機能を低下させる。テロメアは癌や老化に関連する疾患と深く関係することから、糖尿病では選択的に細胞のテロメア短縮が加速していると予想した。糖尿病例と非糖尿病例の剖検膵組織パラフィン切片にFISHを施行し、膵各細胞群のテロメア長を計測し、比較した。また、膵島細胞についてはFISHにグルカゴンおよびインスリンの免疫蛍光法を重ねて鑑別した。テロメア長は神経細胞で最も長く、上皮では導管が外分泌腺、膵島細胞より長かった。対照群に比し糖尿病例ではテロメアが短縮し、特に細胞において著明であった。従って2型糖尿病の発症にテロメアが関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In type 2 diabetes, reduction of beta cells causes dysfunction of the glucose tolerance. Telomere is related to malignant neoplasms or geriatric diseases. Therefore, we predicted that telomeres of beta cells should be shorten selectively in diabetic pancreas. Tissue Q-FISH method was applied to paraffin-embedded pancreatic sections from autopsy cases (type 2 diabetes 47 cases and control 104 cases). Telomere lengths of each cell group of the pancreas were measured and compared. Alpha and beta cells in pancreatic islets were distinguished by superimposed immunofluorescence study for glucagon and insulin. Telomere lengths were longest in the nerve cells, and longer in ducts than exocrine or endocrine glands. In the diabetic cases, almost cell group showed shorter telomeres than the controls, but most prominent especially in beta cells. Therefore, it is suggested that telomere shortening in beta cells has relevance to occurrence of type 2 diabetes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、人体病理学

キーワード：分子病理 テロメア Q-FISH 膵細胞 膵細胞 2型糖尿病 加齢 老化

1. 研究開始当初の背景

年々増加する糖尿病の90%以上は2型糖尿病であり、生活習慣病の1つとして注目されている。糖尿病患者では診断時既に細胞機能が健常人の半分程度まで低下している。加齢により膵機能は低下するが、糖尿病患者においては膵機能の低下が健常人よりも加速していると考えられる。膵細胞は膵全体の約2%を占めると言われており、肥満により増加することが知られている。しかし、耐糖能が悪化するにつれ細胞量は減少し、糖尿病患者では通常の約1/3とも言われている。この細胞量の減少アポトーシスによるとされている。

テロメアは染色体末端にあり染色体を保護する役割を担っている。細胞分裂時に短縮し、6kbp以下に短縮すると染色体保護機能が不十分となり、染色体不安定性を来す。加齢による短縮以外にも、酸化ストレスやアルコール摂取、日光被曝等の他心理的ストレスによっても短縮が加速すると言われている。テロメアの短縮は癌や老年病の原因となる。我々のグループでは組織切片上でPNAプローブを用いたQ-FISH法を施行することにより、組織切片上でテロメア長を測定する方法を確立してきた。切片上で内部コントロールとしてセントロメアを用い、テロメアとセントロメアの蛍光光度比(Telomere to Centromere Ratio; TCR)を用いて相対的に評価する。さらにテロメア長既知の培養細胞セルブロックを同時にFISHすることで標準化を行っている。再現性があり正確な方法である。

2. 研究の目的

今回我々は2型糖尿病において、アポトーシスにより減少する細胞にはテロメア短縮が予測されることからQ-FISH法によるテロメア長測定を試みる。

Q-FISH法施行後に免疫蛍光法により細胞マーカー(インスリン)あるいは細胞マーカー(グルカゴン)を染色することにより選択的に細胞あるいは細胞のテロメア長を測定できると考えられる。免疫蛍光法の条件を吟味した上で、細胞、細胞、また免疫蛍光法を用いないQ-FISH法によりその他の膵各細胞群のテロメア長を計測、比較する。これらの結果から2型糖尿病における細胞の選択的テロメア短縮の存在を証明する。

3. 研究の方法

剖検例膵組織パラフィン包埋切片を用い、我々の開発したQ-FISH法を行なう。プローブはテロメアとセントロメアに対するPNAプローブ(Telo C-Cy3 probe: 5'-CCCTAACCCCTAACCCCTAA-3', Cemp 1-FITC probe: 5'-CTTCGTTGGAAACGGGT-3')を用いてFISHを行ない、テロメアとセントロメアとの蛍光光度比(TCR)により相対的なテロメア長

を決定した。さらにテロメア長既知の培養細胞セルブロック(TIG-1, 34PDL; 8.5kbp)を用いて標準化を行ない(Normalized TCR)、検討を行った。

膵組織は導管、外分泌腺、膵島(細胞、細胞)線維芽細胞、神経細胞の各細胞群の計測を行なった。ただし、膵島(細胞、細胞)はFISH施行後にそれぞれのマーカー(グルカゴン、インスリン)について免疫蛍光法を重ねて行なった。

症例は、糖尿病例47例、対照例(高齢者51例、青壮年31例、乳幼児22例)を用いた。

テロメア長について、各細胞群ごとに比較を行い、また糖尿病群と対照群で比較を行なった。

4. 研究成果

当初細胞と細胞をFISH後に二重染色してテロメア長を解析する予定であったが、10例~20例解析した段階で免疫蛍光法を用いないQ-FISHの結果と合わせ検討した所、二重染色を行なった標本では免疫蛍光法を用いない場合と結果が合致せず、一定の傾向がみられないことが判明した。従って、Q-FISH法と免疫蛍光法を重ねて行なう場合、1種類のマーカーの染色を行なうべきであると考えられる。

膵組織各細胞群ごとのテロメア長比較では、神経細胞が最も長く、上皮では導管細胞が長かった。年齢とテロメア長の分布図を描くと、線維芽細胞以外の成分(外分泌細胞、膵島、導管細胞、神経細胞)はいずれも有意な減少を示した。

糖尿病群ではいずれの細胞群も対照群に比して短縮が認められたが、特に細胞においてその傾向は著明であった(Fig.1)。

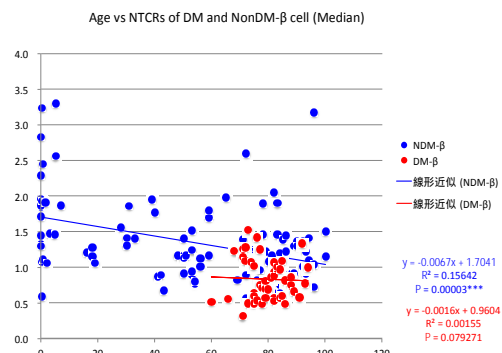


Fig.1 年齢と細胞のテロメア長 青は対照群、赤は糖尿病群。対照群に比し明らかに短い。

細胞の数は糖尿病群において減少しており、細胞との数の比は糖尿病群と対照群で有意に差があった(Fig.2)。

以上の結果より2型糖尿病では膵島細胞のテロメアが著明に短縮しており、2型糖尿病の発症に細胞のテロメア短縮が関わっている可能性が示唆された。糖尿病群の各細胞

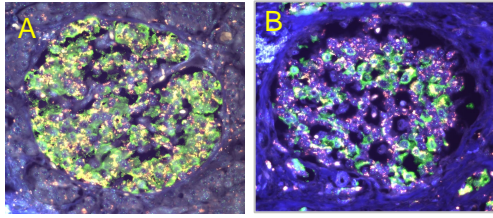


Fig.2 インスリン抗体により免疫蛍光法を重ねた FISH イメージ。緑色の細胞が β 細胞。A: 対照例 B: 糖尿病例。細胞の減少が認められる。

胞群のテロメアがいずれも短縮している原因については糖毒性などによる短縮の可能性が考えられた。

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 1 件)

1. Tamura Y., Izumiyama-Shimomura N., Kimbara Y., Nakamura K., Ishikawa N., Aida J., Chiba Y., Mori S., Arai T., Aizawa T., Araki A., Takubo K., Ito H. Beta Cell Telomere Attrition in Diabetes: Inverse Correlation Between HbA1c and Telomere Length. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; in press.

Abstract

Context: Although accelerated β cell telomere shortening may be associated with diabetes which shows a dramatically increased incidence with aging, β cell telomere length in diabetes has never been explored.

Objective: The objective of the present study was to examine telomere length in the β cells of patients with diabetes.

Design and patients: We determined telomere length in β and α cells of pancreases obtained at autopsy from 47 patients with type 2 diabetes and 51 controls, all over 60 years of age.

Main outcome measure: The normalized telomere-centromere ratio (NTCR), an index of telomere length, was determined for β (NTCR β) and α (NTCR α) cells by quantitative fluorescence in situ hybridization.

Results: The NTCR β was reduced by $27 \pm 25\%$ and NTCR α by $15 \pm 27\%$ in the patients with diabetes relative to the controls ($P < 0.01$ for both). Importantly, the degree of shortening was significantly ($P < 0.01$) greater in β cells than in α cells. The histogram of NTCR distribution was significantly skewed to the left in the patients with diabetes relative to the controls for both β and α cells, indicating preferential depletion of

longer-telomere islet cells. HbA1c was negatively correlated with β cell telomere length, and the telomeres were significantly shorter in patients who had used hypoglycemic agents than in those who had not.

Conclusion: The telomeres of β cells are shortened in patients with type 2 diabetes. There may be a vicious cycle involving β cell telomere attrition and 1 sustained hyperglycemia.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 相田順子, 泉山七生貴, 仲村賢一, 石川直, 直井美穂, 藤原睦憲, 櫻井うらら, 新井富生, 田久保海誉 糖尿病において β 細胞のテロメアは短縮するか?—, β 細胞別テロメア長の検討第102回日本病理学会総会(札幌) 2013.6.6-8

2. 石川直, 泉山七生貴, 相田順子, 仲村賢一, 藤原睦憲, 新井富生, 田久保海誉 β 細胞を構成する細胞系列別のテロメア長の Q-FISH 法による解析: 加齢および糖尿病病態との相関の検討第103回日本病理学会総会(広島)2014.4.24-26

〔図書〕(計 1 件)

田久保海誉, 仲村賢一, 泉山七生貴 テロメア、テロメラーゼと老化 老年医学系統講義テキスト 日本老年医学会編 西村書店 東京 2013; 39-42

〔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

・研究グループホームページ（研究内容の概要、論文の解説、業績）など

<http://www.ttaggg-rtgp.org/>

・研究所ホームページ（研究内容の概要、業績の一部）

http://www.tmig.or.jp/J_TMIG/J

・ Research Gate（研究業績）

https://www.researchgate.net/profile/Junko_Aida/

6．研究組織

(1)研究代表者

相田 順子（AIDA JUNKO）

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター・東京都健康長寿医療センター研究所・老年病理学研究チーム・研究員

研究者番号：80425678

(2)連携研究者

泉山 七生貴（IZUMIYAMA NAOTAKA）

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター・東京都健康長寿医療センター研究所・老年病理学研究チーム・助手

研究者番号：10158751

(3)連携研究者

仲村 賢一（NAKAMURA KEN-ICHI）

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター・東京都健康長寿医療センター研究所・老年病理学研究チーム・研究員

研究者番号：60159069