

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659158

研究課題名(和文) 2型糖尿病膵島アミロイドの病因解析とそれを標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Analysis of islet amyloid in Japanese type 2 diabetic patients and exploration of new treatment for diabetes

研究代表者

八木橋 操六 (Yagihashi, Soroku)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40111231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病の膵島アミロイド沈着について検討した。アミロイド沈着は欧米人では90%以上の患者にみられるが、日本人では28%と低く、膵島内占有面積も17.5%と軽度であった。アミロイド沈着はBMI高値群で頻度が高く、インスリン抵抗性と関連し、今後わが国でも頻度が高くなる可能性がある。アミロイド沈着群では、非沈着群に比し、より高度の膵細胞容積の減少がみられ、アミロイドが細胞の脱落を促進していることが示された。さらに、アミロイド沈着は活性化マクロファージの浸潤を伴い、催炎症反応によって細胞の脱落を促進している可能性が示された。この機構を制御することは新しい糖尿病治療の標的となるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated islet amyloid deposition in Japanese type 2 diabetic patients. Different from high prevalence in Western diabetic patients, amyloid deposition was found in 28% of Japanese patients, occupying 18% area of the islet. The amyloid-rich diabetic group was associated with high BMI, indicating the implication of insulin resistance in the evolution of amyloid deposition. The beta cell volume density in amyloid-rich diabetic group was significantly smaller than that in amyloid-free diabetic group, suggesting that amyloid promotes the beta cell decline. The amyloid deposition was also accompanied by robust infiltration of activated macrophages. Thus, the intervention of the amyloid deposition and consequent inflammatory sequelae could be a novel target for the treatment 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：糖尿病 細胞 アミロイド マクロファージ 炎症 膵ランゲルハンス島 病理 形態計測

1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病患者の爆発的増加が国際的に大きな問題となっている。肥満、運動不足、脂質に富む食事内容の影響から、メタボリック症候群をもたらし、それに付随し高血圧、動脈硬化による大血管障害をもたらし、生活の質の低下と早期死を導いている。これまで、2 型糖尿病の病態はインスリン作用不足からの高血糖とされてきた。そこでは膵細胞からのインスリン分泌の低下とインスリン標的臓器におけるインスリン作用の低下、すなわちインスリン抵抗性によって代表されてきた。ところが、糖尿病でのインスリン分泌の低下が、単に膵細胞機能の異常のみならず、その背景に膵細胞の進行性脱落があることが近年の病理学的研究から明らかとなってきた。とくに、日本人 2 型糖尿病での膵細胞の選択的減少の報告を嚆矢とし、引き続き韓国、米国からの報告が相次ぎ、国際的に細胞容積の減少が 2 型糖尿病の特徴としてコンセンサスとなっている。しかも、この細胞容積減少は、前糖尿病ともいわれる空腹時高血糖の患者においても観察されている。

この細胞容積の減少は、細胞の進行性脱落に起因しており、その基盤には細胞の早期死と再生障害が与っている。多くの動物実験を用いた研究から、糖尿病での細胞脱落には細胞のアポトーシスが関与していることが示されている。また、同時にヒト成人では細胞の再生能が著しく低く、喪失した細胞を補填できない機構も示されている。このような事実から、2 型糖尿病においても細胞を補填、あるいは細胞量を増加させるような新しい治療の道が探索されるようになってきている。

一方、ヒト 2 型糖尿病の代表的病理所見として膵ランゲルハンス島におけるアミロイドの沈着があげられる。このアミロイド沈着は、1902 年ジョンスホプキンス大学病理学教室の Opie によって初めて記載されたもので、その歴史は古い。しかしながら、アミロイド沈着がなぜ起こるのか、またそれが細胞にいかなる影響を与えているのかは全く知られていなかった。試験管や動物モデルでの実験では、アミロイド線維が細胞に対し毒性を示すことなどが示されてきたが、ヒト 2 型糖尿病膵島でのアミロイドの意義については全く知られていなかった。ごく、最近になり、米国ワシントン大学の研究グループからアミロイド沈着例では、より高度の細胞の脱落がみられることが示された。しかしながら、その機構については深く調べられていない。

私共のヒト 2 型糖尿病の病理学的解析では、欧米人に比し、いくつか異なった病理学的特徴がみられている。その代表的なものとして、欧米人 2 型糖尿病に比し、日本人 2 型糖尿病の多くは肥満がそれほど強くないことがあげられる。欧米人 2 型糖尿病では Body mass

index (BMI) が通常 30% 以上である。一方、日本人では BMI は 22~25 程度で、非糖尿病に比し有意な肥満はみられない。また、欧米人では、肥満とともに脂質異常を伴うことが多い。一方、欧米人と共通の所見として高血圧、喫煙の頻度が高いこともあげられる。このような臨床背景の違いが膵島病変にどのような影響を与えているか、わが国での膵島病変は特徴はいまだ確立されていない。

糖尿病の本態が病理学的研究によってようやく器質的なアミロイド沈着を伴う膵細胞脱落として確立されつつある。この 2 つの病理学的特徴の病因的関連性を追究し、その機序を解明することは糖尿病の本質的治療の指針を探る意味からも不可欠である。

2. 研究の目的

2 型糖尿病でのアミロイド沈着の病因的意義を明らかにし、その機序を探索する。まず、本邦 2 型糖尿病において、欧米人糖尿病と同じようにアミロイド沈着がみられるか否かを解決する。このことは、遺伝的、民族的差がアミロイド沈着に関連するかを解決することになる。また、アミロイド沈着が膵細胞脱落に影響を与えるかを明らかにする。とくにアミロイド沈着例で細胞減少が著しい場合、アミロイドの病因的意義が確立される。またこれが実証された場合、アミロイド沈着を防止することが糖尿病進展の鍵となる可能性が高い。さらに、膵アミロイドはこれまで硝子化として表現されてきたが、そのなかに脂質物質、あるいは糖化終末産物 (AGE) などを証明できれば、アミロイド沈着過程が推定でき、その防止の道を探ることが可能となる。さらに、アミロイド沈着が膵島で観察される炎症機構となんらかの関係があるかを炎症細胞浸潤として同定を試みる。糖尿病膵島では催炎症反応が亢進することが指摘されている。アミロイド沈着膵島が炎症とどう関係しているかを明らかにすることは、アミロイド沈着過程のみならず、アミロイドがいかに細胞脱落と関連するかを明確に示すことになる。そして、これらの所見からアミロイドの糖尿病発症についての病因的意義を見出し、その機構を干渉することによる新しい糖尿病治療の道を探索する。

3. 研究の方法

1) ヒト 2 型糖尿病の膵島アミロイドの検討。日本人 2 型糖尿病 100 例以上を用い、膵島アミロイド沈着の頻度、程度を形態計測法を用いて評価する。アミロイド沈着は Thioflavin 染色により検出した。

弘前大学医学部附属病院、青森県立中央病院、八戸市立病院、函館市立病院で 2000 年から実施された 75 歳以下の病理解剖例を探索し、2 型糖尿病と診断され例を蒐集した。死後 5 時間以内に剖検が施行された例で、膵全体が摘出されたもの、良好な固定条件のものに限った。腫瘍合併例、膵炎合併例は除外

した。また、対照とする 75 歳以下の非糖尿病剖検例では、糖尿病の可能性のある例は除外した。10%ホルマリン固定後、パラフィン包埋ブロックされた膵体部、膵尾部の標本を HE 染色し、膵島硝子化の有無をみた。その中で明らかな膵島硝子化のある例 26 例、硝子化のみられない糖尿病症例 20 例、非糖尿病対照として 20 例を選択し解析に用いた。

2) 沈着アミロイドの構成成分の免疫組織学的検討

アミロイド沈着のある 5 例を選択し、それに対し、アミリン抗体、Apoprotein E(ApoE)抗体、AGE(carboxymethyllysine)抗体をそれぞれ一次抗体として用い、パラフィン切片を脱パラ後、SAB 抗体法によって免疫染色した。発色はジアミノベンチジンをを用いた。

3) 臨床病態とアミロイド沈着の関連の検討。

アミロイド沈着例 26 例、非沈着糖尿病例 20 例 BMI、HbA1c、罹病期間、年齢などの臨床事項とアミロイド沈着との関連を検討した。また、アミロイド沈着と糖尿病病態との関連を調査した。全例で、BMI や HbA1c のデータなどみられなかったが、それぞれ 15 例以上での記載がみられたことから、データのある部分に関して、統計学的解析を加えてアミロイド沈着と臨床病態との関連を検討した。

4) アミロイド沈着と膵島内分泌細胞の関係。

膵体部パラフィン切片をアミロイド沈着糖尿病、非沈着糖尿病、非糖尿病群の分け、それぞれについて、インスリン抗体、グルカゴン抗体、ソマトスタチン抗体、Pancreatic Peptide (PP)抗体を用い、免疫 4 重染色を施行した。4 重染色切片で膵島、PP 細胞についてのポイントカウンティング法による形態計測を施行し、各内分泌細胞の細胞容積、細胞量、細胞数を求めた。各群での平均値を求めるとともに、アミロイド沈着との関連は、各個体における相関を検討し、送関係数を求めた。細胞容積は、アミロイド沈着 (%) とともに、罹病期間、HbA1c との相関も検討した。

5) 膵島炎症反応の検討。アミロイド沈着と膵島内マクロファージ浸潤の関連を検討する目的から、膵島内浸潤マクロファージを同定し、また 細胞脱落との関連をみた。すなわち、マクロファージのマーカーである CD68 (Panmacrophage marker), iNOS 陽性マクロファージ (活性化マクロファージ)、抗炎症性マクロファージ(CD163, CD204)それぞれの抗体を用いて免疫組織化学法によりマクロファージを同定し、膵島内面積あたりの数量として評価した。マクロファージ浸潤と細胞容積比、アミロイド沈着容積比を算定し、炎症反応との関連をみた。

さらに、膵島内分泌細胞でのアポトーシス

細胞の有無を TUNEL 法により ApopTag により検出を試みた。さらに、細胞の DNA 傷害の検出をみる目的から H2AX 抗体を用いて免疫染色を行った。

4. 研究成果

1) ヒト 2 型糖尿病での膵島アミロイド。アミロイドは Thioflavin に陽性を示し、染者型蛍光顕微鏡で明瞭に区別された。HE 染色で明らかな陽性を示す症例は Thioflavin によるアミロイド容積も多く、アミロイド沈着糖尿病群は全例アミロイド容積 0.05% 以上であり、平均 26% であった。これに比し、アミロイド非沈着群は全例 0.01% 以下であった。非糖尿病健常群でも同様に 0.001% 以下であった。

アミロイド沈着の頻度は日本人 2 型糖尿病では 28% (118 名中 27 名) と欧米人の 90% 以上を考慮すると著しく低く、またその程度も軽かった (膵島内平均占有率 17.5%)。

2) アミロイド構成成分の検討。

免疫組織学的にアミロイドはアミリン蛋白に対し強陽性を示した。また、それとともに、広範に ApoE にも陽性を示した。その範囲は、ほぼ一致していた。一方、AGE は細胞に弱陽性を示したが、アミロイド部分には陰性であった。

3) 臨床病態とアミロイド沈着との関係。

糖尿病患者をアミロイド沈着群とアミロイド非沈着群に分け、その臨床病態を比較した。非糖尿病健常群では男女比 9 : 1 1 であったが、アミロイド沈着群 16 : 4、アミロイド非沈着群 19 : 7 で男性が糖尿病群で多いものの、女性にやや増加傾向を認めた。年齢に差はなかった。また、アミロイド沈着糖尿病群では、非沈着糖尿病群、健常者群に比して、有意に BMI 高値であった。また、ApoE の脂質沈着と合わせて、肥満、インスリン抵抗性がアミロイド沈着と関連する可能性を示した。糖尿病罹病期間は、アミロイド沈着群と非沈着群と差を認めなかった。HbA1c はアミロイド沈着群で $7.46 \pm 0.5\%$ 、非沈着群で $7.00 \pm 0.3\%$ で、沈着群で高い傾向をみたが有意ではなかった。各種糖尿病治療とアミロイド沈着との関連は認められなかった。

4) アミロイド沈着と膵内分泌細胞容積。

形態計測による膵細胞容積の検討では、健常群に比しアミロイド非沈着糖尿病群で細胞容積の軽度 (20%) かつ有意の減少がみられた ($p < 0.05$)。これに対し、アミロイド沈着糖尿病群ではさらに高度の (40%) 細胞容積減少がみられた。アミロイド沈着度と細胞容積は有意な逆相関を示し、アミロイド沈着が多いほどより高度の細胞容積低下を示した。すなわち、アミロイド沈着は細胞脱落に対し促進的に作用していることを示した。

一方、細胞容積は健常群に比し、アミロイド非沈着糖尿病群では軽度の増加を示すものの、アミロイド沈着糖尿病群では健常群に比しむしろ減少を示した。そのほか、細胞容積、PP細胞容積は各群間で差を認めなかった。

5) 膵島炎症反応の検討。

アミロイド沈着膵島では高度の CD68 陽性マクロファージ浸潤を認めた。また、同時にこれらの CD68 陽性細胞は iNOS にも陽性を示し、M1 型の活性型マクロファージであることを示した。これに対し、CD163, CD204 陽性マクロファージは健常群、アミロイド非沈着糖尿病群、アミロイド沈着群いずれもほぼ同等の浸潤度であった。すなわち、アミロイド沈着膵島で特異的に M1 型活性マクロファージ浸潤がみられた。このことから、アミロイド沈着膵島では、M1 マクロファージ浸潤による炎症活性化により細胞に対し傷害性に作動し、細胞脱落に促進的に作用している可能性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. Mizukami H, Takahashi K, Inaba W, Tsuboi K, Osonoi S, Yoshida T, Yagihashi S. Involvement of oxidative stress-induced DNA damage, endoplasmic reticulum stress, and autophagy deficits in the decline of β -cell mass in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2014 Apr 4. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24705612. (査読有)(掲載確定)
2. Mizukami H, Takahashi K, Inaba W, Osonoi S, Kamata K, Tsuboi K, Yagihashi S. Age-associated changes of islet endocrine cells and the effects of body mass index in Japanese. *J Diabetes Invest* 2014; 5:38-47, doi: 10.1111/jdi.12118. (査読有)
3. Nagao M, Asai A, Inaba W, Kawahara M, Shuto Y, Kobayashi S, Sanoyama D, Sugihara H, Yagihashi S, Oikawa S. Characterization of pancreatic islets in two selectively bred mouse lines with different susceptibilities to high-fat diet-induced glucose intolerance. *PLoS One* 2014; 9: e84725, doi: 10.1371/journal.pone.0084725 (査読有)
4. Abe H, Uchida T, Hara A, Mizukami H, Komiyama K, Koike M, Shigihara N, Toyofuku Y, Ogihara T, Uchiyama Y, Yagihashi S, Fujitani Y, Watada H. Exendin-4 improves β -cell function in autophagy-deficient β -cells. *Endocrinology* 2013; 154: 4512-4524, doi: 10.1210/en.2013-1578 (査読有)
5. Mizukami H, Inaba W, Takahashi K, Kamata K, Tsuboi K, Yagihashi S. The effects of dipeptidyl-peptidase-IV inhibitor, vildagliptin, on the exocrine pancreas in spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. *Pancreas* 2013; 42: 786-794, doi: 10.1097/MPA.0b013e318287c9b5.(査読有)

有)

6. Sugimoto K, Baba M, Suzuki S, Yagihashi S. The impact of low-dose insulin on peripheral nerve insulin receptor signaling in streptozotocin-induced diabetic rats. *PLoS One* 2013; 8: e74247, doi: 10.1371/journal.pone.0074247. (査読有)
7. Inaba W, Mizukami H, Kamata K, Takahashi K, Tsuboi K, Yagihashi S. Effects of long-term treatment with the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor vildagliptin on islet endocrine cells in non-obese type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Eur J Pharmacol* 2012; 691:297-306, doi: 10.1016/j.ejphar.2012.07.030. (査読有)
8. Yagihashi S. Clinical staging of type 2 diabetes: The time has come. *J Diabetes Invest* 2012; 3: 1-2, doi: 10.1111/j.2040-1124.2011.00192.x (査読有)
9. Mizukami H, Inaba W, Takahashi K, Inoue K, Sawanobori K, Yagihashi S. Augmented reduction of islet beta-cell mass in Goto-Kakizaki rats fed high fat diet and its suppression by pitavastatin treatment. *J Diabetes Invest* 2012; 3: 235-244, doi: 10.1111/j.2040-1124.2011.00173.x (査読有)
10. Takahashi K, Mizukami H, Kamata K, Inaba W, Kato N, Hibi C, Yagihashi S. Amelioration of acute kidney injury in lipopolysaccharide-induced systemic inflammatory response syndrome by an aldose reductase inhibitor, fidarestat. *PloS One*. 2012; 7: e30134, doi: 10.1371/journal.pone.0030134 (査読有)
- 11: Yagihashi S. Imaging of insulin factory: Is it just imagination or approaching reality? *J Diabetes Invest* 2012; 3: 429-31. doi: 10.1111/j.2040-1124.2012.00236.x. (査読有)

〔学会発表〕(計 12 件)

1. Tsuboi K, Mizukami H, Inaba W, Kamata K, Ogasawara S, Yagihashi S. Amelioration of neuropathic changes with correction of nerve insulin resistance in diabetic Goto-Kakizaki rats treated with DPP-IV inhibitor vildagliptin. 49th Annual meeting of European Association of Study of Diabetes, September 23-27, 2013, Barcelona, Spain
2. Mizukami H, Takahashi K, Inaba W, Kamata K, Uehara O, Tsuboi K, Yagihashi S. Slow and minimal decline of beta cell mass associated with aging in non-diabetic Japanese and lack of compensatory islet hyperplasia in obesity. 49th Annual meeting of European Association of Study of Diabetes, September 23-27, 2013, Barcelona, Spain
3. 吉田太郎、水上浩哉、稲葉渉、鎌田耕輔、坪井堅太郎、八木橋操六. ヒト 2 型糖尿病膵細胞容積減少と酸化ストレス、ER ストレス、オートファジーとの関連について. 第 102 回日本病理学会総会、平成 25 年 6 月 6 日-8 日、

札幌

4. 水上 浩哉、坪井堅太郎、三五一憲、鎌田耕輔、稲葉渉、八木橋操六. 網羅的メタボローム解析による新規糖尿病性神経障害発症機序の探索. 第 102 回日本病理学会総会. 平成 25 年 6 月 6 日-8 日、札幌

5. 八木橋操六. 糖尿病病理学の進歩、第 102 回日本病理学会総会. 平成 25 年 6 月 6 日-8 日、札幌

6. Iwashita M, Mizukami H, naba W, Osonoi S, Kamata K, Tsuboi K, Yagihashi S. Involvement of DNA damage, ER-stress and autophagy deficits in the β cell loss in Japanese type 2 diabetic patients. 56th Annual Meeting of Japan Diabetes Society, May 16-18, Kumamoto, 2013

7. Mizukami H, Yagihashi S. Progress and perspective of diabetic neuropathy care. New approach to the pathogenesis of diabetic polyneuropathy. 56th Annual Meeting of Japan Diabetes Society, May 16-18, 2013, Kumamoto

7. Osonoi S, Mizukami H, Inaba W, Kamata K, Tsuboi K, Yagihashi S. Involvement of DNA damage, ER-stress and autophagy deficits in the β cell loss in Japanese type 2 diabetic patients. 73rd Annual Meeting of American Diabetes Association, June 21-25, 2013, Chicago, USA

8. Mizukami H, Tsuboi K, Sango K, Chung SK, Yagihashi S. Metabolomic analysis of glycolytic pathway responsible for diabetic neuropathy beyond polyol pathway hyperactivity. 73rd Annual Meeting of American Diabetes Association, June 21-25, 2013, Chicago, USA

9. 水上 浩哉、坪井堅太郎、三五一憲、鎌田耕輔、稲葉渉、八木橋操六. 網羅的メタボローム解析による糖尿病性神経障害の新しい発症機序の探索. 第 56 回日本糖尿病学会年次集会, 平成 24 年 5 月 16 日-18 日、熊本

10. 水上浩哉、高橋一徳、稲葉渉、鎌田耕輔、小笠原早織、八木橋操六. 加齢、肥満によるヒト膵島容量変化の検討. 第 101 回日本病理学会総会. 平成 24 年 4 月 26-28 日、於京王プラザホテル

11. Mizukami H, Takahashi K, Inaba W, Kamata K, Tsuboi K, Yagihashi S. Slow and progressive age-related decline of beta cell mass and proliferation activity of beta cells in non-diabetic Japanese subjects. 72nd Scientific Meeting of American Diabetes Association, June 8-12, 2012, Philadelphia, USA

12. Tsuboi K, Mizukami H, Inaba W, Kamata K, Ogasawara S, Yagihashi S. Amelioration of neuropathic changes with correction of nerve insulin resistance in diabetic Goto-Kakizaki rats treated with DPP-IV inhibitor, vildagliptin. 28th Annual Meeting of Neurodiab study group, September 17-20, 2012, Dresden, Germany

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○ 出願状況(計 0 件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木橋 操六

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：40111231