

平成 30 年 9 月 10 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09374

研究課題名(和文)2型糖尿病膵島アミロイド沈着に対するエピジェネシス制御による新規治療法の確立

研究課題名(英文) Exploration of new therapy for type 2 diabetes regulating epigenetic state evoked by islet amyloid deposition

研究代表者

水上 浩哉 (Mizukami, Hiroki)

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：00374819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究により、大血管障害を有する2型糖尿病(vT2DM)と老年(75歳以上)でT2DMを発症した症例で膵島のアミロイドの沈着が著明に亢進することが解明された。これらアミロイド沈着はBMIと相関しておらず、肥満によるアミロイド沈着とは別の機序である可能性がある。また、vT2DM症例では膵島の血管構築の変化(膵島内血管の適応不全、膵島周囲の血管の増生、血管壁の肥厚)がみられ、これらのことが膵島アミロイド沈着を促進している可能性がある。また、老年発症T2DM症例では、膵管内腫瘍を高率に伴っており、膵島アミロイド沈着とあいまって、膵臓の広範な萎縮を来たす可能性が解明された。

研究成果の概要(英文)：Our results disclosed that amyloid deposition in islets were markedly accelerated in the subjects of type 2 diabetic subjects complicated with macrovascular disease (vT2DM) and elderly onset T2DM. Since these amyloid depositions did not correlate with BMI, the mechanism assumed to be different from that in BMI. In vT2DM, the alterations of vascular architecture in the islets (reduction of intra-islet vascular area, increase in vascular density of surrounding islets and thickness of vascular wall in the islets) were observed, suggesting the possible promotion of amyloid deposition in the islets. Intraductal epithelial neoplasm was frequently observed in elderly onset T2DM. This and islet amyloid deposition may synergistically accelerate the atrophy of pancreas in elderly onset T2DM.

研究分野：2型糖尿病膵島病理学的研究

キーワード：2型糖尿病 細胞容積 膵島アミロイド沈着 大血管障害 老年発症糖尿病 細胞減少

### 1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病 (T2DM) は世界的に爆発的に増加している。その病態は大きく分けて 2 つに分けることにできる。一つは末梢のインスリン抵抗性、あと一つは膵島の機能不全である。膵島の機能不全のなかで、さらに細胞容積の減少がある。この病変の成立過程にアミロイド沈着の関与が考えられている。申請者はアミロイド沈着の原因に T2DM におけるインスリン抵抗性 (大血管障害) 虚血、加齢からの細胞のエピジェネティック (EG) な変化があり、その結果、細胞容積、機能の低下、2 型糖尿病の進行がおこると推測している。

### 2. 研究の目的

今回の検討ではその実証のため、ヒト剖検組織で T2DM における大血管障害 (急性心筋梗塞) とアミロイドの沈着の相関、細胞容積の変化、臨床データとの相関を検討、大血管障害以外のアミロイド沈着因子である加齢に着目し、老人 T2DM 症例において、と同様な評価を行う。EG 変化の引き金の一つである炎症反応能について免疫組織化学的検討、マイクロダイゼクションによる膵島単離、DNA 抽出によるメチル化などの EG の検討、EG 制御による新規糖尿病治療法の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

#### ヒト膵組織の準備

死後 4 時間以内の剖検症例の膵体部、尾部組織を用いる。大血管障害例として急性心筋梗塞症例 (AMI) とその他に分け、40-70 代までの男女別に非糖尿病 16 症例、非糖尿病+AMI 13 症例、糖尿病 (DM) 13 症例、DM+AMI 13 症例 (このうちアミロイド陰性 16 症例、陽性 17 症例)、計 75 症例を検索した。(膵臓に原発腫瘍、転移、慢性膵炎を有する検体は除く)。また、30 症例の老人症例 (85 歳以上) 糖尿病を 75 歳以上で発症した老人糖尿病症例 15 症例を検討した。

#### 膵島容積、細胞構成、アミロイドの沈着、膵島毛細血管密度の検討

申請者の教室で確立した抗インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、PP 抗体を用いた免疫 4 重免疫染色を施行し、Image J (フリーソフト) を用いて形態計測を行った。形態計測により膵島容積、膵島構成細胞割合を計算した。3 個以内の内分泌細胞からなる小集塊を新生膵島と定義し、数、膵島全体における割合を計算した。さらに膵島におけるアミロイドの沈着を蛍光色素であるチオフラビン T 及び抗クロモグラニン A 抗体を用いた 2 重蛍光染色により計測する。大血管障害、虚血の影響をみるため CD31 とインスリンに対する 2 重染色切片で膵島内血管密度を評価した。

マイクロダイゼクションによる膵島の

抽出

非接触型のマイクロダイゼクション装置 (PALM マイクロビーム、Carl Zeiss) を用いてパラフィン切片より膵島のみを in situ で単離する。単離された膵島組織を Qiagen 社の EpiTect Plus FFPE Bisulfite Kit を用いて DNA の抽出、Bisulfite 処理を行った。その後、E-cadherin に対するメチレーション特異的 PCR を行い、プロモーターメチル化の状態を検討した。

### 4. 研究成果

#### 大血管障害を有する糖尿病症例の膵島病理学的探索

#### 臨床的パラメーター

平均年齢、BMI、膵重量に各群で明らかな有意差は見られなかった。それに対して心臓重量はコントロール  $345.1 \pm 10.1g$  に対し、AMI では  $429.3 \pm 34.0g$  で有意に高かった ( $p < 0.01$ )。DM は  $121.3 \pm 6.1g$  で、DM+AMI では  $423.4 \pm 30.6g$  と有意に増加していた ( $p < 0.01$ )。特に DM+AMI のうち膵島アミロイド沈着を示す症例は  $588.0 \pm 25.0g$  とアミロイド沈着を示さない症例に比し有意に心臓重量が増加していた ( $p < 0.05$ )。また、HbA1c は DM で  $6.6 \pm 0.3\%$ 、アミロイドがない DM+AMI で  $6.3 \pm 0.3\%$  であるのに対し、アミロイド陽性 DM+AMI は  $8.4 \pm 0.7\%$  と有意に高かった ( $p < 0.01$ )。糖尿病罹病期間は DM で  $12.4 \pm 4.0$  年、アミロイド陽性 DM+AMI で  $11.9 \pm 2.4$  年であったのに対し、アミロイド陰性 DM+AMI で  $4.7 \pm 1.6$  年と有意に減少していた ( $p < 0.05$ )。また、血圧、TG、喫煙率には明らかな違いは各群で見られなかったものの、総コレステロール値は DM+AMI で有意に AMI と比較して高かった ( $p < 0.05$ )。

#### 膵島の形態計測

膵島アミロイド容積をチオフラビン T 染色を用いた切片で評価した。コントロール、AMI では膵島アミロイド沈着は認められなかった。それに対し DM では  $0.02 \pm 0.01\%$  認められた。DM+AMI でアミロイド陰性症例ではアミロイド沈着は認められなかったが、アミロイド陽性症例では  $0.28 \pm 0.10\%$  と DM と比較して有意なアミロイド容積の増加が認められた ( $p < 0.05$ )。

抗クロモグラニン A 抗体を用いた免疫染色切片で膵島容積を検討した。コントロールは  $2.18 \pm 0.11\%$ 、AMI は  $2.23 \pm 0.11\%$ 、DM は  $2.14 \pm 0.16\%$ 、DM+AMI でアミロイド陰性群では  $1.98 \pm 0.17\%$  と有意な差は見られなかった。しかしながら、アミロイド陽性 DM+AMI 群では  $1.56 \pm 0.15\%$  と AMI、DM、アミロイド陰性 DM+AMI 群に比し有意な低下が認められた ( $p < 0.05$ )。細胞容積はコントロール、AMI に比し、DM、アミロイド陰性 DM+AMI で有意な増加が認められた ( $p < 0.05$ )。それに対し、アミロイド陽性 DM+AMI では有意な増加は見られなかった。細胞容積は糖尿病群で低下

が認められ ( $1.40 \pm 0.07\%$  vs  $1.13 \pm 0.09\%$ ,  $p < 0.05$ )。特にアミロイド容積 DM+AMI で最も低下が大きかった ( $0.75 \pm 0.10\%$ )。細胞容積、PP細胞容積については各群で明らかな差は認められなかった。

### 膵島内血管構築の変化

膵島内の血管構築の変化を CD31(血管内皮細胞)に対する抗体と、クロモグラニン A(内分泌細胞)に対する抗体を用いた 2重免疫染色で評価した。形態計測を行ったところ、血管容積は膵島内部ではコントロールの  $0.47 \pm 0.06\%$  に対し、AMI で  $0.74 \pm 0.05\%$  と有意に増加していた ( $p < 0.05$ )。アミロイド陰性 DM+AMI は  $0.71 \pm 0.07\%$  と DM ( $0.56 \pm 0.09\%$ ) に比し有意に増加していた ( $p < 0.05$ )。しかしながら、アミロイド陽性 DM+AMI では明らかな血管容積の増加は見られなかった。膵島辺縁ではアミロイド陽性 DM+AMI は  $4.67 \pm 0.58\%$  と他の群に比し有意に血管容積が増加していた ( $p < 0.01$ )。単位面積当たりの血管本数は、膵島内では各群に明らかな違いは認められなかった。それに対し、膵島辺縁ではアミロイド陽性 DM+AMI で  $9.43 \pm 1.04$  (本  $\times 10^5 / \mu\text{m}^2$ ) であったのに対し、他の群では 4-5 本程度であり、有意に増加していた ( $p < 0.01$ )。血管一本当たりの面積は、膵島内ではコントロールが  $22.41 \pm 1.55 \mu\text{m}^2$  であり、それに対し AMI で  $33.39 \pm 31.55 \mu\text{m}^2$  と有意に増加していた ( $p < 0.05$ )。それに対し、膵島周囲では各群で明らかな違いが認められなかった。このことから、AMI の存在により、膵島内の血管容積が増加するが、それは器質的変化ではなく、機能的変化であること、アミロイド沈着により、膵島内の血管の拡張は抑制されたが、膵島周囲の血管が器質的に変化し、増加していることが解明された。

### 膵島内血管壁の肥厚について

PAM 染色切片を用いた。膵島内の血管壁の厚さを定法によって計測した。AMI が合併している症例がしていない症例に比し、有意に血管壁が肥厚していた。また、抗ラミニン抗体を用いた免疫蛍光染色を用いて、血管の基底膜の染色を行った。基底膜の厚さは、群間による明らかな違いは認められなかった。

### マイクロサイゼクションによる膵島単離およびプロモーターメチル化解析

マイクロダイゼクションにより一部の症例については E-cadherin のプロモーターメチル化解析を行った。各群、5 症例ずつマイクロダイゼクションを行い、DNA を抽出後、Bisulfite 処理を行った。E-cadherin に対するプロモーターメチル化をメチレーション特異的 PCR にて検討を加えた。その結果、各群で E-cadherin のメチル化に対する明らかな違いは認められなかった。しかしながら、症例数が少ないため、さらに症例数を増やす必要があり、今後の検討課題となった。

### ：老人糖尿病症例の検討について

#### 臨床的パラメーター

平均年齢はコントロール  $61.3 \pm 1.4$  歳、中年糖尿病  $63.2 \pm 2.3$  歳、老人  $89.5 \pm 0.7$  歳、老人糖尿病  $88.0 \pm 0.6$  歳で、老人群は中年に比し有意に年齢が高かった ( $p < 0.01$ )。BMI に差は見られなかった。糖尿病の発症年齢は、中年糖尿病で  $48.3 \pm 2.4$  歳、老人糖尿病で  $80.8 \pm 1.4$  歳と老人糖尿病で有意に高かった ( $p < 0.01$ )。それに対し糖尿病罹病期間は糖尿病で  $16.4 \pm 2.9$  年、老人糖尿病で  $7.3 \pm 0.3$  年と有意に老人糖尿病で短縮していた ( $p < 0.01$ )。また、血清アミラーゼ値は老人糖尿病が  $152.1 \pm 49.0$  IU/L と他の群に比し 1.5 - 2 倍有意に増加していた。注目すべき所見として、膵重量がある。コントロールが  $127.0 \pm 8.3\text{g}$ 、糖尿病は  $127.0 \pm 7.0\text{g}$ 、老人が  $122.4 \pm 7.6\text{g}$  であるのに対し、老人糖尿病で  $70.4 \pm 4.3\text{g}$  と著明な減少を示していた ( $p < 0.01$ )。

#### 膵島の形態計測

大血管障害症例と同様に膵島アミロイド容積をチオフラビン T 染色を用いた切片で評価した。コントロール、老人群では膵島アミロイド沈着は認められなかった。それに対し中年糖尿病では  $0.1 \pm 0.01\%$  認められた。老人糖尿病では  $0.22 \pm 0.20\%$  と DM と比較して有意なアミロイド容積の増加が認められた ( $p < 0.05$ )。

抗クロモグラニン A 抗体を用いた免疫染色切片で膵島容積を検討した。全ての群で有意な差は見られなかった。しかしながら、膵島マスに限ってみると(膵島容積と膵重量の積算)、老人糖尿病で有意な膵島マスの低下が認められた ( $p < 0.01$ )。細胞、細胞マスも同様で、老人糖尿病で中年糖尿病に比し、有意な低下が認められた ( $p < 0.01$ )。細胞マスについても老人糖尿病で中年糖尿病に比し有意な低下が認められたが、PP細胞においては明らかな違いが認められなかった。以上から、老人糖尿病では膵島内分泌細胞マスが著しく低下しており、それは膵重量の低下とアミロイド沈着が関与していると考えられた。

#### 膵臓外分泌組織の形態変化について

老人糖尿病では膵重量が著しく低下している。その原因を探るため、膵外分泌の形態変化を検討した。その結果、老人糖尿病では中年糖尿病、老人に比し著明な膵外分泌の線維化、軽度の炎症性細胞浸潤、脂肪浸潤が認められた。特に膵導管に注目してみると、導管上皮細胞の腫瘍性増生が著明に認められた。これはいわゆる pancreatic intraepithelial lesion であり、大部分が low grade であるものの、high grade の病変も認められた。このような腫瘍性病変が発生しているため、導管内腔の狭窄、閉塞が発生し、周囲外分泌に慢性膵炎を発症したため、

膵臓の線維化、萎縮をきたしたと想像された。

#### マイクロサイゼクションによる膵島単離およびプロモーターメチル化解析

老人糖尿病症例についてはマイクロサイゼクションによる E-cadherin のプロモーターメチル化解析は行っていない。今後の検討課題と思われる。

#### ：アミロイドの沈着と各種パラメーターとの関連について

我々の以前の報告では T2DM のアミロイド容積の程度は BMI と正の相関を示している (Kamata K, amyloid, 2014)。そこで、BMI との相関を見てみると、老人糖尿病では明らかな相関が認められなかった。これは、DM+AMI でも同様であり、アミロイドの沈着は単純に抹消のインスリン抵抗性亢進によるインスリン過分泌というわけではなく、いくつかの異なる機序が介在している可能性が考えられた。また、アミロイド容積と細胞容積の相関を見ると、老人糖尿病、DM+AMI で同様に逆相関を示していた。アミロイド自体は細胞に toxic に働くことは共通の事実であることが示された。

#### 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. Xin A, Mizukami H, Inaba W, Yoshida T, Takeuchi YK, Yagihashi S. Pancreas Atrophy and Islet Amyloid Deposition in Patients with Elderly-Onset Type 2 Diabetes. J Clin Endocrinol Metab. 2017 102:3162-3171(査読あり).

[学会発表](計 9 件)

1. 2 型糖尿病における膵島アミロイド沈着と急性心筋梗塞の関連について 水上浩哉、稲葉渉、高橋和久、阿部信、八木橋操六 第 106 回日本病理学会総会 2017 年 4 月 27~29 日、東京/新宿、京王プラザホテル
2. 急性心筋梗塞と 2 型糖尿病膵島病理学的変化について 水上浩哉、稲葉渉、高橋和久、阿部信、八木橋操六 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会、2017 年 5 月 18~20 日、名古屋市、名古屋国際会議場

3. Severe cardiac pathology correlates with marked islet amyloid deposition in patients with acute myocardial infarction and type 2 diabetes. Kazuhisa Takahashi, Hiroki Mizukami, Tetsuyuki Tateda, Wataru Inaba, Soroku Yagihashi 77th American Diabetes Association Scientific Sessions June 9th~13th, 2017 San Diego convention center, California, USA
4. 大血管障害を有する 2 型糖尿病膵島の病理学的検討 水上浩哉、稲葉渉、高橋和久、阿部信、八木橋操六 第 105 回日本病理学会 2016 年 5 月 14 日於仙台国際センター
5. 糖尿病膵島の病理 ~ DPP-4 阻害薬による新しい 細胞保護機構の探求 ~ 水上浩哉 第 105 回日本病理学会 ランチョンセミナー 2016 年 5 月 14 日、於仙台国際センター(展示棟)1 階 会議室 1
6. Symposium 9 Molecular mechanisms of pancreatic b cell failure Mechanism of b cell reduction in type 2 diabetes - from pathological investigation of human pancreas - Hiroki Mizukami 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会 2016 年 5 月 5 月 19~21 日、於京都
7. Augmented b-Cell Loss in Japanese Patients with Type 2 Diabetes Complicated with Acute Myocardial Infarction Kazuhisa Takahashi, Hiroki Mizukami, Tetsuyuki Tateda, Wataru Inaba, Soroku Yagihashi American Diabetes Association, 76th Scientific Sessions. June 10 - 14, 2016, New Orleans, Louisiana
8. 2 型糖尿病の病態の解明をめざして ~ 膵島病理学的解析を中心に ~ 水上浩哉 第 83 回日本病理学会 東北支部学術集会 2016 年 7 月 17 日、於コラッセ福島

9. 舘田哲幸、稲葉涉、安欣、八木橋操六、  
水上浩哉 大血管障害を有する2型糖尿病  
症例における膵島変化の検討 第104  
回 日本病理学会総会 2015年4月30  
日 - 5月2日, 於名古屋

〔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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

水上 浩哉 (Mizukami, Hiroki)・  
弘前大学大学院医学研究科・教授・  
研究者番号：00374819.

##### (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

( )