

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 元 年 6 月 23 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16138

研究課題名（和文）2型糖尿病における膵島インスリン - ソマトスタチン二重陽性細胞の意義の検討

研究課題名（英文）Study for significance of islet insulin-Somatostatin double positive cell in type 2 diabetes

研究代表者

稲葉 渉（Inaba, Wataru）

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：00771578

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：2型糖尿病の病因の一つに膵 細胞の減少が知られているが、病期が進行しても膵細胞は完全に消失しない。その背景には、新たに膵 細胞を供給あるいは、維持する機構（自己複製、非 細胞からの分化転換や膵島新生）などが想定されている。しかしながら、その実態は未だ不明である。申請者は自然発症非肥満型2糖尿病モデルGoto-Kakizakiラット（以下GKラット）の膵臓を病理組織学的に検討した。その結果、長期間に渡り高血糖状態にあった高齢のGKラット膵組織中に複数種類の膵内分泌ホルモンを同時に持つ膵内分泌細胞を見出した。これらの細胞が、2型糖尿病状態の膵 細胞の維持機構の一つの可能性であることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複数の膵島ホルモンを持つ膵内分泌細胞の存在は、培養 細胞株の検討などにおいて報告されているが、今検討により、糖尿病モデル動物の生体内においても膵内分泌細胞の一部にインスリンとソマトスタチンといった複数のホルモンを持つ細胞の存在が示唆された。複数の膵島ホルモンを持つ膵内分泌細胞の存在が、糖尿病状態の結果を反映しているのか、あるいは糖尿病状態に抗う生理的反応なのか、そしてヒトの生体内におけるこれらの細胞の存在の有無について今後の更なる検討が必要であると考えられた。今回の検討の結果が、新たな2型糖尿病の病態研究や糖尿病の治療法開発の糸口の一つとなる可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：The decrease in pancreas cell is known to one of the etiologies of type 2 diabetes, but the pancreas cell does not completely disappear even if a stage of a disease progresses. In the scene, supply or mechanism (self-reproduction, trans-differentiation and pancreatic islet new life from a non- cell) to maintain is assumed with a pancreas cell newly. However, the actual situation is still unidentified. It was pathologically, and the applicant examined the pancreas of spontaneous non-obesity type 2 diabetes model Goto-Kakizaki rats (following GK rat). As a result, I found the pancreas endocrine cells which had several kinds of pancreas endocrine hormones in the elderly GK rat pancreas tissue which was in hyperglycemia state for a long term at the same time. These cells suggested that it was one possibility of the maintenance mechanism of the pancreas cell of the type 2 diabetes state.

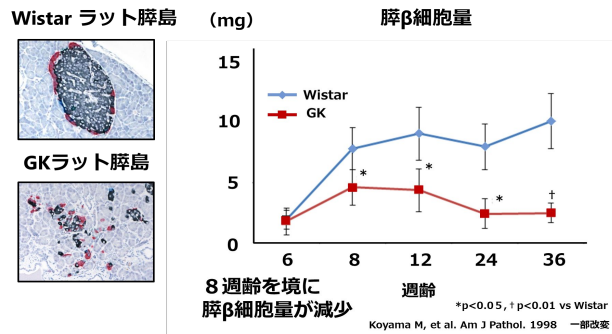
研究分野：2型糖尿病膵内分泌細胞

キーワード：2型糖尿病モデルラット 分化転換

1. 研究開始当初の背景

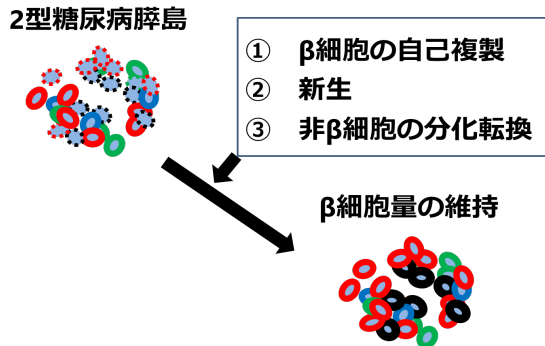
2 型糖尿病 (T2DM) の病因は主に **2** つあり、**1** つはインスリン抵抗性、もう一つはインスリン分泌不全が知られている。後者に関しては、さらに機能的因子 (インスリン分泌機構の異常) と器質的因子 (膵 β 細胞の減少) に分けることができる。特に日本人においてはインスリン抵抗性よりも膵 β 細胞のインスリン分泌不全がその発症に重要であることが指摘されている。その機序に高血糖により誘発される酸化ストレスや **ER** ストレス、オートファジー不全などの細胞傷害因子が想定されている (**Mizukami H, Inaba W. Diabetes Care. 2014**)。膵 β 細胞の減少は、ヒト以外にも糖尿病モデル動物にも認められる。日本人に多い非肥満型 **T2DM** に類似した自然発症モデル動物である **Goto-Kakizaki** ラット (**GK**) では、対照の **Wistar** ラット (**W**) にはない膵島線維化および膵 β 細胞の脱落が見られ、**8** 週齢を境に膵 β 細胞量が進行性に減少する。しかしながら、高齢期 (生後 1 年以上) の **GK** でも膵 β 細胞は一定量保たれたままである (図 1)。これはヒトにおいても同様である。なぜ長期間高血糖に曝されている膵 β 細胞が完全に消失しないのか? その機序の 1 つに、膵 β 細胞の減少に対する代償機構や最近明らかとなってきた膵 β 細胞集団の不均一性 (未成熟な細胞や外部刺激への反応に乏しい細胞の混成) があると想定されている。

図 1 GK ラットの膵 β 細胞量の経時的变化



これまでのヒトや齧歯類の検討から、膵 β 細胞を供給する機序として、膵島内での膵 β 細胞の自己複製、新生、非 β 細胞から分化転換 (例えば α 細胞から β 細胞) が想定されている (図 2)。に関しては、ヒトや齧歯類 (成獣) の膵 β 細胞の増殖率は $\sim 0.1\%$ 前後と非常に低い。よって細胞増殖のみで膵 β 細胞の減少を代償することは生理的な条件下では難しいと考えられる。は膵導管上皮などにある膵内分泌前駆細胞の分化が想定されているが、実際に前駆細胞の存在は確かめられていない。そしてこの機序は、ストレプトゾトシン (**STZ**) 投与や **90%** 膵切除モデルにリニエージトレーシングを用いた研究により膵 β 細胞の分化に必須の転写因子の調節機構が解明されてきている。しかし、自然発症の糖尿病モデルにおいてその過程は十分に説明されていない。これら機序が解明されると **T2DM** での膵 β 細胞減少を改善する治療につながると考えられる。

図 2 想定される β 細胞の供給の機序



β 細胞の分化転換の一つの例として、遺伝子改変 β 細胞欠失モデルマウスで前駆細胞を介して δ 細胞から β 細胞への分化転換が起こることが報告されている。つまり一度脱分化を起こしてから分化転換が生じることになる (**Chera S, et al. Nature. 2014**)。それに対し今回我々が見出した **ISD** 細胞はインスリンとソマトスタチンを同時に発現している。このことは、今までの報告例と異なって独特であり、前駆細胞を経ないで成熟内分泌細胞が直接分化転換するという新しい現象を観察している可能性がある。また、高齢の **GK** を観察することによって初めて **ISD** 細胞の顕著な増加が観察された。ヒトにおける **T2DM** は一般的に中年から老年発症である。今まで報告されてきたモデルでは若齢マウスを用いて研究しているため、ヒト **2 型糖尿病** の病態を正しく反映していない可能性がある。よって我々のモデルはヒト **T2DM** により近いモデルであり、**ISD** 細胞はヒトにおいても見られる β 細胞の新たな供給源の一つの可能性がある。一般的に、細胞の分化転換には転写因子の発現変化、**DNA** のメチル化などエピジェネティック変化などが関係しているとされている。**ISD** 細胞の出現にはこれら機序が関与していることが予想されるが、どのような調節を受けているのかは未だ解明されていない。

2. 研究の目的

2 型糖尿病 の病因の一つに膵 β 細胞の減少が知られているが、病期が進行しても膵 β 細胞は完全に消失しない。その背景には、新たに膵 β 細胞を供給・維持する機構 (自己複製、非 β 細胞からの分化転換や膵島新生) などが想定されているが、その実態は未だ不明である。

申請者は自然発症非肥満型 **2 型糖尿病** モデル **Goto-Kakizaki** ラット (以下 **GK**) の膵臓を病

理学的に検討してきた。その結果、高齢 **GK** で膵 α 、 β 、**PP** 細胞の減少に対し δ 細胞の増加、そしてインスリンとソマトスタチンを同時に持つ膵内分泌細胞 (**ISD**) 細胞を見出した。本研究では、**GK** およびヒトにおける **ISD** 細胞の出現を確認し、出現の意義や発生とその機序を検討することである。

3. 研究の方法

40 週齢の雄性 **GK** ラット(**GK**)と対照の **Wistar** ラット(**W**)を用いた。インクレチン関連薬投与群には **DPP-4** 阻害薬(+ **DI**)を投与した。実験期間中血糖を測定し、18 週間後に摘出した膵臓のパラフィン包埋切片を用いて、膵島ホルモン (インスリン(**In**)、グルカゴン、ソマトスタチン(**So**)、**Pancreatic Polypeptide(PP)**)と **Ki-67** の 5 重免疫染色および、インスリンとソマトスタチンの蛍光 2 重免疫染色を行い検討した。

4. 研究成果

随時と空腹時血糖は **GK** に比し **GK + DI** で有意に改善した($p<0.05$)。 **GK** の膵 β 細胞量は **W** の約 50%であったが、**GK+DI** では **GK** に比し約 140%高値を示した ($p<0.05$)。 **DI** による膵内分泌細胞の増殖率は、0.1~0.2%と非常に低い値を示した。

膵島ホルモンに対する 5 重免疫染色標本を用いて膵島の形態を検討したところ、**GK** の膵内分泌細胞の構成は、**W** に比べて膵 α 、 β 、**PP** 細胞が減少していた。それに対して δ 細胞が軽度増加していた (図 3)。さらにこれらは、糖尿病治療薬 **DPP-4** 阻害薬 (**DI**) の投与により、**PP** を除いて全ての膵島細胞量が増加した (図 3)。膵 β 細胞の供給機構として前述の ~ が想定されているが、前述の理由から、膵島内の非 β 細胞から β 細胞への分化転換に着目し、インスリンとグルカゴン、インスリンとソマトスタチン、インスリンと **PP** を蛍光免疫染色で同時局在性を検討した。その結果、注目すべき所見として、高齢 (54 週齢) の **GK** ラットの膵島に 5~10%程度にインスリン-ソマトスタチン二重陽性細胞 (**ISD** 細胞) を見出した (図 4)。これらは **DPP-4** 阻害薬投与 (**DI**) により増加していた (図 5)。それに対しインスリン-グルカゴン二重陽性細胞は極少数存在し、インスリン - **PP** 二重陽性細胞は確認できなかった。特に **GK** には **In** と **So** の両陽性細胞が **In** 陽性細胞の 約 5%、**So** 陽性細胞の約 26%に見られ、**GK+DI** ではその頻度が約 1.5 倍高値を示した ($p<0.05$)。 **DPP-4i** により中高齢期 **GK** ラットにおいても β 細胞量の改善が見られ、その機序に、**In/So** 両陽性細胞を増加させている可能性が考えられた。

図 3 **GK** ラット膵内分泌細胞量の変化

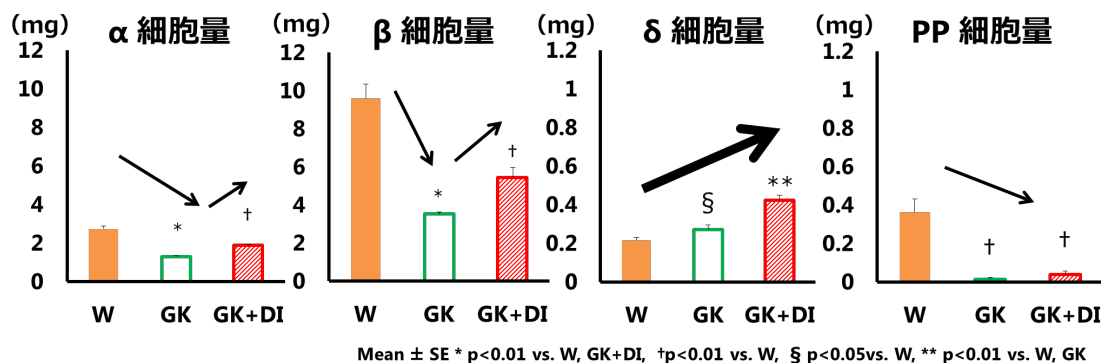
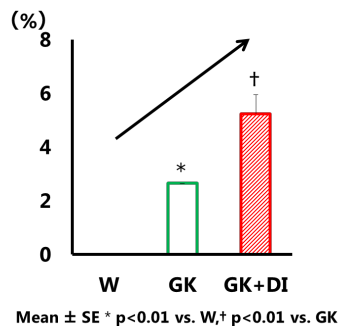


図 4 蛍光免疫染色による **GK** ラット **ISD** 陽性細胞



図 5 ISD 陽性細胞



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

(1) 稲葉 渉、水上 浩哉、安 欣、八木橋 操六、中高年齢期の自然発症 2 型糖尿病モデル GK ラットに対する DPP-4 阻害薬の影響、第 60 回 日本糖尿病学会年次学術集会、2017

〔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：

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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名：高橋 和久

ローマ字氏名：Takahashi Kazuhisa

研究協力者氏名：八木橋 操六

ローマ字氏名：Yagihashi Soroku

研究協力者氏名：水上 浩哉

ローマ字氏名：Mizukami Hiroki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。