

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：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591292

研究課題名(和文) ヒト2型糖尿病膵島細胞におけるプロゲステロン受容体の役割についての検討

研究課題名(英文) Exploration into the role of progesteron reseptor in islet beta cells of Japanese ty pe 2 diabetic subjects

研究代表者

水上 浩哉 (Mizukami, Hiroki)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00374819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：非糖尿病患者115症例における、加齢、肥満などの体格変化における細胞容積について検討した。細胞容積は加齢による変化は認められなかった。さらに、肥満症例でも膵島の過形成は目立たず、日本人では細胞の適応能力は低いことが見出された。加齢、2型糖尿病によるDNAのメチル化亢進の有無を検討した。プロゲステロン受容体、P16のDNAのメチル化亢進について検討したところ、加齢、2型糖尿病において明らかなメチル化の亢進は認められなかった。しかしながら、少数ながらP16のDNAメチル化の亢進が認められ、そのような症例は細胞増殖能が高く、細胞増殖にDNAのメチル化が関与していることが解明された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the kinetics of volume density of beta cells by aging and physical status (i.e. obesity) in 115 non-diabetic Japanese subjects. Significant decline of beta cell volume after twenties was identified by neither aging nor physical status. This result indicated that Japanese beta cell had less ability to adapt to various situation than that of western subjects. Furthermore, evaluation of DNA hypermethylation of P16 and progesteron reseptor genes in beta cells induced by either aging or type 2 diabetes revealed no hypermethylation. However, small part of the examined subjects exhibited DNA hypermethylation in P16 gene independent of aging or type 2 diabetes. Those subjects also exhibited high proliferation rates of beta cells (>2%). Taken together, aging and physical status do not affect beta cell volume in the case of Japanese subjects. DNA hypermethylation of P16 gene is possibly associated with cell proliferation of beta cells irrespective of diabetic state or aging.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：細胞 2型糖尿病 細胞容積 加齢 DNAメチル化亢進

1. 研究開始当初の背景

本邦において2型糖尿病は爆発的に増加しており、社会的に大きな問題となっている。2型糖尿病の原因として従来 細胞におけるインスリン分泌不全、脂肪組織などにおける末梢のインスリン抵抗性が知られていた。特に日本人糖尿病においては膵 細胞のインスリン分泌不全が病態に大きく寄与していると考えられてきた。その一因として、膵 細胞の進行性脱落がある。新規2型糖尿病治療薬である DPP-4 阻害剤の例からも、現在では糖尿病を根治させるためには膵 細胞数、容積の増加が不可欠と考えられている。しかしながら、2型糖尿病による 細胞容積変化を知るためには、日本人における加齢、体格変化などによる 細胞容積の変化を知る必要がある。しかしながら、そのような基礎データは研究開始時にはほとんど知られていなかった。また、様々な細胞で、細胞増殖、機能の変化に後天的遺伝子修飾(エピジェネシス)が関与していることが知られている。エピジェネシスは腫瘍だけでなく、加齢、慢性疾患でもそれら細胞変化に関与していることが知られている。しかしながら、細胞増殖能、機能におけるエピジェネシスの変化は、研究開始時にはほとんどわかっていなかった。

2. 研究の目的

糖尿病の発症には男女差が知られており、性ホルモンが関与している可能性がある。過去の報告からエストロゲン受容体(ER)、プロゲステロン受容体(PgR)がげっ歯類の膵島に発現していることが知られている。エストロゲンアナログをマウスに投与すると、細胞の増殖、再生がもたらされることより、ERは細胞の増殖、再生を促進すると考えられている。一方、PgRのノックアウトマウスでは細胞容積が増大しており、PgRは細胞容積には抑制的に働いていると考えられている。我々の予備実験でヒト 細胞核にプロゲステロン受容体(PgR)のみの発現を見出し、PgRが細胞における性ホルモンの作用の中心をなしている可能性が考えられた。乳癌ではPgRを通じた作用機序の一つにエピジェネシスの一つであるDNAのメチル化の亢進の関与が知られている。また、プロゲステロン受容体だけでなく、細胞増殖に関与する多数の分子がDNAのメチル化の影響を受けることが知られている。よって2型糖尿病膵島脱落においても膵 細胞におけるメチル化亢進の可能性がある。今回の研究ではPgRシグナル、メチル化亢進制御による新たな膵島を標的とした治療の確率を目指す。

3. 研究の方法

膵島組織的検討

ヒト膵組織の準備

分子病態病理学講座、病理部及び関連病院より提供された剖検症例の膵臓組織を用いる。検体は死後4時間以内のものだけを選別し、10%中性緩衝ホルマリンで固定する。頭部にはPP細胞が豊富な部分があるので膵体部、尾部を用いる。死因は問わず、0-70代までの男女別、各年代ごとに計115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)。2型糖尿病症例は40-70代、30例準備した。

膵島容積、細胞構成、増殖能、アポトーシスの検討

H&E染色でスクリーニングし、間質の線維化、自己融解が強いものは除外する。抗クロモグラニンA抗体で切片を免疫染色した後、膵島容積をImage J(フリーソフト)で形態計測した。抗インスリン+抗グルカゴン、ソマトスタチン、PPのカクテル抗体を用いた2重免疫染色を施行した。2重染色切片をバーチャルスライド(オリンパス、VS110)に取り込んだ後、Image Jを用いて形態計測を行なった。膵島容積に膵島構成細胞割合を積分して、各内分泌容積を算出した。さらに、膵臓重量を内分泌細胞容積との積をもとめ、内分泌細胞容量を算出した。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抗PgR抗体、抗インスリン抗体を用いた2重染色により細胞および膵島非細胞のPgR陽性率を計算した。また、TUNEL法によりin situの細胞アポトーシスを検討した。抗p16(Santa Cruz)、E-cadherin(DAKO)抗体を用いた免疫染色により膵島におけるそれら発現をスクリーニングした。

マイクロダイゼクションによる検討

組織的検討により得られた結果を基にして、研究を進める。

マイクロダイゼクションを用いた膵島細胞DNAメチル化亢進の検討

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。

非接触型であるので従来接触型で問題となった組織のコンタミネーションを大幅に減少できることと、操作が煩雑でないため試料採取時間の大幅短縮が見込まれる。単離された膵島組織からフェノール、クロロホルムを用いた定法に従ってDNAを抽出する。抽出されたDNAは品質を調べた後、Bisulfite DNA Modification Kit (TOYOBO)を用いてbisulfite処理を行った。各遺伝子のプロモーター領域におけるCpG島を標的としたプライマーを用いてPCRを行い、DNAの

メチル化亢進を検討した。PgR、P16、E-CadherinのDNAメチル化の検討に対するプライマーは、論文から既存の配列を使用した (P16M-F TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC, P16M-R GACCCCGAACCGCGACCGTAA, P16U-F TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT, P16U-R CAACCCCAAACCAACCATATA, ECadM-F TTAGTTAGAGGGTTATCGCGT, ECadM-R TAACTAAAAATTCACCTACCGAC, ECadU-F TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGT, ECadU-R CACAACCAATCAACAACACA)。ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動にてメチレーションバンドを確認した。

各パラメータの統計、解析

膵島容積、膵島細胞構成、新生膵島、増殖能、PgR、P16、E-cadherinの発現、メチル化亢進の状態を年代別、糖尿病の有無、疾患別、患者の臨床データと比較し統計をとる。2型糖尿病膵島におけるPgRの発現、メチル化亢進と最も相関がある因子を見出し、治療標的とする。

4. 研究成果

膵島容積、細胞構成、増殖能、アポトーシス、膵島新生の検討

細胞容積の加齢、体格変化による変化を知るために、各年代ごとに男性49例、女性66症例、合計115症例の細胞容積、非細胞容積を検討した。膵重量は0代が最小であり、10代以降は30代で膵重量は最大となった。しかしながら、10代以降では各年代で有意差は認められなかった。膵島容積は0代が最大であり、約4%であった。10代で3%となり、その後漸減していくが、0代以外で各年代間で有意差は認められなかった。非細胞容積は0代が最大であり、10代で約60%まで低下した。それ以降は緩やかに容積の低下が認められるものの、各年代で有意差は認められなかった。それに対し、細胞容積は0-70代までほぼ同じであった。細胞容積は非細胞容積に比し、早期から完成している可能性がある。

細胞増殖能はKi67の核細胞の陽性率で検討した。膵島細胞、細胞、非細胞ともに0代で最大となり(それぞれ、約3%、2.5%、6%)、10代まで漸減していき、20代以降はすべて1%以下であった。成人においては膵島細胞は増殖能が非常に低いことが再確認された。

アポトーシスはすべての世代においてTUNEL法にて見出すことができなかった。よって、膵島細胞ではアポトーシスは非常にまれであり、おそらく起きたとしても急速に周囲の細胞に取り込まれている可能性が考えられた。

体格の変化による膵島容積の変化を検討した。15歳以上の症例について膵島、細胞、非細胞容積とBMIの相関を検討したところ、明らかな相関は認められなかつ

た。次に、細胞容積(細胞容積と膵重量の積/膵臓一つ当たりの内分泌細胞量)とBMIの相関を検討した。細胞容積とBMIは有意ではないものの($p=0.06$)正の相関傾向を示した。そこで、BMIを25より大きい症例、25以下の症例で分けて検討してみると、25より大きい症例では膵島容積、細胞容積が有意に大きいことが見出された($p<0.05$)。この結果は、BMIの高い症例は膵重量も大きいことから、結果として膵島容積、細胞容積が大きくなった可能性が考えられた。

さらに膵島新生について検討を加えた。新生膵島は一般的に3個以下からの内分泌細胞からなる小型の膵島と定義されている。加齢による新生膵島密度を検討したところ、0代が最大で5.3個/mm²であったが、10代で約半数に減少し、その後漸減していった。

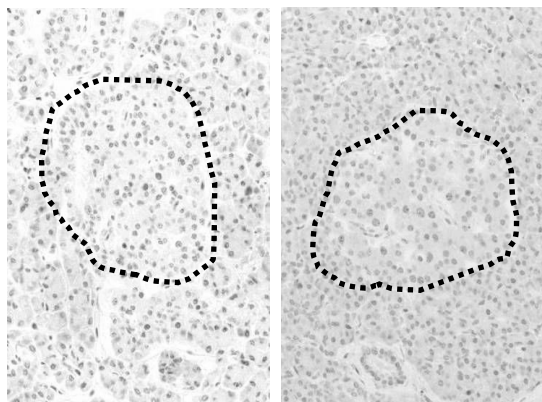
以上の結果から、細胞容積、容量の加齢及び体格変化による変化を解明することができた。このデータは2型糖尿病患者の細胞容積、細胞容積を検討するときに重要な基礎データになると考えられた。

マイクロダイゼクションを用いた膵島細胞DNAメチル化亢進の検討

まず初めに細胞周期阻害分子であるP16、ホルモン受容体であるプロゲステロン受容体、接着因子であるE-Cadherinの細胞における発現をそれぞれの抗体を用いた免疫染色で検討した。症例は非糖尿病検体115例、糖尿病検体30症例を用いた。今回調べた3分子のうち、プロゲステロン受容体、P16では糖尿病の有無による発現の違いは見出すことができなかった。プロゲステロン受容体はユビキタスに細胞に発現が認められ、エピジェネシスの関与の可能性は低そうであった。E-cadherinでは糖尿病における発現の低下が見出された。そこで、まずE-cadherinについてDNAのメチル化の検討を行った。しかしながら、膵島をマイクロダイゼクションした後にDNAを抽出し、Bisfite後PCRを行ったが明らかなメチル化バンドは見出されなかった。このことから、2型糖尿病におけるE-cadherin発現低下はDNAのメチル化とは独立した機序でその発現が制御されていることが予想された。

しかしながら、検索しながらP16はユビキタスに膵島に発現が認められているものの、一部でその発現が低い症例があるのに気が付いた(図1)。そのような症例を集めてDNAのメチル化について検索を行うこととした。

図1 P16の膵島発現



P16 高発現症例 P16 低発現症例

破線内が膵島であり、P16 は核に陽性を示している。周囲腺房細胞に比し P16 低発現症例では膵島内の P16 の発現が低い。

P16 の低発現症例は 145 症例中 13 症例認められた。そこで年齢、背景病変が一致する症例を抽出し細胞増殖能、P16 の DNA メチル化を検討した。

症例の内わけは以下の通りである。

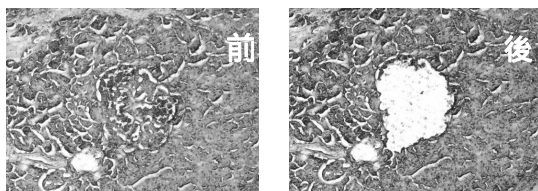
症例の内わけ

	P16 High(H)	P16 Low(L)
症例数	13	13
平均年齢	63.8±4.4	66.1±3.4
男女比	8 : 5	11 : 2
Ki67(%)	0.2±0.1	4.9±1.0*

*p<0.05

症例の内わけで特筆すべき点として、P16 の発現が低い群で有意に Ki67 の陽性率が高く、細胞増殖能が亢進していたことである。これは P16 が cyclin-dependent kinase の阻害分子ということ を考慮すると理にかなっていると考えられる。また、これら症例には 2 型糖尿病も High 群で 2 例、low 群で 4 例含まれている。

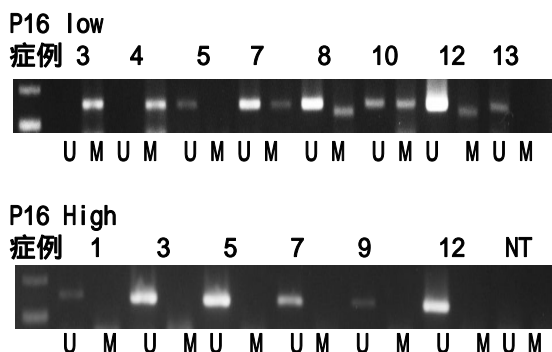
マイクロダイゼクションでは以下のように膵島を単離できる。



このようにして単離された膵島から、DNA を抽出後、Bisulfite 処理をして、メチル化特異的 PCR を行った。

P16 に対するメチル化特異的 PCR を施行した結果、L で 8 症例、H で 6 症例 PCR で評価可能であった。その結果を図 2 に示す。

図2 P16 に対するメチル化 PCR の結果



上記の結果を下表にまとめる。

P16DNA メチル化の結果

	M	U	合計
P16 Low	6	2	8
P16 High	0	6	6
合計	6	8	14

二乗検定を行うと $\chi^2=10.5$ であり $p<0.001$ と P16 の発現と DNA のメチル化は有意に相関した。このことから、P16 の DNA のメチル化は膵島細胞の増殖能低下と密接に関係していることが判明した。さらに 2 型糖尿病の有無は P16 のメチル化には関係していない可能性が考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. 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 Investig. 2014 5:38-47. (査読あり)

2. 水上浩哉、基礎の面から-インクレチン関連薬の 細胞保護作用 糖尿病診療マスター 2013;11:44-49. (査読なし)

3. 水上浩哉、糖尿病発症・進展におけるグルカゴンの重要性 糖尿病における 細胞の相対的・絶対的な量の変化 糖尿病 2012;55:845-848. (査読なし)

〔学会発表〕(計7件)

1. Hiroki Mizukami, Kazunori Takahashi, Wataru Inaba, Kousuke Kamata, Osamu Uehara, Kentaro Tsuboi, Soroku Yagihashi

Slow and minimal decline of beta cell mass associated with aging in non-diabetic Japanese and lack of compensatory islet hyperplasia in obesity

EASD 49th annual meeting 2013 September, 23-27, 2013, Barcelona

2. 水上浩哉、Molecular biology of the incretin in human and animals インクレチンと 細胞、糖尿病動物・肥満学会、平成25年2月23-24日、於 JA 共済ビルカンファレンスホール

3. Hiroki Mizukami, Kazunori Takahashi, Wataru Inaba, Kohsuke Kamata, Kentarou Tsuboi, Soroku Yagihashi

Slow and progressive age-related decline of beta cell mass and proliferation activity of beta cells in non-diabetic Japanese subjects ADA 72nd Scientific Sessions June,8-12,2012, Philadelphia, USA

4. 遅野井祥、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55回日本糖尿病学会年次学術集会
平成24年5月17日-19日、於横浜パシフィコ

5. 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、於東京

6. Hiroki Mizukami and Soroku Yagihashi
Islet Beta Cell Mass in Human Type 2 Diabetic Patients

シンポジウム17 膵 細胞の再生を目指して、第54回日本糖尿病学会年次学術集会、5
平成23年5月19日~21日 於札幌

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔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・講師

研究者番号：00374819

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし