

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461350

研究課題名(和文) ヒト膵組織切片分析による2型糖尿病発症過程の膵島形態学的モデルの構築

研究課題名(英文) Establishment of pancreatic islet morphological model describing pathogenic mechanism of type 2 diabetes by human pancreatic histological analysis

研究代表者

小澤 純二 (Kozawa, Junji)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80513001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：当院における膵切除術施行症例を対象として、術前に耐糖能異常の病期分類(正常型、境界型、新規診断2型糖尿病、長期罹病2型糖尿病)、病態評価(インスリン分泌能および抵抗性)を行い、膵島細胞(膵細胞)の形態学的所見との関連を検討した。耐糖能異常進展とともに膵細胞量の減少がみられ、インスリン分泌能の低下と関連することが明らかとなった。さらに長期罹病2型糖尿病において膵細胞量の増加がみられ、耐糖能異常の進展に寄与している可能性が明らかとなった。膵細胞量の増加は増殖亢進により、高血糖状態および膵島細胞の脱分化・分化転換機構の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Patients who had undergone pancreatic resection in Osaka University Hospital were enrolled. They were classified into those with four different stages (normal glucose tolerance, impaired glucose tolerance, newly diagnosed diabetes, long-standing type 2 diabetes) of glucose intolerance, and their pathological conditions were evaluated. Beta-cell mass decreased as the glucose intolerance advanced, and the decrease was associated with the deterioration of insulin secretory capacity. In patients with long-standing type 2 diabetes, alpha-cell mass increased compared with those in the other groups. The increase of alpha-cell mass was accompanied by increase of Ki67-positive ratio in alpha-cells and was associated with glycemic control. Phenotypic changes in pancreatic endocrine cells, including dedifferentiation and transdifferentiation, might partly contribute to alpha-cell mass with worsening glucose tolerance.

研究分野：内分泌・代謝

キーワード：膵島 インスリン分泌能 インスリン抵抗性 膵細胞 膵細胞

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト2型糖尿病の病態はインスリン分泌不全およびインスリン抵抗性によって特徴づけられる。これら病態の進展においてヒト膵島の形態学的変化に関する詳細な検討および病態との関連についての検討は皆無である。

当研究室では大阪大学医学部附属病院においてインスリン分泌能および抵抗性の病態評価後に膵切除術を施行された患者約40名を対象として、耐糖能正常型(NGT)、境界型(IGT)、新規診断糖尿病型(新規DM型)、長期経過2型糖尿病(長期DM型)の各病期に分けて、膵切除標本を用い膵細胞の形態学的検討を行ってきた。その結果、膵組織単位面積当たりの細胞面積が病期の進展とともに減少していること、この減少がアポトーシスの増加によることを明らかにした。さらに境界型でインスリン陽性細胞の新生を示すインスリンとその他膵島ホルモンの二重陽性細胞が膵導管細胞を中心に認められること、一方でこれら新生像は病期の進展とともに減少することを明らかにし、2型糖尿病発症過程におけるヒト特有のインスリン分泌不全進展の病態を膵組織学的観点から世界に先駆けて明らかにして報告している(引用文献1)。一方、膵細胞はインスリン抵抗性に関与すると想定されるグルカゴンを分泌する。当研究室では2型糖尿病発症患者におけるグルカゴンの分泌異常が食後高血糖と密接に関連していることを報告(引用文献2)、インクレチン関連薬をはじめとしたグルカゴン分泌抑制作用を有する新規糖尿病薬剤の治療標的対象として膵細胞に注目が集まっている。しかしながらヒト糖尿病発症過程の各病期における膵細胞の組織学的所見の変化とグルカゴン分泌異常およびインスリン抵抗性を中心とする病態との関連は全く明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでに明らかにした膵細胞の形態学的所見とインスリン分泌能との関連を検討する。さらに糖尿病発症過程における膵細胞の形態学的変化、特に膵細胞面積の増加の有無を明らかにし、インスリン抵抗性を含む病態および臨床指標との関連を検討することで、ヒト2型糖尿病発症過程におけるインスリン分泌不全、抵抗性の推移を、ヒト膵組織切片分析から構築された膵島の形態学的モデルから明らかにしていくことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1)対象患者の選定・登録

当院消化器外科に通院ないし入院中の膵切除術施行患者(主に膵悪性腫瘍、下部胆管癌、十二指腸乳頭癌などを有する患者)を対象として、術前に消化器外科より紹介、同意書の取得を行う。

### (2)耐糖能および糖尿病病態の評価

膵切除術施行前に75g経口ブドウ糖負荷試験を行い、耐糖能分類および病態(インスリン分泌能、抵抗性)を評価することで、糖尿病発症におけるインスリン分泌不全とインスリン抵抗性の進展過程をモデル化する。

### (3)膵島の形態学的検討

切除膵標本を免疫組織学的に検討し、膵細胞の形態学的変化、特に膵細胞面積の増加の有無を検討することで耐糖能の悪化がこれまでに明らかにしてきた膵細胞量の低下と膵細胞量の増大に基づくのかを明らかにする。さらに膵細胞において増殖・新生・アポトーシスを評価し、形態学的変化の機序を含めて明らかにする。

また近年提唱されるようになった膵島細胞の脱分化・分化転換機構とこれら膵島組織の変化の関連の可能性について、膵島関連転写因子の組織学的な解析により検討する。

#### (4) 耐糖能および病態指標と形態学的所見の関連性の検討および2型糖尿病発症過程の膵島形態学的モデルの構築

2型糖尿病発症過程におけるインスリン分泌不全の進展とこれまでに明らかにした膵細胞量低下との関連を検討する。さらにインスリン抵抗性を含む病態指標や臨床指標と膵

細胞の組織学的変化、特に膵細胞面積の増大との関連を検討する。以上の検討から、ヒト2型糖尿病発症過程における病態の推移を説明する膵島形態学的モデルを構築する。

#### (5) ヒト由来iPS細胞からインスリン陽性細胞への分化誘導法の検証

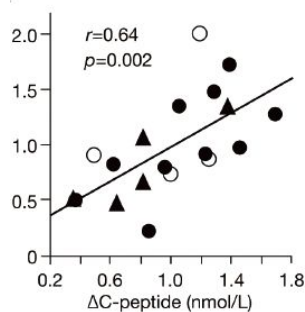
ヒト由来iPS細胞からインスリン陽性細胞への分化誘導法の検証を行い、上記ヒト2型糖尿病発症過程における膵島形態学的モデルに関わると考えられる脱分化・分化転換機構解明に必要な細胞実験系を構築する。

### 4. 研究成果

#### (1) 膵細胞量と病態指標を含む臨床指標との関連の検討

膵細胞量はインスリン分泌能（グルカゴン負荷試験における血中Cペプチド変化量、HOMA-beta、Cペプチドインデックスおよび空腹時血中インスリン濃度）と正相関し、75g経口ブドウ糖負荷試験の120分までの血糖曲線下面積とは負の相関を示した。さらにグルカゴン負荷試験における血中Cペプチド（ng/ml）の変化量（C-peptide）が耐糖能悪化過程でみられる膵細胞量低下の予測に一番良い指標であることが分かった（図1、Endocr J, 2015）。

図1. グルカゴン負荷試験におけるC-peptide (ng/ml) と膵細胞面積 (%) の相関



#### (2) 耐糖能悪化過程における膵細胞量の推移の検討

膵細胞面積は長期罹病2型糖尿病において、糖尿病罹病歴のない患者（正常型、境界型、新規診断2型糖尿病）と比較して多く、Ki67陽性率も高かったことから、膵細胞増加の機序として増殖亢進があることが示された。糖尿病罹病歴のない患者の群間では膵

細胞面積に差はみられなかったことから、膵細胞量の増加は2型糖尿病が長期経過する中で増加してくると考えられた。さらに膵島細胞の脱分化・分化転換を示唆する組織学的所見がいずれの耐糖能の段階でもみられており、膵細胞量の増加に対して膵島細胞の脱分化・分化転換機構が寄与している可能性が示された。

#### (3) 膵細胞量と病態指標を含む臨床指標との関連の検討

膵細胞面積は、インスリン分泌能および抵抗性指標との関連を認めなかったが、術前HbA1cと正相関を認めた。さらに膵細胞面積に対する膵細胞面積比は、術前空腹時血糖値およびHbA1c値と正相関を認めた。

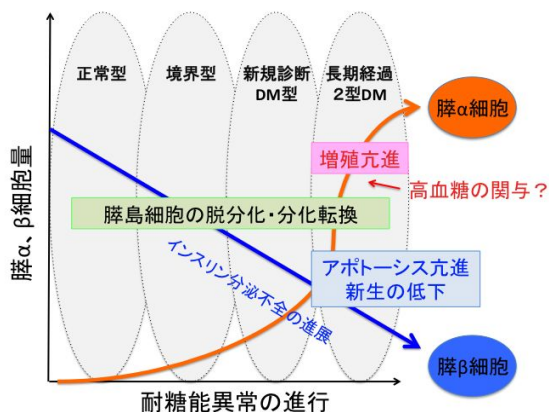
#### (4) 2型糖尿病発症過程における膵島形態学的モデルの構築

以上の結果から、これまで当研究室で明らかにしてきたヒト2型糖尿病発症過程でみられる膵細胞量の減少がインスリン分泌不全の一因であることが示された。また長期罹病2型糖尿病において膵細胞量が増加しており、その機序として増殖亢進が存在すること、糖尿病病態との直接の関連は明らかではなかったが、高血糖の関与の可能性が示

された。さらに膵細胞量の増加に対して膵島細胞の脱分化・分化転換機構が寄与している可能性も示された。

以上を総合してヒト2型糖尿病発症過程における病期・病態の進展を説明する膵島形態学的モデルが構築された(図2)。

図2. ヒト2型糖尿病発症過程における病期・病態の進展を説明する膵島形態学的モデル



### (5) ヒト由来 iPS 細胞からインスリン陽性細胞への分化誘導法の検証

多段階で分化誘導因子を作用させることにより、ヒト由来 iPS 細胞からインスリン陽性細胞へ分化誘導させることが可能となり、脱分化・分化転換機構の解明のための細胞実験系が構築された。

#### <引用文献>

1. Yoneda S, Uno S, Iwahashi H, Fujita Y, Yoshikawa A, Kozawa J, Okita K, Takiuchi D, Eguchi H, Nagano H, Imagawa A, Shimomura I. Predominance of  $\beta$ -cell neogenesis rather than replication in humans with an impaired glucose tolerance and newly diagnosed diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(5):2053-2061.
2. Kozawa J, Okita K, Iwahashi H, Yamagata K, Imagawa A, Shimomura I. Early postprandial glucagon surge affects postprandial glucose levels in obese and non-obese patients with type 2 diabetes. *Endocr J.* 2013;60(6):813-818.

#### 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. Fujita Y, Kozawa J, Iwahashi H, Yoneda S, Uno S, Yoshikawa A, Okita K, Eguchi H, Nagano H, Imagawa A, Shimomura I.

Increment of serum C-peptide measured by glucagon test closely correlates with human relative beta-cell area. *Endocrine Journal.* 査読有. 2015;62(4):329-337. doi: 10.1507/endocrj.EJ14-0456.

#### [学会発表](計3件)

1. 藤田有可里、小澤純二、他。耐糖能悪化過程におけるヒト膵島の形態学的特徴 - 細胞に着目した検討 - 第2報。第58回日本糖尿病学会年次学術集会、2015年5月21-24日、山口。
2. 藤田有可里、小澤純二、他。耐糖能悪化過程におけるヒト膵島の形態学的特徴 - 細胞に着目した検討 - 。第57回日本糖尿病学会年次学術集会、2014年5月22-24日、大阪。
3. 藤田有可里、小澤純二、他。外科膵切除症例における膵細胞の形態学的所見とインスリン分泌能を中心とする糖尿病病態指標の関連。第56回日本糖尿病学会年次学術集会、2013年5月16-18日、熊本。

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小澤 純二 (KOZAWA Junji)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：80513001

##### (2) 研究分担者

今川 彰久 (IMAGAWA Akihisa)  
大阪大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：80373108

##### 研究分担者

岩橋 博見 (IWAHASHI Hiromi)  
大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授  
研究者番号：60397627

##### (3) 連携研究者

江口 英利 (EGUCHI Hidetoshi)  
大阪大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：90527756