

膵臓 β 細胞の新生と環境

九州大学大学院 医学研究院 幹細胞ユニット糖尿病遺伝子分野

稲田 明理

はじめに

周知の通り、日本では生活習慣病の1つである2型糖尿病が深刻な問題となっており、急速に患者人口が増加している。更に、合併症の進行に伴う医療費高騰^{1,2)}やQOLの低下を招いている³⁾。最近の研究で、一旦糖尿病を発症し、罹病期間が長くなればなるほど、 β 細胞数は減少することが分かってきた^{4,6)}。また、元来、日本人は β 細胞を増やす能力やその機能を高めるような能力が欧米人に比べ、少ないとされており、糖尿病になりやすいと言われている^{7,8)}。しかし、糖尿病の治療薬は残存している数少ない β 細胞から強制的にインスリンを分泌させるものが多く、 β 細胞の数の減少を食い止めたり増殖させたりするような根本的な治療薬はない。したがって、 β 細胞を新生・増加させ、根本的な治療へとつながる基礎研究が重要であると考えられる。

β 細胞数/体積は、①生後の成長期、②妊娠、グルコース注入、肥満、インスリン抵抗性への反応など血糖値を維持するために β 細胞補給の必要に迫られた時、③組織破壊が起こった時、に増加することが知られている^{5,6,9-15)}。 β 細胞の増加には、幹細胞からの「新生」と既存の β 細胞からの「複製」の2通りの方法が考えられる¹⁶⁾。膵管上皮細胞からインスリン陽性細胞がbuddingする「新生(ネオジェネシス)」は、これまで肥満のヒト^{5,6,17)}、マウスおよびラット¹⁸⁻²²⁾、膵管結紮、90%膵切などの膵臓組織再生動物モデル¹⁶⁾にお

いて報告されている。「複製」は、 β 細胞体積を拡大させるための主なメカニズムであることが成長マウスにおいて確認されている^{11,12,15)}。

β 細胞体積が細胞成長(複製と新生による)と細胞死のバランスの崩壊により減少すると、耐糖能異常が生じる。事実、ヒトをモデルとした研究において、2型糖尿病患者の膵島では β 細胞が減少し α 細胞が増加して、 β 細胞体積と α 細胞との割合が異常になり、膵島の形態が著しく不均整なものとなっている。これは β 細胞の不足がインスリン分泌障害の源となっているということを示している^{4,6,23,24)}。したがって、糖尿病再生治療を行う為には、体内における β 細胞の増加が重要な要素となるので、 β 細胞の増加と維持を亢進させる生理学的条件とメカニズムを探求することが必要である。

先行研究では、低濃度のストレプトゾトシン(STZ)投与により、部分的に β 細胞数を破壊し高血糖にした後に、短期間 lente インスリン注射^{25,26)}あるいは膵島移植²⁷⁾によって血糖値を正常化したところ、微量なインスリン分泌の回復と一部の β 細胞が増殖したと報告されている。しかしながら、高濃度のSTZで β 細胞をほぼ完全に破壊した場合に β 細胞の新形成が起こるのかということ、未だ解明されていない。また、残存 β 細胞の複製や新生が β 細胞形成の回復に寄与しているのかということも明らかではない。

そこで私たちは、成体マウスの β 細胞を高濃度のSTZ投与によりほぼ完全に破壊し、インスリ

ン注射または膵島移植により血糖値を正常化し、その後、膵臓内のβ細胞の増殖・新生を検討した。つまり、β細胞には新生して増殖する能力が備わっているのか、またその能力は環境を整えてやることで発揮されるのかを検討した²⁸⁾。

方法

モデル群

AMDCC プロトコルに即した方法で、オスの8週齢 C57BL/6 マウス (24.8 ± 0.5g) に、citrate buffer (pH 4.5) に新鮮溶解した STZ (180 mg/kg; Sigma) を一回腹腔内注射して糖尿病を誘発し、注射後3日目、7日目に随時血糖値を測定した。コントロール群には citrate buffer (pH 4.5) のみを注射した。血糖値は、尾部静脈から採取し、ONE TOUCH UltraVue (Johnson & Johnson K.K.) を用いて測定した。3日以内で高血糖 (400 mg/dL 以上) になったマウスを糖尿病マウスとした。STZ 注射の1週間後、それらの糖尿病モデルを高血糖 STZ1 週群、高血糖 STZ8 週群 (高血糖維持群)、移植群とインスリンデテミル (持続型ヒトインスリンアナログ) 注射群の4つのグループに分けた。注射の1週間後、STZ 1 週群 (n = 4) をβ細胞が破壊されているかどうか確認するために解剖した。8週間後、高血糖 STZ8 週群 (高血糖維持群) (n = 17) を解剖した。左腎被膜下に膵島移植をした移植群マウス (n = 6) は、8週間の実験期間中ずっと正常血糖を維持していた。このグループに移植した膵島移植片は、同体重のオスの8週齢 C57BL/6 マウスのものを用いた。インスリンデテミル注射群 (n = 10) には、10週にわたり1日2回のインスリンデテミルを注射した。インスリンデテミルはその特異な構造とプラズマアルブミンが注射部位と可逆的に結合するメカニズムにより基礎インスリンを一定に供給するという特徴を持っている。インスリンの濃度は、血糖値が注射後約

8~12 時間、正常範囲に保たれるように調整した。マウスは、室温 24±2°C、湿度 50±10% (相対湿度)、12 時間の明/暗サイクルの下、マイクロアイソレーター中で飼育し、水及び餌は自由に摂取させた。九州大学の動物実験ガイドラインに従ってマウスを取り扱った。

膵島分離と膵島移植

膵島はコラーゼ消化により Ficoll を用いて勾配分離した²⁹⁾。洗浄後直ちに 500 個の膵島を選び、腎被膜下に移植した。STZ 糖尿病マウスには、STZ 注射の1週間後に膵島移植を行った。

免疫染色

1 次抗体は、抗グルカゴン抗体 (1:500; Linco Reasearch 社)、抗インスリン抗体 (1:500; DAKO)、抗 Ki67 抗体 (1:1000; BD Pharmingen) を使用し、4°Cで一晩インキュベートした。Alexa 488、Alexa 568、又はビオチン標識された二次抗体を用いて検出した。ジアミノベンジジン (DAB) を用いて視覚化し、ヘマトキシリン染色で対比染色した。増殖を確認するために膵臓切片 (1 膵臓につき 3~7 枚の切片) は、インスリンと Ki67 の二重染色を行った。画像は、LSM 510 META 共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss) 上の共焦点モードで撮影した。

血清パラメーターの測定

臓器を採取する直前に、ネブタール麻酔下で心臓から採取した血液を用いて、下記の各種方法または測定キットを用いてそれぞれ測定した。クレアチニン (高速液体クロマトグラフィー; HPLC)、アルブミン (BCG 法)、血液尿素窒素 (ウレアーゼ UV 法)、AST および ALT (JSCC 標準化対応法)、血清インスリン濃度 (酵素結合免疫吸着測定キット; Morinaga Institute of Biological Science)、総血清コレステロール値 (酵素アッセイ試薬; 和光純薬工業製)。

β細胞とα細胞数のカウント

1つの膵臓切片上に存在するすべての膵島、グルカゴン陽性細胞およびインスリン陽性細胞を、Keyence Biorevo microscope で撮影した。1つの膵臓について150μm離れた4~7枚の切片について測定を行った。カウントは、正確さを期するため2人1組でカウントした。統計には unpaired 2-tailed Student's test を用いた。0.05以下のP値は有意とした。

結果

β細胞の新生能力の証明

実験の流れを図1に示す。マウスにSTZ (180 mg/kg 体重)を一回腹腔内注射して糖尿病を誘発した。STZはGLUT-2ブドウ糖輸送担体を介して膵島β細胞に取り込まれることによりβ細胞の選択的破壊(死)を引き起こすことが分かっている³⁰⁻³²⁾。STZ投与後、血糖値は上昇した。3日以内で高血糖(>400 mg/dL)となった糖尿病マウスを選び、それらを高血糖STZ1週群、高血糖STZ8週群(高血糖維持群)、移植群、インスリンデテミル注射群(図1)の4つのグループに分けた。コントロール群にはcitrate bufferのみを投与しコントロールとした。

抗インスリン及び抗グルカゴン抗体を用いて免疫染色を行った結果、STZ1週群はβ細胞のかなりの破壊(β細胞数:ほぼ皆無)が見られた(図2)。膵島のβ細胞(緑色)残数が激減している一方、α細胞(赤色)が増加していた。

(1) インスリンデテミル注射

インスリンデテミル注射により、正常血糖を保った場合にβ細胞が新生・増殖するかを検討した。STZ注射後1週間の経過を待ってインスリンデ

テミル注射を開始した。1日2回のインスリンデテミル注射をすることで血糖値は10週にわたり正常範囲に維持された(図3a)。インスリンデテミル注射により血糖値は大きく変化した、昼間は安定した血糖管理がもたらされた(図3b)。STZ注射後7日目に体重は僅かに減少したが、解剖時には体重はコントロールマウスと比べて大差はなかった(図4d)。

形態変化を調べるため膵臓切片に抗インスリン及び抗グルカゴン抗体を用いて免疫染色を行った。写真からわかるとおり(図3c)、膵島はかなり破壊された状態であった:膵島のβ細胞(緑色)が2~3個のみとなる一方、α細胞(赤色)の割合が増加していた。この形態異常はモデルによって変動することはなく、インスリンデテミル注射ではβ細胞体積と膵島の形態は回復できないということが示された。

(2) 膵島移植

次に、膵島移植により正常血糖を保った場合にβ細胞が新生・増殖するかを検討した。移植群には新鮮分離された500個の膵島を腎被膜下に移植した(図4a)。

STZ投与後、血糖値は上昇し、STZ8週群(高血糖維持群)は実験期間中、高血糖のままであった(図4b)。血中インスリン値はSTZ8週群(高血糖維持群)において大幅に低下し、体重も顕著に減少した(図4c、d)。STZ8週群(高血糖維持群)はSTZ1週群と似た兆候を示し、膵島はα細胞の割合が増大し膵島内のβ細胞(緑色)数はごく僅かで破壊された状態であり(図4e、5)、高血糖を維持したままでβ細胞の増加は見られなかった。このようにSTZマウスは、高血糖によるβ細胞及び体重の減少や、インスリン量低下など、インスリン欠乏の典型的特徴を示した。一方、移植群では血糖値は移植後完全に正常値に戻り、コントロール群に匹敵するものであった(図4b)。

血中インスリン値が上昇し、体重も増加した (図 4c、d)。

更に膵島組織は劇的な回復を見せた (図 4e、5)。コントロール群に見られるような外側に α 細胞、内側に β 細胞が存在する典型的な正常膵島形態が観察され、1~2 個組のインスリン陽性細胞の散在も高頻度で見られた。

(3) 移植モデルにおける β 細胞の増加

β 細胞の増加を調べるため、切片上の全てのインスリン陽性細胞を撮影し、カウントした。STZ8 週群 (高血糖維持群) と比べ、移植群では β 細胞数が増加していた (図 6a)。膵島の大きさで分けると、STZ マウス群では小型膵島のみ (β 細胞数: 6~20) が観察された。一方、移植群では小型だけではなく、より大きな膵島 (β 細胞数: 21~100、100 以上) が多くみられた (図 6b)。膵島の割合変化を調べるため、全ての膵島 (β 細胞数: 6 以上) を撮影し、 α 細胞数、 β 細胞数を分析した (図 6c)。STZ8 週群 (高血糖維持群) においては、膵島 β 細胞比が減少し、細胞のほとんどが α 細胞となっていた。この形態異常は高血糖時においても変わることにはなかった。対照的に、移植群の β 細胞比はコントロール群のようにまで回復した (図 6c)。この回復は正常血糖値に戻ることに伴って β 細胞が増加したためであると考えられる。

既存の β 細胞は図 2 と図 4e で見られるとおり STZ によりほぼ完全に破壊されたため、この多くの α 細胞と共に膵島に残った既存の β 細胞は新しく形成された β 細胞とは識別できる形態であった。移植群では、新生 β 細胞である 1~2 個組のインスリン陽性細胞や β 細胞塊 (β 細胞数: 6 以下) が多く散在していた (図 6d)。移植群の β 細胞塊を細胞数によって分けたところ (β 細胞数: 1~3、4~6)、どちらの塊も増加していた (図 6e)。これは β 細胞の新生が促進されたことを示している。更に、抗インスリン及び抗 Ki67 抗体 (β

細胞複製のマーカー) の二重染色により、移植群で Ki67 陽性膵島が増加したことが認められ (図 6f)、正常血糖値において β 細胞複製が促進されることが示された。

考察

これまで β 細胞は、小胞体ストレス、酸化ストレス、低酸素ストレスなど、様々なストレスに対して脆弱な細胞であるため、一旦死滅すると新生が不可能であると考えられてきたが、私たちの結果は、体内での β 細胞の増加による新しい治療の可能性を示している。今回得られた結果で非常に興味深いのは、 β 細胞に対するインスリンデテミルの効果が、膵島移植とは大きく違っていることであった。ヒトインスリン (100%) に対し、インスリンデテミルはインスリン受容体との親和性が低く (27%)、リン酸化誘発力や細胞増殖誘発能力が低いため (11-14%)、 β 細胞を増加させる能力がなさそうである。

一方、膵島移植が有効な理由の 1 つとして、本来のインスリンの持つ代謝能力が発揮される点が考えられる。膵島細胞片から供給されるインスリンは、他の同濃度インスリンアナログと比較して、インスリン受容体や IGF-I 受容体との親和性が高く³³⁾、インスリン受容体のリン酸化を誘発する能力がある³⁴⁾。インスリン受容体リン酸化反応 (活性化) はシグナル伝達力と直接関係しており³⁴⁾、インスリン受容体の活性化の継続が細胞分裂活動には必要と言われている³⁵⁾。また、 β 細胞においてインスリンと β 細胞特異的インスリン受容体の関係が重要であることは、ノックアウトマウスの研究によっても証明されている³⁶⁾。つまり移植片からのインスリンは、インスリン受容体と下流プロセスを通して β 細胞増殖を促進し、 β 細胞の体積を増加させることができる。2 つ目の理由として、移植片からのインスリンが血

糖値変化に対応できることが挙げられる。3つ目は移植片組成である。膵島は内分泌細胞、外分泌細胞のどちらも含んでおり、血管新生を促進させる可能性がある^{37,38)}。

私たちは膵臓内での増殖や新形成によって自ら十分なβ細胞を供給できるようにする根本的治療を目指して研究している。何がβ細胞を刺激して増殖させるのか、どのようにしてβ細胞が新

しく形成されるのか(新生のメカニズム)、今後の更なる研究が望まれる。

謝辞

本研究を行うにあたり、お世話になりました共同研究者の方々と研究室のメンバーに厚くお礼申し上げます。また、援助頂きました財団法人病態代謝研究会に深謝いたします。

文献

1. 稲田扇, 西村周三, 清野裕, 津田謹輔(2005) 2型糖尿病における外来医療費の研究～医療改革が糖尿病科に与える影響. 糖尿病 48(9): 677-684
2. 稲田扇, 西村周三, 清野裕, 津田謹輔(2006) 2型糖尿病における直接非医療費の研究. 糖尿病 49(8): 679-684
3. 稲田扇, 西村周三, 松島宗弘, 清野裕, 津田謹輔(2007) 人工透析の直接医療費とQOLに関する研究～透析非糖尿病, 透析糖尿病および非透析糖尿病患者間の比較. 糖尿病 50(1): 1-8
4. Sakuraba H, Mizukami H, Yagihashi N, Wada R, Hanyu C, Yagihashi S (2002) Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. Diabetologia 45: 85-96
5. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC (2003) Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. Diabetes 52: 102-110
6. Yoon KH, Ko SH, Cho JH, Lee JM, Ahn YB, Song KH, Yoo SJ, Kang MI, Cha BY, Lee KW, Son HY, Kang SK, Kim HS, Lee IK, Bonner-Weir S (2003) Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. J Clin Endocrinol Metab 88: 2300-2308
7. 清野裕 (1995) 糖尿病の新しい概念. 最新医学 50:639-645
8. 松本和也, 荒木栄一(2006) 食後高血糖の病態・診断・治療. Current therapy: 24-30
9. Brockenbrough JS, Weir GC, Bonner-Weir S (1988) Discordance of exocrine and endocrine growth after 90% pancreatectomy in rats. Diabetes 37: 232-236
10. Bonner-Weir S, Baxter LA, Schuppert GT, Smith FE (1993) A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. Diabetes 42: 1715-1720
11. Parsons JA, Bartke A, Sorenson RL (1995) Number and size of islets of Langerhans in pregnant, human growth hormone-expressing transgenic, and pituitary dwarf mice: effect of lactogenic hormones. Endocrinology 136: 2013-2021
12. Brüning JC, Winnay J, Bonner-Weir S, Taylor SI, Accili D, Kahn CR (1997) Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. Cell 88: 561-572

13. Bonner-Weir S (2000) Islet growth and development in the adult. *J Mol Endocrinol* 24: 297-302
14. Montanya E, Nacher V, Biarnés M, Soler J (2000) Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy. *Diabetes* 49: 1341-1346
15. Bock T, Pakkenberg B, Buschard K (2003) Increased islet volume but unchanged islet number in ob/ob mice. *Diabetes* 52: 1716-1722
16. Bonner-Weir S, Toschi E, Inada A, Reitz P, Fonseca SY, Aye T, Sharma A (2004) The pancreatic ductal epithelium serves as a potential pool of progenitor cells. *Pediatr Diabetes* 5 Suppl 2: 16-22
17. Klöppel G, Löhr M, Habich K, Oberholzer M, Heitz PU (1985) Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. *Surv Synth Pathol Res* 4: 110-125
18. Gu D, Sarvetnick N (1993) Epithelial cell proliferation and islet neogenesis in IFN- γ transgenic mice. *Development* 118: 33-46
19. Wang TC, Bonner-Weir S, Oates PS, Chulak M, Simon B, Merlino GT, Schmidt EV, Brand SJ (1993) Pancreatic gastrin stimulates islet differentiation of transforming growth factor alpha-induced ductular precursor cells. *J Clin Invest* 92: 1349-1356
20. Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S (1999) Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes* 48: 2270-2276
21. Yamamoto K, Miyagawa J, Waguri M, Sasada R, Igarashi K, Li M, Nammo T, Moriwaki M, Imagawa A, Yamagata K, Nakajima H, Namba M, Tochino Y, Hanafusa T, Matsuzawa Y (2000) Recombinant human betacellulin promotes the neogenesis of beta-cells and ameliorates glucose intolerance in mice with diabetes induced by selective alloxan perfusion. *Diabetes* 49: 2021-2027
22. Inada A, Nienaber C, Katsuta H, Fujitani Y, Levine J, Morita R, Sharma A, Bonner-Weir S (2008) Carbonic anhydrase II-positive pancreatic cells are progenitors for both endocrine and exocrine pancreas after birth. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 19915-19919
23. Stefan Y, Orci L, Malaisse-Lagae F, Perrelet A, Patel Y, Unger RH (1982) Quantitation of endocrine cell content in the pancreas of nondiabetic and diabetic humans. *Diabetes* 31: 694-700
24. Clark A, Wells CA, Buley ID, Cruickshank JK, Vanhegan RI, Matthews DR, Cooper GJ, Holman RR, Turner RC (1988) Islet amyloid, increased α -cells, reduced β -cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. *Diabetes Res* 9: 151-159
25. Kergoat M, Bailbe D, Portha B (1987) Insulin treatment improves glucose-induced insulin release in rats with NIDDM induced by streptozocin. *Diabetes* 36: 971-977
26. Adewole SO, Ojewole JA (2007) Insulin-induced immunohistochemical and morphological changes in pancreatic beta-cells of streptozotocin-treated diabetic rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 29: 447-455
27. Hamamoto Y, Tsuura Y, Fujimoto S, Nagata M, Takeda T, Mukai E, Fujita J, Yamada Y,

- Seino Y (2001) Recovery of function and mass of endogenous beta-cells in streptozotocin-induced diabetic rats treated with islet transplantation. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 104-109
28. Inada A, Inada O, Fujii H, Akashi T, Sueishi K, Fukatsu A, Nagafuchi S (2010) Different effects of islet transplantation and Detemir treatment on the reversal of streptozotocin induced diabetes associated with β cell regeneration. *Diabetol Int* 1: 49-59
29. Inada A, Hamamoto Y, Tsuura Y, Miyazaki J-I, Toyokuni S, Ihara Y, Nagai K, Yamada Y, Bonner-Weir S, Seino Y (2004) Overexpression of inducible cyclic AMP early repressor inhibits transactivation of genes and cell proliferation in pancreatic β cells. *Mol Cell Biol* 24: 2831-2841
30. Like AA, Rossini AA (1976) Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science* 193: 415-417
31. Like AA, Appel MC, Williams RM, Rossini AA (1978) Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis in mice. Morphologic and physiologic studies. *Lab Invest* 38: 470-486
32. Szkudelski T (2001) The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50: 537-546.
33. Kurtzhals P, Schäffer L, Sørensen A, Kristensen C, Jonassen I, Schmid C, Trüb T (2000) Correlations of receptor binding and metabolic and mitogenic potencies of insulin analogs designed for clinical use. *Diabetes* 49: 999-1005
34. Wada T, Azegami M, Sugiyama M, Tsuneki H, Sasaoka T (2008) Characteristics of signalling properties mediated by long-acting insulin analogue glargine and detemir in target cells of insulin. *Diabetes Res Clin Pract* 81: 269-277
35. Reid TW, Reid WA (1987) The labile nature of the insulin signal(s) for the stimulation of DNA synthesis in mouse lens epithelial and 3T3 cells. *J Biol Chem* 262: 229-233
36. Kulkarni RN, Brüning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson MA, Kahn CR (1999) Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell* 96: 329-339
37. Brissova M, Fowler M, Wiebe P, Shostak A, Shiota M, Radhika A, Lin PC, Gannon M, Powers AC (2004) Intra-islet endothelial cells contribute to revascularization of transplanted pancreatic islets. *Diabetes* 53: 1318-1325
38. Nyqvist D, Köhler M, Wahlstedt H, Berggren PO (2005) Donor islet endothelial cells participate in formation of functional vessels within pancreatic islet grafts. *Diabetes* 54: 2287-2293

図の説明

図 1. 実験の流れ

マウスに高濃度 STZ (180 mg/kg 体重) の単回腹腔内注射をして糖尿病を誘発し、その 1 週間後にそれらを 4 つのグループに分けた: 高血糖 STZ1 週群 ($n=4$)、高血糖 STZ8 週群 (高血糖維持群) ($n=17$)、インスリンデテミル注射群 ($n=6$)、膵島移植群 ($n=6$)。また、コントロール群 ($n=4$) も用意した。

図 2. STZ により著しく破壊された膵島

STZ 投与の 1 週間後に抗インスリン抗体と抗グルカゴン抗体の二重染色を行った膵島切片を共焦点顕微鏡で分析した。インスリン陽性 β 細胞 (緑色) 残数がかなり少数である一方、グルカゴン陽性 α 細胞 (赤色) の割合が増加している。スケールバーは 50 μm 。

図 3. インスリンデテミル注射による影響

(a) インスリンデテミル注射群における血糖値。マウスに高濃度 STZ (180 mg/kg 体重) の単回腹腔内注射をして糖尿病を誘発した。STZ 注射後 3 日目、7 日目に、随時血糖値を測定した。1 日 2 回のインスリンデテミル注射により、10 週間、血糖値は正常範囲内に維持された ($n=6$)。血糖コントロールは安定しており、移植群と比べ遜色ないものだった。(b) 日中の血糖値の変化 (9:30 a.m.~9:30 p.m.)。インスリンデテミル注射群 ($n=6$)、高血糖 STZ 群 ($n=10$)、コントロール群 ($n=10$) の血糖値。(c) インスリンデテミル注射群では β 細胞増加せず。抗インスリン抗体 (緑) と抗グルカゴン抗体 (赤) の二重染色を行い共焦点顕微鏡により検出。小さいものから大きいものまで全ての膵島が壊滅状態であった。スケールバーは 50 μm 。

図 4. 各モデル群の膵島移植による影響

(a) STZ の単回腹腔内注射後 8 週目の腎臓写真。左: 膵島移植をしていない腎臓。右: 膵島移植した腎臓。新鮮分離された 500 個の膵島を腎被膜下に移植 (矢印)。(b) 随時血糖値、(c) 血中インスリン値、(d) 体重:16 週齢。(b) (c) (d) は STZ 糖尿病群 (黒)、膵島移植群 (Islet Transplantation, IT; 灰色 \circ)、インスリンデテミル注射群 (灰色 Δ)、コントロール群 (白)。mean \pm S.E. * $P < 0.05$. STZ8 週群。

(e) STZ8 週群 (中央): 高血糖を維持した 8 週間には β 細胞の増加は見られなかった。膵島移植群 (右): β 細胞が増加している。抗インスリン抗体 (緑色) と抗グルカゴン抗体 (赤色) の二重染色を行い共焦点顕微鏡で分析。スケールバーは 50 μm 。

図 5. 膵島の形態変化

STZ 糖尿病マウスの膵島 (上段右側) は、グルカゴン陽性細胞 (茶色) の割合が増大し β 細胞が破壊された状態。一方、膵島移植群 (下段) では膵島組織は目覚ましい回復を呈し、外側に α 細胞、内側に β 細胞が存在する典型的な膵島形態であった。スケールバーは 100 μm 。

図 6. β 細胞の定量化

(a) 切片上のインスリン陽性細胞すべてを撮影しカウントした。1 膵臓につき $150\mu\text{m}$ 離れた 4~7 枚の切片について、それぞれ測定を行った。(b) 膵島を大きさによって分けた (膵島中の β 細胞数 : 6~20、21~100、100 以上)。膵島移植群では小型だけではなく、より大きな膵島も存在していた。(c) 膵島の割合変化。インスリン陽性細胞すべてを (a) のとおりカウント。(d) 新しく形成された β 細胞。1~2 個組あるいは 3~6 個の β 細胞塊の散在が膵島移植群に多く見られた。新しく形成された β 細胞は、古い β 細胞 (STZ 注射によりほぼ壊滅し、多くの α 細胞と共に膵島に残っている) と識別できる形態であった。(e) 新しく形成された β 細胞の数 (1 切片上 1-6 個の β 細胞を含む塊)。新しく形成された β 細胞塊を細胞数によって分けた (1-3、4-6 個の β 細胞塊)。(f) 全膵島数に対する Ki67 陽性膵島数。膵臓切片にインスリンと Ki67 の二重染色。STZ 糖尿病群 (黒)、膵島移植群 (Islet Transplantation; 灰色)、コントロール群 (白)。mean \pm S.E. *P < 0.05. NS, no significant. (有意差なし)

図1. 実験の流れ

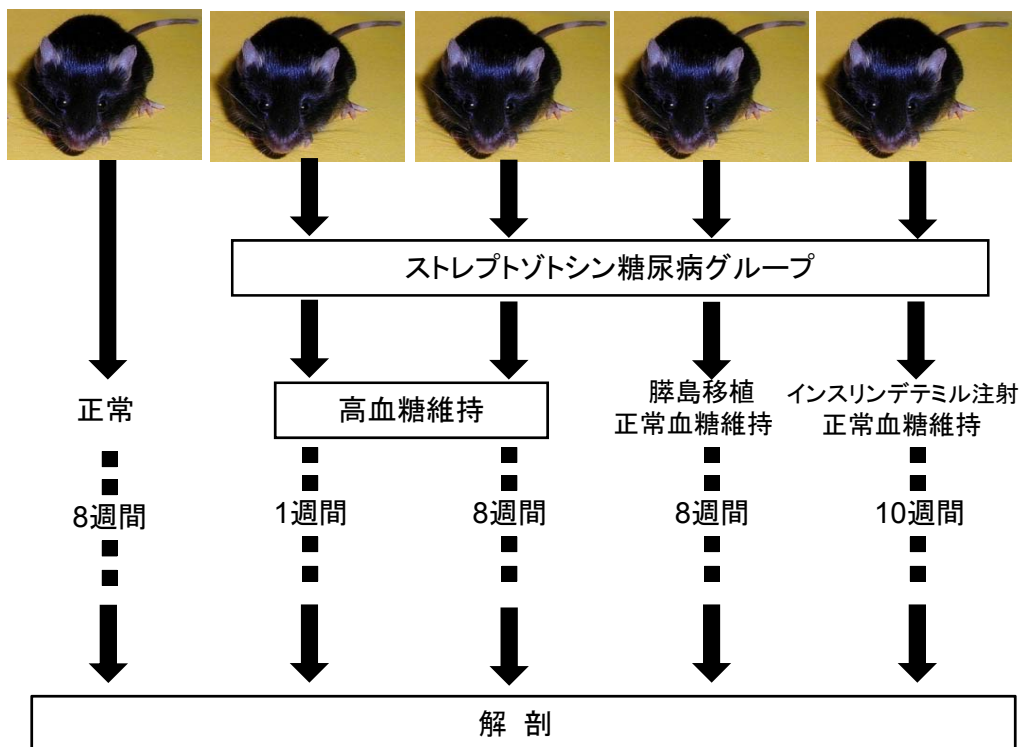
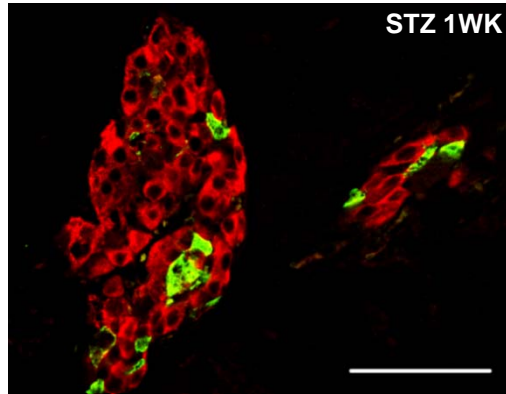
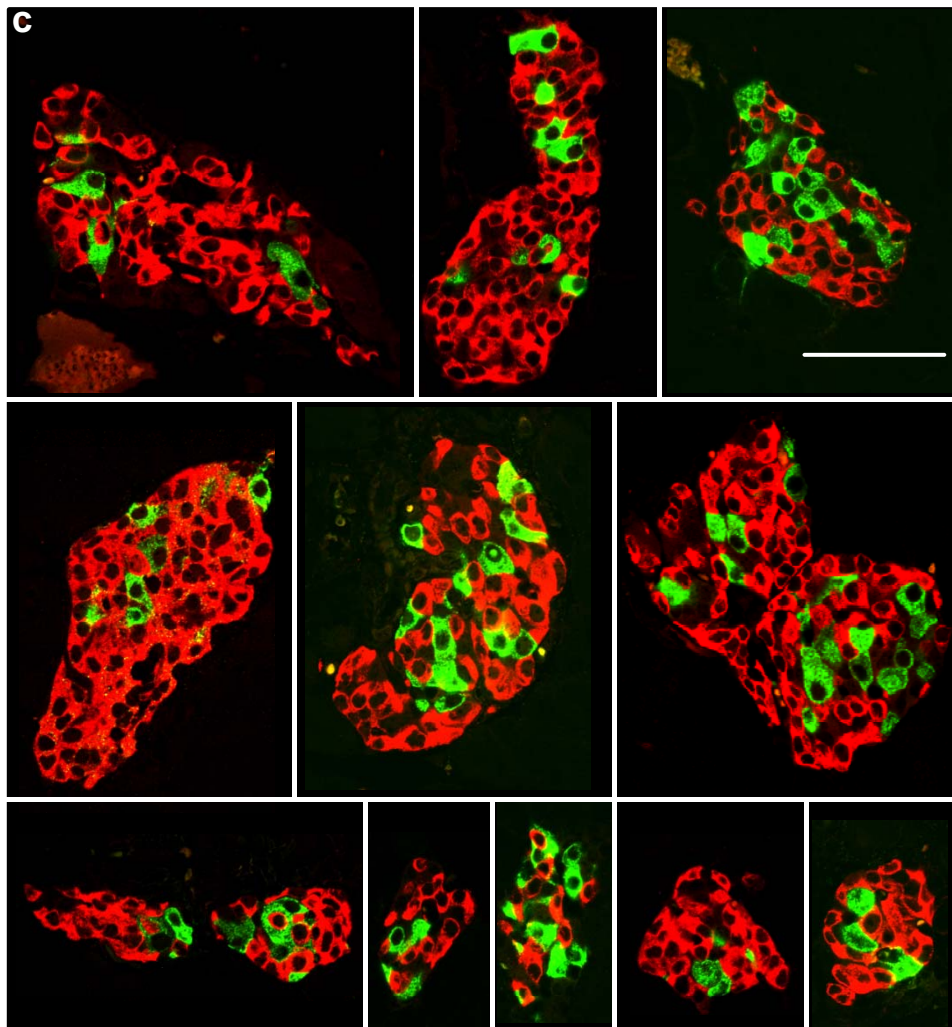
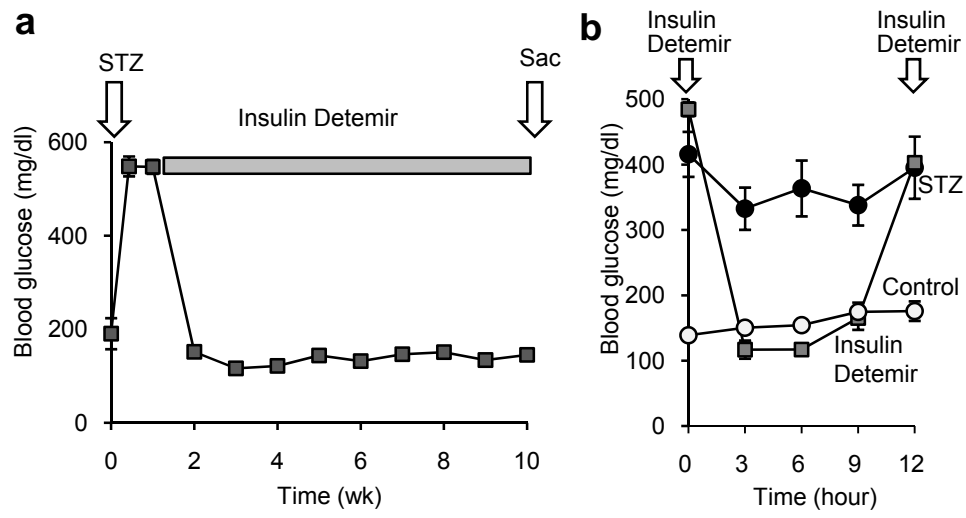


图2.

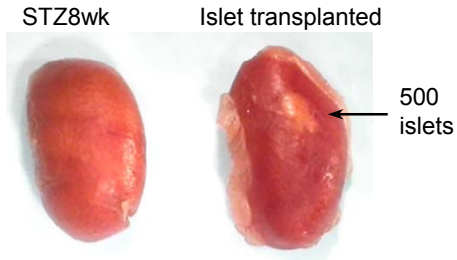


3.

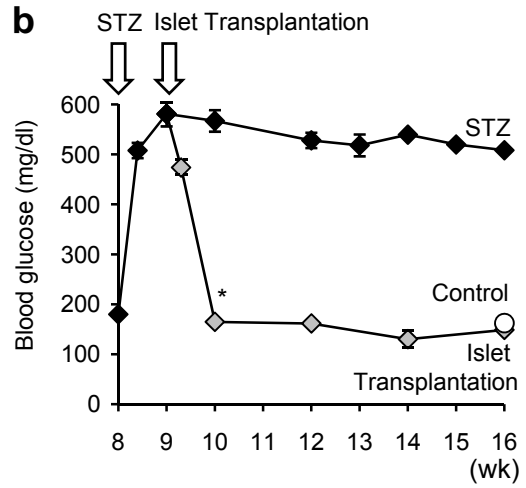


4.

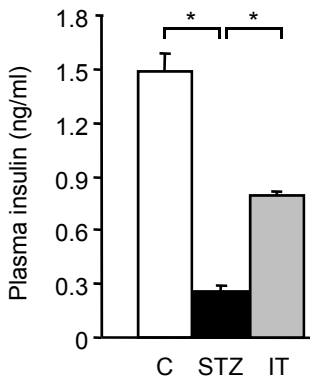
a



b



c



d

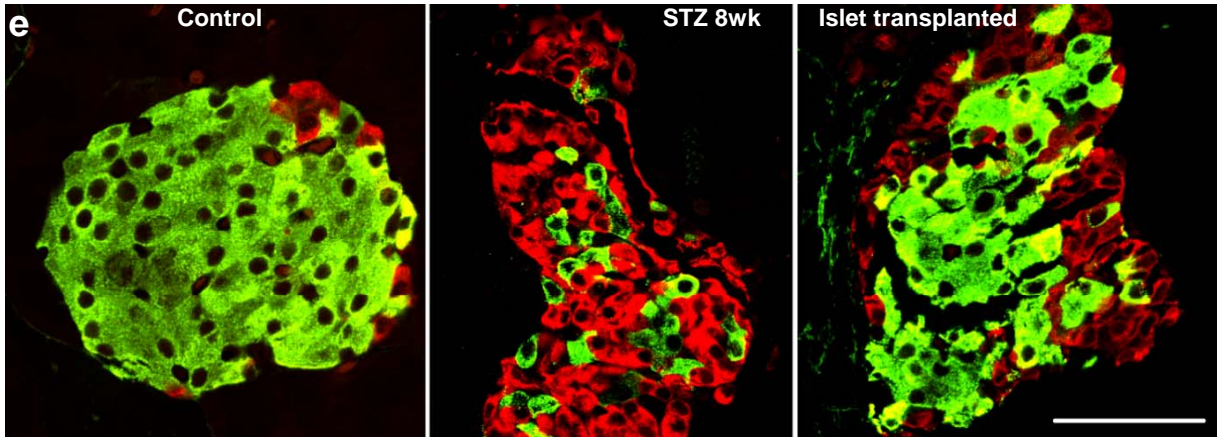
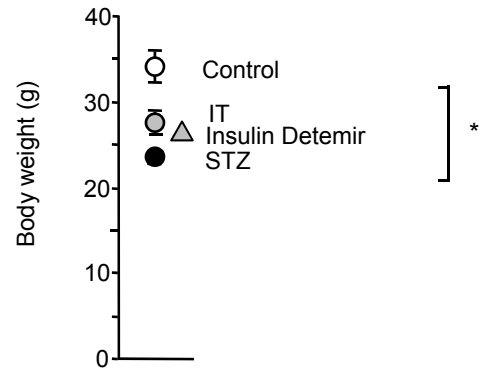
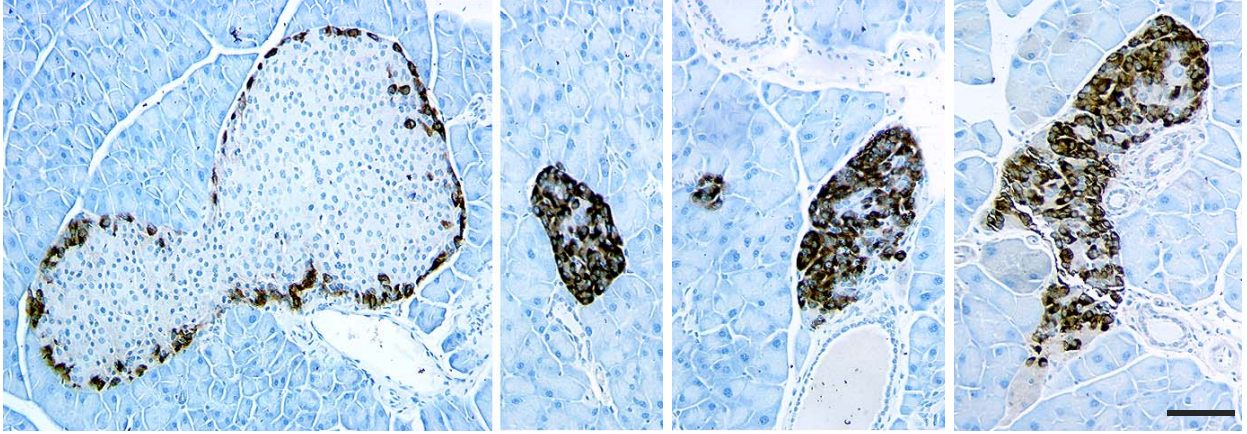


图5.

Control

STZ8wk



Islet transplantation

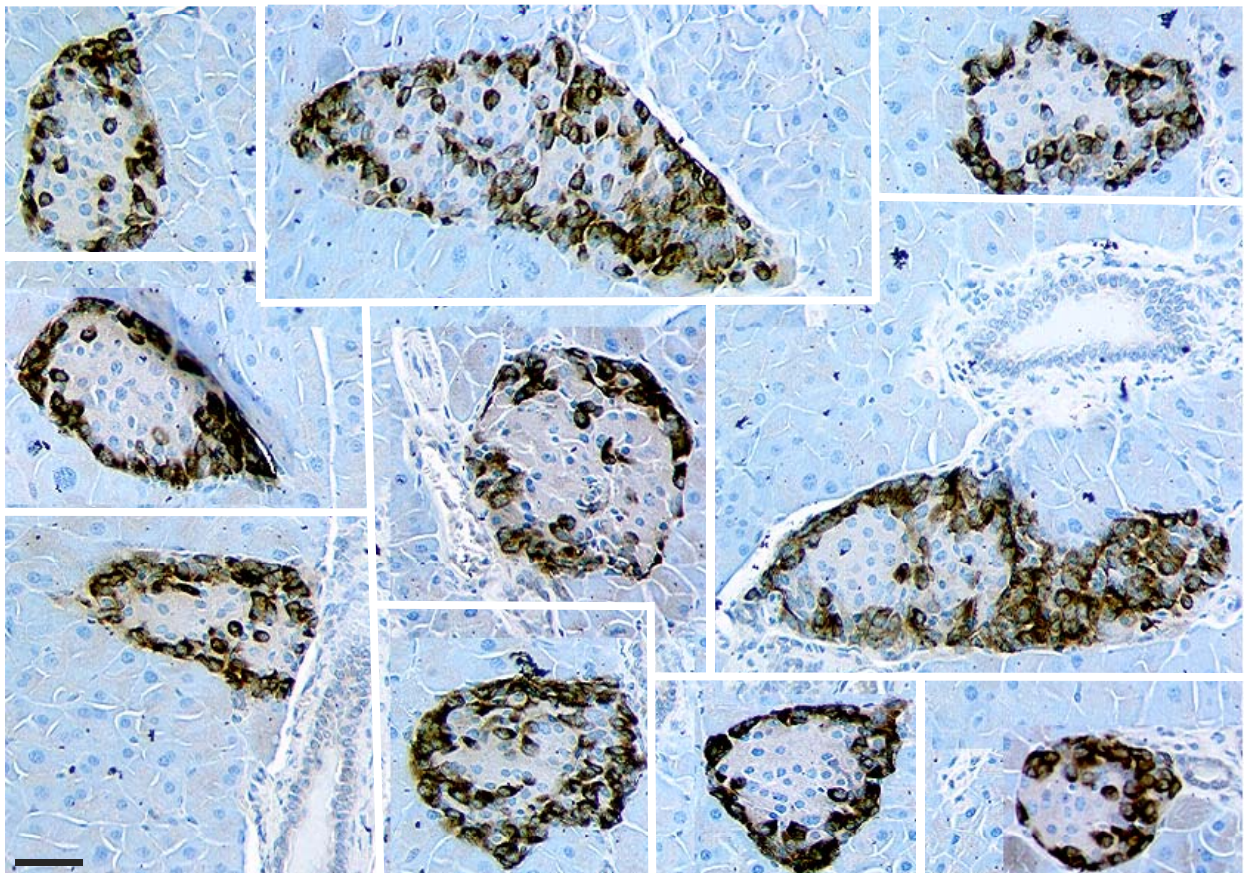


图6.

