

インスリン非依存型糖尿病ヒト膵島における Proinsulin, Insulin の局在に関する免疫組織学的研究

八幡 愛弓

近年, proinsulin の RIA 系が確立され糖尿病とくにインスリン非依存型糖尿病(NIDDM)においても血中 proinsulin 値が高値を示す症例のあることが知られている。今回 NIDDM の外科手術例 3 例の膵組織を用いて、イムノゴールド法を用いた免疫電顕により proinsulin, insulin の局在を検討し、NIDDM における高 proinsulin 血症の原因について考察した。3 症例中 2 症例(Case 1, 3)で血中 proinsulin 値は高値を示した。Case 1 では proinsulin の局在は幼若分泌顆粒のみでなく成熟分泌顆粒にも認められ、proinsulin から insulin への転換阻害が存在すると思われた。Case 3 は、B 細胞内における proinsulin の局在はほぼ正常であったが、一部に幼若分泌顆粒の増加をみとめ、血中に成熟分泌顆粒からだけでなく幼若分泌顆粒からも直接ホルモンが分泌される可能性も示唆されるものと考えられた。Case 2 は血中 proinsulin 値の増加はなく、免疫電顕では proinsulin, insulin の局在には異常は認められなかったが染色性が低下していた。

今回得られた proinsulin の B 細胞内での合成、転換、分泌動態の異常所見は、NIDDM の病因を考える上で有用なものと考ええる。

(平成 5 年10月22日採用)

Immunoelectron Microscopic Studies on the Localization of Proinsulin and Insulin in the Pancreatic Islets of Patients with Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus

Ayumi Yawata

An increased serum concentration of proinsulin has been reported in newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) and most cases of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). It has been accepted that an elevated concentration of circulating proinsulin may serve as an early indicator of B-cell dysfunction. However, the precise mechanism of hyperproinsulinemia in diabetic subjects has not been elucidated. In this study, localization of proinsulin and insulin in the surgical specimens of the pancreatic tissues of four non-diabetic subjects and three cases of NIDDM was studied by the immunogold labelling technique for electron microscopy and a monoclonal antibody to biosynthetic human proinsulin that does not cross-react with human insulin and C-peptide. The immunogold labelling technique made possible the electron microscopic detection of proinsulin and insulin

on thin sections of human pancreatic B-cells, utilizing the monoclonal antibody to human proinsulin and polyclonal antiserum to insulin (cross-reacted with human proinsulin).

The serum proinsulin concentration was markedly elevated in two out of three cases of NIDDM (Case 1 and 3).

Proinsulin was detected only in immature secretory granules and the Golgi complex, but not in the mature secretory granules of pancreatic B-cells of four non-diabetic subjects.

In case 1, proinsulin was detected not only in immature secretory granules but also in mature granules, indicating an impaired conversion mechanism of proinsulin to insulin in pancreatic B-cells. In Case 3, proinsulin was localized only in immature secretory granules and not in the mature secretory granules of pancreatic B-cells, and immature secretory granules were increased in numbers. The results may suggest that proinsulin may be secreted from these immature secretory granules in this case.

In case 2, in whom serum proinsulin was not elevated in circulation, proinsulin was observed in immature secretory granules and not in mature secretory granules by the immunohistochemical technique.

These results indicate impairment of normal mechanism of biosynthesis, conversion and secretion of proinsulin in the pancreatic B-cells of NIDDM. (Accepted on October 22, 1993) *Kawasaki Igakkaishi* 19(4): 283-292, 1993

Key Words ① NIDDM ② Proinsulin ③ Immunohistochemistry

はじめに

Proinsulin は1967年に Steiner らによって発見された分子量約9000の insulin の前駆体である¹⁾. Insulin の生合成, 分泌の過程で, proinsulin の大部分は insulin と C-peptide に分解されるが, 一部は proinsulin のまま血中に放出される. 末梢血中の proinsulin の濃度は, insulinoma や家族性高 proinsulin 血症のような特殊な状態では著しく上昇することが知られているが²⁾, 近年 proinsulin の RIA 系が確立され, 糖尿病とくにインスリン非依存型糖尿病 (NIDDM) においても, 血中 proinsulin 濃度が増加する症例があることが報告されている^{3)~6)}. Proinsulin の分泌動態と糖尿病の発症に関する関係が注目されているが, 未だその詳細は不明である. 今回, ヒト NIDDM 患者の膵島におい

て免疫組織化学的方法により proinsulin, insulin の局在を検討し, NIDDM における高 proinsulin 血症の原因について考察した.

対象と方法

対象

NIDDM と考えられた3例の外科手術により得られた膵組織を対象とした.

Case 1 58歳男性, 162 cm, 53 kg, 1973年頃に NIDDM と診断され1990年より gliclazide 40 mg を服用している. HbA_{1c} 9.4%, 尿中 CPR10 μ g/day.

Case 2 54歳女性, 154 cm, 42 kg, 1976年より NIDDM として加療している. 現在 NPH インスリン 10U の毎朝食前注射を行っている. HbA_{1c} 10.8%, 尿中 CPR 15 μ g/day.

Case 3 82歳男性, 171 cm, 63 kg, 1964年より NIDDM としてインスリン治療を行っているが, コントロール状態は不安定であり, しばしば HbA_{1c} は 10% 以上となっている. 現在混合型インスリン (ノボリン 30 R 40®) 24U 朝食前, 14U 夕食前注射にて加療中. HbA_{1c} 8.9%, 尿中 CPR 8 μ g/day.

症例 1, 2 の glucagon test と症例 3 の血糖日内変動の結果を Table 1 に示す.

対照として臨床的に非糖尿病患者である 4 例 (60歳女性, 53歳男性, 55歳男性, 62歳女性) の外科的手術により得られた膵組織を用いた. 組織の提供に関しては, 患者の informed consent を得た.

方 法

① 透過電顕

細切した膵組織を 2.5% glutaraldehyde にて 2 時間固定後, 1% osmium tetroxide で 1 時間, 固定した. アルコール系列で脱水し, エポキシ樹脂に包埋, 超薄切片作製, 酢酸ウラン, クエン酸鉛で 2 重染色を行い, 透過型電子顕微鏡 JEM-2000EX II にて観察した.

② 免疫電顕

開腹手術により得られた膵組織をすみやかに

1 mm 角に細切し, 4% paraformaldehyde 溶液中に 0.2% glutaraldehyde を含む混合溶液 (0.1M リン酸緩衝液, pH 7.4 に溶解) で 4°C で一晩固定し電顕試料とした. リン酸緩衝液で洗浄後, エタノール系列で脱水処理したのち, Lowicryl K 4 M⁷⁾ に -30° 紫外線重合を行い包埋した. 超薄切片を作製し nickel grid にとった.

免疫染色は 1% bovine serum albumin (BSA) で blocking 後, 1 次抗体と反応させた. マウス抗ヒト proinsulin monoclonal 抗体は 1% BSA 加 Tris buffer (pH 8.2) で 100 倍に希釈し, 4°C で一晩反応させた. この抗 proinsulin 抗体は, insulin, C-peptide とは交差反応を示さなかった^{6),8)}. モルモット抗ウシ, ブタ insulin 抗体は 1000 倍に希釈し, 4°C で 2 時間反応させた. 本抗体はヒト insulin とは 100%, ヒト proinsulin と 25% の交差反応を認めた. リン酸緩衝液で洗浄後, 10 nm gold conjugate solution (Biocell 社, Cardiff, UK) と室温 60 分反応させた. 酢酸ウランで 6 分, クエン酸鉛で 1 分間 2 重染色をした. 観察には透過型電子顕微鏡 JEM-2000EX II を使用した.

③ 血中ホルモン等の測定

血中 proinsulin 値は proinsulin に特異的な血清を用いたラジオイムノアッセイ法により測定した⁹⁾. 血中 insulin 値はインスリン・リアビーズ II (ダイナボット社) を用いた Immuno-radiometric assay (IRMA) 法により測定した.

結 果

1. 透過型電顕による膵 B 細胞の観察

非糖尿病患者の膵においては, 膵ラ氏島構成細胞の 70% 以上を B 細胞がしめた. B 細胞内には電子密度のやや高い結晶状の芯 (core) が存在し, 芯と限界膜の間 (halo) の幅もや

Table 1. Glucagon Tests and Diurnal Rhythm of Plasma Glucose in 3 Cases of NIDDM

Case	Glucagon test, Diurnal rhythm*						
1	Time (min)	0	2	6	10	20	
	BS (mg/dl)	108	109	114	118	132	
	Insulin (μ U/ml)	8	14	18	23	18	
	CPR (ng/ml)	3.1	3.6	4.2	4.8	5.0	
2	Time (min)	0	2	6	10	20	
	BS (mg/dl)	147	145	153	160	168	
	CPR (ng/ml)	1.5	2.4	4.0	3.6	3.3	
3	Clock Time	8°	10°	12°	14°	17°	19° 22°
	BS (mg/dl)	78	95	90	167	119	161 153

*

や広い成熟分泌顆粒が数多くみられた。また、Golgi装置より分泌された直後では、限界膜が被覆されている低い電子密度の幼若分泌顆粒も認

められた(**Fig. 1-A**)。

NIDDMの膵においては、症例1と2ではB細胞内に軽度な脱顆粒の所見をみとめる以外、

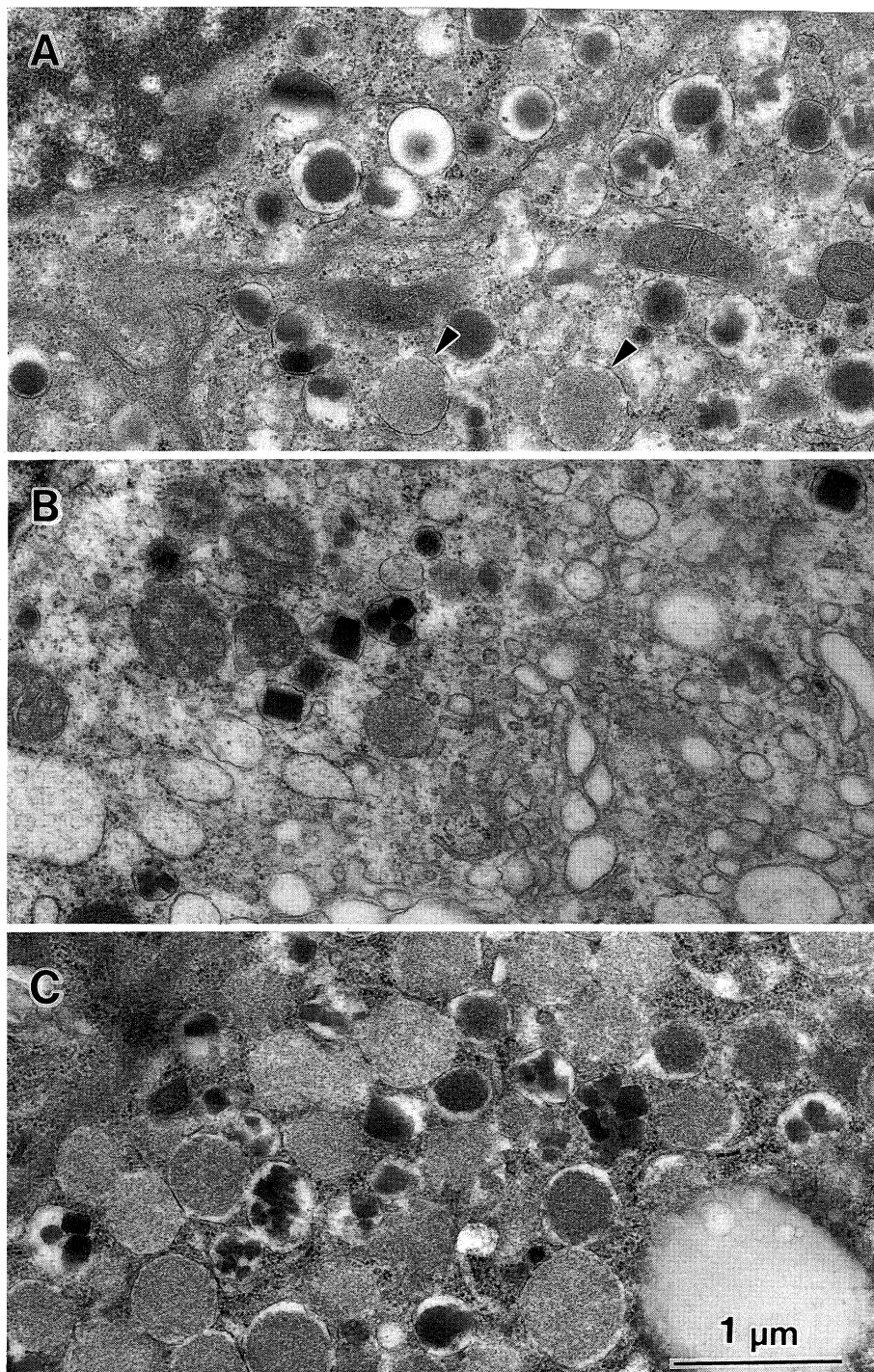


Fig. 1.

超微形態的变化に乏しかった。症例3では多くのB細胞内で分泌顆粒が著しく減少しており、細胞質全体を大小さまざまな大きさの vacuoles が占めていた。小胞体は層板状を呈さず小胞状に断裂拡張して増加していた (Fig. 1-B)。症例3の別のラ氏島においてはB細胞内に著明に分泌顆粒が増加しており、特に幼若分泌顆粒が細胞膜辺縁まで成熟分泌顆粒とほぼ同じ割合で認

められた (Fig. 1-C)。

2. 免疫電顕による観察

a) 非糖尿病例

proinsulin の局在は、Golgi 装置と幼若分泌顆粒に主として認められた。Johnson ら¹⁰⁾の方法により結合した gold particle を計算すると、幼若分泌顆粒で 70 ± 18 gold particles/granule cross-section, 電子密度の低い core をもつ分泌

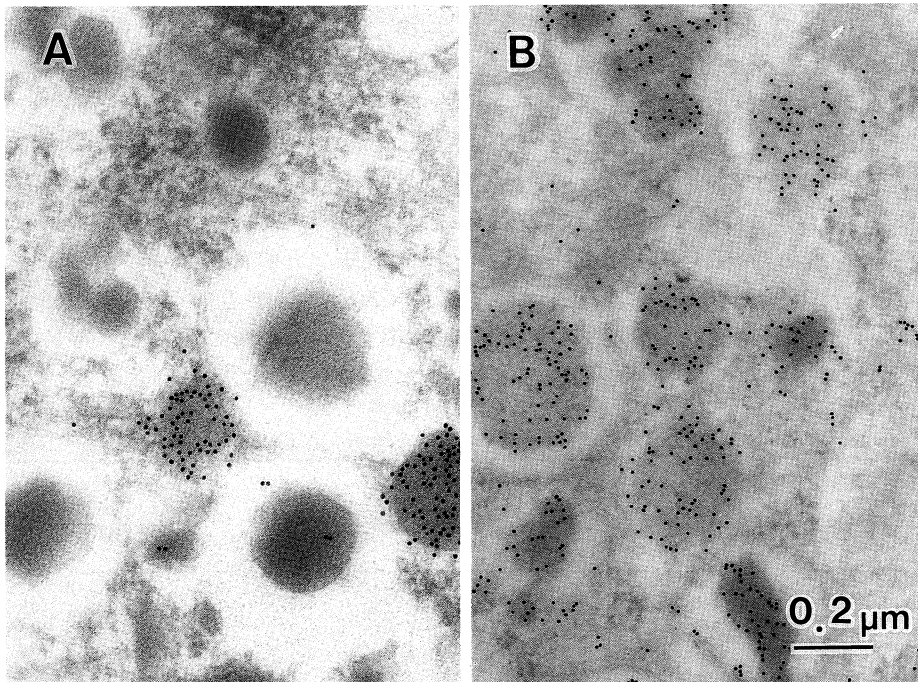


Fig. 2. Immunoelectron micrographs of pancreatic B-cells in non-diabetic subjects.

A. Proinsulin : Proinsulin is located mostly in immature secretory granules, but almost none in mature secretory granules.

B. Insulin : Insulin is detected in all of secretory granules, especially at the core region.

Bar indicates $0.2 \mu\text{m}$.

← Fig. 1. Transmission electronmicrographs of human pancreatic B-cells in non-diabetic control and in the patients with NIDDM.

A. Non-diabetic control

Substantial number of secretory granules are observed in B-cells. Immature secretory granules of a low electron density are also seen, which are coated with limited membranes (▼).

B. NIDDM (Case 3)

The number of secretory granules in the B-cells is reduced. Numerous vacuoles are observed.

C. NIDDM (Case 3)

Whole cytoplasm is occupied by numerous secretory granules, and also by increased immature secretory granules.

Bar indicates $1 \mu\text{m}$.

顆粒では、 20 ± 6 gold particles/granule cross-section, 成熟分泌顆粒においては 2 ± 2 gold particles/granule cross-section であった (Fig. 2-A). Golgi 装置には 70 ± 6 gold particles/ μm^2 の染色性を認めた.

Insulin の局在は、幼若分泌顆粒に 15 ± 5 gold particles/granule cross-section, 成熟分泌顆粒では core の部分に、 62 ± 26 gold particles/granule cross-section, halo の部分には 3 ± 2 gold particles/granule cross-section 認められ, insulin は主として成熟分泌顆粒の core に存在すると考えられた (Fig. 2-B).

b) NIDDM

proinsulin の局在は、Case 1 と Case 2, 3 とでは異なっていた. Case 1 の幼若分泌顆粒においては 90 ± 25 gold particles/granule cross-section, 成熟分泌顆粒では 15 ± 10 gold particles/granule cross-section と幼若分泌顆粒から成熟分泌顆粒にいたるまで全ての分泌顆粒に

染色性を認めた (Fig. 3-A). Case 2 では幼若分泌顆粒には 25 ± 15 gold particles/granule cross-section, 成熟分泌顆粒では 5 ± 3 gold particles/granule cross-section の proinsulin の局在を認め, その局在は control と同様主として幼若分泌顆粒にあり, control に比較して染色性は低下していた (Fig. 4-A). Case 3 は検索した限りでは Case 2 と同様の結果であった.

Insulin の染色所見は Case 1, 2, 3 とともにほぼ同様で幼若分泌顆粒に 10 ± 6 gold particles/granule cross-section, 成熟分泌顆粒の core に 32 ± 16 gold particles/granule cross-section であり, 局在は control と同様で染色性は低下していた (Fig. 3-B, Fig. 4-B).

3. 血中ホルモンの測定結果 (Table 2)

血中 insulin 値は Case 1, 2 で低値であった. Case 3 では混合型インスリン注射後12時間後の採血で $40 \mu\text{U}/\text{ml}$ であった. 血中 proinsulin 値は Case 1 と 3 で高値, Case 2 では低値であ

Table 2. Serum Insulin and Proinsulin Levels in 3 Cases of NIDDM

Case	Serum insulin, $\mu\text{U}/\text{ml}$ (Normal range at fasting: ~ 10)	Serum proinsulin, pg/ml (Normal range at fasting: 32 ± 6)	A molar ratio of insulin to proinsulin	Insulin antibody
1	3.6	181	1.25 : 1	not determined
2	3.75	22.7	10 : 1	not determined
3	40	179	(13.4 : 1)	Negative

Case 1 Blood was drawn before lunch.

Case 2 Blood was drawn at 26 hours after injection of insulin.

Case 3 Blood was drawn at 12 hours after injection of insulin.

った. Case 3 は長期にわたる insulin 使用例であったが, 血中インスリン抗体は陰性であった.

考 察

現在 insulin の生合成と分泌に関しては次のように考えられている. すなわち粗面小胞体のリボゾームにおいて preproinsulin がつくられ, 粗面小胞体腔内で signal peptide が切断される. その後, Golgi 装置に送られ濃縮されて分泌顆粒

が形成される. そして proinsulin から insulin への転換は carboxypeptidase 様の酵素が働き, 幼若分泌顆粒 (Clathrin に被覆された分泌顆粒) 内で行われる^{11), 12)}. 顆粒内では insulin の結晶化が進行し, B 細胞内の core に結晶化した insulin が, halo には C-peptide が存在し¹³⁾, 開口分泌により放出される. 今回の研究結果でも非糖尿病例では, proinsulin は主として Golgi 装置と幼若分泌顆粒に存在し, Orci らの結果と一致した^{11), 12)}. Insulin 染色で, 幼若分泌顆粒と成

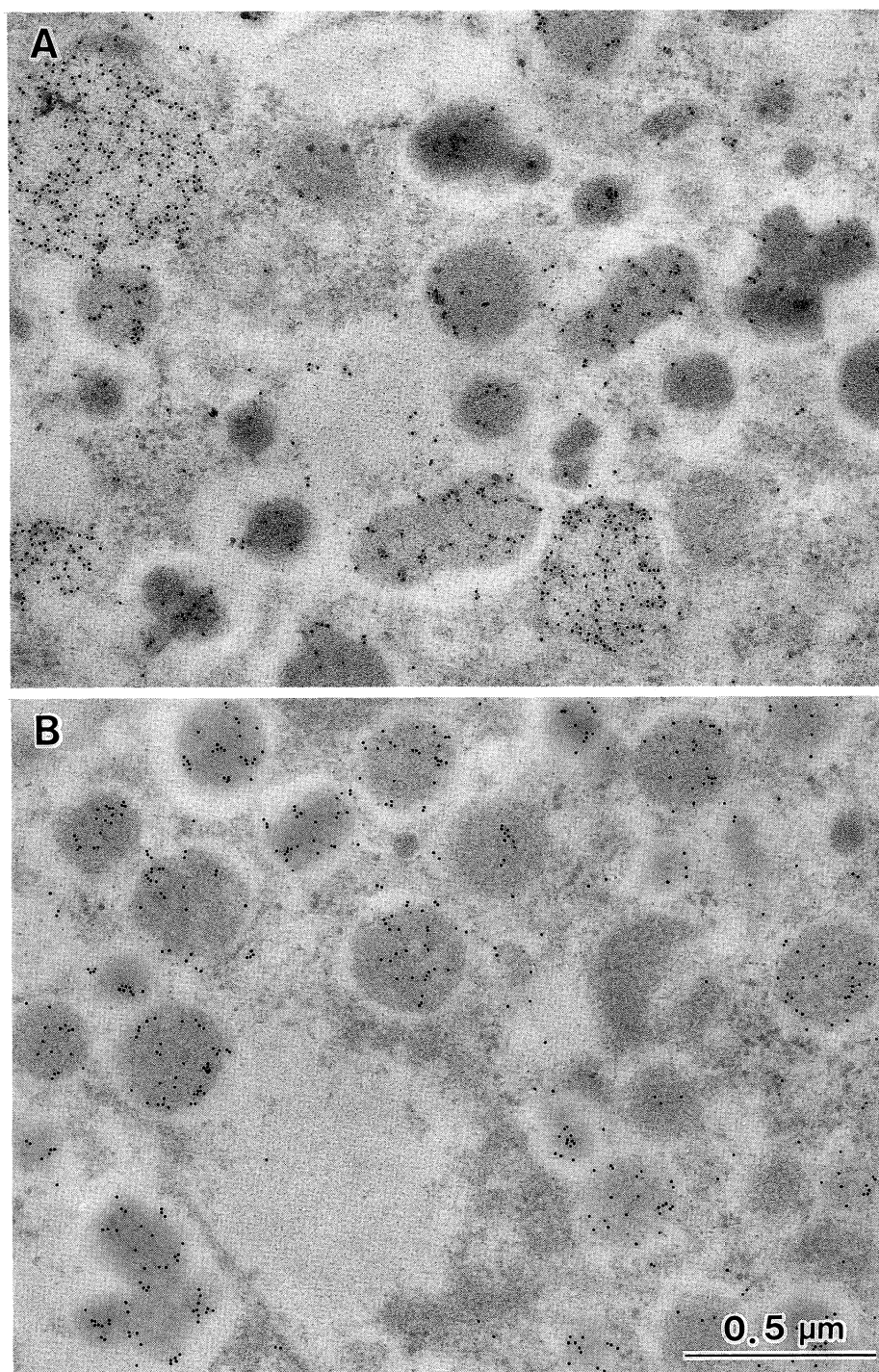


Fig. 3. Immunoelectron micrographs of pancreatic B-cells of the patient with NIDDM (Case 1).

A. Proinsulin : Proinsulin is detected both in the immature secretory granules and in the mature secretory granules.

B. Insulin : Insulin is observed at all of secretory granules but the intensity is rather reduced compared to non-diabetic control.

Bar indicates 0.5 μ m.

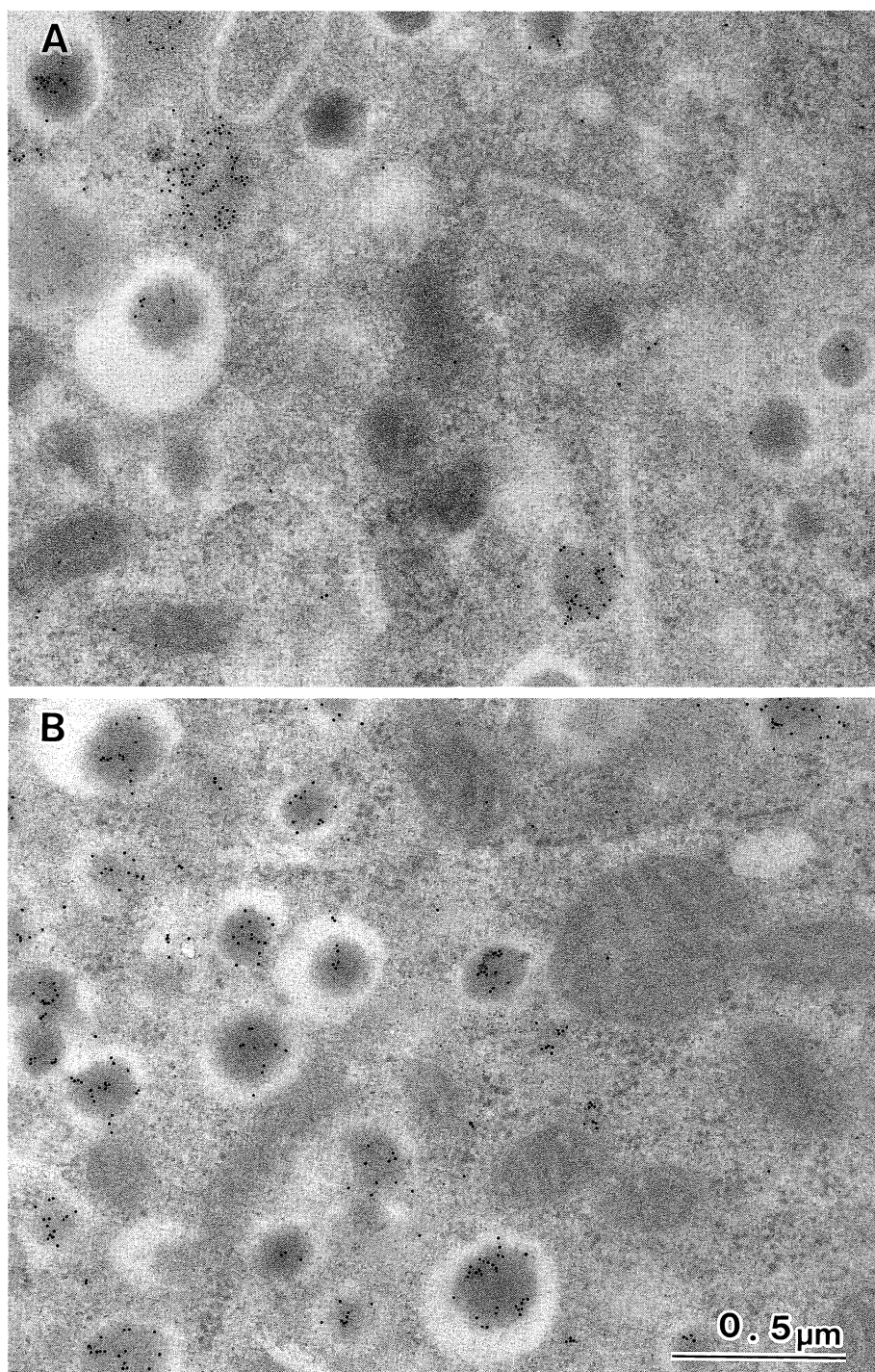


Fig. 4. Immunoelectron micrographs of the patient with NIDDM (Case 2).

- A.** Proinsulin : Proinsulin is located in the immature secretory granules mainly but the intensity is reduced compared to nondiabetic subjects.
 - B.** Insulin : All of secretory granules are labeled with colloidal gold particles but the extent of intensity is less than that in non-diabetic control.
- Bar indicates 0.5 μ m.

熟分泌顆粒に反応を認めたことは、使用した insulin 抗体が, proinsulin と交差反応を有することに起因すると考えられる。

NIDDM の 3 症例のうち血中 proinsulin 値が低値を示したのは Case 2 のみであり, Case 1 と 3 は高値を示した。

Case 2 は臨床的には内因性インスリンの分泌が低下しており, インスリンを少量使用中である。免疫電顕では proinsulin, insulin の局在には異常なく, 双方の染色性が低下していることより insulin の合成が低下していると考えられた。

Case 1 も内因性インスリン分泌は低下しており, 経口血糖降下剤で治療されている。本症例の高 proinsulin 血症の原因として考えられることは, 免疫電顕の control の膵 B 細胞では, proinsulin は主として幼若分泌顆粒に存在しているが, 本症例では, 幼若顆粒のみならず成熟分泌顆粒にも認められたことより, proinsulin から insulin への転換障害が存在し, proinsulin を多く含んだ分泌顆粒が血中へ放出されるためと推測される。

Case 3 は約 30 年間 insulin 治療を行っているコントロール困難な 82 歳の症例である。電顕にみられた, 分泌顆粒が減少し少胞体の増殖し vacuoles の目立つ細胞は, タン白合成の機能は亢進状態にあると考えられている。このような所見は高血糖の続いた場合にみられると言われているが, 糖尿病に特異的とはいえない¹⁴⁾。また, 非常に分泌顆粒の増えている B 細胞においては幼若分泌顆粒も多数認められ, 免疫電顕においては proinsulin の局在に異常を認めなかったことを考え合わせると, 本症例の高 proinsulin 血症の原因は insulin の欠乏状態に生体が反応し, 成熟分泌顆粒のみならず幼若分泌顆粒までが動員されている可能性があると思われる。

NIDDM は機能性疾患の色彩が強く, 病因としても多彩な因子が複雑に関連しており単一の疾患としてとらえにくい。今回検索した 3 症例ともインスリン, 経口血糖降下剤により治療が行われており膵病変も修飾をうけている可能性があり, 今後検索症例を増やして検討する必要性があろう。糖尿病剖検例においては免疫組織学的方法によっては proinsulin の染色は困難であったため, 1 症例の膵の各部分につき多数の膵ラ氏島を, 観察し総括的に判断をすることは不可能であった。しかし現在まで動物モデル以外には NIDDM の免疫電顕の報告はほとんどなく, 今回得られた proinsulin の B 細胞内での合成, 転換, 分泌動態の異常所見は NIDDM の病因を考える上で有用なものとする。

稿を終えるにあたり, 直接ご指導をいただいた内科内分泌部門 西田聖幸教授, 川崎医科大学名誉教授 堀野正治教授に深甚なる謝意を捧げます。川崎医科大学名誉教授 佐野開三教授より外科材料膵組織提供に関して協力をいただき深く感謝いたします。終始, 暖かい理解と助力をいただきました川崎医科大学内分泌内科教室のみなさまに深謝いたします。また本研究では使用した biosynthetic human proinsulin は Dr. B. H. Frank と Dr. R. E. Chance (Lily Research Laboratories) により供与され, 血中 proinsulin の測定に関しては三菱油化ビーシーエルのご協力をいただきました。電顕的検索に関しては川崎医科大学電顕センター各位の協力をいただきました。厚くお礼申しあげます。

本研究は平成 4 年度日本私学振興財団私立大学等經常費補助金特別補助(高度化推進特別経費)および平成 2 年度川崎医科大学プロジェクト研究(2-401)の援助をうけて行われた。附記して謝意をあらわします。本論文の要旨は, 第 36 回日本糖尿病学会年次学術集会(平成 5 年 5 月)において発表した。

文 献

- 1) Steiner DF, Oyer PE: The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 57: 473-80, 1967
- 2) Robbin DC, Tager HS, Rubenstein AH: Biological and clinical importance of proinsulin. N. Engl.

- J. Med. 310 : 1165—1175, 1984
- 3) 米田正也, 尾山秀樹, 粟井佐知夫, 遠藤昌彦, 松木道裕, 西田聖幸, 堀野正治 : 正常者, 肥満者, 糖尿病患者における糖負荷時の血中 proinsulin の変動. 「Peptide Hormones in Pancreas」(Y. Akanuma 編), 第6版. 東京, Biomedical Research Foundation. 1986, pp 29—34
 - 4) Yoshida N, Kuzuya T, Matsuda A, Iwamoto Y : Serum proinsulin levels at fasting and after oral glucose load in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 31 : 355—360, 1988
 - 5) Yoshida N, Kuzuya T, Matsuda A, Iwamoto Y : Effect of dietary treatment on serum insulin and proinsulin response in newly diagnosed NIDDM. *Diabetes* 38 : 262—266, 1989
 - 6) 堀野正治, 米田正也, 八幡愛弓, 河合洋二郎, 津島 公, 松木道裕, 尾山秀樹, 西田聖幸, 佐野開三, 広川満良, 池田 章, 飯塚幸男, 中沢信彦 : プロインスリン. 「Peptide Hormones in Pancreas」(M. Horino 編), 第10版. 東京, Biomedical Research Foundation. 1990, pp 19—27
 - 7) Roth J, Bendayan M, Carleman E, Villiger W, Garavito M : Enhancement of structural preservation and immunocytochemical staining in low temperature embedded pancreatic tissue. *J. Histochem. Cytochem.* 29 : 663—671, 1981
 - 8) 米田正也, 堀野正治, 尾山秀樹, 安達典子, 松木道裕, 西田聖幸 : ヒトプロインスリンに特異的なモノクローナル抗体の作製とプロインスリン測定系への応用. *糖尿病* 30 (Suppl. 1) : 421, 1988, Abstract.
 - 9) 渡辺康子, 堀口 均, 畠 啓視, 大野富雄, 伴野詳一, 河津捷二 : ヒトプロインスリン RIA 法の確立およびその臨床評価. 「Peptide Hormones in Pancreas」(N. Yanaihara 編), 第13版. 東京, Biomedical Research Foundation. 1993, pp 69—73.
 - 10) Johnson KH, O'Brien TD, Hayden DH, Jordan K, Ghobrial HKG, Mahoney WC, Westermarck P : Immunolocalization of islet amyloid polypeptide (IAPP) in pancreatic beta cell by means of peroxidase-antiperoxidase (PAP) and Protein A-gold techniques. *Am. J. Pathol.* 130 : 1—8, 1988
 - 11) Orci L : The morphology underlying insulin secretion. *糖尿病* 27 : 1243—1262, 1984
 - 12) Orci L, Ravazzola M, Storch MJ, Anderson RGW, Vassalli JD, Porrelet A : Proteolytic maturation of insulin is a post-Golgi event which occurs in acidifying clathrin-coated secretory vesicles. *Cell* 49 : 865—868, 1987
 - 13) Michael J, Carroll R, Swift HH, Steiner DF : Studies on the molecular organization of rat insulin secretory granules. *J. Biol. Chem.* 262 : 16531—16535, 1987
 - 14) Volk BW, Wellman KF : Type II Diabetes. *In* The Diabetic Pancreas, ed. by Volk B. and Arquilla E. R. 2nd ed. New York, Plenum Publishing Corporation. 1985, pp 233—264