

Exon1 のシーケンス

PCR の際に用いたものと同じ Reverse プライマーで 3' 側からシーケンス解析を行ったところ 3ヶ所の SNP が確認できた。そこで Forward プライマーで 5' 側から変異を確認しようとしたところ、poly-A 配列以降のシーケンスが困難だった。そこで新たにシーケンス用のプライマーを設定し、3' 側からシーケンス解析を行った(図 7)。なお、この際にプロモーター領域の 1 部(4910-5000)も同時に解析している。

```
atcgcggctg agtgacgaat
4861 gagccccagg accaatgaga gtgcccac
catggcaaaa aaaaaaaaaat ccaatggtga
4921 cgagcagga gaacagagca gctgccaatg
ggcgtgtgctg tttcaggcgg ccaatgggag
4981 gaggcgtctc ggcgggggac aagcagtagc
taccgcggg agcggggagg ggtccgggtt
5041 cgagcttgtg ttccccgga aggggtgagtc
tggacgcggg cgcggaagga gcgcggccgg
5101 aggtctctcag gaagaagccg cggggactgg
ctgccttga caggctgcac ttggatggga
5161 gcaactggtg cctcgggact gctccgatgc
ccggtgggtg cacatcccag ttcccgcctg
5221 tgccggccgg gtttagaggt tttgggggga
ggacatgggg gcgtgcagcc ttcccagttg
5281 caaactteac tccgacctg tttcaaaagc
tgggtctggg tc
```

図 ヒト IFRG 遺伝子における Exon1 の塩基配列

Exon1 増幅の PCR の際に用いた primer () 部位、新たに設定したシーケンス用 primer () 部位、poly-A 配列の部位 (), Exon1 の部位 (), SNP の部位を赤字で、それぞれ示している。

Exon2 のシーケンス

PCR の際に用いたものと同じ Forward プライマーでシーケンス解析を行ったところ遺伝子変異が見つからなかったため、5' 側からのみの解析を行った。

エタノール/EDTA/酢酸ナトリウム精製

- ① シーケンス反応済み溶液 10 μ l に滅菌蒸留水 10 μ l, 3M 酢酸ナトリウム 2 μ l, 125mM EDTA 2 μ l, 100% エタノール 50 μ l を加えて遮光して室温に 15 分間静置した。
- ② 25°C , 15,000rpm, 20 分間遠心した。
- ③ 上清を除いて、70%エタノールを 60 μ l 加えて、25°C , 15,000rpm , 5 分間遠心した。

- ④ 上清を除き、室温で遮光して風乾した。
- ⑤ 教育支援センターに依頼し、塩基配列の決定を行った。

遺伝子変異, 多型の確認

機能シーケンス編集ツール BioEdit を利用し、遺伝子変異, 多型の有無を確認した。

C. 研究結果

シーケンス結果

IFRG プロモーター領域, Exon1, Exon2 の 3 つの非翻訳領域のうち、プロモーター領域と Exon1 にそれぞれ 3ヶ所の 1 塩基置換を認めた。プロモーター領域では 4071G/A, 4072T/A, 4897A/C を認め(図 6), Exon1 では 5001A/G, 5062G/A, 5063G/A を認めた(図)。また表に SNP の認められた 1 型糖尿病患者を示す。

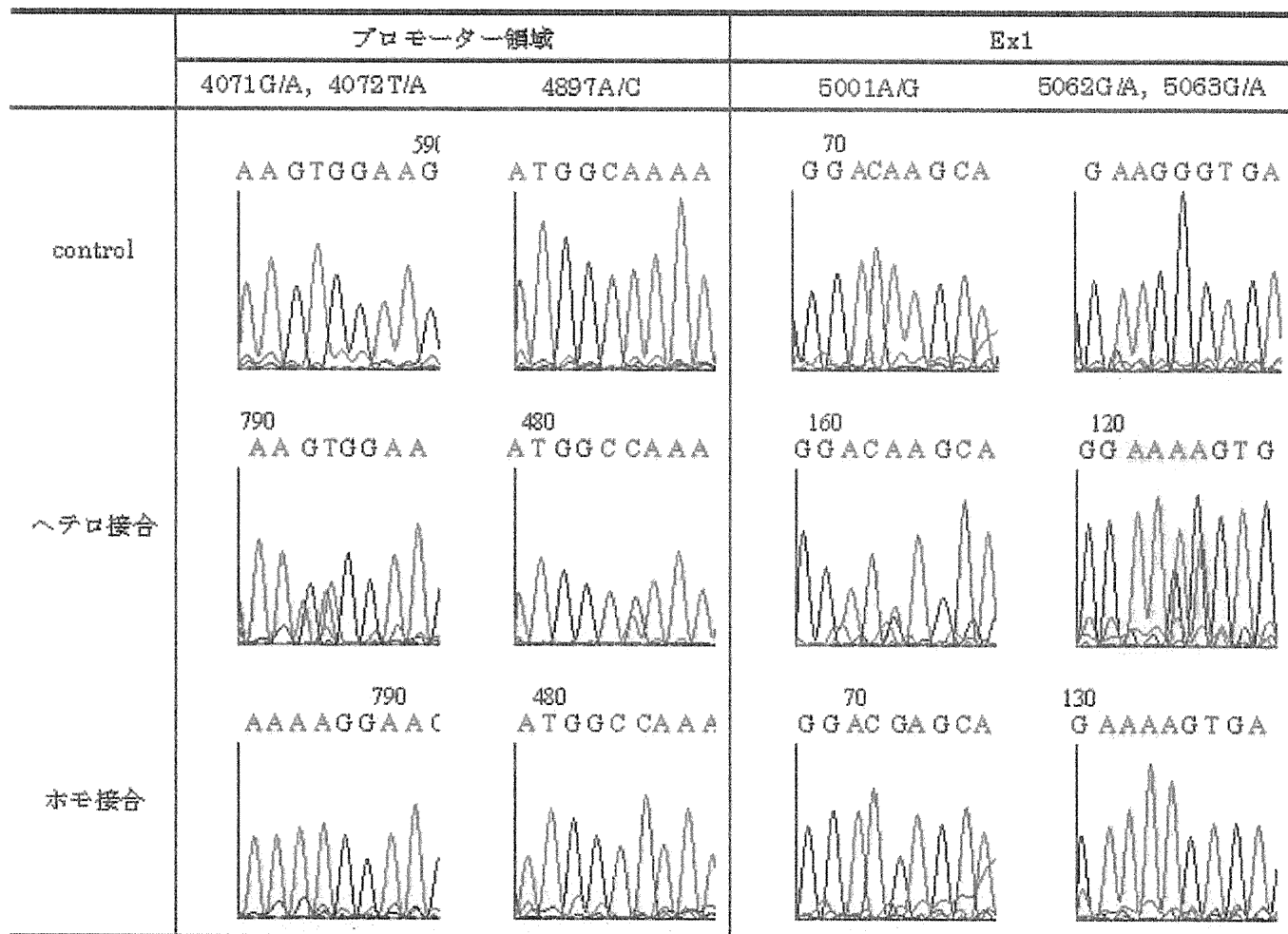


図 プロモーター領域および Exon1 の遺伝子変異

表 IFRG 遺伝子に SNP が認められた 1 型糖尿病患者

患者番号	プロモーター領域の SNP の有無			Exon1 の SNP の有無		
	4071G/A	4072T/A	4897A/C	5001A/G	5062G/A	5063G/A
1						
2	ヘテロ	ヘテロ		ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ
3	ヘテロ	ヘテロ		ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ
4						
5			ヘテロ			
6			ヘテロ			
7			ホモ			
8	ホモ	ホモ		ホモ	ホモ	ホモ
9						
10	ヘテロ	ヘテロ		ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ
11	ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ
12			ヘテロ			
13	ヘテロ	ヘテロ		ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ
14			ヘテロ			
15			ホモ			
16	ヘテロ	ヘテロ		ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ
17						
18						
19						
20			ヘテロ			
21						
22			ホモ			

今回検出した 6 ヶ所の SNP のうち、5 ヶ所の SNP(プロモーター領域の 4071G/A および 4072T/A と Exon1 の 5001A/G, 5062G/A, 5063G/A) は 23 検体すべてで同じ変異の形式をとり、同一のハプロタイプ上にあることが示唆された。この変異(以下、変異 1)の頻度はヘテロ接合で 26.1%(6/23 名)、ホモ接合で 4.4%(1/23 名)だった。またプロモーター領域における 4897A/C の変異(以下、変異 2)の頻度はヘテロ接合で 26.1%(6/23 名)、ホモ接合で 13%(3/23 名)だった。変異 1 と変異 2 の両方が認められた患者は患者 11 の 1 名のみだった。また、いずれかの変異を有する患者は 65.2%(15/23 名)と極めて高率だった。今回検出された 6 ヶ所の SNP はいずれも、以前に報告されている Exon6 の 19043C/T および Exon8 の 20597G/T とは、相関を示さなかった。

	1DM [※]		2DM [※]	HC	total	劇症1型
	全体 [※]	風邪先行 ^{※※}				
wild	273 (90.4%)	63 (86.3%)	287 (91.4%)	317 (95.8%)	877 (92.6%)	13 (92.9%)
hetero	28 (9.3%)	9 (12.3%)	26 (8.3%)	14 (4.2%)	68 (7.2%)	1 (7.1%)
homo	1 (0.3%)	1 (1.4%)	1 (0.3%)	0 (0%)	2 (0.2%)	0 (0%)
total	302 (100%)	73 (100%)	314 (100%)	331 (100%)	947 (100%)	14 (7.1%)
P値	0.012		0.034		0.47	
	0.0094					
OR (95%CI)	2.4 (1.2-4.6)	3.6 (1.5-8.5)	2.1 (1.1-4.1)			1.7 (0.21-14.3)

図. ヒト IFRG 遺伝子における非翻訳領域(プロモーター領域の頻度とその意義

ヒト IFRG 遺伝子における非翻訳領域(プロモーター領域, Exon1, Exon2)のうち, プロモーター領域と Exon1 でそれぞれ 3 ヲ所の SNP を検出した. 変異 1(同一のハプロタイプ上に乗っている, プロモーター領域の 4071G/A および 4072T/A と Exon1 の 5001A/G, 5062G/A, 5063G/A)の頻度はヘテロ接合で 26.1% (6/23 名), ホモ接合で 4.4% (1/23 名) だった. また変異 2(プロモーター領域における 4897A/C)の頻度はヘテロ接合で 26.1% (6/23 名), ホモ接合で 13% (3/23 名) だった. いずれかの変異を有する患者は 65.2% (15/23 名) と極めて高率に検出できた. 以上のことから, これらの変異はウイルス誘発性 1 型糖尿病の疾患感受性マーカー因子である可能性が高いと考えられ, 多型マーカーとして疾患の発症に関連する遺伝子を検出するために有用である. ただし, SNP が検出された患者は, 年齢, 性別, 家族歴には相関性が認められなかった. また, 今回は急性または劇症型の 1 型糖尿病という条件だけで対象とする血液検体を選択し, 年齢や性別などの条件は考慮していない. 今後も 1 型糖尿病患者の血液検体の収集を続け, より多数の標本で検討し, 各条件別で SNP の頻度を比較しなければならない. さらに, 1 型糖尿病患者と健常者コントロールにおいて SNP の発生頻度を比較すれば, IFRG 遺伝子の機能障害の臨床的な意義を明らかにすることができる. したがって, 多数の血液検体を対象とした, ウイルス性 1 型糖尿病感受性の遺伝子同定につながることを期

待できる.

今回の SNP の検出は, 簡便でかつ迅速に結果を得られるダイレクトシーケンス法によって行っている. しかし, ダイレクトシーケンス法による SNP の検出はスクリーニングの 1 つに過ぎず, SNP の有無や部位を裏付けるためには RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)法を行うことも有用である. RFLP 法では, 目的の変異を含む領域を PCR 増幅後に制限酵素処理をし, 切断された断片の鎖長の長さの違いを確認する. したがって, プロモーター領域, Ex1 に SNP があるならば, SNP を含む遺伝子断片を対象とする制限酵素で切断することができる. もし仮に, 対応した制限酵素が存在せず, RFLP 法を行うことができない場合, ミスマッチプライマー法という選択もある. これは, 1~2 個のミスマッチ塩基を設定したプライマーで PCR を行い, 意図的に制限酵素に対応する領域を作成する方法である. ミスマッチプライマーを用いれば, RFLP 法ができない場合でも目的の SNP に対応した制限酵素を見つけられる可能性もある. それでももし制限酵素を見つけられないならば, RFLP 法を断念しなければならない. 塩基置換を検出できる PCR 法には, RFLP 法の他に PNA クランピング・アリル特異的 PCR がある. PNA はペプチド結合を有し, DNA や RNA に似た構造を成す分子である. PNA にはリン酸部位の電化が存在しないため, DNA 鎖と強力に結合する. よって, 野生型 DNA 鎖に相補的な PNA

とプライマーを共存させた状態では、PNA が DNA 鎖と結合して野生型 DNA を増幅することができない。しかし、変異型では PNA は DNA 鎖に結合することができず、プライマーが DNA 鎖に結合して塩基置換を含む領域以降を増幅することになる。野生型 DNA 鎖の増幅は PNA によって抑制されるため、ヘテロ接合でも SNP の検出は可能である。PNA クランピング・アリアル特異的 PCR 法は感度が高い上に特異的なので、SNP の検出には有用である。

プロモーター領域および Exon1 における SNP 群が確実に存在していれば、その SNP が INFRRG を介した IFN シグナル伝達障害に関与しているかどうかを評価する必要がある。本研究で SNP を検出したプロモーター領域、Exon1、Exon2 は IFRG 遺伝子の非翻訳領域である。よって、SNP によるアミノ酸の変化は認められず、IFRG 遺伝子の機能が変化している可能性は低い。しかし、タンパクの構造や IFRG 遺伝子の発現などに変化が認められる可能性があり、一概に変化していないとはいえない。そこでプロモーター領域に検出した SNP が与える IFRG 遺伝子への影響を次の 2 点について考察する。第一に、今回プロモーターだと仮定した領域について、プロモーター配列解析データベース (TRANSFAC) を用いて転写因子結合配列を予測したところ、次の予測が得られた。本研究でプロモーター領域に検出された 3 ヶ所の SNP を含む配列は、いずれも FOXD3 と呼ばれる転写因子に認識され、結合する可能性がある。この FOXD3 と呼ばれる転写因子は DNA 結合モチーフであるフォークヘッドドメインを有している。したがって、この部位に変異が存在すると DNA 結合能が低下し、転写が抑制される可能性がある。第二に、本研究でプロモーター領域に検出された 3 ヶ所の SNP はいずれも poly-A 配列の非常に近傍に存在している。poly-A 配列は遺伝子の mRNA に安定性を与える役割がある。したがって、この部位に変異が存在すると mRNA の安定性が失われるか、あるいは弱まることによって、IFRG 遺伝子の構造が変化する可能性がある。これらの可能性を検討するためには、IFRG 遺伝子の発現を確認しなければならない。

つまり、IFN α やウイルスの刺激によって本来産生されるべき PKR、IFN γ などの抗ウイルス作用性のタンパクの産生レベルが、どのように変化するかを評価する必要がある。その方法の 1 つとして、組み換え DNA を用いた方法がある。SNP を含む遺伝子断片をプラスミド DNA に組み換え、IFRG 遺伝子を発現させる。そして、その際に産生されたタンパクの分子量を SDS-PAGE やウエスタンブロットなどで測定することで、タンパクの活性の程度を評価することができる。また、患者の白血球を enterovirus などのウイルスで刺激し、産生され

た抗ウイルス作用性タンパクによってウイルス増殖の抑制が可能かどうか確認する方法もある。もし、IFRG 遺伝子の機能障害による IFN シグナル伝達障害があるならば、PKR や IFN γ の濃度は健常者よりも低く、ウイルス増殖抑制能が低下することが予想される。このように、IFRG 遺伝子発現への影響やタンパク質の量的異常または機能異常を解析し、1 型糖尿病との関連を検討することが今後の課題である。

E. 結論

今回の研究結果により、IFRG 遺伝子のプロモーター領域に遺伝子多型を認めた。1 型糖尿病、2 型糖尿病、健常対照で比較検討したところ、驚くべきことにすべての糖尿病群で対照群より、明らかに有意なリスク因子であると判定された。また、特に、風邪症状先行例、自己抗体陰性例で危険率 (オッズ比) が高かった。このことも、この遺伝子がウイルス糖尿病の感受性遺伝子であることを示唆していると考えられた。一方、花房班の協力も得て、劇症 1 型糖尿病患者で検討したところ、対照群よりこの多型の頻度は高かったが、統計的な有意差は認められなかった。今後、日本糖尿病学会 1 型糖尿病の成因、診断、病態、治療に関する調査研究委員会のメンバーの協力も得て、症例を蓄積し、さらに検討することが必要であると考えられた。

3. IFRGシグナル経路に関する研究

分担者 下田和哉：宮崎大学医学部内科学講座消化器血液学分野・教授

研究要旨

Interferon (IFN)の抗ウイルス作用はIFRGの欠損により部分的な障害をうけるが十分量のIFNが存在するときには障害されない。IFRGの下流に位置し、IFN- α / β のシグナルを伝達する分子の候補として、Siva-1をクローニングした。Siva-1はIFRGと会合し、Siva-1によるアポトーシスを亢進させる。このアポトーシスの亢進にはIFRGとSiva-1の会合が必須であり、Siva-1のリン酸化は影響しないことが明らかとなった。このことからIFRG遺伝子はインターフェロンの抗ウイルス作用に関するのみでなく、ウイルス感染標的細胞のアポトーシスを誘導することで細胞傷害に働くことが示唆された。

A. 研究目的

Interferon (IFN)レセプターと会合するJAKキナーゼであるIFRGは、その欠損マウスの解析からIFN- α によるB細胞の細胞抑制のシグナル伝達に必須である。一方、IFNの抗vesicostomatitis virus (VSV)ウイルス作用は、IFRGの欠損により部分的な障害をうけるものの、十分量のIFNが存在するときには障害されない。VSVウイルスに加え、Encephalomyocarditis virus (EMCV)ウイルス、Herpes Simplex virus (HSV)ウイルスを用い、IFNによる抗ウイルス作用におけるIFRGの役割を明らかにする。

IFRGの活性化はIFN- α 刺激により一過性に生じ、その後速やかに脱リン酸化される。IFRGの欠損は、IFN- α による細胞増殖抑制、抗ウイルス作用に影響を与えるが、逆にIFRGの恒常的活性化がIFN- α の作用に与える影響を検討し、IFRGの生物学的役割を明らかにする。

B. 方法

野生型マウス、およびIFRG欠損マウスよりembryonic fibroblasts (EF細胞)を分離し、10%FBS加DMEM培地で培養した。EF細胞の抗ウイルス活性は、ウイルスによる細胞溶解の抑制効果により測定した。96穴プレートを用い 8×10^4 個/穴のEF細胞を、種々の濃度のIFN- α 、あるいはIFN- β と共に培養した。48時間後細胞を洗浄し、EMCV、あるいはVSVを感染させた。Crystal violet染色を行い540 nmの波長を用いて、生存細胞を測定した。

IFRGの678番目のアミノ酸であるバリンをフェニルアラニンへ置換する変異の導入(V678F IFRGは、CGTGCATGGCGTCTGTTCCGCGGCCCTGAAオリゴプライマーとsite-directed mutagenesis kit (BD Clontech)を用いて行った。STAT3、あるいはSTAT5のプロモーターにルシフェラーゼを結合したSTAT3-LUC、あるいはSTAT5-LUCを、ベクターのみ、

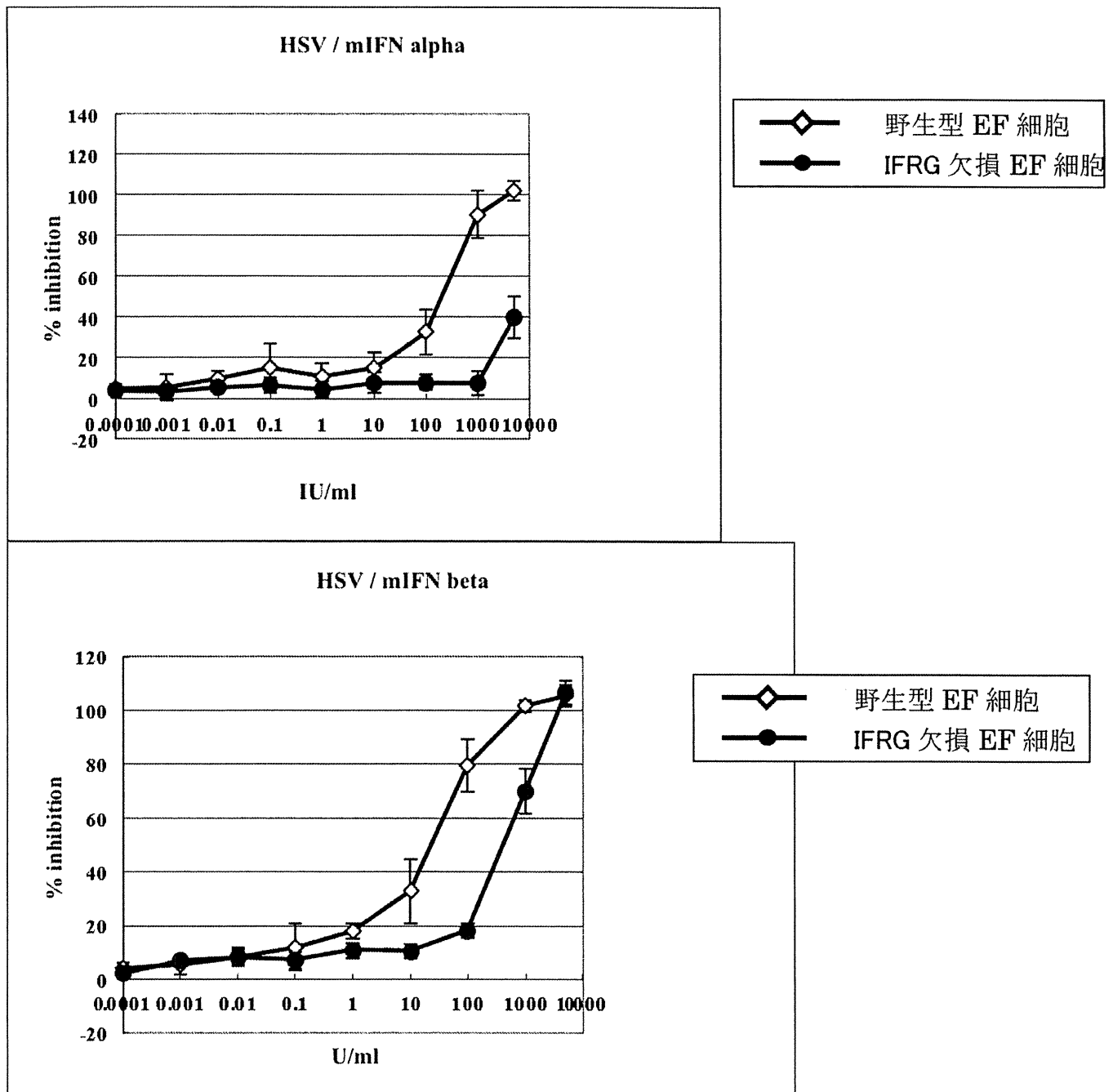
野生型IFRG、V678F IFRGとともに293T細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った。

IL-3非依存性増殖を調べる目的で、IL-3依存性細胞株であるBa/F3細胞に野生型IFRG、あるいはV678F Tyk2を導入した。PBSで洗浄後、 1×10^5 /mLの細胞をサイトカイン非添加の培地で培養し、細胞数を計測した。IL-3刺激による ^3H -サイミジンの取り込みは、サイトカイン非添加の培地で16時間培養した 5×10^3 個の細胞を種々の濃度のIL-3で刺激し、12時間後に測定した。

C. 研究結果

1) IFRG欠損による抗ウイルス活性の低下

EF細胞を種々の濃度のIFN- α により48時間刺激した。IFN- α を除去後、十分量の(IFN- α による刺激を行っていない細胞を24時間以内に100%細胞変性させる量)EMCVウイルス、あるいはHSVウイルスを感染させた。高濃度のIFN- α 、あるいはIFN- β により刺激すると、IFRGが欠損していてもEF細胞に細胞変性はみられなかった。しかし、IFN- α 、またはIFN- β の濃度が低い場合、IFRGが欠損したEF細胞では野生型EF細胞と比べ、細胞変性がみられた。



2) IFRG の恒常的活性化により STAT が活性化され、細胞の自律増殖が生じる
 骨髄増殖性腫瘍では JAK の 617 番目のアミノ酸であるバリリン (V) のフェニルアラニン (F) への変異 (V617F) が高頻度に生じており、その結果 JAK2 の恒常的活性化が生じるようになる。JAK2 と IFRG の遺伝子配列を比較すると、JAK2 の 617 番目のアミノ酸であるバリリンは T IFRG でも保存されており、678 番目のアミノ酸に相当する。JAK2 の場合、V617 は kinase 領域の活性化を抑制していると想定される pseudokinase 領域に存在する。そのため、IFRG V678 も同様に kinase 領域を抑制

している可能性を想定し、IFRG V678 をフェニルアラニンに置換した V678F 変異体を作成した。JAK キナーゼの主要な基質は STAT であるため、V678F IFRG の機能を評価するために、STAT の転写活性を評価した。野生型の IFRG を 293T 細胞に導入すると STAT3, STAT5 は活性化される。V678F IFRG は、STAT3, STAT5 の活性化を野生型 IFRG に比べ約 2 倍に亢進した。次に IL3 依存性細胞株である Ba/F3 細胞にベクターのみ、野生型 IFRG、V678F IFRG を導入した。IL-3 を培地から除去し 16 時間静置した。V678F IFRG を導入した Ba/F3 細胞は、サイトカイン刺激がない状態でもリン酸化が生じていた。IFN α/β 刺激時には IFRG とともに JAK2 もリン酸化されるが、V678F IFRG を導入した Ba/F3 細胞では JAK2 の自

発的リン酸化は観察されなかった。JAK キナーゼの主要な基質は STAT であるため、V678F IFRG を導入した Ba/F3 細胞における STAT5 の自発的リン酸化を検討した。野生型 v を導入した Ba/F3 細胞では STAT5 の自発的リン酸化は観察されないが、V678F IFRG を導入した Ba/F3 細胞では IL-3 非存在下でも STAT5 が自発的にリン酸化されていた。

V678F IFRG を発現する Ba/F3 細胞は、IFRG とその下流に位置する STAT5 の自発的活性化が生じていた。そこで、この細胞株の増殖に及ぼす V678F IFRG の影響を検討した。IL-3 を培地から除去すると、ベクターのみを導入した Ba/F3 細胞、あるいは野生型 IFRG を導入した Ba/F3 細胞は増殖しなかった。ところが、V678F IFRG を発現する Ba/F3 細胞は、サイトカイン非存在下でも自律増殖を示した。

次に、V678F IFRG を発現する Ba/F3 細胞では、サイトカインへの反応性が亢進しているかを検討した。ベクターのみ、野生型 IFRG、あるいは V678F IFRG を導入した Ba/F3 細胞のいずれも IL-3 へ容量依存的に反応し、10 pg/ml の濃度でプラトーに達した。V678F IFRG を発現する Ba/F3 細胞は、ごく少量ではあるものの IL-3 非存在下でも ^3H -サイミジンの取り込みを示し、Ba/F3 細胞、あるいは野生型 IFRG を発現する Ba/F3 細胞に比較してより強い IL-3 への反応性を示した。

D. 考察

IFN- α/β のシグナルは IFRG、JAK1 を介して、IFN- γ のシグナルは JAK1、JAK2 を介して伝達される。VSV を用いて、IFN の抗ウイルス作用は IFRG の欠損により部分的な障害をうけることを以前に報告したが、今回、EMCV ウイルス、HSV ウイルスを用い、IFN の抗ウイルス作用は IFRG の欠損により部分的な障害をうけるが十分量の IFN が存在するときには障害されないことを明らかにした。さらに IFRG の役割を明確にする目的で、恒常的活性化 IFRG 変異体を構築した。骨髄増殖性腫瘍において高頻度に観察される JAK2 V617 に相当する IFRG V678 に変異を導入すると、JAK キナーゼの下流に位置する主要な基質である STAT3、STAT5 の活性化が約 2 倍に亢進した。さらに、IFRG V678F を導入した IL-3 依存性細胞株 Ba/F3 は、サイトカイン非存在下での STAT5 のリン酸化、細胞増殖、サイトカインへの反応性亢進がみられた。JAK2 V617 は、kinase domain の活性化を抑制していると想定される pseudokinase 領域に存在し、kinase 領域を抑制していると想定されているが、IFRG も pseudokinase 領域に相当する V678 に変異を導入

すると恒常的活性化が生じたため、JAK2 と同様に pseudokinase 領域が kinase domain を抑制している可能性が示された。Tyk2 の恒常的活性化により細胞が自律増殖を示すことを明らかにしたが、次に、IFRG の恒常的活性化が抗ウイルス活性に及ぼす影響の検討を行って、IFRG の生物学的作用を明らかにする必要がある。

D. 結論

IFN の抗ウイルス作用は IFRG の欠損により部分的な障害をうけるが十分量の IFN が存在するときには障害されない。IFRG の pseudokinase 領域は kinase 領域を抑制しており、pseudokinase 領域に変異を導入すると IFRG の恒常的活性化が生じ、下流の STAT の恒常的活性化、細胞の自律増殖、サイトカインへの反応性亢進が生じる。

F. 健康危険情報

問題なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nagafuchi S, Katsuta H, Anzai K. Rituximab, B-Lymphocyte depletion, and beta-cell function. *N Engl J Med* 362(8):761, 2010.

Inada A, Inada O, Fujii H, Nagafuchi S, et al. Different effects of islet transplantation and Detemir treatment on the reversal of streptozotocin induced diabetes associated with β cell regeneration. *Diabetol Int* 1(1):49-59, 2010.

Nagafuchi S. The role of B cells in regulating the magnitude of immune response. *Microbio Immunol* 54:487-490. 2010.

永淵正法、近藤しおり. 自己免疫性1型糖尿病とウイルス感染. *Diabetes Frontier* 21(3):314-319, 2010.

永淵正法、塚本浩、新納宏昭、小林隆志. 自己免疫疾患と炎症. *細胞工学* 29(9):769-775, 2010.

永淵正法. 糖尿病発症に関するウイルス感染. *感染症* 40(5):19-24, 2010.

Shimoda HK, Shide K, Kameda T, Matsunaga T, Shimoda K. Tyrosine kinase 2 interacts with the proapoptotic protein Siva-1 and augments its apoptotic functions. *Biochem Biophys Res Commun.* 400(2):252-257, 2010.

Kameda T, Shide K, Shimoda HK, Hidaka T, Kubuki Y, Katayose K, Taniguchi Y, Sekine M, Kamiunntenn A, Maeda K, Nagata k, Matsunaga T, Shimoda K. Absence of gain-of-function JAK1 and JAK3 mutations in adult T cell leukemia/lymphoma. *Int J Hematology* 92(2):320-325, 2010.

Oku S, Takenaka K, Kuriyama T, Shide K, Kumano T, Kikushige Y, Urata S, Yamauchi T, Iwamoto C, Shimoda HK, Miyamoto T, Nagafuji K, Kishimoto J, Shimoda K, Akashi K. JAK2 V617F uses distinct signalling pathways to induce cell proliferation and neutrophil activation. *Br J Haematol* 150:334-344, 2010.

Muramoto R, Kuroda M, Togi S, Sekine Y, Nanbo A, Shimoda K, Oritani K, Matsuda T. Functional involvement of Daxx in gp130-mediated cell growth and survival in BaF3 cell. *Eur J Immunol* 40:3570-3580, 2010.

永淵正法. ウイルス糖尿病と自己免疫糖尿病. *臨床と微生物* 38(1):57-61, 2011.

永淵正法、栗崎宏憲、勝田仁. ウイルス感染の免疫防御と自己免疫. *臨床とウイルス* 39(1):3-9, 2011.

Shide K, Kameda T, Markovtsov V, Shimoda HK, Shimoda K, et al. R723, a selective JAK2 inhibitor, effectively treats JAK2V617F-induced murine myeloproliferative neoplasma.

Blood 117:6866-6875, 2011.

Ishizaki, M., T. Akimoto, R. Muromoto, M. Shimoda, K. et al. Involvement of Tyk2 in both the IL-12/Th1 and IL-23/Th17 axis in vivo.

J Immunol 187(1):181-189, 2011.

Ishizaki, M., R. Muromoto, T. Akimoto, Y. Sekine, H. Shimoda, K. et al. Tyk2 deficiency protects joints against destruction in anti-type II collagen antibody-induced arthritis in mice.

Int Immunol 23(9):575-582, 2011.

Nagafuchi S, Kurisaki H, Katsuta H. Encephalomyocarditis virus. Chapter 5.

In Diabetes and Viruses, Springer Publications, in press.

2. 学会発表

藏藤利暢、小川秀一郎、甲斐裕次、高上悦志、和泉賢一、安西慶三、近藤しおり、松尾友仁、栗崎宏憲、勝田仁、永淵正法. マウス脳心筋炎ウイルス (EMCV) 誘発糖尿病における防御機構と性差.

第80回日本感染症学会西日本地方会学術集会. 松山市. 2010.11.9.

勝田仁、永淵正法. 20年以上インスリン分泌能が維持され膵β細胞の再生の可能性が示唆された1型糖尿病の1例.

第49回日本糖尿病学会九州地方会. 福岡. 2011.10.7.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

研究成果刊行物一覧

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nagafuchi S, Katsuta H, Anzai K.	Rituximab, B-Lymphocyte depletion, and beta-cell function.	N Engl J Med	362(8)	761	2010
Inada A, Inada O, Fujii H, Nagafuchi S, et al.	Different effects of islet transplant ation and Detemir treatment on the reversal of STZ induced diabetes associated with β cell regeneration.	Diabetol Int	1(1)	49-59	2010
永淵正法、近藤 しおり	自己免疫性1型糖尿 病とウイルス感染	Diabetes Frontier	21(3)	314-319	2010.
永淵正法、塚本 浩、新納宏昭、小 林隆志.	自己免疫疾患と炎症	細胞工学	29(9)	769-775	2010.
永淵正法.	糖尿病発症に関する ウイルス感染	感染症	40(5)	19-24,	2010
Nagafuchi S	The role of B cells in regulating the magnitude of immune response.	Microbiol Immunol	54	487- 490	2010
Shimoda HK, Shide K, Kameda T, Matsunaga T, Shimoda K.	Tyrosine kinase 2 interacts with the proapoptotic protein Siva-1 and augments apoptotic functions.	Biochem Biophys Res Commun	400(2)	252-257	2010
Kameda T, Shide K, Shimoda HK, Shimoda K, et al.	Absence of gain-of-function JAK and JAK3 mutations in adult T cell leukemia/lymphoma.	Int Hematology	92(2)	320-325	2010
Oku S, Shimoda HK, Miyamoto T, Nagafuji K, Kishimoto J, Shimoda K, Akashi K, et al.	JAK2 V617F uses distinct signalling pathways to induce cell proliferation and neutrophil activation in murine myeloproliferative neoplasma.	Br J Haematol	150	334-344	2010.
Muramoto R, Shimoda K, Matsuda T, et al.	Functional involvement of Daxx in gp130-mediated cell growth and survival in BaF3 cell.	Eur J Immunol	40	3570-3580	2010

永淵正法.	ウイルス糖尿病と自己免疫糖尿病.	臨床と微生物	38(1)	57-61	2011
永淵正法、栗崎宏憲、勝田仁.	ウイルス感染の免疫防御と自己免疫	臨床とウイルス	39(1)	3-9	2011
Shide K, Shimoda K, et al.	R723, a selective JAK2 inhibitor, effectively treats JAK2V617F-induced	Blood	117	6866-6875	2011
Ishizaki M, Shimoda M, Shimoda K, et al.	Involvement of Tyk2 in both the IL-12/ Th1 and IL-23/Th17 axis in vivo.	J Immunol	187(1)	181-189	2011
Ishizaki M, Muromoto T, Shimoda K, et al.	Tyk2 deficiency protects joints against destruction in anti-type II collagen antibody-induced arthritis in mice.	Int Immunol	23(9)	575-582	2011
Nagafuchi S, Kurisaki H, Katsuta H.	Encephalomyocarditis virus	Diabetes and Viruses	Chapter 5		in press

Rituximab, B-Lymphocyte Depletion, and Beta-Cell Function

TO THE EDITOR: Pescovitz et al. (Nov. 26 issue)¹ reported that the use of B-lymphocyte depletion therapy with rituximab was effective in preserving beta-cell function in patients with newly diagnosed type 1 diabetes who did not have severe infections. B cells may play a role in preventing infection in vivo by taking up a specific pathogen when it enters the bloodstream. This event is followed by the presentation of the specific antigen to T cells, which increases the level of T-cell response to better control overwhelming infection; this sequence of events does not occur in response to local infections. In addition, since studies of B-cell knockout in autoimmune mice with diabetes have shown that T-cell response to islet cells (insulinitis) is minimal, even in the presence of efforts to prevent the development of diabetes,^{2,3} it follows that the cessation of rituximab therapy may induce autoreactive T cells to attack pancreatic beta cells. Thus, it is important to watch for the complications of severe infections^{4,5} and, in the long-term, for appropriate beta-cell function when using rituximab in the treatment of patients with newly diagnosed type 1 diabetes.

Seiho Nagafuchi, M.D., Ph.D.

Hitoshi Katsuta, M.D., Ph.D.

Kyushu University
Fukuoka, Japan
nagafuchi@shs.kyushu-u.ac.jp

Keizo Anzai, M.D., Ph.D.

Saga University
Saga, Japan

No potential conflict of interest relevant to this letter was reported.

1. Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Krause-Steinrauf H, et al. Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *N Engl J Med* 2009;361:2143-52.
2. Akashi T, Nagafuchi S, Anzai K, et al. Direct evidence for the contribution of B cells to the progression of insulinitis and the development of diabetes in non-obese diabetic mice. *Int Immunol* 1997;9:1159-64.
3. Kondo S, Iwata I, Anzai K, et al. Suppression of insulinitis and diabetes in B cell-deficient mice treated with streptozocin: B cells

are essential for TCR clonotype spreading of islet-infiltrating T cells. *Int Immunol* 2000;12:1075-83.

4. Barnadas MA, Roe E, Brunet S, et al. Therapy of paraneoplastic pemphigus with rituximab: a case report and review of literature. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2006;20:69-74.

5. Lutt JR, Pisculli ML, Weinblatt ME, Deodhar A, Winthrop KL. Severe nontuberculous mycobacterial infection in 2 patients receiving rituximab for refractory myositis. *J Rheumatol* 2008;35:1683-6.

THE AUTHORS REPLY: We agree with Nagafuchi and colleagues that when patients with newly diagnosed diabetes are treated with rituximab, long-term follow-up is essential to rule out increased rates of infection and other adverse events. We acknowledged the long-term risk of unknown adverse events in our article and for this reason recommended that the use of such therapy should be limited to carefully controlled studies. Although the potential for an augmented response at the time of reconstitution is reasonable, such an event did not occur in models of nonobese mice with diabetes that were given anti-CD20 treatment.^{1,2} Furthermore, we found that the rate of C-peptide loss did not accelerate with recovery of B cells between 6 months and 1 year into our study. Consequently, such a concern was not supported by experimental evidence.

Mark D. Pescovitz, M.D.

Indiana University
Indianapolis, IN
mpescov@iupui.edu

Jay S. Skyler, M.D.

University of Miami
Miami, FL

Since publication of their article, the authors report no further potential conflict of interest.

1. Xiu Y, Wong CP, Bouaziz JD, et al. B lymphocyte depletion by CD20 monoclonal antibody prevents diabetes in nonobese diabetic mice despite isotype-specific differences in Fc gamma R effector functions. *J Immunol* 2008;180:2863-75.
2. Hu CY, Rodriguez-Pinto D, Du W, et al. Treatment with CD20-specific antibody prevents and reverses autoimmune diabetes in mice. *J Clin Invest* 2007;117:3857-67.

Different effects of islet transplantation and Detemir treatment on the reversal of streptozotocin-induced diabetes associated with β -cell regeneration

Akari Inada · Oogi Inada · Hiroshi Fujii ·
Tomoyuki Akashi · Katsuo Sueishi ·
Atsushi Fukatsu · Seiho Nagafuchi

Received: 7 June 2010 / Accepted: 23 August 2010 / Published online: 2 November 2010
© The Japan Diabetes Society 2010

Abstract Here we examined whether new β -cell formation occurs when β cells face being severely destroyed and hyperglycemia is restored. Animals were made diabetic by a single i.p. injection of a high dose of streptozotocin, and blood glucose levels were kept in the normal range with twice-daily Detemir (long-acting human insulin analog) injection or islet transplantation for 10 weeks. Although Detemir injection could effectively reverse hyperglycemia

and glycemic control was successful, there was no β -cell increase, new formation, or recovery of islet morphology in Detemir-treated mice. In contrast, β -cell regeneration was restored when hyperglycemia was reversed by islet transplantation. The number of β cells and islets was increased, and islet structure was greatly recovered. We further evaluated whether replication or new formation contributes to the recovery. Newly born β cells, as observed as scattered singlets-doublets of insulin-positive cells or clusters of less than 6 β cells across, were frequently seen in transplanted mice, suggesting that neogenesis of β cells was enhanced in transplanted mice. Ki67-positive islets were increased in transplanted mice, suggesting that β -cell proliferation is enhanced. Thus, this recovery involved both increased new formation and replication. Our results suggest that the effects of Detemir on pancreatic β cells were very different from those of islet transplantation and that islet transplantation could be a trigger for the induction of new formation and replication.

A. Inada (✉) · O. Inada
Section of Diabetes and Genes, Stem Cell Unit,
Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University,
3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan
e-mail: inadaa@bcell.med.kyushu-u.ac.jp

H. Fujii · K. Sueishi
Division of Pathophysiological and Experimental Pathology,
Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University,
Fukuoka, Japan

T. Akashi
Medical Shimada Hospital, Fukuoka, Japan

A. Fukatsu
Department of Nephrology, Graduate School of Medicine,
Kyoto University, Kyoto, Japan

S. Nagafuchi
Laboratory of Viral and Molecular Immunology of Diabetes,
Department of Medical Science and Technology, Graduate
School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Present Address:
K. Sueishi
National Hospital Organization Fukuoka-Higashi Medical
Center, Fukuoka, Japan

Keywords Islet regeneration · Diabetes · Islet transplantation · Organ injury

Introduction

Vigorous studies have shown that pancreatic β -cells have the ability to adapt to physiological changes. To maintain glycemic levels, β -cell number/mass increases for (1) the normal growth after birth with body growth; (2) increased demand to compensate, such as pregnancy, chronic glucose infusion, obesity, and response to insulin resistance; and (3) tissue injury [1–9]. For new β -cell formation, two pathways are thought to exist, the replication of existing β cells and neogenesis from precursors [10]. Neogenesis,

insulin-positive cells budding from the ducts, has been reported in the pancreas of obese humans [8, 9, 11], rodents [12–16], and injury animal models [10]. Replication is the major mechanism for expanding the β -cell mass in adult mice [3, 4, 7].

When β -cell mass is decreased by a disruption of balance between cell growth (replication and neogenesis) and cell death, glucose intolerance develops. Indeed, human studies have shown reduced β cells with increased α -cell proportions in the islets and remarkable heterogeneity of morphological changes of islets in patients with type 2 diabetes mellitus and suggest that insufficient β -cell mass could be the basis of the impaired insulin secretion [9, 17–19]. Since the expansion of β -cell mass in vivo is crucial in the regeneration-based therapy of diabetes, it is important to investigate the physiological conditions and mechanisms that promote β -cell increase and survival.

Previous studies have shown the slight improvement of insulin release and the only partial increase of β -cell ratio in the islet in weakly β -cell damaged rats using low doses of streptozotocin (STZ), when treated with short-term injection of lente insulin [20, 21] and islet transplantation [22]. However, little is known about whether new β -cell formation occurs when β cells face being severely destroyed and hyperglycemia was restored by the long-acting insulin injection or islet transplantation. In addition, it is not clear whether replication of the remaining β cells or neogenesis contributes to the recovery of β -cell formation.

We therefore investigated the ability of β cells to have new formation when hyperglycemia was prolonged in which residual β cells were severely destroyed by high doses of STZ (180 mg/kg) and when normoglycemia was achieved thereafter.

Materials and methods

Animals and animal groups

Male C57BL/6 mice aged 8 weeks (24.8 ± 0.5 g) ($n = 27$) had a single i.p. injection of STZ (180 mg/kg; Sigma), freshly dissolved in sterile citrate buffer (pH 4.5) or sterile citrate buffer (pH 4.5) alone, according to the Animal Models of Diabetic Complications Consortium (AMDCC) protocol. Blood glucose levels were measured by an enzyme-electrode method with ONE TOUCH UltraVue (Johnson & Johnson K.K.) on whole blood taken from the tail vein. Only those mice with a blood glucose concentration greater than 400 mg/dl within 3 days were used as diabetics in the experiments. One week after STZ injection, the diabetic mice were then divided into three groups (STZ 1 week group, hyperglycemic STZ 8 weeks

group, and transplanted group). STZ 1 week mice ($n = 4$) were killed 1 week after STZ injection to confirm the destruction of β cells. STZ 8 weeks mice ($n = 17$) sustained hyperglycemia and were killed after 8 weeks. Mice in the transplanted group ($n = 6$) received islet transplantation under the left kidney capsule, which sustained normoglycemia throughout the 8-week course of the experiment. Weight-matched 8-week-old male C57BL/6 mice were used as donors and recipients of islet grafts. For insulin injection study, animals ($n = 10$) were made diabetic by a single i.p. injection of the same dose of STZ (180 mg/kg). On days 3 and 7 after STZ injection, fed plasma glucose levels were measured, and the diabetic mice (22.1 ± 1.2 g) received twice-daily injections of the long-acting human analog, Detemir (NN304) [LysB29 (N^{ϵ} -tetradecanoyl) des (B30) insulin human] (1/10–1/50 U; Novo Nordisk) for 10 weeks. Detemir is designed to have a prolonged duration of action and provide a constant basal insulin supply due to its unique primary structure and mechanisms of reversible binding to plasma albumin and injection site [23–26]. The type and concentration of insulin were selected based on trial series such that the blood glucose level was in the normal range about 8–12 h/injection. Animals that kept normal blood glucose levels during the study were analyzed (Detemir injected group). Mice were housed in microisolator cages in a temperature-controlled room at $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and at $50 \pm 10\%$ relative humidity under 12-h light/dark cycle. Standard rodent diet (CE-2; CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan) and water were supplied ad libitum. All animal experiments were approved by the Animal Care and Use Committee of Kyushu University, and mice were handled in accordance with guidelines for Animal experiments of Kyushu University.

Islet isolation and islet transplantation

Islet isolation and transplantation was performed as previously described in detail [27]. Islets were isolated by collagenase digestion, followed by separation on Ficoll gradients. After washing, 500 islets were handpicked and transplanted under the kidney capsule immediately. Implantation of islets was performed 1 week after STZ injection to STZ diabetic mice.

Histological study

Pancreases, kidney, and livers were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, and cut in serial sections (2 μm). Kidney sections were stained with periodic acid-Schiff (PAS) and periodic acid-methenamine silver (PASM). Liver and pancreas sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) using standard histological procedures.

Immunohistochemistry

The following primary antibodies were used: anti-glucagon (1:500; Linco Research Inc.) and anti-insulin (1:500; DAKO), and Ki67 (1:1000; BD Pharmingen). Primary antibody was incubated overnight at 4°C and detected by immunofluorescence labeling with Alexa 488 or Alexa 568-conjugated secondary antibodies (1:200; Molecular Probes) or by immunoperoxidase with biotin-labeled secondary antibody (1:800; Vector Laboratories). Staining was visualized with diaminobenzidine. The sections were counterstained with hematoxylin. For proliferation studies, pancreatic sections (3–7 sections/animal) were double immunostained for insulin and Ki67. Images of all insulin-positive cells were captured on a Zeiss LSM 510 META confocal microscope in the confocal mode and were evaluated for expression of the cell cycle marker Ki67.

Measurements of serum variables

Blood was obtained from the heart immediately before isolation of the organs under pentobarbital anesthesia. Serum parameters were determined using the following methods: creatinine (high performance liquid chromatography; HPLC), albumin (BCG method), BUN (urease UV method), aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT) (JSCC). Serum insulin was determined by enzyme-linked immunosorbent assay kit (Morinaga Institute of Biological Science, Yokohama, Japan). Total serum cholesterol (enzymatic assays) was determined by enzymatic assays (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Japan).

Quantification of β cells and α cells

All islets, glucagon-positive, and insulin-positive cells on one full footprint section were photographed on the Keyence Biorevo microscope; 4–7 sections/animal at least 150 μ m apart were evaluated. Each section was evaluated in pairs to match the quantification. Unpaired two-tailed Student's test was used for statistics. Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). A *P* value of less than 0.05 was considered significant.

Results

STZ diabetic animals and treatment 1 (Detemir injection)

We examined the β -cell ability to increase when normoglycemia was achieved by injections of long-acting human insulin analog (Detemir). Animals were made diabetic by a

single i.p. injection of the same dose of STZ (180 mg/kg body weight). It is known that STZ causes the preferential death of pancreatic β cells by its uptake in these cells via the GLUT-2 glucose transporter [28–30]. On days 3 and 7 after STZ injection, fed plasma glucose levels were measured to confirm hyperglycemia (>400 mg/dl within 3 days). After 1 week, the diabetic mice started receiving Detemir injections. Blood glucose levels were kept in normal range with twice-daily Detemir for 10 weeks (Fig. 1a). Blood glucose levels vary enormously along with Detemir injection, but twice-daily Detemir provided stable glycemic control during daytime (Fig. 1b). Seven days after STZ injection, animals showed slight loss of body weight, but at the time they were killed their body weight was not significantly different from that of the control mice (Fig. 2f).

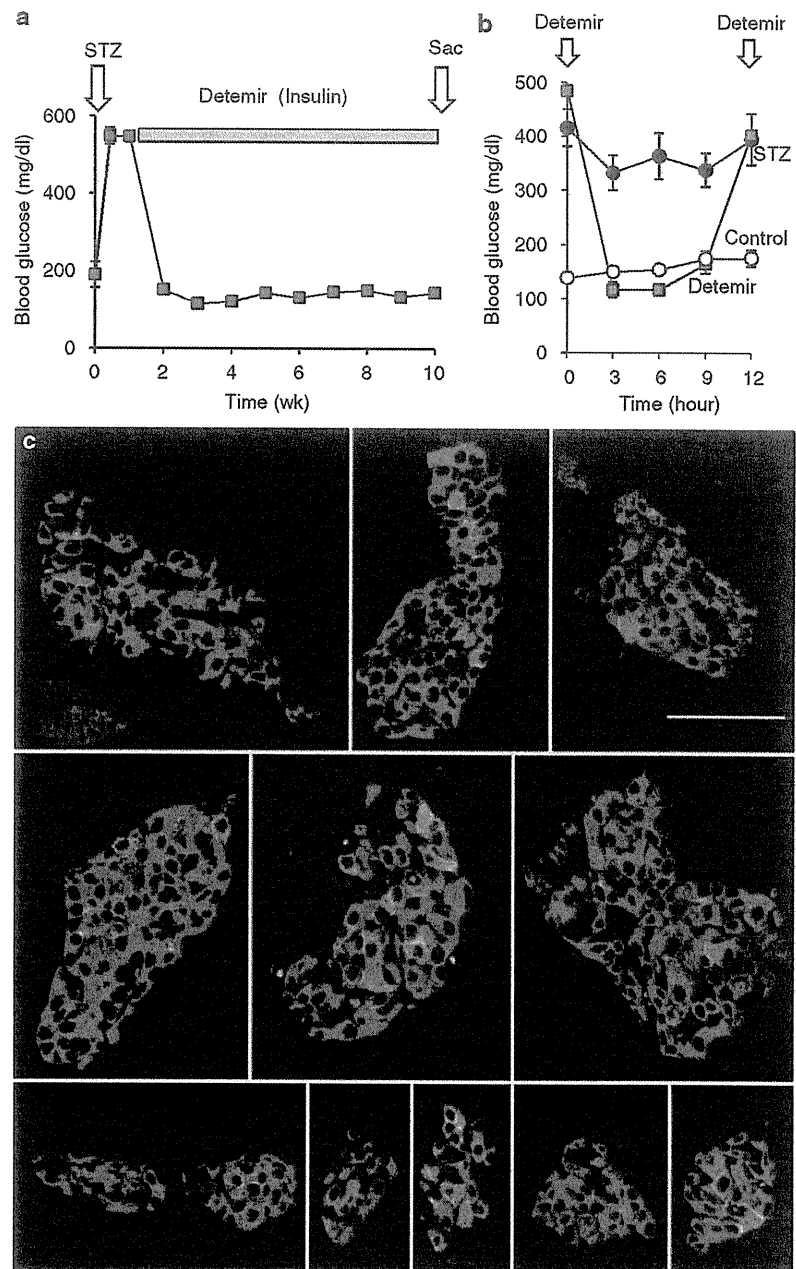
To assess the changes in islet morphology, pancreatic sections were immunostained for insulin and glucagon. As shown in the multiple pictures (Fig. 1c), islets were severely disorganized; there were few β cells (green) and an increased proportion of α cells (red). This pattern did not differ with animals, indicating that β -cell mass and islet morphology were not recovered by Detemir injection.

STZ diabetic animals and treatment 2 (islet transplantation)

We then examined the β -cell ability to increase when normoglycemia was achieved by islet transplantation. Animals were made diabetic by a single i.p. injection of a high dose of STZ (180 mg/kg body weight). In this experiment, only those mice with hyperglycemia (>400 mg/dL) within 3 days were used. 1 week after STZ injection, these diabetic animals were divided into three groups, the hyperglycemic STZ 1 week group, hyperglycemic STZ 8 weeks group, and transplant group (Fig. 2a). The control group receiving citrate buffer alone was used as a positive control. For the transplant group, freshly isolated 500 islets were transplanted under kidney capsules (Fig. 2b).

Initially we investigated the effect of STZ on mice. Severe β -cell destruction (almost total absence of β cells) was determined by immunostaining for insulin and glucagon in STZ 1 week mice (Fig. 2c). There are few β cells (green) left with an increased proportion of α cells (red) in islets. Blood glucose levels were elevated after STZ injection and remained high during the study in STZ 8 weeks mice (Fig. 2d). The plasma insulin levels were considerably decreased, and body weight was markedly reduced in STZ 8 weeks mice (Fig. 2e, f). In STZ 8 weeks mice, similarly to STZ 1 week mice, there are few insulin-positive cells (green) left in islets, and reduced β cells remained throughout the 8-week course of the experiment

Fig. 1 Effect of Detemir injection. **a** Blood glucose levels in Detemir-injected mice. Animals were made diabetic by high doses of STZ (180 mg/kg body weight). On days 3 and 7 after STZ injection, fed plasma glucose levels were measured. Blood glucose levels of diabetic animals were kept in normal range with twice-daily injection for 10 weeks ($n = 6$). Glycemic control was stable, which is comparable to islet transplantation. **b** Glycemic excursion during daytime. Blood glucose levels of Detemir-injected mice ($n = 6$), STZ-treated mice ($n = 10$) and WT mice ($n = 10$) (from 9:30 a.m. to 9:30 p.m.). **c** No β -cell increase by Detemir treatment. Dual staining of insulin (*green*) and glucagon (*red*) was analyzed by confocal microscopy. All islets, small or large, were severely disorganized; this pattern did not differ with animals. Scale bar 50 μ m

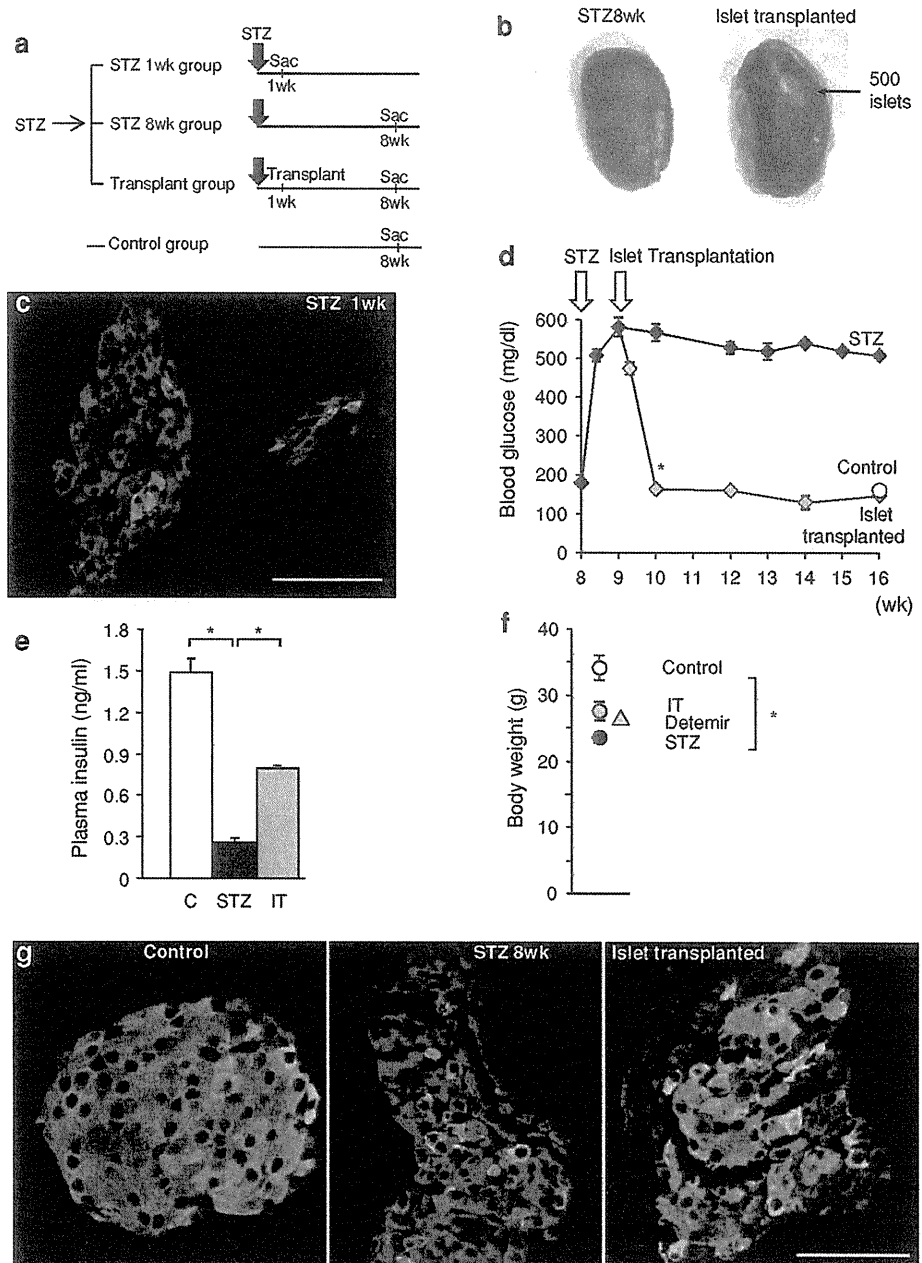


(Fig. 2g). The islets appeared severely disorganized with an increased proportion of glucagon-positive cells (Figs. 2g, 3), showing no β -cell increase in sustained hyperglycemia. Thus, the STZ mice displayed typical features of insulin deficiency, including loss of β cells and body weight, and low insulin content. In contrast, in transplanted mice, blood glucose levels were completely normalized and exhibited similar glycemic excursion to that of controls (Fig. 2d). The plasma insulin levels

and body weight were increased after transplantation (Fig. 2e, f).

Furthermore, islet structure was greatly recovered (Figs. 2g, 3). The typical islet morphology of the core of insulin-positive cells with a mantle of glucagon-positive cells as seen in controls was found; this pattern did not differ with animals. Scattered singlets-doublets of insulin-positive cells were frequently observed in transplanted mice.

Fig. 2 Animal groups and effect of islet transplantation. **a** One week after STZ injection, animals made diabetic by a high dose of STZ (180 mg/kg body weight) were divided into three groups, STZ 1 week group ($n = 4$), STZ 8 weeks group ($n = 17$), and transplant group ($n = 6$). Control animals ($n = 4$). **b** A photograph of kidneys from mice with or without islet transplantation 8 weeks after a single i.p. STZ injection (180 mg/kg body weight). Freshly isolated 500 islets were transplanted under the kidney capsule (*arrow*). **c** Severely disorganized islets by STZ. Dual staining of pancreatic sections at 1 week after STZ injection with anti-insulin and anti-glucagon antibody was analyzed by confocal microscopy. There are few insulin-positive cells (*green*) left with an increased proportion of glucagon-positive cells (*red*). Scale bar 50 μ m. Fed blood glucose levels (**d**), plasma insulin (**e**), body weight (**f**) of mice with or without transplantation at 16 weeks of age. **d** * $P < 0.05$ versus STZ 8 weeks mice. **g** No β -cell increase in sustained hyperglycemia in STZ 8 weeks mice and β -cell increase by islet transplantation. Dual staining of insulin (*green*) and glucagon (*red*) was analyzed by confocal microscopy. Scale bar 50 μ m. Results are expressed as mean \pm SEM. STZ-diabetic group (*black*), islet transplanted (IT) group (*gray*), control group (*white*). * $P < 0.05$

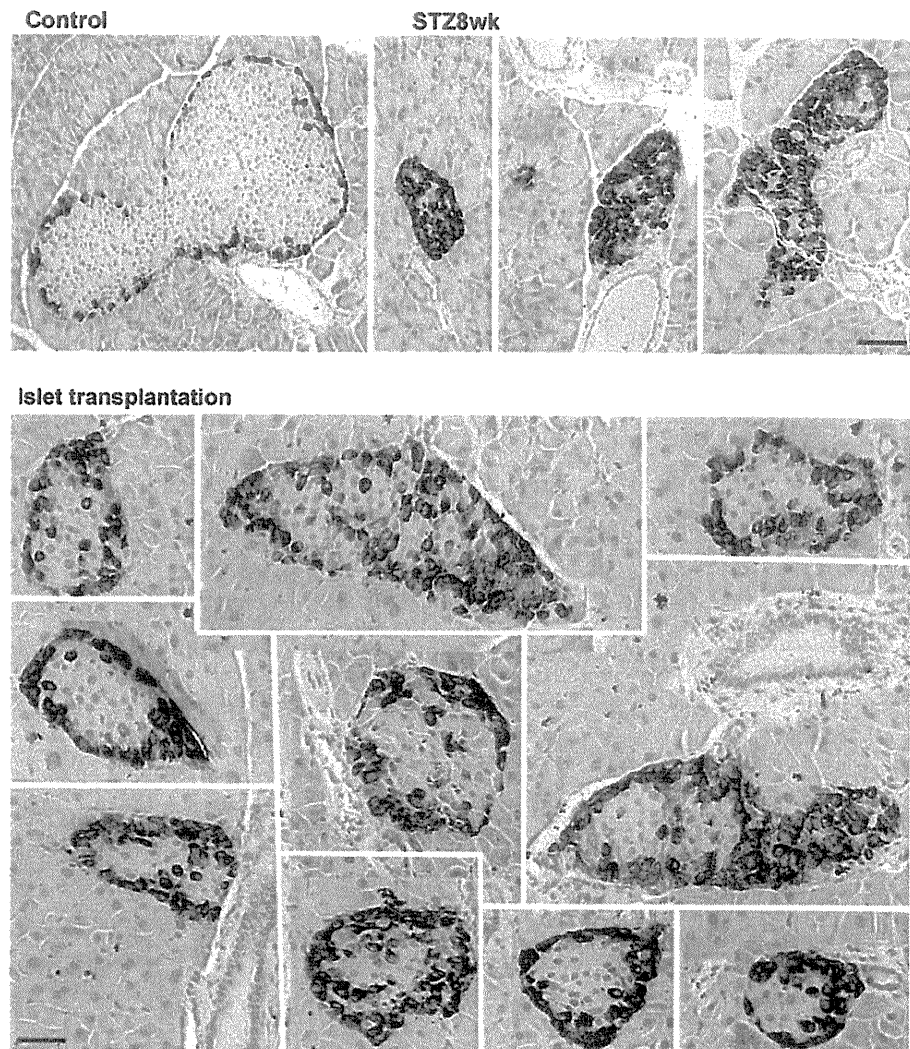


β -cell increase in the transplanted animals

To evaluate the β -cell increase, all insulin-positive cells on the cross section were photographed and counted. Compared to STZ 8 weeks mice, total β cells in the cross-section were increased in transplanted mice (Fig. 4a). Dividing by islet size, only small islets (6–20 β cells in the islet) were observed in the STZ mice group, while in islet transplanted mice, not only small islets but also many larger islets (21–100 and over 100 β cells)

were found (Fig. 4b). To determine the changes of proportion of islets, all islets (collection of insulin-positive cells at least 6 cells in cross section) on the cross section were photographed, and the number of α cells and β cells in the islet were analyzed (Fig. 4c). In STZ 8 weeks mice, the ratio of β cells in the islet was reduced, and most of cells in the islet were α cells. These morphological abnormalities were not changed in hyperglycemia. In contrast, in transplanted mice, the ratio of β cells was recovered, as seen in control mice (Fig. 4c), indicating

Fig. 3 The changes in the islet morphology. In STZ-diabetic mice, islets appear severely disorganized with a significantly increased proportion of glucagon-positive cells (*brown*). In contrast, islet morphology is greatly recovered and the typical islet morphology of the core of β cells is seen with a mantle of α cells in islet-transplanted mice. Scale bar 100 μ m



that these changes are a direct result of the increased β cells due to normoglycemia.

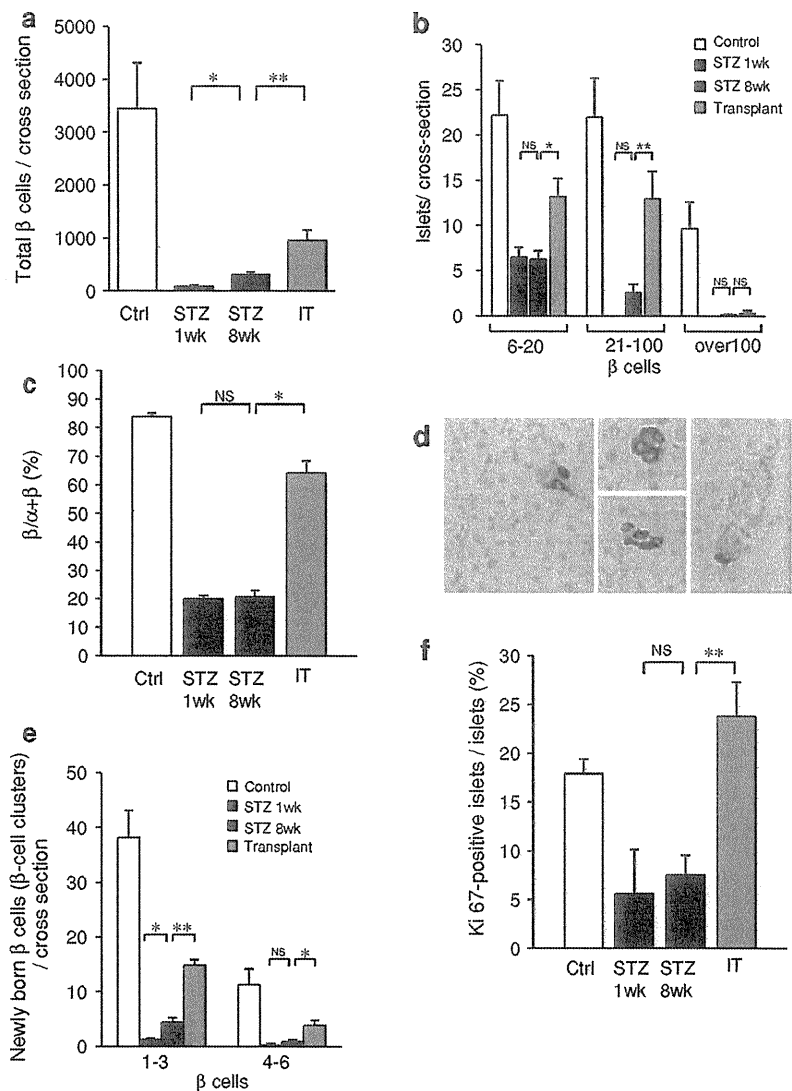
Since the β cell increases through neogenesis and proliferation, these determinants of β -cell increase were examined. Because pre-existing β cells were destroyed almost completely with STZ as shown in Fig. 2c, g, newly born β cells and old β cells left in the islet with many α cells are morphologically distinguishable. Newly born β cells, as observed as scattered singlets-doublers of insulin-positive cells or clusters less than 6 β cells across, were frequently seen in transplanted mice (Fig. 4d). Dividing by β cell number (1–3 and 4–6 β cells), both small β -cell clusters were increased in transplanted mice (Fig. 4e), suggesting that neogenesis of β cells was enhanced in transplanted mice. Furthermore, using dual staining of insulin and Ki67, a marker for β -cell proliferation, we

found that Ki67-positive islets were increased in transplanted mice (Fig. 4f), suggesting that β -cell proliferation is enhanced in normoglycemia.

Acute damages in the liver and kidney

Since STZ induces cytotoxicity in multiple organs, including liver and kidney [31–36], we finally examined the recovery from these toxicities in the liver and kidney from both the Detemir injected group and islet transplanted group. After 8 weeks, STZ 8 weeks mice showed dyslipidemia (Table 1), but both treatments significantly reduced the elevated total cholesterol. Liver weight/body weight and AST/ALT levels were significantly higher in STZ 8 weeks and Detemir injected mice, but normalized in transplanted mice (Table 1). The liver section also showed hepatic steatosis

Fig. 4 Quantification of β cells. **a** All insulin-positive cells on the cross section were photographed and counted; 4–7 sections/animal at least 150 μ m apart were evaluated. **b** Islets were divided by their size (6–20, 21–100, and over 100 β cells in the islet). In transplanted mice, not only small islets but also larger islets were found. **c** The changes of proportion of islets. All insulin-positive and glucagon-positive cells were counted as above. **d** Newly formed β cells. Scattered singlets-douplets of insulin-positive cells or clusters less than 6 β cells across were frequently seen in transplanted mice. Because pre-existing β cells were destroyed almost completely with STZ, newly born β cells and old β cells left in the islet with many α cells are morphologically distinguishable. **e** Quantification of newly born β cells (1–6 β -cell clusters cross section). Newly born β cells were divided by their size (1–3, 4–6 β cells). **f** Quantification of Ki67-positive islets/total islets. Pancreatic sections were double immunostained for insulin and Ki67, a marker for cell proliferation; 3–7 sections/animal 150 μ m apart were evaluated. Results are expressed as mean \pm SEM. STZ diabetic group (black), islet transplanted (IT) group (gray), control mice (white)



(Fig. 5). The severity of degenerative changes was lessened by islet transplantation in the islet-transplanted mice compared to the STZ mice (Fig. 5).

Renal hypertrophy, which is expressed as the ratio of the combined weight of the two kidneys to body weight, was prominent in STZ mice (Table 2). Histologically, glomerular hypertrophy, the characteristic phenomenon of diabetes, was prominent, and glomerular size in the superficial cortex is small in STZ mice (data not shown). BUN was also significantly high in STZ mice. These acute damages of renal function were restored in transplanted mice, but not in Detemir-injected mice (Table 2). There was no significant difference in serum creatinine and serum albumin among the three groups, STZ, transplanted, and Detemir-injected mice.

Table 1 The liver toxicity by STZ

Group	Liver weight/body weight ($\times 10^2$)	AST/ALT	Total cholesterol (mg/dl)
STZ	7.0 \pm 0.39*	4.7 \pm 1.1*	152.8 \pm 11.2*
Insulin (Detemir)	6.4 \pm 0.10*	3.8 \pm 0.3*	108.0 \pm 1.7
Islet transplant	4.3 \pm 0.04	1.6 \pm 0.01	106.9 \pm 8.2
Control	4.5 \pm 0.02	1.9 \pm 0.2	108.8 \pm 4.3

* $P < 0.05$ versus control

Discussion

In this study, we examined whether new β -cell formation occurs when β cells face being severely destroyed and hyperglycemia was restored with two different methods.