

# 第 1 型糖尿病 ( Type 1 diabetes mellitus ) 治療的新展望

蔡東華 張恬君 \* 莊立民 \*

彰化基督教醫院 內科部內分泌暨新陳代謝科  
國立臺灣大學醫學院附設醫院 內科部新陳代謝科 \*

## 摘 要

典型的第 1 型糖尿病乃因自體免疫破壞胰島  $\beta$ -細胞的一種疾病，僅僅靠胰島素注射治療並不能達良好的控制而預防諸多慢性併發症的發生。胰島素分泌組織的移植，使得對第 1 型糖尿病患的血糖控制有令人鼓舞的期待；但不論是胰臟或胰島細胞的移植都得面臨手術之併發症及需長期服用免疫抑制劑之副作用，而胰島細胞移植的成功率尚面臨考驗。因此，細胞及基因治療亦將成爲未來研究發展的焦點，以取代第 1 型糖尿病患之多次胰島素注射治療的方法，使糖尿病的治療更趨理想之境界。

**關鍵詞：**多重幹細胞 ( Pluripotent stem cells )

**轉錄因子 ( Transcription factors )**

**胰 - 十二指腸同源區蛋白質 ( PDX-1 )**

**前胰島素轉化酵素 ( Proinsulin convertase )**

## 前言

典型的第 1 型糖尿病患 ( Type 1a ) 由於自體免疫破壞胰島  $\beta$ -細胞，導致胰島素的缺乏，使得終生需賴胰島素的注射治療維生。目前雖有多種不同胰島素注射療法，使血糖可以得到良好的控制，但僅僅靠胰島素治療並不能達到理想的控制而預防視網膜、腎臟、神

經以及心臟、大血管病變的發生。 1993 年美國糖尿病控制及合併症試驗（ Diabetes Control and Complications Trial, DCCT）的研究顯示，經過嚴密的血糖控制（配戴胰島素幫浦（CSII），或一天三至四次，甚至更多次胰島素注射）能延緩第 1 型糖尿病患者慢性併發症的發生，併改善症狀延長壽命<sup>1</sup>，但卻無法治癒疾病本身，無法完全避免視網膜、腎臟及神經病變的發生；同時，嚴格的控制也相對提高了三倍嚴重低血糖發生的危險性，且對一些配合意願不高或無法配合的患者，也很難達成一天多次注射的要求。胰島素分泌組織的移植，將使得第 1 型糖尿病患對血糖控制的生理需求能獲得精確的調解。但不論是胰臟或胰島細胞的移植都面臨免疫排斥及自體免疫反應的問題。胰臟移植的成功率雖較高，但手術之併發症大<sup>2-4</sup>；而胰島細胞的移植尚面臨種種未能解決的問題，使得胰島細胞移植成功率偏低<sup>5-7</sup>。Cretin 等報告胰臟移植術後一年的存活率可高達 70% 以上；而胰島細胞移植術後一年可達正常基礎 C-peptide 值及改善血糖調節有 20%，但不需依賴胰島素者僅有 8%<sup>5</sup>。最近的文獻報告，雖無統計數字，胰島細胞移植都相當成功<sup>6-8</sup>。不過面對移植手術之併發症、需長期服用副作用大之免疫抑制劑<sup>2-5,9-11</sup>及胰島細胞移植的成功率尚待考驗情況下，於是近來有些專家學者將焦點轉移至細胞及基因治療上<sup>12</sup>。

## 體外幹細胞（stem cells）培養

在胚胎發育過程中，胰島發育始於一個未分化的前導細胞胰管上皮幹細胞，而後胰管上皮細胞迅速增生，分化成不同的內分泌細胞的族群。所以一般認為胰島內分泌細胞的分化源於同一胰管上皮細胞<sup>13</sup>。由於胰島細胞移植因供體不足、分離純化過程中胰島細胞的流失，不易取得足夠大量純化的胰島細胞，常為胰島細胞移植失敗的原因之一<sup>5,9,10,14,15</sup>，於是有些學者開始研究胰臟多重幹細胞作為替代來源。如同造血多重幹細胞具有更新血循環中血球細胞之能力，由人類胚胎細胞培養而得之多重幹細胞具有分化成各種細胞之能力

最近 Cornelius 等成功的從前糖尿病鼠 ( prediabetic mice ) 胰管分離出製造胰島之多重幹細胞，於體外培養分化成未成熟之功能性胰島狀細胞，且能表現低量胰島素分泌<sup>17</sup>。Soria 等的報告從鼠胚胎幹細胞分化而得之胰島素分泌細胞，能夠改善由 streptozotocin 所誘導之糖尿病鼠血糖的控制<sup>18</sup>。而 Ramiya 等由成年非肥胖型糖尿病鼠 ( non-obese diabetic mice, NOD ) 前糖尿病期 ( prediabetic ) 之胰管所分離出之多重幹細胞經體外培養分化，每個胰臟能產生之功能性胰島細胞增加約高達一萬倍。再將體外生長之胰島細胞植入糖尿病鼠 ( NOD ) 腎臟之囊下區，結果有植入體外培養之胰島細胞的老鼠血糖比對照組得到明顯的改善；而且未見植入之胰島細胞受到自體免疫的破壞<sup>19</sup>。此結果告訴我們經由多重幹細胞於體外培養分化出胰島細胞，雖然目前仍有一些問題尚待解決，但此技術對於無法取得足量的胰島細胞以供胰島細胞的移植，給了我們未來一個新的方向，同時也給了第 1 型糖尿病患另一種療法的新途徑。此外，由體外培養出胰島細胞，不受自體免疫排斥，更可減少使用免疫抑制劑所帶來之副作用。

在體內胰管上皮細胞要分化成不同的內分泌細胞的族群尚受許多因子影響，包括血管內皮生長因子<sup>20</sup> ( Vascular endothelial growth factor )、轉化生長因子- $\alpha$ <sup>13</sup> ( transforming growth factor- $\alpha$  )、肝細胞生長因子<sup>21</sup> ( hepatocyte growth factor )、再生基因-1<sup>22</sup> ( regenerating gene-1 )、胰島新生相關蛋白質<sup>23</sup> ( islet neogenesis-associated protein ) 等等。利用這些因子於體外胰島幹細胞培養，或許將可於體外製造更合適的胰島幹細胞培養環境，以分化成更適於移植之胰島細胞之質與量。

## 轉錄因子 ( Transcription factors )

胰臟蘭氏小島由四種不同內分泌細胞包括  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$  及 pp 所組成，分別製造荷爾蒙

glucagon、insulin、somatostatin 及 pancreatic polypeptide。胰島細胞的成長包含二部份：(1) 原先存在之  $\beta$ -細胞的增生或複製，(2) 胰管上皮細胞分化胰島的新生<sup>13</sup>。最近研究顯示，一開始內分泌細胞能表現多種荷爾蒙，而後發育逐漸侷限於單一荷爾蒙的表現。故在胰管上皮細胞分化這過程中需一些特殊的轉錄因子來加以調解，包括螺旋 - 環 - 螺旋 (helix-loop-helix) 及同源轉換區 (homeodomain) 蛋白質<sup>24,25</sup>。其中辨識同源轉換區轉錄因子胰 - 十二指腸同源區蛋白質 (PDX-1, 又稱 IPF-1、IDX-1、STF-1 或 IUF-1) 為胰島素基因轉錄最重要的調解因子<sup>26-28</sup>，在胰臟內分泌細胞發育中扮有決定性角色。PDX-1 表現於胰臟發育早期鼠胚第 8.5 天<sup>27</sup>，在發育晚期而後逐漸侷限於成熟胰島製造細胞  $\beta$ -細胞及一部份  $\delta$ -細胞<sup>29</sup>。在胰島表現蛋白的許多基因之啓動子，能活化胰島素基因轉錄，及調節多樣的胰島內分泌細胞基因的表現，包括 insulin<sup>28</sup>、somatostatin<sup>30</sup>、glucokinase<sup>31</sup>、glucose transporter 2 (Glu t2)<sup>32</sup> 及 islet amyloid polypeptide<sup>33</sup>。PDX-1 表現於幾乎所有發育早期的胰臟上皮細胞，所以被認為扮演控制胰臟發育之主要基因。實驗證實若將 PDX-1 因子在發育早期破壞或去除，將導致無胰臟之鼠的產生<sup>34,35</sup>。同樣的，若 PDX-1 產生基因突變，亦導致人類的胰臟發育不全，進而影響血糖的控制<sup>36-38</sup>。

其它轉錄因子如 BETA2/Neuro D 及 neurogenin 3 (ngn3, 同樣均為基本螺旋 - 環 - 螺旋之蛋白質) 皆表現於胰臟胚胎發育早期，ngn3 扮有誘導 BETA2 表現的角色<sup>25</sup>，兩者對胰島素基因轉錄及早期胰內分泌細胞的發育佔有相當重要的角色<sup>39</sup>。如缺乏 BETA 2/Neuro D 及 Neurogenin 3，則老鼠將因無法產生任何胰內分泌細胞，而於產後死於糖尿病<sup>25,39</sup>。

此外尚有 IB 1、Isl 1、Pax 6、Pax 4、Nkx 2.2、Nkx 6.1、Hlx 9 以及正在研究或尚未被發現之轉錄因子<sup>25,40</sup>，這些基因分別在胰島內分泌細胞的增生、分化及型態的表現分別扮有重要的角色。對這些基因的進一步瞭解，將有助於糖尿病治療的發展。

## 肝細胞轉換成 $\beta$ - 細胞

第 1 型糖尿病患治療的方法，除了胰島素注射外，目前的焦點似乎集中於胰臟或胰島細胞的移植上。最近研究顯示，糖尿病患  $\beta$  - 細胞替代物的誘導以取代已受損之胰島細胞功能，也是另一種值得探討的治療方法<sup>10</sup>。眾所周知，肝臟具高度再生能力，佔有比例功能性原細胞。肝原細胞具多重潛力，保有分化成肝細胞之能力，因此肝臟乃為第 1 型糖尿病患提供了一個胰臟外胰島素合成的最佳靶器官。

糖尿病患治療理想的細胞替代物需具有與 $\beta$ -細胞相同的特性：感應葡萄糖之構造，有效的轉換前胰島素成為胰島素，有效的調節胰島素的分泌以對血中葡萄糖或其他物質加以反應。然而到目前為止非胰島素細胞並無轉換前胰島素（proinsulin）成血中胰島素以足以應付代謝所需之能力。肝細胞仍缺乏轉換活性弱之前胰島素成為成熟荷爾蒙所需之前胰島素轉化酵素（proinsulin convertase, PC），且肝細胞也缺乏分泌機制的調節。

Woo 等以反轉錄病毒（Retrovirus）基因治療在肝臟中表現前胰島素，結果被轉導之肝細胞可以合成前胰島素，其胰島素活性雖足以抑制大量肝醣的分解，三酸甘油脂的積聚，及肝中酮酸的形成，但仍無法改善血糖的控制<sup>41</sup>。

Mitanchez 等以轉殖基因鼠（transgenic mice）來表現人類肝之前胰島素 cDNA 或突變的前胰島素 cDNA，結果雖然突變的前胰島素能被有效的轉換成胰島素，但肝細胞轉殖基因表現人類胰島素卻被內生性之胰島素所抑制<sup>42</sup>。於是為改善轉殖基因之轉錄的控制，及肝細胞前胰島素被有效的轉換成胰島素，焦點集中於肝細胞調控胰島素分泌的整組基因加以轉移。

Ferber 等利用重組腺病毒調控將胰島素之轉錄因子 PDX-1 轉移至 BALB/C 及 C57BL/6 鼠肝細胞中，PDX-1 促進胰島素基因表現，使肝細胞分泌胰島素。雖然量遠低於胰臟的

分泌，不過在血清中所測得胰島素之免疫活性已為控制組的三倍，且能改善由 streptozotocin 誘導所產生之糖尿病鼠的高血糖<sup>12</sup>。以含 PDX-1 的腺病毒 vector 靜脈注射老鼠，約 60% 的肝細胞能合成 PDX-1。在肝中俱免疫活性之胰島素增加 25 倍，其中 59% 為完全處理之胰島素，41% 為前胰島素，可能是因前胰島素轉化酵素 PC1 及 PC3 在肝細胞被誘導。在血清中俱免疫活性之胰島素則增加 3 倍<sup>43</sup>。PDX-1 在一些肝細胞的表現為活化內在前胰島素基因之表現但未具轉換荷爾蒙的分泌，小於 1% 之肝細胞發生更顯著轉分化成  $\beta$  - 細胞外表型，誘導 PC1 及 PC3，使前胰島素完全轉換及荷爾蒙儲存。

是否有肝細胞次族群受外來 PDX-1 之誘導，使肝細胞發育發生轉變，目前仍不清楚。不過要製造一個新的  $\beta$  - 細胞是非常複雜不易的，此種轉分化肝細胞技術提供了一個擴充  $\beta$  - 細胞表現型至自體的胰臟外組織取代功能受損之胰島細胞的途徑。糖尿病患治療的方法，除了胰島素注射外，焦點不應只集中於胰臟或胰島細胞的移植上，自身肝細胞轉分化成分泌胰島素的  $\beta$  - 細胞，可免去移植及免疫抑制劑之副作用也值得努力。

## 結論

要取代第 1 型糖尿病患之多次胰島素注射治療，藉由植入分泌胰島素的裝置或細胞來調解血糖，在不久的未來是一個重大的挑戰。動物研究實驗告訴我們，基因治療可應用於許多的代謝疾病，第 1 型糖尿病為胰島素的缺乏，故也被認為基因治療對象之一。對胰臟胚胎發育過程的瞭解，及經由基因的研究對胰島細胞轉錄因子功能更深一層的認識，未來可預期胰島多重幹細胞的培養分化，及自身細胞轉分化成分泌胰島素的  $\beta$  - 細胞，作為細胞取代治療，將取代第 1 型糖尿病患之多次胰島素注射甚或移植手術，成為糖尿病治療的主流，使糖尿病的治療更趨理想之境界。

## 參考文獻

1. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-86.
2. Alberti KGMM, Zimmet P, DeFronzo RA, Keen H: *International Textbook of Diabetes Mellitus*. 2nd ed. John Wiley and Sons. 1997; 981-90.
3. Luzi L: Pancreas transplantation and Diabetic complications. *N Engl J Med* 1998; 339: 115-7.
4. Sutherland DE, Gruessner AC, Gruessner RW: Pancreas transplantation: a review. *Transplant Proc* 1998 Aug; 30(5): 1940-3
5. Cretin N, Buhler L, Fournier B, et al: Human islet allotransplantation: world experience and current status. *Dig Surg* 1998; 15(6): 656-62.
6. Shapiro AMJ, Lakey JRT, Ryan E, et al: Metabolic control after insulin independence in solitary islet transplantation for type 1 diabetes mellitus. *Diabetes* 2000; 49 (suppl 1): A31.
7. Ferreira JV, Alejandro R, Kenyon NS, et al: Nine year islet allograft function in p'ts with type 1 DM. *Diabetes* 2000; 49 (suppl 1): A31.
8. Robertson RP, Kendall DM, Sutherland DER, Lanz KJ: Prevention of diabetes for up to 13 years by autoislet transplantation after pancreatectomy for chronic pancreatitis.

Diabetes 2000; 49 (suppl 1): A31.

9. 莊峻鎧: 以胰臟與胰島移植治療第 1 型糖尿病的現況與展望. *Endocrinol Diabetol* 2000; 13(2): 19-23.
10. Kenyon NS, Ranuncoli A, Masetti M, Chatzipetrou M, Ricordi C: Islet transplantation: present and future perspectives. *Diabetes Metab Rev* 1998 Dec; 14(4): 303-13.
11. Stratta RJ: Immunosuppression in pancreas transplantation: progress, problems and perspective. *Transpl Immunol* 1998 Jun; 6(2): 69-77.
12. Ferber S, Halkin A, Cohen H, et al: Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Med* 2000 May; 6(5): 568-72.
13. Bonner-Weir S, Smith FE: Islet cell growth and the growth factors involved. *Trends Endocrinol Metab* 1994; 5: 60-4.
14. Rosenberg L, Wang R, Paraskeras S, Maysinger D: Structural and functional changes resulting from islet isolation lead to islet cell death. *Surgery* 1999 Aug; 126(2): 393-8.
15. Paraskeras S, Maysinger D, Wang R, Duguid TP, Rosenberg L: Cell loss in isolated human islets occurs by apoptosis. *Pancreas* 2000 Apr; 20(3): 270-6.
16. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998 Nov 6; 282 (5391): 1145-7.



17. Cornelius JG, Tchernev V, Kao K-J & Peck AB: In vitro generation of islets in long-term cultures of pluripotent stem cells from adult mouse pancreas. *Hum Metab Res* 1997; 29: 271-7.
18. Soria B et al: Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 2000; 49: 157-61.
19. Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB, Cornelius JG: Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med* 2000 Mar; 6(3): 278-82.
20. Rooman I, Schuit F, Bouwens L: Effect of vascular endothelial growth factor on growth and differentiation of pancreatic ductal epithelium. *Lab Invest* 1997; 76: 225-32.
21. Nakano M, Yasunami Y, Maki T, et al: Hepatocyte growth factor is essential for amelioration of hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice receiving a marginal mass of intrahepatic islet grafts. *Transplantation* 2000 Jan 27; 69: 214-21.
22. Wang TC, et al: Pancreatic gastrin stimulates islet differentiation of transforming growth factor alpha-induced ductular precursor cells. *J Clin Invest* 1993; 92: 1349-56.
23. Rafaeloff R, et al: Cloning and sequencing of the pancreatic islet neogenesis associated protein (INGAP) gene and its expression in islet neogenesis in hamsters.

J

Clin Invest 1997; 99: 2100-9.

24. Sander M, German MS: The beta cell transcription factors and development of the pancreas. J Mol Med 1997 May; 75(5): 327-40.
25. Hung Hp, Tsai MJ: Transcription factors involved in pancreatic islet development. J Biomed Sci 2000 Jan-Feb; 7(1): 27-34.
26. Ohlsson H, Thor S, Edlund T: Novel insulin promoter- and enhancer-binding proteins that discriminate between pancreatic  $\alpha$ - and  $\beta$ - cells. Mol Endocrinol 1991; 5: 897-904.
27. Ohlsson H, Karlsson K, Edlund T: IPF-1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. EMBO J 1993; 12: 4251-9.
28. Kajimoto Y, Watada H, Matsuoka Ta: Suppression of transcription factor PDX-1/IPF1/ STF-1/ IDX-1 causes decrease in insulin mRNA in MIN6 cells. J Clin Invest 1997 Oct 1; 100(7): 1840-6.
29. Guz Y, Montminy MR, Stein R, et al: Expression of Stf-1, a putative insulin gene transcription factor, in b-cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. Development 1995; 121: 11-8.
30. Anderson FG, Jensen J, Heller RS, et al: Pax 6 and Pdx 1 form a functional complex on the rat somatostatin gene upstream enhancer. FEBS Lett 1999; 445: 315-20.
31. Watada H, kajimoto Y, Miyagaua J, et al: PDX-1 induces insulin and glucokinase

gene expression in alpha TC1 clone 6 cells in the presence of betacellulin. *Diabetes* 1996; 45: 1826-31.

32. Waeber G, Thompson N, Nicod P, Bonny C: Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-1/ STF-1/ IDX-1 homeobox factor. *Mol Endocrinol* 1996; 10: 1327-34.
33. Watada H, Kajimoto Y, Kaneto H, et al: Involvement of the homeodomain-containing transcription factor PDX-1 in islet amyloid polypeptide gene transcription. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 229: 746-51.
34. Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H: Insulin-Promoter-Factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 1994; 371: 606-9.
35. Ahlgren U, Johansson J, Edlund H: The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/ PDX1-deficient mice. *Development* 1996; 122: 1409-16.
36. Stoffers DA, Zinkin NT, Stanojevic V, Clarke WL, Habener JF: Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat Genet* 1997 Jan; 15(1): 106-10.
37. Crisera CA, Longaker MT, Gittes GK: Molecular approaches to understanding organogenesis. *Semin Pediatr Surg* 1999 Aug; 8(3): 109-18.
38. Habener JF, Stoffers DA: A newly discovered role of transcription factors involved in

pancreas development and the pathogenesis of diabetes mellitus. Proc Assoc Am Physicians 1998 Jan-Feb; 110(1): 12-21.

39. Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F: Neurogenin 3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. Proc Natl Acad Sci USA 2000 Feb 15; 97(4): 1607-11.
40. Madsen OD, Jensen J, Petersen HV, et al: Transcription factors contributing to the pancreatic beta-cell phenotype. Horm Metab Res 1997; 29: 265-70.
41. Kolodka TM, Finegold M, Moss L, Woo SL: Gene therapy for diabetes mellitus in rats by hepatic expression of insulin. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 3293-7.
42. Mitanchez D, Chen R, Massias J-F, et al: Regulated expression of mature human insulin in the liver of transgenic mice. FEBS Letters 1998; 421: 285-9.
43. Kahn A: Converting hepatocytes to  $\beta$ -cells - a new approach for diabetes? Nat Med 2000 May; 6(5): 505-6.

## **The New Future of Treatment of Type 1 Diabetes Mellitus**

**Dong –Hwa Tsai, Tien-Jyun Chang \*, Lee-Ming Chuang \***

*Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine,  
Changhua Christian Hospital  
National Taiwan University Hospital \**

Typical type 1 diabetes mellitus is a disease of autoimmune destruction of the islet  $\beta$ -cell, only insulin treatment can't well control blood glucose and prevent the occurrence of varieties of chronic complications. The transplantation of insulin-secreting tissue give us the exciting expectancy of blood glucose control in type 1 diabetes. But either pancreatic or islet cell transplantation, all have surgical and long-term immunosuppressive side effects, and the success rate of islet cell transplantation still under to be solved. So the cell and gene therapy will also become the focus in the future to replace the many times insulin injection of treatment of type 1 diabetes, and will give us a promising future in type 1 diabetes.