

令和 2 年 4 月 28 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18081

研究課題名（和文）生理活性ペプチドサルユージン の糖尿病慢性血管障害における病態生理学的意義の解明

研究課題名（英文）The pathophysiological role of Salusin-beta in chronic diabetic vascular complications

研究代表者

林 哲範 (Hayashi, Akinori)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：30458830

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病慢性合併症におけるサルユージン の病態生理学的意義の解明を目的とし行った。遊離サルユージン のより精度の高い測定系を構築した。この新たに構築した測定系を用いて糖尿病患者の遊離サルユージン を測定し、136例の糖尿病患者において遊離サルユージン の病態生理学的意義を検討した。結果、遊離サルユージン は年齢、性別などの患者特性で明らかな変化はなかったが、腎機能と関連した。一方で糖尿病慢性合併症、特に糖尿病性腎症の進展と関係する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今後さらにサルユージン の病態生理学的意義を明確にしていくことにより、サルユージン が糖尿病慢性血管障害の新たなターゲットマーカー、ひいては糖尿病合併症の進展予防薬開発のための創薬シーズになる可能性も期待される。

研究成果の概要（英文）：We aimed to elucidate the pathophysiological significance of salusin- in chronic complications of diabetes mellitus. In this study, we successfully established a new sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to quantitate plasma free salusin-concentration, which is more accurate than previous our measurement systems. We evaluated 136 patients with diabetes mellitus. In the results, salusin- was not significantly difference in patients' characteristics, such as age, gender, etc. However, salusin- was correlated with kidney function. And it was suggested that salusin- was related to chronic diabetic complications, especially diabetic nephropathy.

研究分野：内科系臨床医学・内分泌学・代謝学

キーワード：生理活性ペプチド 糖尿病 糖尿病慢性合併症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者数は世界的にも本邦でも年々増加しており、本邦では細小血管障害である腎症により年間 16,000 人が透析療法に至り、網膜症により 3,000 人が失明に至り、神経障害により 3,000 人が下肢切断に至っている。また糖尿病腎症、虚血性心疾患、脳血管障害などの血管障害による死亡は 26.8%を占め(Hotta et al. J Japan Diab Soc 2007;50:47-61)、これらの糖尿病に伴う慢性血管障害の発症・進展を抑制することが糖尿病治療の目標の根幹であることは言うまでもない。サリュージン<sup>®</sup>は、研究協力者である七里らが考案したバイオインフォマティクス解析によって初めて同定した生理活性ペプチドホルモンで、サリュージン<sup>®</sup> とサリュージン<sup>®</sup> の 2 種類のアイソフォームが同定された。しかし、このペプチドは特異な物理化学的性状を有するため、その機能解明は困難を極めた(Shichiri et al. Nature Med 2007;13:661-662)。近年、この特性を回避し測定系を構築し、サリュージン<sup>®</sup> が 20 個のアミノ酸配列からなるヒトのペプチドホルモンであることが明らかになった(Sato et al. Regul Pep 2009;158:63-67)。また、抗原性がきわめて低いこのペプチドの N 末端配列に対する鶏卵由来 IgY 抗体を、研究協力者の七里が考案した新たな手法(WO2010071237 A1PCT/JP2009/071716)を用いて作成し、ヒト血中総サリュージン<sup>®</sup> 濃度を測定する高感度サンドイッチ ELISA 系の確立に成功した(Fujimoto et al. PLoS One 2013;8(10):e76714 1-8)。これによりこれまでサリュージン<sup>®</sup> は降圧・除脈、細胞増殖・アポトーシス制御、動脈硬化促進作用などの生体内作用が明らかにされてきた(Watanabe et al. J Am Soc Hypertens 2011;13:359-365)。基礎的研究では総サリュージン<sup>®</sup> は ACAT-1 を亢進させ、マクロファージ泡沫化を促進して動脈硬化を促進する(Watanabe et al. Circulation 2008;117:638-648)と同時に、血管内皮細胞にも作用して炎症性変化を惹起することが示唆されている(Koya et al. Am J Physiol 2012;303:H96-105)。このため、サリュージン<sup>®</sup> は血管障害治療の新たな標的分子として現在注目されている(Nagashima et al. Atherosclerosis 2010;212:70-77)。健常者を対象とした臨床的検討では血漿総サリュージン<sup>®</sup> は  $4.1 \pm 0.9\text{nmol/L}$  ( $1.9 \sim 6.6\text{nmol/L}$ ) で存在し、性差を認めなかった。また日中に最も高値を示し、夜間低下し、早朝に最も低値を示すことが明らかになった。更に臥位、坐位、立位での測定で変化は認めなかった(Fujimoto et al. PLoS One 2013;8(10):e76714,1-8)。このように我々の研究室ではヒトにおける測定条件による影響や日内変動を解明し、より正確に病態を反映するサリュージン<sup>®</sup> の測定が可能となった。これにより血管障害以外の作用として、自律神経系の経時的測定結果により副交感神経系が優位になると血漿総サリュージン<sup>®</sup> は低下し、Valsalva 反射や排尿によっても血漿総サリュージン<sup>®</sup> が低下することが明らかになった(Ogawa et al. Peptide 2014;59:83-88)。また先行研究により糖尿病患者では各種心血管疾患と同様、健常者に比し著明な高値を示すことが明らかになっている。一方で、我々の追加検討では糖尿病慢性合併症の進行により血漿総サリュージン<sup>®</sup> は有意に低下する可能性が示唆されている。つまり糖尿病や心血管疾患などの血管障害性疾患では、有意に高値を示すが、少なくとも総サリュージン<sup>®</sup> はそれら病態の進展により徐々に低下することが示唆される。現在までに糖尿病の病態進行に伴い、このような変化を示す生理活性ペプチドはない。これはサリュージン<sup>®</sup> が血中では様々なタンパクと結合して存在し、他の生体内ペプチドと同様にタンパクと結合したサリュージン<sup>®</sup> は生理活性を失い、遊離サリュージン<sup>®</sup> が真のサリュージン<sup>®</sup> の病態生理学的意義を有しているためと考えられる。現在、当研究室で遊離サリュージン<sup>®</sup> 濃度のサンドイッチ ELISA を用いた測定系が新たに樹立され、血漿総サリュージン<sup>®</sup> および遊離サリュージン<sup>®</sup> を合わせて測定することにより、糖尿病慢性血管合併症におけるサリュージン<sup>®</sup> の病態生理学的意義が明確となり、治療学的にも革新的に進歩し、糖尿病慢性血管合併症の発症・進展抑制に大きく貢献できることが期待できる。

### 2. 研究の目的

サリュージン<sup>®</sup> の糖尿病慢性血管合併症における病態生理学的意義を明らかにし、新たな特異的マーカーとしての可能性を検討した。北里大学病院内分泌代謝内科で受療中の糖尿病患者を対象に、一定の測定条件で採取し血漿中の総サリュージン<sup>®</sup> 濃度及び遊離サリュージン<sup>®</sup> を測定し、慢性血管障害である糖尿病神経障害、腎症、網膜症との関係性、大血管障害である虚血性心疾患、脳血管障害、末梢動脈疾患との関係性を検討することにより、糖尿病患者におけるサリュージン<sup>®</sup> の病態生理学的意義について解明を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 対象

北里大学病院内分泌代謝内科で受療中の糖尿病患者のうち、インフォームド・コンセントが得られた全患者を対象とした。糖尿病患者の臨床的所見として、喫煙などの生活歴の調査、身体的所見、血液尿検査所見、生理学的検査所見、細小血管障害・大血管障害の有無、それらの重症度に関して、問診及びカルテベースに情報を抽出した。

#### 【研究対象：選択基準】

北里大学病院に受療中の 20 歳以上の糖尿病患者のうち、インフォームド・コンセントが得られた全患者を対象とする。糖尿病の病型、治療内容は問わない。

#### 【研究対象：除外基準】

- 明らかな感染症合併患者
- 明らかな活動性悪性腫瘍合併患者

妊娠または妊娠の可能性のある女性患者

【糖尿病合併症評価項目】

神経障害：神経症に伴う症状の有無、アキレス腱反射、下肢内踝振動覚(『米国糖尿病学会の診断基準 2010』及び『糖尿病性神経障害を考える会の診断基準・2012 年改定』を用いた)。

腎症：尿中アルブミン、尿蛋白、血清クレアチニン値、推定糸球体濾過量(eGFR)

網膜症：眼科専門医による眼底検査結果をカルテベースに抽出した。

大血管障害

- ・ 虚血性心疾患、脳血管障害、末梢動脈疾患について、既往歴を含め確認した。
- ・ 心電図所見、頸動脈超音波所見(最大内膜中膜複合体厚；IMT)、足関節上腕収縮期血圧比(ABPI)、脈波伝播速度(PWV)、下肢動脈超音波所見を実施した患者に関しては、それらの検査結果を用いて総合的に大血管障害の有無とその程度を評価した。

(2) 総サリュージン及び遊離サリュージン濃度の測定

先行研究により証明されたサリュージンの変動の少ない時間帯に血液採取を実施し、通常に血液検査検体の血漿成分を用いてサリュージンの測定を行う。総サリュージンの測定は、本ペプチドのN末端配列に対する鶏卵由来IgY抗体を用いた高感度サンドイッチELISA法で測定を行った。遊離サリュージンは新たに作成した遊離サリュージンのC末端を認識する家兎ポリクローナル抗体と、鶏卵由来N末端IgY抗体とを組み合わせることにより測定した。

(3) 統計学的解析

データは平均±SD(standard deviation)ないし、中央値(最小値-最大値)で表記した。統計学的解析にはGraphPad Prism software version 5.0(GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA)およびJMP version 14(SAS, Cary, NC, USA)を用いて行った。2群間の比較には<sup>2</sup>検定ないしunpaired t-test、3群以上の比較にはKruskal-Wallis法を用いた。p値は<0.05で有意とした。

4. 研究成果

当初の研究計画では、総サリュージンの測定も併せて実施する予定であったが、測定系の精度確認の必要が生じたため、今回の研究期間内にすべての患者の結果を提示することが困難であり、遊離サリュージンに関して結果を示す。

サリュージンの測定を136例の糖尿病患者で実施した。患者背景をTable 1に示す。患者は男性75例、女性61例で、平均年齢60.5±17.7歳、平均BMI(Body mass index)24.9±5.5であった。BMI<18.5の痩が13例、BMI 18.5-24.9の標準体重が63例、BMI 25の肥満が60例であった。糖尿病病型は1型糖尿病が29例、2型糖尿病が107例であり、糖尿病罹病期間は12(0-50)年、平均空腹時血糖値152.2±50.9mg/dL、平均HbA1c 9.6±2.5%であった。遊離サリュージンは20.89(<4.00->150.00)nmol/Lであった。

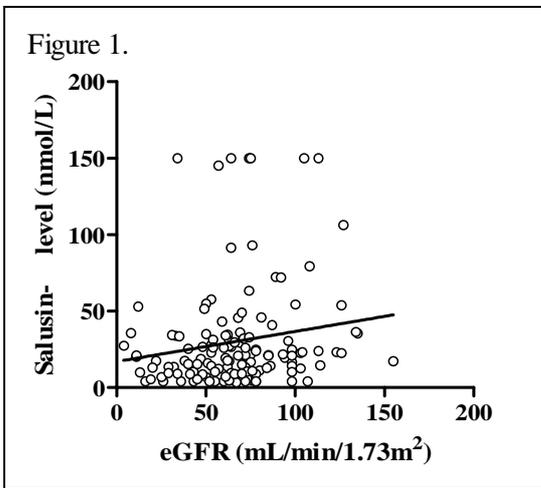
Table 1. Characteristics of participants

Parameters	N=136
Sex, male/female (n)	75/61
Age (years)	60.5 ± 17.7
Body mass index	24.9 ± 5.5
Smoking, never/past/current/unknown (n)	62/41/31/2
Type of diabetes, type 1/type 2	29/107
Duration of diabetes (years) *	12 (0-50)
Fasting plasma glucose (mg/dL)	152.2 ± 50.9
HbA1c (%)	9.6 ± 2.5
Glycated albumin (%) (n=133)	26.3 ± 8.4
Fasting C-peptide (ng/mL) (n=132) *	1.24 (<0.03-9.49)
Serum creatinine (mg/dL) *	0.80 (0.35-11.69)
eGFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	67.1 ± 29.0
Free salusin- (nmol/L) *	20.89 (<4.00->150.00)

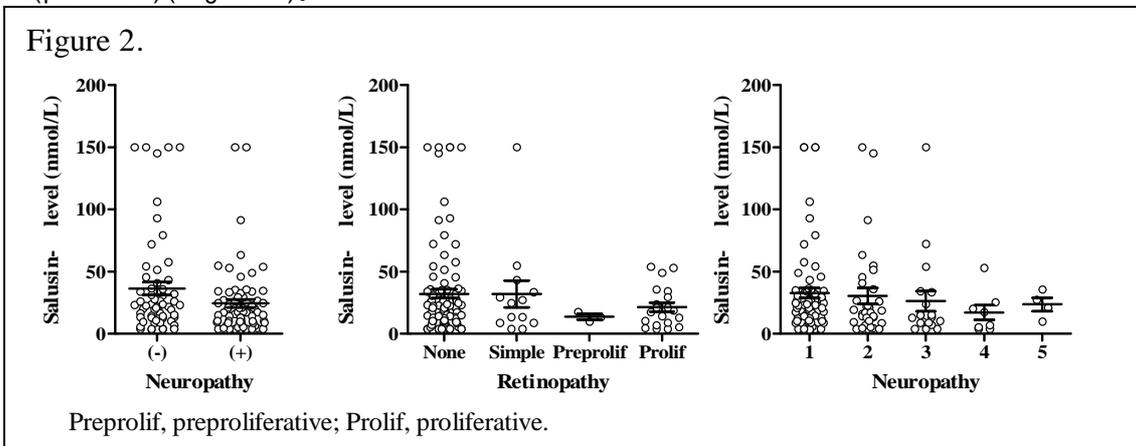
Data are mean±SD, unless otherwise indicated. \*median(minimum-maximum).

eGFR, estimate glomerular filtration ratio

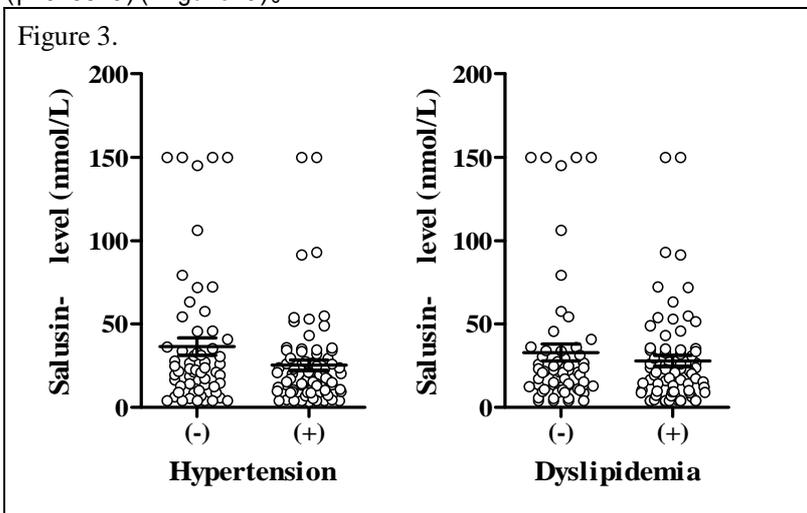
遊離サリュージンは男性20.92(<4.00->150.00)nmol/L、女性19.49(3.34->150.00)nmol/Lであり、有意な差はなかった(p=0.5703)。また遊離サリュージンは年齢、BMI(Body Mass Index)、糖尿病罹病期間と相関はなく、喫煙歴、糖尿病病型での差はなかった。遊離サリュージンと血液検査結果との関係の検討において、空腹時血糖値、HbA1c、グリコアルブミン、空腹C-peptide、血清クレアチニン値と有意な相関はなかったが、推定糸球体濾過量(eGFR; estimate glomerular filtration ratio)と有意な正の相関があった(r=0.1696、p=0.0484)(Figure 1)。



糖尿病細小血管障害における遊離サリウスンは、神経障害において神経障害なし(n=60) 22.15(3.34->150.00)nmol/L、神経障害あり(n=71) 17.32(<4.00->150.00)nmol/Lであり有意な差はなかった(p=0.1175)。網膜症において網膜症なし(n=100) 21.07(3.34->150.00)nmol/L、単純網膜症(n=12) 26.07(<4.00->150.00)nmol/L、前増殖性網膜症(n=3) 13.41(9.88-17.79)nmol/L、増殖性網膜症(n=2) 18.00(<4.00-53.93) nmol/Lであり有意な差はなかった(p=0.6069)。腎症において1期(n=72) 23.28(3.34->150.00)nmol/L、2期(n=33) 17.24(<4.00->150.00)nmol/L、3期(n=19) 13.62(<4.00->150.00)nmol/L、4期(n=8) 12.13(<4.00-52.99)nmol/L、5期(n=4) 24.20(9.88-35.70)nmol/Lであり、1期から4期にかけて低下傾向であったが有意な差はなかった(p=0.7231)(Figure 2)。



また高血圧の有無に関して高血圧なし(n=76) 22.14(<4.00->150.00)nmol/L、高血圧あり(n=60) 17.40(3.34->150.00)nmol/Lであり有意ではなかったが、高血圧合併患者で低値の傾向を示した(p=0.0565)。脂質異常症の有無に関して脂質異常症なし(n=75) 20.92(<4.00->150.00)nmol/L、脂質異常症あり(n=61) 20.33(3.34->150.00)nmol/Lであり有意な差はなかった(p=0.3875)(Figure 3)。



大血管障害において心血管障害の有無(心血管障害あり n=8)、脳血管障害の有無(脳血管障害あり n=12)、末梢動脈疾患の有無(末梢動脈疾患あり n=7)で有意な差はなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hayashi Akinori, Shichiri Masayoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Use of Noncontact Infrared Skin Thermometer for Peripheral Arterial Disease Screening in Patients With and Without Diabetes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angiology	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0003319720920162	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Mitsuko, Hayashi Akinori, Taguchi Tomomi, Arai Riina, Sasaki Sayaka, Takano Koji, Inoue Yusuke, Shichiri Masayoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Effects of canagliflozin on body composition and hepatic fat content in type2 diabetes patients with non-alcoholic fatty liver disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 1004-1011
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.12980	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujimoto Kazumi, Hayashi Akinori, Koderia Yoshio, Saito Tatsuya, Toki Takuya, Ogawa Akifumi, Kamata Yuji, Takano Koji, Katakami Hideki, Shichiri Masayoshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Identification and quantification of plasma free salusin-, an endogenous parasympathomimetic peptide	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8275
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-08288-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 林哲範, 的場健太, 桃園明, 正木嗣人, 小川顕史, 森口いづき, 小林直之, 高野幸路, 七里真義
2. 発表標題 糖尿病血液透析患者の透析関連低血糖の発生頻度～CGMによる検討～
3. 学会等名 第19回日本先進糖尿病治療研究会・第17回1型糖尿病研究会合同開催
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉野苑美, 高田哲秀, 藤本和実, 河合沙友希, 林哲範, 鎌田裕二, 七里眞義
2. 発表標題 糖尿病における新規病態予測バイオマーカーとしての血清 2-マクログロブリン四量体の臨床的意義
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hayashi A, Momozono A, Kawai S, Masaki T, Yoshino S, Ogawa A, Takano K, Shichiri M
2. 発表標題 Glycemic Fluctuation and the Risk of Hypoglycemia Unawareness Associated with Hemodialysis in Type 2 Diabetic Renal Failure
3. 学会等名 American Diabetes Association 78th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉野苑美, 藤本和実, 高田哲秀, 川村沙友希, 小川惇郎, 林哲範, 鎌田裕二, 小寺義男, 七里眞義
2. 発表標題 心血管疾患リスク因子としての血清 2-マクログロブリンの意義
3. 学会等名 第28回臨床内分泌代謝Update
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 土岐卓也, 佐々木沙也加, 桃園明, 藤本和実, 林哲範, 市川雷師, 鎌田裕二, 小寺義男, 七里眞義
2. 発表標題 抗インスリン抗体陽性症例における疾患特異的成分の探索
3. 学会等名 第28回臨床内分泌代謝Update
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	藤本 和実  (Fujimoto Kazumi)  (50769297)	北里大学・理学部・特任助教    (32607)	
研究協力者	七里 眞義  (Shichiri Masayoshi)  (10206097)	北里大学・医学部・主任教授    (32607)	