

令和 6 年 5 月 9 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16523

研究課題名（和文）インスリン抵抗性惹起因子レジスチンを高発現する新たな単球サブタイプの統合的解明

研究課題名（英文）Comprehensive elucidation of a new monocyte subtype with high expression of insulin resistance-inducing factor, resistin.

研究代表者

池田 陽介（Ikeda, Yosuke）

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60866698

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：単球・マクロファージのサブタイプ別にレジスチン遺伝子発現・機能解析を行った。現段階ではフローサイトメトリーによる手技の誤差も認められるため、本格的な機能統合解析は課題である。一方で、一般住民の検体採取を進め、2型糖尿病患者や耐糖能正常ボランティアからの検体採取の環境整備を行い、耐糖能正常ボランティアの検体を用いて、単球サブタイプ分類の手技を獲得できた。今後、レジスチンを起点とした遺伝子・環境因子相互作用の機序解明の一助になると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

単球・マクロファージのサブタイプ別にレジスチン遺伝子発現・機能解析を行った。現段階ではフローサイトメトリーによる手技の誤差も認められるため、本格的な機能統合解析は課題である。健診を受診した一般住民より検体を採取し、単球細胞を抽出してサブタイプ分類を行った。測定誤差をなくすことで、今後はレジスチンを起点とした遺伝子・環境因子相互作用の機序解明の一助になると考えている。

研究成果の概要（英文）：We conducted gene expression and functional analysis of resistin in monocyte-macrophage subtypes. At the current stage, there is acknowledgment of potential technical errors in flow cytometry, thus comprehensive functional integration analysis remains a challenge. However, we have progressed in collecting samples from the general population and have established the infrastructure for sample collection from type 2 diabetes patients and glucose-tolerant volunteers. Utilizing samples from glucose-tolerant volunteers, we have acquired the techniques for classifying monocyte subtypes. Moving forward, we believe this will aid in elucidating the mechanisms of genetic and environmental interactions centered around resistin.

研究分野：糖尿病・代謝

キーワード：レジスチン

1. 研究開始当初の背景

インスリン抵抗性とは、血糖値を下げるホルモンであるインスリンの“効き”が悪いことを言う。原因となる遺伝子に、肥満や運動不足等の環境因子が作用して発症する。2 型糖尿病の発症予防には、先行する病態であるインスリン抵抗性への早期介入が重要である。

レジスチンは、数少ないインスリン抵抗性関連遺伝子である。申請者の教室は、レジスチン遺伝子転写調節領域の一塩基多型(SNP)-420 が、血中濃度を非常に強く規定し、2 型糖尿病のリスクを高めることを見出した(*Am J Hum Genet* 2004, *Diabetes Care* 2007)。

レジスチンは、ヒトでは主として単球・マクロファージに発現している。ヒトレジスチンを高発現させたマウスにおいて、高脂肪食はマクロファージの脂肪組織への浸潤を促進し、炎症とインスリン抵抗性を惹起することが報告されている。すなわち、レジスチンは SNP によって非常に強く規定され、炎症とインスリン抵抗性をリンクする鍵分子である。しかし、その機序は解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、単球・マクロファージのサブタイプ別にレジスチン遺伝子発現・機能解析を行い、遺伝子・環境因子相互作用を明らかにする。

患者/対照において、単球・マクロファージのサブタイプ別にレジスチン遺伝子発現を比較する。

一般住民において、SNP-420 の遺伝子型が、各サブタイプでの発現に及ぼす影響を解明する。

患者 *in vivo* ならびに単離したサブタイプの細胞 *in vitro* において、環境因子の影響を明らかにする。

以上を統合し、レジスチンの発現細胞を焦点に、炎症とインスリン抵抗性をリンクするメカニズムを解明し、新規分子標的へ応用させる。さらに、レジスチン SNP を標的として環境因子に介入することで、2 型糖尿病をはじめとする、インスリン抵抗性疾患の個別化予防戦略を確立する。

3. 研究の方法

目的 1. 単球・マクロファージのサブタイプ別にレジスチン遺伝子発現を比較する

a. 患者/対照モデルでの検証 (2020 年)

2 型糖尿病患者 50 名、耐糖能正常ボランティア 50 名から血清を採集し、ELISA 法で血中レジスチン濃度を測定する。同時に採取した血球は、フローサイトメトリーを用いて分離する。単球については CD14⁺⁺CD16⁻単球(古典的単球)、CD14⁺⁺CD16⁺単球(中間型単球)、CD14⁺CD16⁺⁺単球(非古典的単球)の 3 つのサブタイプに、マクロファージについては炎症性 M1 マクロファージと抗炎症性 M2 マクロファージの 2 つのサブタイプに分離する。これらのどのサブタイプでレジスチン遺伝子発現が最も上昇しているのかを、RT-PCR 法で評価する。さらに、それぞれのサブタイプでの炎症性単球・マクロファージの占める割合と血中レジスチン濃度との関連を調べる。患者/対照での差を解析する。

b. サブタイプ毎での単球・マクロファージの機能的評価 (2020 年、主に 2021 年)

申請者は、2 型糖尿病モデルマウスにおいて、骨髄レベルで炎症性単球を抽出し、各種炎症関連遺伝子群の発現が上昇していることを発見した(図 2, 図 5)(論文投稿中)。本研究においても、患者群の単球・マクロファージでは、レジスチンを含む炎症関連遺伝子の発現が、正常群と比して上昇している可能性がある。上記で同定した、血中レジスチンを規定する単球・マクロファージのサブタイプに対して、RT-PCR および microarray を用いて炎症関連遺伝子群の発現変化を解析する。

目的 2. レジスチン SNP-420 の遺伝子型が各サブタイプに及ぼす影響を明らかにする

a. 一般住民における遺伝疫学研究 (2020 年)

一般住民約 2000 名において、血中レジスチンは測定済みで、血清・RNA も既に収集し、レジスチン SNP-420 は TaqMan 法でタイピングした。この中の約 100 名をレジスチン SNP-420 の C/C 型、C/G 型、G/G 型に分ける。単球・マクロファージのサブタイプ毎に、レジスチン遺伝子発現を RT-PCR 法で測定し、細胞抽出液中のレジスチン蛋白は高感度 ELISA 法で測定する。炎症性単球・マクロファージの占める割合、レジスチン mRNA・蛋白・血中濃度について、遺伝子型による違いの有無を解析する。

さらに、本集団では 2019 年度より 10 年後の前向き調査を行っている。75g ブドウ糖負荷試験を行い、インスリン抵抗性の悪化や糖尿病発症を追跡している。また、全例に頸動脈エコーを行い、動脈硬化の進行が評価できる。経年的に認知機能検査も行っている。これにより、糖尿病・動脈硬化・認知症などの疾患発症との因果関係や、遺伝子・環境因子相互作用を解析することが可能となる。

b. サブタイプ毎での単球・マクロファージの機能的評価 (2020 年、主に 2021 年)

単球・マクロファージのサブタイプ毎に、RT-PCR および microarray を用いて炎症関連遺伝子群の発現を測定する。SNP-420 C/C、C/G、G/G 遺伝子型により、これらの炎症関連遺伝子群の発現に違いがあるかを解析する。各サブタイプのマクロファージを分離し、遊走能・分化能・増殖能などの機能に違いがあるかどうかを評価する。

目的 3. 環境因子が各サブタイプに及ぼす影響を解明する

a. 2 型糖尿病患者入院前後での *in vivo* 解析 (2021 年以降)

申請者らは、これまでに、栄養・運動・喫煙などの環境因子によって血中レジスチンが変化することを、一般住民約 2000 名の前向き研究で明らかにした。そこで、2 型糖尿病患者 50 名において、教育入院期間である 2 週間で、環境の変化が各サブタイプに及ぼす影響を解析する。入院前後で検体を採集し、各サブタイプの単球・マクロファージに発現するレジスチンの変化を評価する。

b. 単離した各サブタイプ細胞における環境因子刺激 *in vitro* 解析 (2021 年以降)

上述の 2 型糖尿病患者 50 名、正常耐糖能者 50 名、およびレジスチン SNP-420 の遺伝子型解析を行う一般住民 100 名の研究開始時の単球・マクロファージを採集する。各サブタイプの細胞を単離し、環境因子として、EPA・DHA などの脂肪酸、AICAR、ニコチン、メトホルミン、LPS 等で刺激し、レジスチンの mRNA およびタンパク発現量の変化を評価する。

4. 研究成果

単球・マクロファージのサブタイプ別にレジスチン遺伝子発現・機能解析を行った。現段階ではフローサイトメトリーによる手技の誤差も認められるため、本格的な機能統合解析は課題である。一方で、一般住民の検体採取を進め、2 型糖尿病患者や耐糖能正常ボランティアからの検体採取の環境整備を行い、耐糖能正常ボランティアの検体を用いて、単球サブタイプ分類の手技を獲得できた。今後、レジスチンを起点とした遺伝子・環境因子相互作用の機序解明の一助になると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------