

令和 5 年 5 月 28 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18047

研究課題名(和文) インスリン受容体基質に着目した2型糖尿病に伴う組織線維化機序の解明と予防

研究課題名(英文) Evaluation of tissue fibrosis mechanism associated with type 2 diabetes mouse focusing on insulin receptor substrate

研究代表者

山中 芳亮 (Yamanaka, Yoshiaki)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：60644862

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)：2型糖尿病患者では臓器の線維化が促進されることが知られており、線維化にインスリン受容体基質(IRS)の関連が指摘されている。本研究では2型糖尿病における線維化の機序を、マウス膝関節包の線維化に着目してIRSの関連も含めて検討した。2型糖尿病モデルマウスであるdb/dbマウスでは野生型マウスと比較してIRS2およびコラーゲンを含めた線維化関連遺伝子の発現が亢進していた。2型糖尿病ではIGF-1Rの発現が亢進していることが知られており、IRSはIGF-1シグナルの重要な下流メディエーターであるため、db/dbマウスの関節包線維化にIRSを介したシグナルが関与している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織の線維化は臓器不全に共通の病態である。特に2型糖尿病患者では心臓、肝臓、腎臓など重要臓器の線維化が促進されることが知られており重篤な症状を呈する。従って、2型糖尿病患者の線維化の機序を解明することは、臓器不全の進展予防や治療法の開発に繋がる。一方、線維化とインスリン受容体基質(IRS)の関連が肺線維症や腎線維症など線維化が主な病態である疾患において指摘されている。本研究では、2型糖尿病モデルマウスの膝関節包線維化にIRSを介したシグナルが関与している可能性があることを明らかにした。今後、IRSに着目することで2型糖尿病患者の組織線維化を抑制する治療法の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Fibrosis of organs is accelerated in patients with type 2 diabetes mellitus, and an association of insulin receptor substrate (IRS) with fibrosis has been demonstrated. In this study, we evaluated the mechanism of fibrosis in type 2 diabetes mellitus, focusing on fibrosis of the knee joint in mice, including the association with IRS. The expression of fibrosis-related genes including collagen and IRS2 expression was upregulated in db/db mice, a mouse model of type 2 diabetes, compared to wild mice. Since IGF-1R expression is known to be upregulated in type 2 diabetes and IRS is an important downstream mediator of IGF-1 signaling, IRS-mediated signaling may be involved in arthrofibrosis in db/db mice.

研究分野：整形外科

キーワード：線維化 2型糖尿病 インスリン受容体基質

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

組織の線維化は臓器不全に共通の病態である。特に2型糖尿病患者では心臓、肝臓、腎臓など重要臓器の線維化が促進されることが知られており重篤な症状を呈する。従って、2型糖尿病患者の線維化の機序を解明することは、臓器不全の進展予防や治療法の開発に繋がる。

一方、整形外科領域では関節包の線維化が主な病態である関節拘縮が問題となる。本研究では2型糖尿病における線維化の機序を関節拘縮に着目して解明を試みた。また近年、線維化とインスリン受容体基質(IRS)の関連が肺線維症や腎線維症など線維化が主な病態である疾患において指摘されている。申請者が非糖尿病マウスの膝関節拘縮モデルで行った検討でも、線維化した膝関節包内線維芽細胞においてIRSの発現上昇を認めた。一方、IRSは2型糖尿病発症にも関与が指摘されていることから、2型糖尿病患者における組織線維化にIRSが重要な役割を果たしている可能性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、2型糖尿病モデルマウス(db/dbマウス)を用いて膝関節包の線維化の機序をIRSに着目して明らかにすることである。

3. 研究の方法

12週齢のC57BL/6J雄マウス(22-27g; Clea, Tokyo, Japan)及びdb/db雄マウス(41-45g; Clea, Tokyo, Japan)を使用した。

形態学的評価

左後肢を4%パラホルムアルデヒド(pH7.4)で36時間固定後、K-CXで脱灰し5%硫酸ナトリウム溶液で中和した。その後、パラフィン包埋し、ミクロトームで5 μ mの矢状切片を作成した。ヘマトキシリン・エオジン(HE)で染色後にオールインワン蛍光顕微鏡BZ-X710とBZ-Xアナライザーを用いて後方関節包の厚さを半月板後方で測定した。

また、Picro sirius red染色を行い、後方関節包全体とPicro siriusで染色された面積の比率をコラーゲン線維の密度として評価した。画像測定はImageJ 1.46rを使用して定量化した。

関節包の線維化関連遺伝子の発現解析

右後肢の膝関節包組織を1.5mLチューブに入れTRIzolに溶解した。ホモジェナイズ後、溶解液を遠心分離した。上清からTotal RNAを酸性チオシアン酸グアニジニウム-フェノール-クロロホルム法で抽出した。iScript cDNA Synthesis Kitを使用してTotal RNAを逆転写した。quantitative real-time PCRはCFX Connect Real-Time System (Bio-Rad)を使用して、デルタデルタCT法で行った。線維化関連遺伝子(I型コラーゲン $\alpha 1$ (Col1 $\alpha 1$)、I型コラーゲン $\alpha 2$ (Col1 $\alpha 2$)、III型コラーゲン $\alpha 1$ (Col3 $\alpha 1$)、 α -平滑筋アクチン(α SMA)、結合組織増殖因子(CCN2)、およびトランスフォーミング増殖因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)の発現を評価した。また、IRS1およびIRS2の発現の評価も行った。House keeping geneは $\beta 2$ マイクログロブリンとした。

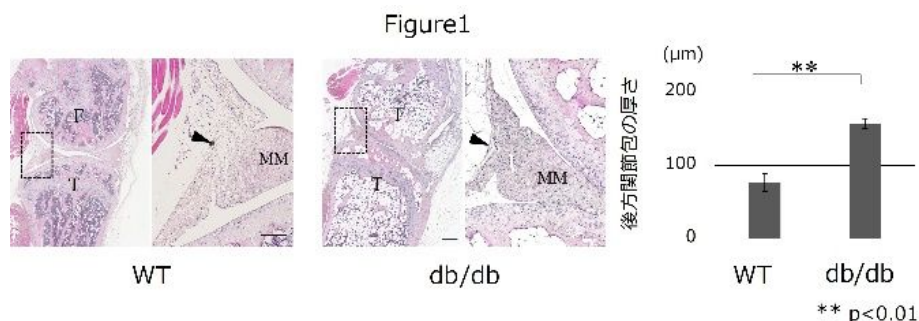
免疫組織化学染色

切片を脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼを不活性化しプロテインブロックを行った。一次抗体はウサギ抗マウスTGF- $\beta 1$ ポリクローナル抗体、ウサギ抗マウスACTA2ポリクローナル抗体、ウサギ抗マウスCCN2ポリクローナル抗体を使用し、DAB IHC Substrateで発色させた。ヘマトキシリンで対比染色した。オールインワン蛍光顕微鏡BZ-X710を使用して、各スライドの後方関節包を400倍の倍率で撮影した。各画像では、ImageJ 1.46rを使用して、後関節包内の全細胞数およびTGF- $\beta 1$ 陽性、ACTA2陽性、CCN2陽性細胞数を測定した。全細胞数に対するTGF- $\beta 1$ 陽性、ACTA2陽性、CCN2陽性細胞の割合を算出した。

4. 研究成果

形態学的評価

HE染色ではdb/dbマウスでwildマウスと比較して有意に後方関節包の肥厚を認めた(Figure 1)。

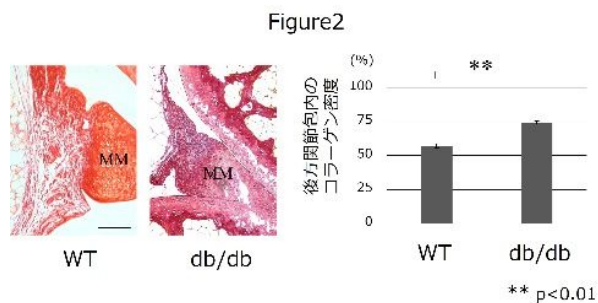


また、Picro sirius red 染色によるコラーゲン線維の密度の比較でも、db/db マウスで wild マウスと比較して有意に後方関節包内のコラーゲン密度の上昇を認めた (Figure2)。

線維化関連遺伝子発現の評価

wild マウスと db/db マウスの膝関節包から線維芽細胞を抽出して、細胞内の線維化関連遺伝子の発現を評価した。Col1 α 1、Col1 α 2、Col3 α 1、TGF- β 1、Acta2、および Ccn2

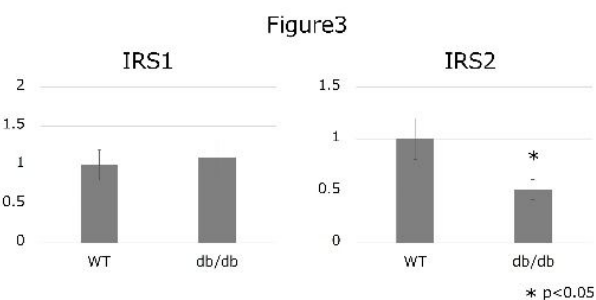
の発現は、wild マウスと比較して db/db マウスで有意に亢進していた。IRS1 および IRS2 の発現の比較では、wild マウスで db/db マウスと比較して IRS2 の発現が有意に亢進していた (Figure3)。



線維化関連タンパク発現の評価

免疫組織化学染色で TGF- β 1、ACTA2、CCN2 のタンパク発現の半定量評価を行ったところ、ACTA2、CCN2 の発現が db/db マウスにおいて wild マウスと比較して有意に亢進していた。

2 型糖尿病モデルマウスである db/db マウスでは野生型マウスと比較して IRS2 およびコラーゲンを含めた線維化関連遺伝子の発現が亢進していた。2 型糖尿病では IGF-1R の発現が亢進していることが知られており、IRS は IGF-1 シグナルの重要な下流メディエーターであるため、db/db マウスの関節包線維化に IRS を介したシグナルが関与している可能性がある。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Tokuda Kotaro, Yamanaka Yoshiaki, Mano Yosuke, Tsukamoto Manabu, Tajima Takafumi, Suzuki Hitoshi, Kawasaki Makoto, Uchida Soshi, Nakamura Eiichiro, Wang Ke-Yong, Sakai Akinori	4. 巻 11
2. 論文標題 Effect of metformin treatment and its time of administration on joint capsular fibrosis induced by mouse knee immobilization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17978
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-97445-7	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 -
1. 著者名 Yamanaka Yoshiaki, Tajima Takafumi, Tsujimura Yoshitaka, Kosugi Kenji, Mano Yosuke, Zenke Yukichi, Hachisuka Akiko, Aoki Takatoshi, Sakai Akinori	4. 巻 103
2. 論文標題 Molecular and Clinical Elucidation of the Mechanism of Action of Steroids in Idiopathic Carpal Tunnel Syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Joint Surgery	6. 最初と最後の頁 1777 ~ 1787
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2106/JBJS.20.02096	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 Tokuda Kotaro, Yamanaka Yoshiaki, Kosugi Kenji, Nishimura Haruki, Okada Yasuaki, Tsukamoto Manabu, Tajima Takafumi, Suzuki Hitoshi, Kawasaki Makoto, Uchida Soshi, Nakamura Eiichiro, Wang Ke-Yong, Sakai Akinori	4. 巻 63
2. 論文標題 Development of a novel knee contracture mouse model by immobilization using external fixation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Connective Tissue Research	6. 最初と最後の頁 169 ~ 182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/03008207.2021.1892088	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 Yamanaka Yoshiaki, Gingery Anne, Oki Gosuke, Yang Tai-Hua, Zhao Chunfeng, Amadio Peter C.	4. 巻 26
2. 論文標題 Effect of a monocyte chemoattractant protein-1 synthesis inhibitor on fibroblasts from patients with carpal tunnel syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Science	6. 最初と最後の頁 295 ~ 299
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jos.2020.03.010	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 Tokuda Kotaro, Yamanaka Yoshiaki, Kosugi Kenji, Nishimura Haruki, Okada Yasuaki, Tsukamoto Manabu, Tajima Takafumi, Suzuki Hitoshi, Kawasaki Makoto, Uchida Soshi, Nakamura Eiichiro, Wang Ke-Yong, Sakai Akinori	4. 巻 4
2. 論文標題 Development of a novel knee contracture mouse model by immobilization using external fixation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Connective Tissue Research	6. 最初と最後の頁 1~14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/03008207.2021.1892088	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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山中 芳亮, 田島 貴文, 辻村 良賢, 真野 洋佑, 酒井 昭典, 善家 雄吉, 蜂須賀 明子, 青木 隆敏
2. 発表標題 トリアムシノロンの抗線維化作用に着目した特発性手根管症候群患者における手根管内滑膜線維化機序の解明
3. 学会等名 第39回産業医科大学学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山中 芳亮, 田島 貴文, 辻村 良賢, 小杉 健二, 真野 洋佑, 善家 雄吉, 酒井 昭典
2. 発表標題 CCL2に着目した特発性手根管症候群の発症機序の解明
3. 学会等名 第38回産業医科大学学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 徳田 昂太郎, 山中 芳亮, 小杉 健二, 西村 春来, 塚本 学, 田島 貴文, 鈴木 仁士, 川崎 展, 内田 宗志, 中村 英一郎, 酒井 昭典
2. 発表標題 関節拘縮抑制効果を有するメトホルミンの適切な投与時期の検討
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山中 芳亮, 田島 貴文, 辻村 良賢, 小杉 健二, 真野 洋佑, 善家 雄吉, 酒井 昭典
2. 発表標題 特発性手根管症候群に対するトリアムシノロンの効果発現機序 基礎および臨床双方の観点から
3. 学会等名 第64回日本手外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 徳田 昂太郎, 山中 芳亮, 小杉 健二, 西村 春来, 塚本 学, 田島 貴文, 鈴木 仁士, 川崎 展, 内田 宗志, 中村 英一郎, 酒井 昭典
2. 発表標題 マウス膝関節拘縮モデルにおいてメトホルミンは関節拘縮を抑制する
3. 学会等名 第35日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山中 芳亮, 田島 貴文, 辻村 良賢, 善家 雄吉, 戸羽 直樹, 大茂 壽久, 目貫 邦隆, 酒井 昭典
2. 発表標題 アディポネクチンはDupuytren拘縮における手掌腱膜内線維芽細胞の線維化を抑制する
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山中 芳亮, 田島 貴文, 辻村 良賢, 佐藤 直人, 濱田 大志, 善家 雄吉, 酒井 昭典
2. 発表標題 屈筋腱滑膜に着目した特発性手根管症候群の病態 解明の試み
3. 学会等名 第95回日本整形外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山中 芳亮, 田島 貴文, 小杉 健二, 真野 洋佑, 善家 雄吉, 酒井 昭典
2. 発表標題 特発性手根管症候群の手根管内屈筋腱滑膜に性ステロイドが与える影響
3. 学会等名 第31回日本末梢神経学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山中 芳亮, 田島 貴文, 蜂須賀 明子, 小杉 健二, 岡田 祥明, 善家 雄吉, 青木 隆敏, 酒井 昭典
2. 発表標題 特発性手根管症候群患者に対する手根管内トリアムシノロン注射の経時的効果の検討
3. 学会等名 第63回日本手外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山中 芳亮, 田島 貴文, 小杉 健二, 真野 洋佑, 善家 雄吉, 酒井 昭典
2. 発表標題 ステロイドは特発性手根管症候群に対してどのように作用するのか
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------