

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08590

研究課題名(和文) 1型糖尿病におけるマイオカインを介した臓器間ネットワークの解明

研究課題名(英文) Study of myokine-mediated inter-organ cross-talk in type 1 diabetes

研究代表者

菊地 晶裕 (Kikuchi, Akihiro)

生理学研究所・生体機能調節研究領域・特任助教

研究者番号：90321752

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)：1型糖尿病の原因はインスリン欠乏であるが、同時にマイオカインの分泌異常も認められる。そのため、マイオカインの分泌異常を修復すれば、インスリンの使用量を減らし、かつ、安定した血糖コントロールが可能になると考えられる。本研究では1型糖尿病モデルマウスにおいて過剰分泌が認められたIL-6に着目し、IL-6中和抗体とインスリンをマウスに併用投与して血糖を追跡した。その結果、併用投与群ではインスリン単独投与群と比べてより良好な血糖コントロールが実現できた。

また、マイオカインの異常分泌メカニズムを1細胞レベルで解明することを目指し、シングル核RNA-seq解析に適したサンプル調整法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1型糖尿病の主要な治療はインスリン補充であるが、血糖コントロールは必ずしも容易ではなく、血糖値の上昇を補正し過ぎることで低血糖昏睡に至ることもある。また、長期のインスリン投与は様々な合併症を引き起こす場合もある。そこで、1型糖尿病に対し、インスリンの使用量を減らし、かつ、安定した血糖コントロールが可能となる新規な治療法が求められている。本研究では、1型糖尿病マウスで過剰分泌しているIL-6の作用を中和抗体により中和させるとインスリンの単独投与よりも血糖コントロールが安定することを示した。得られた知見は1型糖尿病の新規治療法の開発の基盤となる。

研究成果の概要(英文)：Type 1 diabetes is caused by insulin deficiency, which is accompanied by abnormal myokine secretion. Therefore, if the abnormal secretion of myokine can be restored, more stable blood glucose control will be possible. In this study, we focused on IL-6, which was found to be over-secreted in a mouse model of type 1 diabetes. An IL-6-neutralizing antibody was administered to the mice in combination with insulin, and their blood glucose levels were monitored. As a result, it was found that stable blood glucose control was achieved in the combined administration group compared to the group receiving insulin alone.

In addition, we established a sample preparation method suitable for single-nucleus RNA-seq analysis, which enable us to elucidate the mechanism of abnormal myokine secretion at single-cell level.

研究分野：代謝・内分泌学

キーワード：1型糖尿病 マイオカイン IL-6 臓器間ネットワーク シングル核RNA-seq解析

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1型糖尿病は自己免疫により膵細胞が破壊され内因性インスリンが不足することで発症する。そのため主要な治療法はインスリン補充である。しかし、インスリン補充による血糖コントロールは必ずしも容易ではなく、血糖値の上昇を補正し過ぎると低血糖昏睡に至り、時には生命の危機を伴うこともある。また、長期のインスリン投与は高血圧や腎障害などの合併症を引き起こす場合もある。そこで、1型糖尿病に対し、インスリンの使用量を減らし、かつ、安定した血糖コントロールが可能となる新規な治療法が求められている。

研究代表者らのグループでは現在までに1型糖尿病のモデルマウスとしてストレプトゾトシン(STZ)を投与することで膵細胞を破壊した糖尿病 C57BL/6J マウス(STZ 糖尿病マウス)の解析を行ってきた(未発表データ)。STZ 糖尿病マウスはコントロールマウスに比べて血中インスリンレベルは大幅に低下し、著名な高血糖を示した。それに加え、脂肪組織や骨格筋の萎縮、高脂肪酸血症、高中性脂肪血症や高ケトン体血症などの代謝異常を示し、さらに、マイオカインとアディポカインの分泌異常を示した。例えば、マイオカインの1つである IL-6 の血中レベルはコントロールマウスの6倍程度にまで増加していた。IL-6 の過剰分泌は脂肪組織の萎縮を誘導することが知られており、さらに、脂肪組織の萎縮は糖や脂質代謝の調節作用を有するレプチンを減少させる。従って、IL-6 などのマイオカインの分泌異常は臓器間ネットワークを介したインスリン非依存的な代謝調節メカニズムを破綻させる要因となり、その結果として代謝異常が増悪していると考えられる。実際、1型糖尿病モデルマウスに高濃度のレプチンを投与すると、インスリン単独投与と比べて大幅に少ないインスリンであっても安定した血糖コントロールが可能であることが他のグループからも報告されている(Wang et al., PNAS, 2010)。先行研究の結果や既報から、マイオカインの分泌異常を改善することができれば、臓器間ネットワークによるインスリン非依存的な代謝調節メカニズムが修復し、その結果、血糖コントロールに必要なインスリン使用量を減少させることが可能であるとの仮説を立てることができた。

2. 研究の目的

本研究では、マイオカインの異常分泌、具体的には STZ 糖尿病マウスで増加する IL-6 の異常分泌、を改善することで臓器間ネットワークによるインスリン非依存的な代謝調節メカニズムが修復し、その結果、インスリンの使用量を減らしても安定した血糖コントロールが可能であることを明らかにし、1型糖尿病の新規治療法としての proof of concept を示することを目的とした。さらに、ヒトにおいてもマウスと同様な臓器間ネットワークを介したインスリン非依存的な代謝調節メカニズムが存在することを明らかにするために1型糖尿病患者の種々の血中マイオカインレベルと血糖コントロールに必要なインスリン使用量の関連を解析することを目的とした。

また、近年、様々なシングルセル解析の結果から骨格筋細胞もまた多様性を持った細胞集団であることが明らかになってきた。従って、STZ 糖尿病マウスにおいても特定のサブタイプの骨格筋細胞のみで IL-6 の分泌異常が生じている可能性もあり、マイオカインを介したインスリン非依存的な代謝調節メカニズムの解明にシングルセル解析が重要となる。しかしながら、物理的・化学的な手法でシングルセル化する過程においては RNA の分解や修飾が入る可能性があり、いかなる実験条件においてもシングルセル RNA-seq 解析に適したサンプルが得られるとは限らない。そこで、本研究ではシングル核 RNA-seq 解析に着目して実験手法、特にシングル核 RNA-seq 解析に適したサンプル調整法の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) STZ 糖尿病マウス

C57BL/6J マウスに高用量(150 mg/kg、または、200 mg/kg)の STZ を腹腔内に2回投与して STZ 糖尿病マウスを作成した。血糖値が 450 mg/dL 以上のマウスを STZ 糖尿病マウスとし、血中インスリンレベルや各種の血中マイオカインレベルを測定した。また、STZ 糖尿病マウスに浸透圧ポンプを用いてインスリンを単独で、または、インスリンと IL-6 中和抗体を同時に投与し、血糖値を2週間追跡した。

(2) 1型糖尿病患者

1型糖尿病患者の血中マイオカインレベルを測定し、血糖コントロールに必要な1日のインスリン使用量との関連を解析した。STZ 糖尿病マウスでは血中 IL-6 レベルが顕著の高値となっており、1型糖尿病患者においても血中 IL-6 レベルに特に着目した。

(3) シングルセル解析

シングル核 RNA-seq 解析の実験手法、特にサンプル調整法の確立を目指し、本研究では末梢組

織におけるエネルギー代謝の調節に深く関与する視床下部に着目した。C57BL/6J マウスの視床下部の室傍核を切り出し、そこに存在するニューロンをシングルセル化、または、シングル核化して RNA-seq 解析を行った。データ解析には R パッケージである Seurat を用いた。

4. 研究成果

(1) STZ 糖尿病マウス

STZ 糖尿病マウスに浸透圧ポンプを用いてインスリン (0.2 U/day) を 2 週間連続投与すると血糖値 (随時) の低下は見られたものの、良好な血糖コントロールは得られず、インスリン投与前と同程度の血糖値を示すこともあった。一方、単独投与と同量のインスリン (0.2 U/day) に加えて IL-6 中和抗体も併用投与すると血糖コントロールは良好であった (図 1)。この結果から、IL-6 の分泌異常そのものの改善ではないが、中和抗体を用いてその作用を中和することで同量のインスリンであっても安定した血糖コントロールが可能であることが明らかとなった。IL-6 中和抗体の投与量など、さらに検討が必要ではあるが、マイオカインをターゲットとする 1 型糖尿病に対する新規治療法の可能性を示すことが出来た。

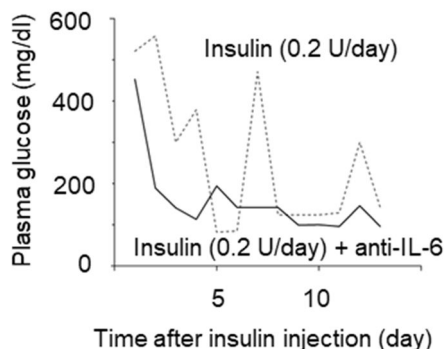


図 1 STZ 糖尿病マウスのインスリン単独投与、または、IL-6 中和抗体との同時投与期間中の血糖値

(2) 1 型糖尿病患者

1 型糖尿病患者においても血中 IL-6 レベルと血糖コントロールに必要な 1 日のインスリン使用量には正の相関があると思われる結果が得られた ($r = 0.59$, $p = 0.13$)。しかしながら、コロナ禍の影響もあり、ヒト由来試料を用いた研究を計画通りに進めることが困難な時期であり、解析できた検体数は少なかった ($N = 8$)。そのため、本研究期間中には優位な相関関係を得ることが出来なかった。マウスで得られた結果を応用するためにも、1 型糖尿病患者の血中 IL-6 レベルと血糖コントロールに必要な 1 日のインスリン使用量との関連について引き続き解析を行うことが必要である。

(3) シングルセル解析

本研究では視床下部の室傍核に着目してサンプル調整法の確立を試みた。まず、マウスの視床下部室傍核に存在するコルチコトロピン放出ホルモン (CRH) ニューロンのシングルセルを調整した。しかしながら、RT-PCR 解析の結果は、調整したシングルセルの多くで少なくとも一部の RNA が分解されていることを示唆し、その結果、RNA-seq に適したサンプルが 100 細胞/匹程度にとどまった。そこで、シングル核の調整法を検討した。最適化した調整法を用いると RNA-seq に適したサンプルがシングルセルよりも安定して多く得ることができた。そこで、確立した手法によりシングル核を調整し、シングル核 RNA-seq を行った。約 20,000 のシークエンスデータを得たが、そのうちシークエンスデータにおいても *Crh* の発現が確認できた約 6,000 のデータのみを用いてクラスター解析を行った。その結果、視床下部室傍核の CRH ニューロンは 17 のクラスターに分かれ、これらのクラスターは 4 つのメジャークラスター (A, B, C, D) に分類できることが分かった (図 2)。クラスター A はグルココルチコイド受容体 (*Nr3c1*) を発現しており、HPA 軸の制御に関与する CRH ニューロンであると考えられた。クラスター B は *Crh* に加えて神経ペプチド *Avp*, *Trh*, *Adcayp1*, *Bdnf*, *Oxt* などを共発現するグルタミン酸ニューロンであり、クラスター C は *Cck*, *Vip*, *Sst* などを共発現する GABA ニューロンであった。また、レプチン受容体 (*Lepr*) や NPY 受容体 (*Npy1r*, *Npy5r*) などのホルモン受容体はクラスター B および C に局在して発現していた。従って、クラスター B および C はホルモン応答に関与する CRH ニューロンであると考えられた。さらに、クラスター D はこれまでに明らかにされていない新規クラスターであり、*Wnt3* を発現していた。また、Wnt 受容体である Frizzled (*Fzd1*) の発現レベルはクラスター D で最も高かった (図 3)。免疫染色を行ったところ、社会的敗北ストレスを受けたマウスでは

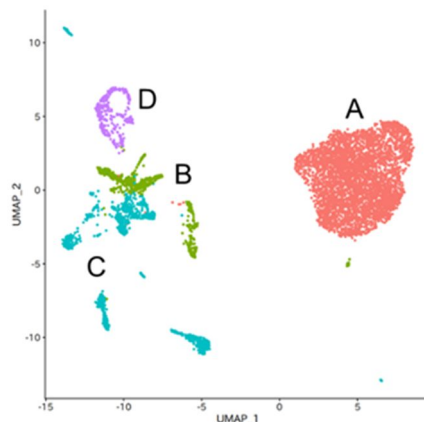


図 2 視床下部室傍核 CRH ニューロンのクラスター解析 (UMAP プロット)

CRH と共発現する WNT3 の発現が顕著に増加した。このことから、クラスター-D はストレス応答の制御に関わることが示唆された。

次いで、視床下部室傍核の CRH ニューロン以外 (non-CRH) のニューロンについてもシングル核 RNA-seq 解析を行った。クラスター解析の結果、CRH ニューロンのクラスター-D の発現プロファイルと類似した新規クラスターの存在が明らかとなった。しかし、non-CRH ニューロンの新規クラスターでは *Wnt3* よりも *Wnt4* の発現レベルが高く、このクラスターは CRH ニューロンのクラスター-D と類似の機能を有しているが、CRH ニューロンと non-CRH ニューロンでは使い分けがなされていることが示唆された。

本研究ではシングル核 RNA-seq に適したサンプルの調整法を確立し、その手法により得られたニューロンの核を用いてシングル核 RNA-seq 解析を行った。その結果、シングルセルよりも多くの細胞 (核) のシーケンスデータを得ることができ、新規な機能を有するクラスターを見出すことができた。今後、この手法を用いて骨格筋や脂肪組織などに対してもシングル核 RNA-seq 解析を行い、マイオカインを介したインスリン非依存的な代謝調節メカニズムの解明をシングルセルレベルで行う予定である。

STZ 糖尿病マウスでは IL-6 の異常分泌により代謝異常が増悪していることを先行研究で明らかにしていたが、その IL-6 の作用を抗体で中和することによりインスリン単独療法よりも安定した血糖コントロールが得られることを本研究で明らかにした。これは、マイオカインを介した臓器間ネットワークが改善することでインスリン非依存的な代謝調節メカニズムも修復した結果であると考えられる。さらに、本研究期間中には優位な相関であることを示すまでには至らなかったが、1 型糖尿病患者においても血中 IL-6 レベルとインスリン使用量には正の相関があると思われる結果を得ることができた。これらの結果から、今後のさらなる研究は必要ではあるが、インスリンと IL-6 中和抗体の併用療法はインスリン単独療法よりも少ないインスリン量で安定した血糖コントロールが得られる 1 型糖尿病の新規治療法になり得る可能性を示すことができた。

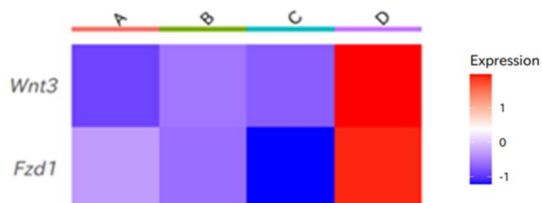


図3 各クラスターにおける *Wnt3* および *Fzd1* の発現レベルの比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菊地 晶裕、郷 康広、近藤 邦生、箕越 靖彦
2. 発表標題 視床下部室傍核CRHニューロンのシングル核RNA-seq解析
3. 学会等名 第48回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菊地 晶裕、郷 康広、近藤 邦生、箕越 靖彦
2. 発表標題 視床下部室傍核CRHニューロンのシングル核RNA解析
3. 学会等名 第25回アディポサイエンス・シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菊地 晶裕、郷 康広、近藤 邦生、箕越 靖彦
2. 発表標題 CRHニューロンのシングル核解析により明らかとなった新規クラスターの発見
3. 学会等名 第42回日本肥満学会
4. 発表年 2022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
---------	---------