

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 年度～2012 年度

課題番号：22790862

研究課題名（和文） 新規インスリン分泌能評価法の開発およびその遺伝因子との関連に関する研究

研究課題名（英文） Research on new method for evaluating insulin secretion, and association with the genetic factors

研究代表者

廣田 勇士 (HIROTA YUSHI)

神戸大学・医学部附属病院・糖尿病・内分泌内科 助教

研究者番号：80566018

研究成果の概要（和文）：

クランプ法による disposition index (clamp DI) は、正常耐糖能 (NGT)、耐糖能異常 (IGT)、2 型糖尿病 (T2DM) と病態が進行するにつれて低下しており、病態の進行とともに低下する膵  $\beta$  細胞の機能を的確に表現できる指標であると考えられた。

また遺伝因子との関連では、日本人で同定された最も重要な疾患感受性遺伝子である *KCNQ1* の SNP において、リスクアレル保持者は非保持者に対し、IGT の段階で clamp DI の低下を示した。

研究成果の概要（英文）：

Disposition index determined by glucose clamp technique (clamp DI) differed significantly among NGT, IGT and T2DM. Clamp DI was decreased with deterioration in glucose tolerance. Therefore, we consider clamp DI as more sensitive measure of beta cell function.

We showed the risk allele of *KCNQ1*, which is the most important disease susceptibility gene identified by Japanese people, was associated with decrease of clamp DI in IGT.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1000000	300000	1300000
2011 年度	900000	270000	1170000
2012 年度	900000	270000	1170000
年度			
年度			
総計	2800000	840000	3640000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：糖尿病、遺伝因子、インスリン分泌能、インスリン抵抗性

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国における 2 型糖尿病患者の急増は、社会医学的観点からも大きな問題になりつつある。2 型糖尿病の発症には、膵臓の  $\beta$  細胞から分泌されるインスリンの低下と、肝臓や筋肉など末梢組織でのインスリン抵抗性が関与している。また疫学的研究により、

その発症には遺伝的背景が関与すると考えられ、「糖尿病になりやすい遺伝因子」を有した人に、様々な環境因子が加わり、2 型糖尿病が発症すると考えられる。

(2) 近年、連鎖解析やゲノムワイド関連解析から徐々に遺伝因子の解明が進んでいる。代表者は、2 型糖尿病の疾患感受性に関する

研究に携わってきた。欧米人の連鎖解析から新規関連遺伝子であることが報告された TCF7L2 は、日本人における大規模関連解析でも 2 型糖尿病関連遺伝子であることを明らかとした。また、日本人におけるゲノムワイド関連解析では、KCNQ1 が新規糖尿病関連遺伝子であることも明らかとした。これら二つの遺伝因子は強力な 2 型糖尿病関連遺伝子といえる。TCF7L2 と KCNQ1 ともにインスリン分泌能の指標との関連を示すことが報告されている。

(3) 近年インスリン感受性指標とインスリン分泌指標の積によってインスリン感受性で調整したインスリン分泌能を評価するという試みがなされている。このような、インスリン感受性指標とインスリン分泌指標の積で表される指標は一般に disposition index と呼ばれる。高インスリン正常血糖クランプでのグルコース注入量は、幅広い病態の患者で最も正確にインスリン感受性を評価できる指標として広く受け入れられている。また、高血糖クランプはインスリン感受性とは無関係に第 1 相および第 2 相インスリン分泌を評価できる鋭敏なインスリン分泌能の検査法としての評価が定着している。このような点を踏まえると、「高血糖クランプで得られた分泌指標」と「高インスリン正常血糖クランプで得られた感受性指標」を用いた disposition index は、最も正確かつ鋭敏な新規の  $\beta$  細胞機能評価法となる可能性がある。

## 2. 研究の目的

インスリン分泌の低下は 2 型糖尿病を特徴付ける重要な病態であるが、既存のインスリン分泌能検査法は、インスリン感受性の影響も受けるため純粋な  $\beta$  細胞機能を評価できない。また TCF7L2 や KCNQ1 等の遺伝子ハプロタイプが 2 型糖尿病の遺伝的素因として報告されているが、これらがどのような機序で 2 型糖尿病の発症を促すかは明らかでない。本研究では、「高血糖クランプ」と「高インスリン正常血糖クランプ」を組み合わせた新たな  $\beta$  細胞機能評価法の開発を目指すとともに、各種の遺伝因子が 2 型糖尿病患者の  $\beta$  細胞機能に及ぼす影響を明らかとする。

## 3. 研究の方法

(1) 2 型糖尿病患者、耐糖能異常者 (IGT)、正常耐糖能者において、インスリン分泌能および抵抗性の評価を行う。DeFronzo が提唱した高血糖クランプ法および高インスリン正常血糖クランプ法 (DeFronzo RA: Am J Physiol 6(237) E214-233, 1979) を連続して

行うことで、同一被験者に対して分泌能と抵抗性の両者の評価を同一日に行う。人工膵臓 (日機装 STG-22) を用いて以下の方法で行う。

【高血糖クランプ法】開始 5 分以内に 125mg/dl 以上血糖値を上昇させるようにブドウ糖を経静脈的に注入する。その後 200mg/dl の高血糖を維持するようブドウ糖注入を行っている状態で、開始前・5 分後・10 分後・15 分後・60 分後・75 分後・90 分後に IRI を測定する。これらから、第 1 相インスリン分泌 (開始 10 分間の AUC IRI) および第 2 相インスリン分泌 (60 分後・75 分後・90 分後の IRI の平均) を評価する。

【高インスリン正常血糖クランプ法】上記に続き、速効型インスリンを 40mU/m<sup>2</sup>/min で静注し、100  $\mu$ U/ml 前後の高インスリン状態で、正常血糖 (90~100mg/dl) を維持するようブドウ糖の注入を行う。90~120 分後には血糖値やグルコース注入量は安定化するため、この 30 分間のグルコース注入率 (Glucose Infusion Rate) を平均し、終了時の血糖および IRI で補正したものをインスリン抵抗性指標 (insulin sensitivity index: ISI) とする。

【disposition index】高血糖クランプによる第 1 相インスリン分泌と、高インスリン正常血糖クランプによる ISI の積を clamp disposition index とする。

(2) この新規  $\beta$  細胞機能評価法を、75g ブドウ糖負荷試験を行っている 2 型糖尿病患者、耐糖能異常者 (IGT)、正常耐糖能者で評価し、この disposition index とインスリン分泌能に関する指標 (insulinogenic index や HOMA- $\beta$  など) やその他の臨床指標との関連を検討し臨床的意義につき検討する。またあらかじめ同意を得たうえで、末梢血より DNA を抽出する。遺伝因子の解析については、タックマン PCR 法や直接シーケンス法などを用い、TCF7L2、KCNQ1 などの報告された遺伝子多型 (SNPs) タイピングを行う。これら SNPs のタイピングデータと、グルコースクランプ法から得られた disposition index との関連について検討する。

## 4. 研究成果

(1) 各耐糖能群にグルコースクランプ検査を施行し、累計として 2 型糖尿病患者 (T2DM) 48 例、耐糖能異常者 (IGT) 18 例、正常耐糖能 (NGT) 38 例の合計 104 例において、インスリン分泌能および抵抗性の評価を行った。高血糖クランプ法で評価された第 1 相インスリン分泌 (開始 10 分間の AUC IRI) は、NGT 300  $\pm$  141、IGT 344  $\pm$  177、T2DM 98  $\pm$  99  $\mu$ U/ml  $\cdot$  min と有意に T2DM で低下していた (P < 0.001)。

また高インスリン正常血糖クランプ法では、インスリン感受性指数(Insulin sensitivity index:ISI)は、NGT  $0.14 \pm 0.40$ 、IGT  $0.07 \pm 0.03$ 、T2DM  $0.07 \pm 0.31$  と有意に IGT および T2DM で低下していた( $P < 0.05$ )。

(2) 高血糖クランプによる第 1 相インスリン分泌と、高インスリン正常血糖クランプによる ISI の積である新規インスリン分泌評価法 disposition index(clamp DI)は、NGT  $40.3 \pm 16.4$ 、IGT  $25.5 \pm 14.8$ 、T2DM  $5.7 \pm 5.1$  と 3 群間で有意な差を認めた( $P < 0.001$ )。

(3) 既知の 2 型糖尿病感受性 SNPs を Taqman PCR 法によりタイピングし、clamp DI を含む各種指標との関連を解析した。KCNQ1 rs2237892 の genotype により 3 群間で解析したところ、OGTT から得られる insulinogenic index は T2DM、IGT、NGT いずれにおいても有意差を認めなかったが、Clamp DI は IGT において、CC 群  $11.8 \pm 5.7$ 、CT 群  $18.8 \pm 11.4$ 、TT 群  $45.6 \pm 11.3$  とリスクアリルを保持する CC 群および CT 群は非保持者である TT 群より有意に低値であった( $P < 0.05$ )。

(4) クランプ法による disposition index (clamp DI) は、NGT、IGT、T2DM と病態が進行するにつれて低下していた。HOMA- $\beta$ 、CPR index、insulinogenic index などの指標も含めた解析においても、clamp DI は最も良く耐糖能を表現していた。clamp DI は病態の進行とともに低下する膵 $\beta$ 細胞の機能を、的確に表現できる指標であると考えられた。

また遺伝因子との関連では、日本人で同定された最も重要な疾患感受性遺伝子である KCNQ1 の SNP において、リスクアリル保持者は非保持者に対し、IGT の段階で clamp DI の低下を示した。この傾向は NGT でも認められたが、T2DM では認められなかったことより、耐糖能が著しく低下してくる以前には、遺伝因子による要因が関わっている可能性が示唆された。少数例の検討でありながら、clamp DI の解析のみ、遺伝因子保持による有意な低下を示したことから、clamp DI は鋭敏な指標である可能性があると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

①Fujita H, Hara K, Shojima N, Horikoshi M, Iwata M, Hirota Y, Tobe K, Seino S, Kadowaki T. Variations with modest effects have an important role in the

genetic background of type 2 diabetes and diabetes-related traits. J Hum Genet. 2012 Sep 20. doi: 10.1038/jhg.2012.110. [Epub ahead of print] PMID:22992776、査読有

②Takabe M, Matsuda T, Hirota Y, Hashimoto N, Nakamura T, Sakaguchi K, Ogawa W, Seino S. C-peptide response to glucagon challenge predicts improvement by liraglutide of both early insulin secretion and glucose tolerance. Diabetes Res Clin Pract. 2012 Oct 12. doi:pil: S0168-8227(12)00359-2. 10.1016/j.diabres.2012.09.036. [Epub ahead of print PMID: 23068961、査読有

③Sakaguchi K, Hirota Y, Hashimoto N, Ogawa W, Sato T, Okada S, Hagino K, Asakura Y, Kikkawa Y, Kojima J, Maekawa Y, Nakajima H. A Minimally Invasive System for Glucose Area under the Curve Measurement using Interstitial Fluid Extraction Technology: Evaluation of the Accuracy and Usefulness with OGTTs in Diabetic and Nondiabetic Subjects. Diabetes Technol Ther 2012, 14(6):485-491、doi: 0.1089/dia.2011.0255. PMID:22537393、査読有

④Komada H, Sakaguchi K, Takeda K, Hirota Y, Hashimoto N, Okuno Y, Seino S, Ogawa W. Age-dependent decline in  $\beta$ -cell function assessed by an oral glucose tolerance test-based disposition index. Journal of Diabetes Investigation 2011, 2(4): 293-296、DOI: 10.1111/j.2040-1124.2010.00099.x、査読有

[学会発表] (計 6 件)

①駒田久子、廣田勇士、坂口一彦、中村友昭、福岡秀規、橋本尚子、井口元三、高橋裕、小川渉、清野進、グルコースクランプ法を用いた内分泌疾患における耐糖能の検討、2013年1月27日、浜松

②駒田久子、坂口一彦、中村友昭、井口元三、橋本尚子、廣田勇士、小川渉、清野進、75g OGTT における負荷後 1 時間血糖値の臨床的意義、第 49 回日本糖尿病学会近畿地方会、2012年11月17日、京都

③井上喜文、坂口一彦、廣田勇士、駒田久子、奥野陽子、近藤奈央、松木核、高部倫敬、松田友和、橋本尚子、井口元三、高橋裕、清野進、小川渉、褐色細胞腫術前後におけるインスリン分泌能および抵抗性評価、第 54 回日

本糖尿病学会年次学術集会、2011.05.20、札幌

④駒田久子、廣田勇士、坂口一彦、奥野陽子、松田友和、橋本尚子、清野進、小川渉、oral disposition index による膵β細胞機能と年齢の関係、第54回日本糖尿病学会年次学術集会、2011.05.20、札幌

⑤井上喜文、坂口一彦、廣田勇士、駒田久子、奥野陽子、近藤奈央、松木核、高部倫敬、松田友和、橋本尚子、井口元三、高橋裕、清野進、小川渉、内分泌疾患のグルコースクランプによるインスリン分泌抵抗性評価、第20回臨床内分泌代謝Update、2011年1月29日、札幌

⑥駒田久子、坂口一彦、隅田健太郎、神野歩、有村愛子、西海智子、奥野陽子、橋本尚子、廣田勇士、井口元三、小川渉、清野進、2型糖尿病患者の高血糖クランプ時のインスリン分泌パターンとその臨床像、第53回日本糖尿病学会年次学術集会、2010年5月28日、岡山

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

廣田 勇士 (HIROTA YUSHI)  
神戸大学・医学部附属病院・糖尿病・内分泌内科 助教

研究者番号：80566018