

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590676

研究課題名(和文)レジスチンによる免疫機構の変化を介した糖尿病発症メカニズムの解明と発症予知

研究課題名(英文)The influence of resistin related immune-system on the pathophysiology of diabetes

研究代表者

高田 康徳(Takata, Yasunori)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：20432792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病の既往の無い129症例のうち、血中レジスチン高値群13例、低値群16例から単球を単離し、DNA Array及びパスウェイネットワーク解析を施行した。その結果、血中レジスチンにて影響を受ける免疫、炎症関連遺伝子ネットワークを明らかにした。この内の複数の遺伝子は既に糖尿病、動脈硬化との関連が報告されている因子であった。更に、別の70症例においてこれらの因子の発現量を遺伝子、タンパクレベルで解析し、血中レジスチン値との相関関係を確認した。レジスチン過剰発現単球細胞の遺伝子発現解析でも同様の結果であった。レジスチンは免疫、炎症応答を介して、糖尿病や動脈硬化の発症に関与していると考えられる。

研究成果の概要(英文)： We have previously reported that resistin is clinically associated with the prevalence of type 2 diabetes and cardio-vascular disease (CVD). However, the mechanism is still unknown. In human, resistin is derived from white blood cells especially monocytes. Thus we hypothesized that resistin is related to diabetes and CVD through immune system and inflammation. To clarify this hypothesis we performed case control analysis using DNA-array. Then we analyzed these data using bio-informatics. It revealed that highly expressed genes in monocytes from resistin high cases were associated with immune system and inflammation, and some of these genes were known to be related to pathophysiology of diabetes and CVD. To confirm these results, we performed quantitative RT-PCR and ELISA. It demonstrated that 9 genes are correlated with plasma resistin levels in 70 general subjects. These results suggest that resistin is associated with pathophysiology of diabetes and CVD through immune-system.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態医学

キーワード：レジスチン 免疫 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

レジスチンはマウスにおいて主として脂肪細胞から分泌され、インスリン抵抗性に関連するアディポカインとして発見された (Nature, 2001)。ヒトにおいては、レジスチンは脂肪細胞ではなく、単球、マクロファージに高発現している。我々は、1) ヒトレジスチン遺伝子の転写調節領域の SNP-420 が、血中レジスチン濃度を強く規定している事、2) ヒトにおいて血中レジスチンレベルや一塩基多型 (SNP) -420 遺伝子型が、インスリン抵抗性、2 型糖尿病や心血管病の発症に関連する事を報告した (Am J Hum Genet. 2004, Diabetes Care. 2007, Hypertension. 2008)。そこで、これらのメカニズムを明らかにするために 200 名の血中レジスチンレベルを 4 分位した最上位 1/4 群、下位 4/4 群に相当する対象者 7 名の末梢血から単球を分離し、DNA array や real time PCR を用いた遺伝子発現解析を行った。その結果、血中レジスチンレベル高値群では低値群に比較し免疫や炎症に関連した遺伝子群の発現が異なっていた。

従来から、T 細胞や major histocompatibility complex については、1 型糖尿病の成因として、主に膵細胞破壊のメカニズムから多くの研究がなされてきた。一方、他の組織やインスリン抵抗性、2 型糖尿病、特に、インスリン抵抗性については極めて限定的な報告のみであった。しかし、2009 年 7 月の Nature Medicine に、1) 肥満モデルマウスの脂肪組織における CD8 陽性 T 細胞、CD4 陽性制御性 T 細胞の発現比率が、高脂肪食による代謝異常 (インスリン抵抗性や耐糖能異常) や脂肪炎症に強く関与すること、2) ヒト脂肪組織においても肥満度により同様な所見を認めること、3) マウスにおいて、これら CD8 陽性 T 細胞あるいは CD4 陽性 T 細胞の働きや発現比率を変化させることにより、代謝異常 (インスリン抵抗性や耐糖能異常) や炎症の改善を認めることが複数の施設

から発表された。前述のように、マウスにおいてレジスチンは主として脂肪細胞から分泌され、インスリン抵抗性をきたすアディポカインとして発見された経緯がある。

従って、申請者らが最近得た前述の DNA array のデータもあわせて考えると、Nature Medicine に報告されたマウス脂肪組織における T 細胞により制御される糖代謝異常は、脂肪組織でのレジスチン発現と、更にヒトにおいては、単核球内でのレジスチン発現とリンクしている可能性が高い。

2. 研究の目的

以上の背景から、申請者らは、ヒトレジスチン SNP-420 変異、血中レジスチンレベルなどにより、マクロファージや単球、T 細胞といった単核球のプロファイルが変化することにより、システミックな免疫制御機構に何らかの影響をおよぼし、インスリン抵抗性や糖尿病のような生活習慣病や動脈硬化を発症するのではないかと仮説をたてた。本研究の目的はこれを明らかにすることである。

3. 研究の方法

1) 遺伝子発現解析

糖尿病の既往の無いボランティア 29 症例のうち、血中レジスチンレベルが高い群 13 例を case とし、低い群 16 例を control とした。これらの対象者の末梢血中から、CD14 抗体を用いた MACS system により単球を単離した。次に、単離した単球から、total RNA を抽出した。さらに、逆転写酵素により cDNA を作成した。この cDNA を用いて human DNA array を施行した。これらのデータを統合し、統計学的手法を用いて、血中レジスチン値により影響を受ける遺伝子群を同定した。

2) パスウェイネットワーク解析

次に、先の DNA array (case 群で 3 回、control 群で 4 回施行) から得られたデータ

を用いて、パスウェイネットワーク解析を行い、単一遺伝子の変動だけではなく、レジスチンで影響を受ける遺伝子群を疾患に関連する遺伝子群として解析した。

3) 同定された因子の遺伝子、タンパクレベルでの解析

更に、これらの遺伝子群の発現量を先の 29 症例とは別の、血中レジスチン値の偏りのない 70 名の単球 total RNA を用いた定量的 QRT-PCR 法で確認した。次に、これらの遺伝子群の mRNA レベルと血中レジスチンの相関関係について確認した。

4) 培養細胞を用いた遺伝子発現解析

1) - 3) の研究で同定した因子群に対し、レジスチンが、上流にあるのか、あるいは下流にあるのかを明らかにするために、定量的 QRT-PCR 法を用いて、レジスチン高発現単球細胞と対照での遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

1) 血中レジスチン高値群から得られた単球内において発現が高い遺伝子の解析

糖尿病の既往の無いボランティア 29 症例のうち、血中レジスチンレベルが高い群 13 例を case、低い群 16 例を control とした。これらの対象者の末梢血中から、CD14 抗体を用いた MACS system により単球を単離した。これを用いて Human DNA array を施行した。その結果、約 3 万個の遺伝子の発現を確認した。同様の DNA array を case 群で 3 回、control 群で 4 回施行し、これらのデータを統合し、統計学的手法を用いて、血中レジスチン値により影響を受ける遺伝子群を同定した。この遺伝子群には、レジスチンそのものを始め、複数の免疫、炎症に関連する遺伝子が含まれていた。

2) パスウェイネットワーク解析による遺伝

子間の相互関係の解析

更に、先の DNA array (case 群で 3 回、control 群で 4 回施行) から得られたデータを用いて、パスウェイネットワーク解析を施行した。その結果、血中レジスチンにより影響を受ける免疫、炎症関連遺伝子群ネットワークを明らかにした。興味深いことに、この内の複数の遺伝子は既に糖尿病、インスリン抵抗性、動脈硬化との関連が報告されている因子であった。更に、明らかになった個々の遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR 法を用いて確認した。また、これらの血中タンパクレベルを ELISA 法で解析した。次に、統計解析を行い、血中レジスチン値とこれらの因子の相関関係を確認した。

3) 培養細胞レベルでの解析

次に血中レジスチンレベルがこれらの遺伝子の発現と関係するメカニズムを明らかにするために、レジスチン高発現ヒト単球細胞を用いた遺伝子発現解析を行った。その結果、レジスチン高発現単球細胞では、対照と比較し、先に DNA array やパスウェイネットワーク解析で同定した免疫、炎症関連遺伝子群の高発現を認めた。

4) まとめ

本研究において、DNA array、定量的 RTPCR 法による遺伝子発現解析、パスウェイネットワーク解析によるそれらの遺伝子の相互関係、ELISA 法により複数の免疫、炎症に関連する因子が、血中レジスチンレベルと相関することを明らかにした。これらの因子のうち、いくつかは既に、糖尿病、インスリン抵抗性、動脈硬化との関連が報告されていた。また、レジスチンはこれらのネットワークに関連し、免疫応答を介して、全身の炎症、インスリン抵抗性や糖尿病の発症に関与していると考察された。

5) 今後の展開

本研究の結果から、マウスとは異なり、レジスチンは免疫-炎症を介して糖尿病や動脈硬化の進展に関連している可能性が示唆された。従って、血中レジスチン値や、それを強く規定しているレジスチン遺伝子の一塩基多系は、将来の糖尿病の発症、あるいは、糖尿病重症度、心血管病発症リスク因子、予測因子となる可能性が高い。今後は、一般住民の血中レジスチン値を測定し、前向き試験を行い、実際に、将来の糖尿病あるいは、心血管病発症に関連するか否か明らかにしてゆく。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

高田 康德 (Takata, Yasunori)

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20432792

(2)研究分担者

大澤 春彦 (Osawa, Haruhiko)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90294800

大沼 裕 (Onuma, Hiroshi)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00294794

川村 良一 (Kawamura, Ryoichi)

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90533092

(3)連携研究者

なし