

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 年 月 日現在

機関番号：82654
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791047
 研究課題名（和文） インスリン抵抗性に関与する自然免疫システムにおけるレジスチン様分子の役割の解析
 研究課題名（英文） The role of resistin-like molecules in natural immune system involving insulin resistance.
 研究代表者 榎山 暁史（KUSHIYAMA AKIFUMI）
 公益財団法人朝日生命成人病研究所・その他部局等 准教授
 研究者番号：30435820

研究成果の概要（和文）：レジスチン様分子ファミリーの一員である RELM β は分泌タンパク質の一種であり、腸管および気管支上皮細胞における局所免疫反応をひきおこすことが報告されている。しかしながら、我々は活性化型マクロファージも RELM β を発現することを発見し、インスリン抵抗性における RELM β の役割を研究した。RELM β KO マウスは、対照マウスに比べてインスリン抵抗性が改善し、NASH モデルにおいては、肝における脂肪蓄積、炎症、繊維化が改善していた。また、ヒト RELM β の ELISA が開発され、食生活の変化による RELM β 発現量の検討を行った。

研究成果の概要（英文）：Resistin-like molecule (RELM) β , secretory protein homologous to resistin, reportedly contributes to local immune response regulation in gut and bronchial epithelial cells. However, we found that activated macrophages also express RELM β and thus investigated the role of RELM β in the insulin resistance. In RELM β KO mice, insulin resistance is ameliorated, and lipid accumulation, inflammation, and fibrosis in liver is ameliorated in NASH model, compared with control mice. Furthermore, ELISA system measuring RELM β is developed, and now investigating RELM β expression accompanied with change of dietary habitat.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：インスリン抵抗性・メタボリックシンドローム・NASH モデル

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞や心筋梗塞といった動脈硬化性疾患およびがんは死因の大半を占め重要な医学的課題である(World Health Report2003, WHO)が、特にその元となる「生活習慣病」は遺伝的背景と環境、およびその相互作用による個体差までも重視した治療が望ましい。現在、環境因子や遺伝的背景と環境の相互作用のコントロールは十分追及されているとは言い難く、特徴的な環境下(病的な食習慣・強いストレス下などの病態)に関与しうる生

活習慣)にのみ発生する遺伝子機能・機能異常は検出されていないものが多数あると推察される。

その中で、腸管は生活習慣病の重要な環境因子である食習慣と体の臨界面であり、腸管で起こっていることと生活習慣病の関係を多面的(遺伝子・環境の影響・それらの相互作用)に解析することは、環境因子(と遺伝的背景)を治療の標的としていく上で基本的な方法となると考えられる。

近年、分泌タンパクとインスリン抵抗性、あるいは動脈硬化との関連に関する研究はメタボリック症候群として世界的にも重要視されるが、その中で Resistin は、脂肪細胞より分泌され、肝でのインスリン抵抗性や糖脂質代謝異常をもたらす、またヒトでは動脈硬化との関連も示唆されている (Atherosclerosis 2005(182), 241-248. 2005)。Resistin にはマウスでアイソフォームが3種同定されており、それぞれ REsistin-Like Molecule(RELM) α 、 β 、 γ (Proc Natl Acad Sci U S A 2005(101), 13596-13600.) と命名されている。そのうちヒトでは RELM β のみが存在する。RELMs は Resistin と同様血液中を循環するが、Resistin とは発現臓器が異なり、また発現の制御機構も異なり、RELM β は下部腸管に限局して発現するとされてきた。RELM β は腸管の感染や炎症に際して発現が上昇し免疫防御において重要な役割を果たしていることも報告され、炎症時にインスリン抵抗性が増大することもあり、RELM β の発現調節が、インスリン抵抗性を介した生活習慣病に関与することが示唆される。そこで、我々の研究グループは RELM β の食生活による調節とインスリン抵抗性への関与について研究を続けてきた。RELM β を扱った研究は本邦では我々以外によってはほとんど行われていない。海外では、様々な分野、特に炎症・アレルギー・糖代謝・発がんといった免疫機構に関連する病態で研究が進められているが、本研究との類似したアプローチのものは見られない。

2. 研究の目的

腸管およびマクロファージにおける免疫機構、特に innate immunity にとって重要な役割を持つレジスチン様分子 Resistin like molecule (RELM) β がインスリン抵抗性、臓器の炎症に及ぼす影響を検討する。具体的には RELM β 欠損マウスを用いて炎症や脂肪蓄積をもたらすインスリン抵抗性における RELM β の役割を明らかにし、さらに、ヒトでの代謝への影響については、血中 RELM β 検出系を構築し、メタボリック症候群および2型糖尿病患者血清での測定を行うことで明らかにする。

3. 研究の方法

RELM β の発現、分泌の変動をもたらすインスリン抵抗性の分子機構とその病態のヒトでの関与について以下の方法で検討した。

1. RELM β 欠損マウスの解析：RELM β 欠損マウスのインスリン抵抗性について検討する。高脂肪食、NASH モデルにおける肝の病理に対するクッパー細胞由来 RELM β の影響を検討

した。

2. 血清中ヒト RELM β 検出システム：MUS-Tag 法と磁気ビーズ固層による高感度化が得られてきており、RELM β の血中への分泌とインスリン抵抗性や炎症状態との関連について検討した。

4. 研究成果

RELM β 欠損マウスを作成し、肝臓、あるいは全身に生じさせた炎症・インスリン抵抗性に生じる変化を検討した。

1-1 糖負荷・インスリン負荷：耐糖能・インスリン感受性は、通常食摂取マウスにおいて対照マウスよりも高かった。

1-2. 高脂肪食モデル、NASH モデル：高脂肪食モデルでは、RELM β KO マウスにおける高脂肪食モデルでのインスリン抵抗性は通常食時と同様、対照マウスより改善した。また、NASH モデルはメチオニンコリン欠乏食ではクッパー細胞から分泌される RELM β による肝脂肪蓄積や NASH の病理像について検討したが、RELM β の欠損によって脂肪肝、肝の炎症、肝繊維化ともに改善した。骨髄移植を行いクッパー細胞における RELM β 欠損を生じさせると全身性 RELM β の欠損の 1/2 程度の NASH 改善効果を認めた、以上の結果を元に、現在論文投稿中である。

RELM β のインスリン抵抗性に関与する機序がマウスとヒトで共通であるかどうかは、ヒトにおける RELM β の分泌・発現レベルの検討が必須である。すでにヒト RELM β に対するウサギポリクロナル抗体は東京大学 迫田秀之助教によって作成され、Resistin には全く反応せず、RELM β のみに反応する。3A6H12 クローンを得て、ELISA の検出感度は 16pg/ml まで改善している。現在2型糖尿病患者の教育入院における RELM β 変化をみたところ、Preliminary であるが、教育入院によって血糖が改善し体重が減少するとともに便中の RELM β の減少が見られた。また、健診で得られた検体について RELM β の測定を行っている。

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 12 件)

1: Kushiya A, Sakoda H, Oue N, Okubo M, Nakatsu Y, Ono H, Fukushima T, Kamata H, Nishimura F, Kikuchi T, Fujishiro M, Nishiyama K, Aburatani H, Kushiya S, Iizuka M, Taki N, Encinas J, Sentani K,

- Ogonuki N, Ogura A, Kawazu S, Yasui W, Higashi Y, Kurihara H, Katagiri H, Asano T. Resistin-Like Molecule β Is Abundantly Expressed in Foam Cells and Is Involved in Atherosclerosis Development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301546
- 2: Iwashita M, Nakatsu Y, Sakoda H, Fujishiro M, Kushiya A, Fukushima T, Kumamoto S, Shinjo T, Kamata H, Nishimura F, Asano T. Valsartan restores inflammatory response by macrophages in adipose and hepatic tissues of LPS-infused mice. *Adipocyte.* 2013 2(1):28-32. doi: 10.4161/adip.21837
- 3: Otani Y, Nakatsu Y, Sakoda H, Fukushima T, Fujishiro M, Kushiya A, Okubo H, Tsuchiya Y, Ohno H, Takahashi S, Nishimura F, Kamata H, Katagiri H, Asano T. Integrator complex plays an essential role in adipose differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 434(2):197-202. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.029.
- 4: Nakatsu Y, Otani Y, Sakoda H, Zhang J, Guo Y, Okubo H, Kushiya A, Fujishiro M, Kikuchi T, Fukushima T, Ohno H, Tsuchiya Y, Kamata H, Nagamachi A, Inaba T, Nishimura F, Katagiri H, Takahashi S, Kurihara H, Uchida T, Asano T. Role of Pin1 protein in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis in a rodent model. *J Biol Chem.* 2012;287(53):44526-35. doi: 10.1074/jbc.M112.397133.
- 5: Kushiya A, Okubo H, Sakoda H, Kikuchi T, Fujishiro M, Sato H, Kushiya S, Iwashita M, Nishimura F, Fukushima T, Nakatsu Y, Kamata H, Kawazu S, Higashi Y, Kurihara H, Asano T. Xanthine oxidoreductase is involved in macrophage foam cell formation and atherosclerosis development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 32(2):291-8. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.234559.
- 6: Arima Y, Miyagawa-Tomita S, Maeda K, Asai R, Seya D, Minoux M, Rijli FM, Nishiyama K, Kim KS, Uchijima Y, Ogawa H, Kurihara Y, Kurihara H. Preotic neural crest cells contribute to coronary artery smooth muscle involving endothelin signalling. *Nat Commun.* 2012;3:1267. doi: 10.1038/ncomms2258.
- 7: Iwashita M, Sakoda H, Kushiya A, Fujishiro M, Ohno H, Nakatsu Y, Fukushima T, Kumamoto S, Tsuchiya Y, Kikuchi T, Kurihara H, Akazawa H, Komuro I, Kamata H, Nishimura F, Asano T. Valsartan, independently of AT1 receptor or PPAR γ , suppresses LPS-induced macrophage activation and improves insulin resistance in cocultured adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012 302(3):E286-96. doi: 10.1152/ajpendo.00324.2011.
- 8: Nakatsu Y, Sakoda H, Kushiya A, Zhang J, Ono H, Fujishiro M, Kikuchi T, Fukushima T, Yoneda M, Ohno H, Horike N, Kanna M, Tsuchiya Y, Kamata H, Nishimura F, Isobe T, Ogihara T, Katagiri H, Oka Y, Takahashi S, Kurihara H, Uchida T, Asano T. Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1 associates with insulin receptor substrate-1 and enhances insulin actions and adipogenesis. *J Biol Chem.* 2011 Jun 10;286(23):20812-22. doi: 10.1074/jbc.M110.206904.
- 9: Tanaka K, Hara S, Kushiya A, Ubara Y, Yoshida Y, Mizuiri S, Aikawa A, Kawazu S. Risk of macrovascular disease stratified by stage of chronic kidney disease in type 2 diabetic patients: critical level of the estimated glomerular filtration rate and the significance of hyperuricemia. *Clin Exp Nephrol.* 2011 15(3):391-7. doi: 10.1007/s10157-011-0420-6.
- 10: Ohno H, Nakatsu Y, Sakoda H, Kushiya A, Ono H, Fujishiro M, Otani Y, Okubo H, Yoneda M, Fukushima T, Tsuchiya Y, Kamata H, Nishimura F, Kurihara H, Katagiri H, Oka Y, Asano T. 4F2hc stabilizes GLUT1 protein and increases glucose transport activity. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011 May;300(5):C1047-54. doi:10.1152/ajpcell.00416.2010.
- 11: Nakarai H, Yamashita A, Nagayasu S, Iwashita M, Kumamoto S, Ohyama H, Hata M,

Soga Y, Kushiya A, Asano T, Abiko Y, Nishimura F. Adipocyte-macrophage interaction may mediate LPS-induced low-grade inflammation: potential link with metabolic complications. *Innate Immun.* 2012 18(1):164-70. doi:10.1177/1753425910393370.

12: Matsuzaki G, Kushiya A, Uto K, Shoda M, Seko Y. Atrio-His (James) accessory pathway and infiltration of $\gamma\delta$ T cells in the heart with MELAS. *BMJ Case Rep.* 2011 doi:pil: bcr0920103359. 10.1136/bcr.09.2010.3359.

〔学会発表〕(計6件)

第24回 分子糖尿病研究会 2012年12月8日[東京・品川インターシティー] 「インスリン抵抗性および大血管障害におけるマクロファージ由来 resistin like molecule β の意義」(Research Travel Grant 受賞)

第9回国際糖尿病連合西太平洋地区会議・第4回アジア糖尿病学会学術集会 2012年11月24日～27日[京都・国立京都国際会館] 「A 20-year trend of patients with type 2 diabetes at first diagnosis in urban Japan」

第55回日本糖尿病学会学術総会 2012年5月17日(木)～19日(土)[神奈川・パシフィコ横浜] 「インスリン分泌能と関連する血糖変動の指標の特徴」

第13回骨粗鬆症学会 健診・骨ドック分科会 平成23年11月3日～5日[兵庫・神戸国際会議場] 「2型糖尿病患者における骨折リスクに関する横断的研究」

第84回日本生化学会大会 2011年9月21日～24日[京都・国立京都国際会館] 「Mechanism of atherosclerosis development facilitated by resistin like molecule beta」

第54回日本糖尿病学会学術総会 2011年5月19日～21日[北海道・さっぽろ芸術文化の館他4箇所] 「キサンチンオキシダーゼ経路のマクロファージ泡沫化と動脈硬化への関与」 「CGMからみた血糖変動指標と糖尿病の病態の検討」

〔図書〕(計1件)

看護学大辞典 第6版

メヂカルフレンド社

ISBN: 978-4-8392-1478-4

2013年1月刊行(レジスチンの項目等)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 大腸癌、動脈硬化症、又はメタボリックシンドロームの検出方法

発明者: 浅野 知一郎、櫛山 暁史

出願人: 広島大学・朝日生命成人病研究所

種類: 特許

出願番号: 特願2013-40964(分割出願)

出願日: 平成24年11月26日

国内外の別: 国内

○取得状況(計1件)

名称: 大腸癌、動脈硬化症、又はメタボリックシンドロームの検出方法

発明者: 浅野 知一郎、櫛山 暁史

権利者: 広島大学・朝日生命成人病研究所

種類: 特許

番号: 特許第5229866号

取得年月日: 平成25年3月29日

国内外の別: 国内

〔その他〕

所属機関ホームページ

<http://www.asahi-life.or.jp/laboratory/biomolecular.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫛山 暁史 (KUSHIYAMA AKIHUMI)

公益財団法人朝日生命成人病研究所・その他部局等 准教授

研究者番号: 30435820

(2) 研究分担者

浅野 知一郎 (ASANO TOMOICHIRO)

広島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授
研究者番号: 70242063

(2) 研究分担者

迫田 秀之 (SAKODA HIDEYUKI)

東京大学・医学部附属病院・特任講師
研究者番号: 50376464

(2)研究分担者

栗原 裕基 (KURIHARA HIROKI)
東京大学・医学系研究科・教授
研究者番号： 20221947

(3)連携研究者

なし