

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501  
研究種目：基盤研究(C)  
研究期間：2012～2014  
課題番号：24500491  
研究課題名(和文) 包括的代謝プロファイリングによる自己免疫疾患モデルラットの病態発症機構の解明  
  
研究課題名(英文) Elucidation of pathogenesis of autoimmune diseases in animal models by comprehensive metabolomic profiling  
  
研究代表者  
横井 伯英 (YOKOI, Norihide)  
  
神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・特命准教授  
  
研究者番号：70311610  
  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、自己免疫性1型糖尿病モデルラットおよび自己免疫性甲状腺炎モデルラットを用いて、自己免疫疾患の病態発症過程の経時的な代謝プロファイルの変化を明らかにすることにより、自己免疫疾患の病態発症機構を解明することに挑んだ。本研究の結果、メタボロームというこれまでとは異なる視点から、自己免疫疾患の病態発症に關与する代謝物・代謝経路ならびに自己免疫疾患の病態発症を鋭敏に感知する新規のバイオマーカー候補が同定されるなど、全く新しい自己免疫疾患の早期診断や病態評価法の確立に直結する成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate pathogenesis of autoimmune diseases (autoimmune type 1 diabetes and autoimmune thyroiditis) in animal models by comprehensive longitudinal metabolomic profiling. From the viewpoint of metabolome, metabolites and metabolic pathways which are involved in the pathogenesis of autoimmune diseases were identified. Novel biomarker candidates which reflect the state of diseases were also found. These results could lead to the development of novel diagnosis and evaluation methods of autoimmune diseases.

研究分野：実験動物学、分子代謝学

キーワード：病態発症機構 自己免疫疾患 疾患モデル バイオマーカー 代謝物・代謝経路 メタボローム 1型糖尿病 自己免疫性甲状腺炎

## 1. 研究開始当初の背景

自己免疫性1型糖尿病および自己免疫性甲状腺炎(橋本病)は臓器特異的自己免疫疾患の代表例であり、T細胞による組織破壊が病態の原因として考えられている。いずれの疾患についても、炎症の開始から慢性化までの機構、炎症の慢性化による組織変性、それに伴う病態の惹起から重症化までの機構など、病態発症機構については不明な点が多い。

これまで研究代表者は1型糖尿病モデルKDPラットを用いた研究により、本ラットについて病態発症に至るまでの詳細な特徴を把握している。また、研究代表者は甲状腺機能低下症を発症する初めての自己免疫性甲状腺炎モデルとしてPVG.KDP-Cblbラットを確立した。

近年、生体内の代謝物を網羅的に解析するメタボロミクスの手法により、病態発症機構の解明や疾患バイオマーカーおよび治療標的の探索を目的とした研究が開始されている。すでに研究代表者は、包括的メタボローム解析による2型糖尿病バイオマーカーの探索研究などの実績があり、質量分析計を用いた包括的メタボローム解析に習熟している。

そこで、研究代表者が熟知している自己免疫疾患の動物モデルを対象とした包括的メタボローム解析により、新たな視点からの自己免疫疾患の病態発症機構の解明を目的とする本研究を着想した。

## 2. 研究の目的

本研究では、自己免疫性1型糖尿病モデルKDPラットおよび研究代表者が新規に確立した自己免疫性甲状腺炎モデルPVG.KDP-Cblbラットを対象として、包括的メタボローム解析により病態発症過程の経時的な代謝プロファイルの変化(経時的代謝ダイナミクス)を明らかにする。膵臓および甲状腺における炎症や病態の発症・進展・重症化を鋭敏に反映する代謝物・代謝経路を同定し、細胞レベルおよび個体レベルの解析から病態生理学的な意義を検討することにより、メタボロームという新たな視点から自己免疫疾患の病態発症機構の解明に挑む。

## 3. 研究の方法

(1)1型糖尿病モデルKDPラットを対象とした包括的メタボローム解析:

KDPラットと対照のKND(Komeda non-diabetic)ラットについて、生後4週齢から糖尿病発症後まで1週ごとに採血を行って血漿サンプルを採取すると同時に血糖値をモニターして糖尿病発症に至るまでの経時的推移を記録する。さらに、210日齢あるいは糖尿病発症後に膵臓の組織学的解析を行い、膵島炎の程度を判定する。このようにして採取した血漿サンプルについてガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)およびキャピラリー電気泳動質量分析計(CE-MS)を用いたメタボローム解析を行い、

病態発症過程の詳細な代謝プロファイルの変化(経時的代謝ダイナミクス)を明らかにする。

(2)自己免疫性甲状腺炎モデルPVG.KDP-Cblbラットを対象とした包括的メタボローム解析:

PVG.KDP-Cblb系統におけるCblb遺伝子座に関して変異型のホモ個体と対照のヘテロあるいは野生型個体について生後8週齢から発症後まで4週ごとに採血を行って血漿サンプルを採取する。300日齢あるいは甲状腺機能低下症(脱毛、甲状腺刺激ホルモン高値など)を発症するまで観察を行い、甲状腺の組織学的解析により甲状腺炎の程度を判定する。このようにして採取した血漿サンプルについてGC-MSおよびCE-MSを用いたメタボローム解析を行い、病態発症過程の詳細な代謝プロファイルの変化(経時的代謝ダイナミクス)を明らかにする。

(3)上記の解析から特定された代謝物・代謝経路について、代謝物の生成や分解に関わる酵素の阻害薬・活性化薬や代謝酵素遺伝子のノックダウンなどにより細胞レベルにおける代謝・生理学的意義を検討する。さらに、代謝酵素の阻害薬や活性化薬を自己免疫疾患の動物モデルに投与して個体レベルの解析を行い、病態生理学的な役割を検討する。

## 4. 研究成果

(1)1型糖尿病モデルKDPラットを対象とした包括的メタボローム解析の結果、膵島炎や糖尿病の病態発症過程の詳細な代謝プロファイルの変化を明らかにするとともに、病態発症を鋭敏に反映する代謝物・代謝経路の候補を同定した。

(2)自己免疫性甲状腺炎モデルPVG.KDP-Cblbラットを対象とした包括的メタボローム解析の結果、甲状腺における炎症発症過程の詳細な代謝プロファイルの変化を明らかにするとともに、病態発症・進展を鋭敏に反映する代謝物・代謝経路の候補を同定した。

(3)上記の解析から特定された代謝物・代謝経路について、代謝物の生成や分解に関わる酵素の阻害薬・活性化薬により細胞レベルにおける代謝・生理学的意義を検討した結果、膵島炎の発症を反映すると考えられる代謝物および代謝経路を特定した。

メタボロームというこれまでとは異なる視点から、自己免疫疾患の病態発症に関与する代謝物・代謝経路ならびに自己免疫疾患の病態発症を鋭敏に感知する新規のバイオマーカー候補が同定された。全く新しい自己免疫疾患の早期診断や病態評価法の確立に直結する成果が得られた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

Yokoi, N., Beppu, M., Yoshida, E., Hoshikawa, R., Hidaka, S., Matsubara, T., Shinohara, M., Irino, Y., Hatano, N., Seino, S. Identification of putative biomarkers for prediabetes by metabolome analysis of rat models of type 2 diabetes. *Metabolomics*(査読有) 2015. (in press) [doi: 10.1007/s11306-015-0784-9]

Gheni, G., Yokoi, N., Beppu, M., Yamaguchi, T., Hidaka, S., Kawabata, A., Hoshino, Y., Hoshino, M., Seino, S. Characterization of the prediabetic state in a novel rat model of type 2 diabetes, the ZFDM rat. *J. Diabetes Res.* (査読有) 2015:261418, 2015 [doi: 10.1155/2015/261418]

Nukaya, D., Minami, K., Hoshikawa, R., Yokoi, N., Seino, S. Preferential gene expression and epigenetic memory of induced pluripotent stem cells derived from mouse pancreas. *Genes Cells* 20:367-381, 2015. [doi: 10.1111/gtc.12227]

横井伯英, 清野進. バイオマーカー. 実験医学 (査読無) 33:1173-1177, 2015. 2015年4月増刊号「先制医療へ向かう医学研究」羊土社

Gheni, G., Ogura, M., Iwasaki, M., Yokoi, N., Minami, K., Nakayama, Y., Harada, K., Hastoy, B., Wu, X., Takahashi, H., Kimura, K., Matsubara, T., Hoshikawa, R., Hatano, N., Sugawara, K., Shibasaki, T., Inagaki, N., Bamba, T., Mizoguchi, A., Fukusaki, E., Rorsman, P., Seino, S. Glutamate acts as a key signal linking glucose metabolism to incretin/cAMP action to amplify insulin secretion. *Cell Reports* (査読有) 9:661-673, 2014. [doi: 10.1016/j.celrep.2014.09.030]

Yokoi, N., Hoshino, M., Hidaka, S., Yoshida, E., Beppu, M., Hoshikawa, R., Sudo, K., Kawada, A., Takagi, S., Seino, S. A novel rat model of type 2 diabetes: the Zucker Fatty Diabetes Mellitus ZFDM rat. *J. Diabetes Res.* (査読有) Article ID 103731, 9 pages, 2013. [DOI: 10.1155/2013/103731]

Sasase, T., Ohta, T., Masuyama, T., Yokoi, N., Kakehashi, A., Shinohara, M. The Spontaneously Diabetic Torii rat: an animal model of nonobese type 2 diabetes with severe diabetic complications. *J. Diabetes Res.* (査読有) 2013:976209, 2013. (Review)

〔学会発表〕(計13件)

別府正悠、横井伯英、星川律子、日高志保美、松原稔哉、篠原雅巳、清野 進. 2型糖尿病モデル SDT ラットにおけるトリプトファン代謝変動の解析. 第29回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会(京都、京都大学医学部芝蘭会館)2015年2月14日

横井伯英、山口拓郎、艾尼吾甫尔江、清野 進. 新規肥満・糖尿病モデル ZFDM ラットを用いたインスリン分泌研究. 第29回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会(京都、京都大学医学部芝蘭会館)2015年2月13日

Yokoi N., Beppu, M., Hoshikawa, R., Hidaka, S., Matsubara, T., Shinohara, M., Seino, S. Identification of biomarkers for prediabetes: a study of rat models of type 2 diabetes. 10th IDF-WPR Congress 2014 and 6th AASD Scientific Meeting, (Suntec, Singapore) November 21, 2014

清野 進、松原稔哉、横井伯英. 質量分析計を利用したプロテオミクス、メタボロミクスの糖尿病研究への応用. 第57回日本糖尿病学会年次学術集会(大阪)2014年5月23日

別府正悠、横井伯英、星川律子、日高志保美、篠原雅巳、清野 進. 自然発症糖尿病モデルラットを用いた経時的メタボローム解析による2型糖尿病バイオマーカーの探索. 第57回日本糖尿病学会年次学術集会(大阪)2014年5月23日

横井伯英、山口拓郎、吾甫尔江 艾尼、日高志保美、別府正悠、星川律子、星野雅行、清野 進. 新規肥満性2型糖尿病モデル Zucker fatty diabetes mellitus (ZFDM) ラットの病態解析. 第57回日本糖尿病学会年次学術集会(大阪)2014年5月23日

横井伯英、別府正悠、星川律子、日高志保美、篠原雅巳、清野 進. 自然発症モデルを用いた疾患バイオマーカーの探索 - 2型糖尿病モデル SDT ラットを用いた検討 -. 第61回日本実験動物学会総会(札幌)2014年5月16日

横井伯英、別府正悠、星川律子、日高志保美、篠原雅巳、清野 進. 経時的メタボローム解析による2型糖尿病バイオマーカーの探索 - 非肥満性2型糖尿病モデル SDT ラットを用いた検討 -. 第28回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会(宮崎、宮崎市民プラザ)2014年2月15日

Yokoi N., Hoshikawa, R., Beppu, M., Hidaka, S., Hoshino, M., Shinohara, M., Seino, S. Search for biomarkers that predict the development of type 2

diabetes. 49th EASD Annual Meeting  
(Barcelona, Spain) September 26,  
2013

横井伯英、星野雅行、日高志保美、別府  
正悠、星川律子、河田昭彦、清野 進. 新規肥満性2型糖尿病モデル Zucker fatty  
diabetes mellitus (ZFDM) ラットの確  
立と表現型解析. 第60回日本実験動物  
学会総会(つくば、つくば国際会議場)  
2013年5月15日

横井伯英、星野雅行、日高志保美、別府  
正悠、星川律子、清野 進. 新規肥満・  
糖尿病モデル Zucker fatty diabetes  
mellitus (ZFDM) ラットの確立. 第27  
回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集  
会(東京)2013年2月23日

N. Yokoi, E. Yoshida, R. Hoshikawa, S.  
Hidaka, M. Beppu, M. Oya, S. Seino.  
Search for biomarkers of type 2  
diabetes by metabolome analysis. 9th  
IDF-WPR Congress and 4th AASD  
Scientific Meeting (Kyoto, Japan)  
November 27, 2012

横井伯英、日高志保美、大矢美紀、井嶋  
誠、高木弓枝、増井則夫、清野 進. 1  
型糖尿病および甲状腺炎の発症におけ  
るラット主要組織適合遺伝子複合体ク  
ラス II 分子の役割. 第59回日本実験動  
物学会(別府)2012年5月25日

〔図書〕(計1件)

清野進, 横井伯英. 診断と治療社 日本の  
未来を拓く医療 - 治療医学から先制  
医療へ - (井村裕夫編) メタボローム.  
189 (76-85), 2012.

〔その他〕

ホームページ等  
神戸大学医学研究科分子代謝医学ホームペ  
ージ  
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/phys1/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

横井 伯英 (YOKOI, Norihide)  
神戸大学・大学院医学研究科・特命准教授  
研究者番号: 70311610