

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：32705

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25750364

研究課題名(和文) インスリン分泌能の指標となる新規分泌型miRNAの網羅的同定と生理的機能の解明

研究課題名(英文) Identification and characterization of novel circulating miRNAs as markers of insulin secretion

研究代表者

伊藤 太二(Ito, Taiji)

鎌倉女子大学・家政学部・講師

研究者番号：60343109

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)：本研究は、初期の2型糖尿病で、インスリン分泌能を高精度、簡便、迅速かつ低侵襲でモニターできるmiRNA マーカーの確立を目的とした。本研究では、糖尿病発症の前段階と考えられる「インスリン抵抗性」特異的に発現変動する分泌型miRNAを49種類、マイクロアレイ法により同定した。そのうち、発現上昇する2種類が動脈硬化に、4種類がインスリン分泌低下に、それぞれ関わる可能性を見出した。さらに、ゼブラフィッシュを用いた糖尿病合併症評価法を開発し、上記2種類のmiRNAの機能評価が可能となった。本研究から、上記miRNAの組み合わせは、糖尿病発症段階を総合的に評価できるマーカーとして有効と考えられた。

研究成果の概要(英文)：This study was intended by the establishment of the miRNA marker which could monitor ability for insulin secretion with quickness and a low aggression for early stage of type 2 diabetes. In this study, 49 kinds of miRNAs up- or down-regulated specifically to insulin resistance, which was thought to be the stage before the diabetes onset, were identified by miRNA microarray. Two kinds up-regulated were possible to be concerned with arteriosclerosis, and four kinds up-regulated with insulin secretion, respectively. Furthermore, a diabetes complications rating system using the zebrafish was developed, and an usability test of miRNA of two kinds of above was enabled. It was thought as the marker which could effectively evaluate a diabetes onset stage by a combination of miRNA mentioned above from this study generally.

研究分野：栄養医科学

キーワード：糖尿病 インスリン抵抗性 exosome 分泌型miRNA 肥満モデルゼブラフィッシュ インスリン分泌能

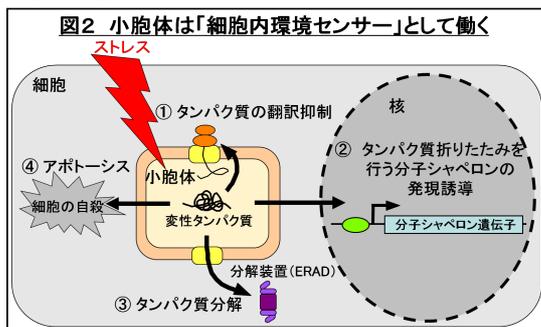
1. 研究開始当初の背景

(1) 日本人では、膵臓のインスリン分泌予備能が欧米人に比べて少ないため、早期にインスリン療法を導入し膵臓の疲弊を防ぐことが重要である。初期型糖尿病では、スルホニル尿素 (SU) 剤、ピグアナイド剤、チアゾリジン剤等が用いられるものの、膵臓の機能低下 (図1) による薬効低下がみられ、インスリン療法への切換えの判断が極めて重要となる。現在、インスリン分泌能は、尿排泄 C-ペプチド量、グルカゴン負荷試験、糖負荷試験等を総合して推測されており、エビデンスに基づく明確な判断基準はない。従って、簡便、迅速かつ低侵襲な膵臓機能の指標の開発が急務である。



(2) 2型糖尿病はインスリン抵抗性獲得が主な起因である(1)。このインスリン抵抗性により膵β細胞でのインスリン合成が慢性的に活性化し、インスリンのプロセッシングを行う膵β細胞内小胞体に対する負荷の増大を招き、膵臓の疲弊が起ると考えられている(図1)

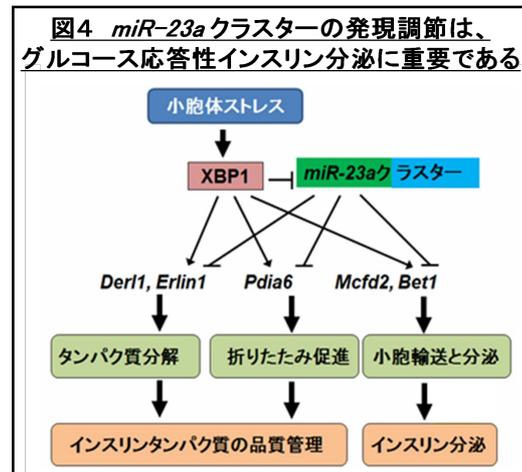
(3) 膵臓の疲弊は、小胞体ストレス応答機構の破綻によることが近年明らかとなった。小胞体は細胞内環境の変化(小胞体ストレス)を検知して、それに適応する「小胞体ストレス応答」機構を持つ(図2)。



この応答機構には、タンパク質の翻訳抑制、タンパク質折りたたみを行う分子シャペロンの発現誘導、変性タンパク質の分解除去、細胞の修復機能を超える場合のアポトーシス誘導等がある。2型糖尿病の増悪過程ではこうした小胞体ストレス応答機構の破綻によるインスリン分泌能の低下が起ると考えられている(2)。

(4) 申請者は、micro(mi)RNAを介した小胞体ストレス応答がグルコース応答性のインスリン分泌に重要であることを見出している。miRNAは、様々な遺伝子の発現を一括して制御する働きをもつ低分子RNAである(3,4)。小胞

体ストレス応答は転写制御因子である小胞体ストレス応答メディエーター(XBP1, ATF4, ATF6α, ATF6β)による遺伝子発現調節を介して行われるが、miRNAの関与については全く不明であった。申請者は小胞体ストレスを与えた野生型及び上記メディエーターをそれぞれ欠失させた線維芽細胞を用いて、マイクロアレイによる網羅的なmRNA及びmiRNA発現の相関解析を行った。その結果、各々のメディエーターはmiRNAの発現制御を介して代謝をはじめとした種々の生体機能を調節するほか、XBP1, ATF4, ATF6αがそれぞれ、miRNAの発現抑制を介して小胞体ストレス応答関連のタンパク質品質管理遺伝子群の発現を誘導することがわかった。その中でXBP1が、miR-23a, 27a, 24で構成されるクラスターを転写抑制して、タンパク質品質管理遺伝子群、特にBet1, Mcfd2といった小胞輸送過程に機能する遺伝子群の発現誘導を行うことを見出した(図3, 図4)。そして、miR-23aクラスターの発現抑制を介した小胞輸送関連遺伝子群の発現の最適化が、グルコース応答性インスリン分泌に重要であることを明らかにした(図3, 図4)。



(5) miRNAは細胞外にも分泌され血液、尿、唾液等の体液中にも存在する。これを利用して癌の診断や治療、予後予測用のマーカーとしての応用が検討されている(5)。そして、miRNAは血液中で、exosomeやHDL等の小胞に含まれ、組織間にわた

る遺伝子発現調節を行うことで組織間情報伝達にも機能する可能性が報告された(6, 7)。miR-23a, 27a, 24 についても、細胞外にも分泌されることが報告されている (Vesiclepedia, http://microvesicles.org/exp_summary?exp_id=45)。

(6) 以上から申請者は、インスリン分泌の調節に関わる一群の分泌型 miRNA について、2 型糖尿病の増悪過程で血液への分泌量が変動するのではないかと考え、こうした miRNA を網羅的に同定すれば、迅速かつ低侵襲で膵臓機能のモニタリングが可能な指標として活用できると着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、インスリン分泌能低下が見られる初期の 2 型糖尿病の増悪過程に焦点を当て、インスリン分泌能を高精度、簡便、迅速かつ低侵襲でモニターできる miRNA マーカーの確立を目的とする(図 1)。そのため、以下の(1)により、健常および初期糖尿病のヒト血液検体を用いて、miRNA マーカーの候補を絞り込む。そして(2)により、マウスやヒト培養細胞と「発生期間が短く、ヒトに酷似した代謝系をもつ」ゼブラフィッシュ個体を用いて、miRNA マーカー候補の分泌量変化とインスリン分泌能低下との因果関係を明らかにすると共に、分泌型 miRNA の標的となる生体内組織および遺伝子群の同定により分泌型 miRNA の生理的機能を解明する。

(1) 初期型糖尿病患者の病態進行に沿った、分泌型 miRNA 発現の網羅的解析と発現チャート作成

(2) 培養細胞とゼブラフィッシュ個体を用いた分泌型 miRNA の標的組織および標的遺伝子の探索

3. 研究の方法

(1) 初期型糖尿病患者の病態進行に沿った、分泌型 miRNA 発現の網羅的解析と発現チャート作成

(a) 血液生化学検査に基づくインスリン抵抗性をもつ被験者の大別
インフォームドコンセントを得た被験者から採血を行い、空腹時における血糖値と IRI (血中インスリン濃度) のデータを持ち、HOMA-R 指数を算出した。インスリン抵抗性をもつが糖尿病ではない被験者として、HOMA-R 指数が 1.7 以上かつ空腹時血糖値が 110mg/dL 未満(正常域)である被験者 2 名とインスリン抵抗性なしの健常被験者 2 名を選抜した。同時に、脂質生化学検査として、総コレステロール値、HDL コレステロール値、LDL コレステロール値を計測した。ここで得た血液については血清を分離して保存し、(b) の miRNA 抽出に用いた。

(b) 分泌型 miRNA の抽出と miRNA マイクロアレイによる網羅的発現解析

(a) で得られた血清から、東レ社製「3D-Gene RNA extraction reagent from liquid sample kit」をもちいて、exosome を単離後、この中に含まれる分泌型 miRNA を精製した。得られた分泌型 miRNA の発現量を、miRNA マイクロアレイ(3D-Gene miRNA labeling kit および Human_miRNA_V20 chip)により網羅的に解析した(受託解析)。

(c) 発現量変化がインスリン抵抗性獲得と高い相関性をもつ miRNA の抽出

インスリン抵抗性獲得に伴い、1.5 倍以上発現が上昇あるいは低下する分泌型 miRNA をクラスタリング解析により網羅的に抽出した。

(d) インスリン分泌能低下に伴う分泌型 miRNA の発現変動チャート作成と標的遺伝子予測

(c) で同定した分泌型 miRNA について、その標的となる遺伝子群を、miRNA 標的遺伝子予測ソフトウェアである TargetScan や miRDB により予測した。予測された遺伝子群に対して、遺伝子発現制御、物質輸送、免疫、発生・分化、代謝等の機能別分類を行うことにより、分泌型 miRNA の標的となる組織を予測した。

(2) 培養細胞とゼブラフィッシュ個体を用いた分泌型 miRNA の標的組織および標的遺伝子の探索

(a) 培養細胞を用いた分泌型 miRNA の標的組織および標的遺伝子の探索

(1) で同定した 49 種類の分泌型 miRNA 群について、マウスでも保存されているか NCBI ゲノムデータベースで検索した。その結果、約 50% の miRNA がマウスで保存されていた。これをふまえて、exosome 中に含まれる miRNA の絶対量を考慮し、解析する miRNA の優先順位づけを行った。一方、インスリン抵抗性が惹起するインスリン分泌能低下のモデルとして、これまでにマウス 3T3L1 細胞を用いた脂肪細胞分化系の構築を行い、脂肪細胞分化前後での培養上清を回収し、exosome 中に含まれる miRNA を精製した。

(b) ゼブラフィッシュ個体を用いた分泌型 miRNA の標的組織および標的遺伝子の探索

(a) と同様に、分泌型 miRNA 群のゼブラフィッシュでの保存性を解析した。その結果、約 20% の miRNA がゼブラフィッシュで保存されていた。一方、インスリン抵抗性が惹起するインスリン分泌能低下のゼブラフィッシュモデルとして、高脂質食による肥満モデルを構築した。さらに、光電脈波センサーを用いた非侵襲の加速度脈波による動脈硬化評価法と、非侵襲の心電による心虚血評価法および心電図の R-R 間隔のゆらぎを利用し

た自律神経障害評価法 (CVRR 解析およびパワースペクトル解析) の開発を行った。

4. 研究成果

空腹時血糖値と HbA1c 値がともに正常であるが HOMA-R からインスリン抵抗性を認めたヒト被験者 (図 5) 血液中の miRNA 発現の網羅的解析を行った。

図5 miRNAマイクロアレイ対象被験者の血液生化学検査値

検査項目	ヒト被験者(男性)				基準値
	1	2	3	4	
空腹時血糖(mg/dl)	75	99	86	94	70-109
空腹時インスリン(μ U/ml)	3.2	3.4	12.8	7.5	2.0-10
HbA _{1c} (%)(NGSP)	5.8	5.3	5.5	4.9	4.6-6.2
Total Cho.(mg/dl)	223	210	227	174	128-219
LDL-Cho.(mg/dl)	150	117	144	88	70-139
HDL-Cho.(mg/dl)	50	78	40	64	40-96
HOMA-R	0.59	0.83	2.72	1.74	≤ 1.0

HOMA-R = $\frac{\text{空腹時血糖(mg/dl)} \times \text{空腹時インスリン}(\mu\text{U/ml})}{405}$

そして、インスリン抵抗性特異的に発現変動する miRNA を 49 種類同定した (図 6)。

そのうち発現上昇する 2 種類が動脈硬化進行に関わり、また、発現上昇する 4 種類がインスリン分泌低下に関わる可能性を見出した (図 7)。

図6 健常者(1, 2)とインスリン抵抗性を認める被験者(3, 4)を比較して、発現量に1.5倍以上差が認められたmiRNA

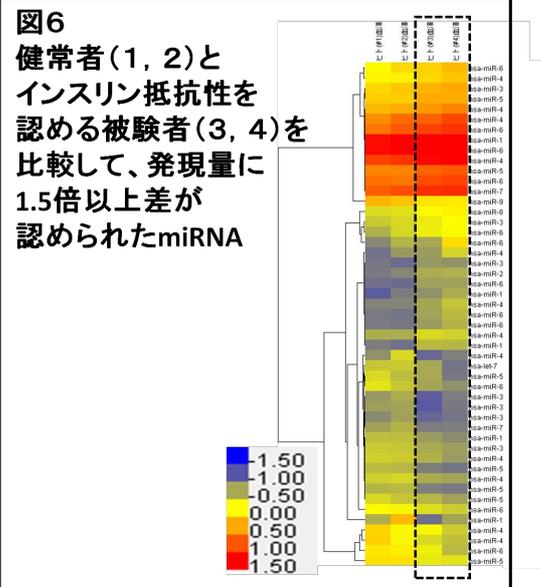


図7 Targetscan(targetscan.org)によるmiRNAの標的遺伝子予測

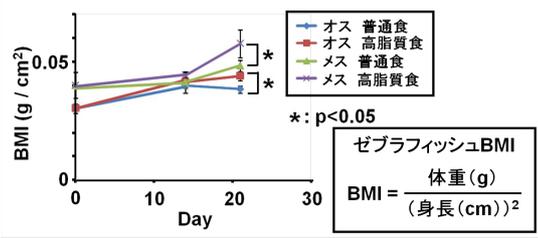
miRNA	標的遺伝子	標的遺伝子の機能
3xxx	SLC2A1 (GLUT1)	グルコースを細胞内に輸送
4xxx	GOLGINA1 GLPIR2	ゴルジ体での輸送に関わる GLP-1(インクレチン)を受容
4xxx	SOC57	サイトカインシグナルに必要
2xxx	AdipoR2	Adiponectin(アディポサイトカイン)を受容
6xxx	PDX1 AdipoR2	インスリン遺伝子の転写制御 Adiponectinを受容

従って本研究では、インスリン抵抗性特異的に発現する miRNA は血管に影響を与え、動脈硬化や糖尿病合併症を誘発するという仮説を立てた。ゼブラフィッシュモデルを用いてこの仮説を検証するため、本研究では、miRNA 解析とあわせて、ゼブラフィッシュ

を用いた加速度脈波による動脈硬化評価法と、心電による心虚血評価法および自律神経障害評価法の確立を行った。

まず、高脂質食により、BMI 値が有意に高値を示すオス肥満モデルを作出した (図 8)。

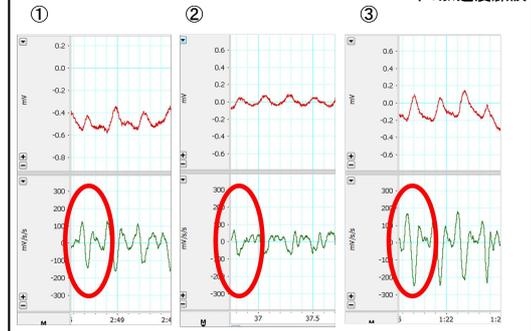
図8 ゼブラフィッシュBMIの変化



これとあわせ、光電脈波センサーの超小型化によるゼブラフィッシュでの非侵襲的脈波測定系の開発に成功し、加速度脈波を得た (図 9)。

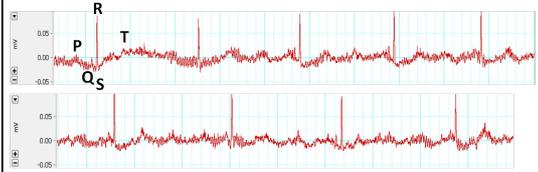
これをもとに加速度脈波加齢指数 (SDPTGAI) の算出を行ったところ、高脂質食はゼブラフィッシュの動脈硬化を進展させることが示された (data not shown)。

図9 光電脈波センサーによる脈波測定結果(普通食)



また、非侵襲的心電測定系の開発にも成功し、心電図波形の取得 (図 10) とともに、R-R 間隔変動 (CVRR) とパワースペクトルの解析を行った。

図10 ゼブラフィッシュ心電図波形



高脂質食では心電図波形において、T 波陰性化や脚ブロック、ST 低下の可能性のある波形が多く観察された (data not shown)。高脂質食では普通食と比べ、CVRR はほとんど変化しなかったが、パワースペクトル解析により自律神経系の活動低下が示唆された (data not shown)。さらに、脈波・心電の同時測定にも成功し、血圧推定が可能となった (data not shown)。従って、ゼブラフィッシュは、動脈硬化とそれによる心虚血、および初期の糖尿病性自律神経障害を評価するための疾患モデルとして有用であることが示された。

以上の結果から、上記 2 種類の miRNA は動

脈硬化に関わり、インスリン抵抗性の段階から微小血管障害のリスクが高まっており、これら2種類のmiRNAは糖尿病合併症リスクを評価できるマーカーとして有効である可能性が考えられた。さらに、上記49種類のmiRNAのうち、発現上昇する4種類が種々のインスリン分泌過程に影響して分泌低下に関わることから、糖尿病初期のインスリン分泌低下リスクを評価できるマーカーとして有効である可能性も考えられた。そして、このうち1種類は、上記の動脈硬化関連miRNAと同一でもあった。すなわち、インスリン抵抗性をもつ糖尿病予備軍の患者に対し、5種類のmiRNAを組み合わせて適用することにより、糖尿病発症段階でのインスリン分泌低下のみならず、糖尿病合併症に関わる微小血管障害をも総合的に評価できるマーカーとして有効である可能性が高いと考えられた。

<引用文献>

- (1) Hirosumi, J., et al. Nature 420, p333 (2002)
- (2) Volchuk, A. and Ron, D. Diabetes Obes Metab. Suppl 2, p48 (2010)
- (3) Fujita, S., et al. J. Mol. Biol. 378, p492 (2008)
- (4) Haraguchi, T., et al. FEBS lett. 581, p4949 (2007)
- (5) Kosaka, N., et al. Cancer Sci. 101, p2087 (2010)
- (6) Mittelbrunn, M., et al. Nat Commun. 2, p282 (2011)
- (7) Vickers, KC., et al. Nat Cell Biol. 13, p423 (2011)

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 1件)

伊藤太二、山崎俊介、太田一樹、大村正史、親泊政一、内分泌攪乱化学物質ノニルフェノールと結合する新たなタンパク質の同定、日本栄養・食糧学会誌 68巻、2015、63-68、査読あり

[学会発表](計 2件)

伊藤太二、山崎俊介、太田一樹、大村正史、親泊政一、新規タンパク質 NPR1 は、ノニルフェノールを受容するとヒストンアセチル化酵素 AIB1 と結合する、第 68 回 日本栄養・食糧学会大会、酪農学園大学・札幌市教育文化会館、2014-05-30 -

2014-06-01、口頭発表

伊藤太二、和久津昌紀、井草真澄美、尾形春香、木村真希、久門令奈、三溝佳苗、嶋内未来、野澤亜衣、日吉統子、藤谷真乃亜、宮崎祐里、大村正史、太田一樹、山崎俊介、ゼブラフィッシュを用いた、脈波と心電による糖尿病合併症評価法の確立、第 59 回 日本糖尿病学会年次学術集会、京都国際会館・ロームシアター京都・みやこめっせ、2016-05-19 - 2016-05-21、口頭発表

[図書](計 0件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

<http://www.kamakura-u.ac.jp/profile/disclosure/teacher/pdf/kan020.pdf>

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤太二 (ITO, Taiji)
鎌倉女子大学・家政学部・管理栄養学科・講師
研究者番号：60343109

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

山崎 俊介 (YAMAZAKI Shunsuke)
大村 正史 (OMURA Masashi)
太田 一樹 (OTA Kazuki)