

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350922

研究課題名(和文) インスリン抵抗性の指標となる新規血中バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Identification of novel biomarkers for insulin resistance

研究代表者

藤田 泰典 (Fujita, Yasunori)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・主任研究員

研究者番号：30515888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではインスリン抵抗性の指標となるバイオマーカーの探索を実施した。パルミチン酸を処理したC2C12筋管細胞の網羅的遺伝子発現解析から、バイオマーカー候補遺伝子としてCcl7とGdf15を選抜した。肥満モデルZuckerラットの血中CCL7とGDF15を測定した結果、対照群と比較して顕著に増加していた。また、血中CCL7は体重と強い相関を示し、血中GDF15は脂質・糖代謝異常、腎機能低下と強い相関を示した。今後、より詳細な解析を行い、CCL7とGDF15のインスリン抵抗性のバイオマーカーとしての有用性を検証する。

研究成果の概要(英文)：To identify novel biomarkers for insulin resistance, we performed a comprehensive gene expression analysis of C2C12 myotubes exposed to the saturated fatty acid, palmitate. We identified 38 genes encoding extracellular proteins whose expression was induced in response to palmitate. Among those genes, we focused on Ccl7 and Gdf15 as candidate genes of the biomarker. We measured serum concentrations of CCL7 and GDF15 in Zucker rats, a widely used animal model of obesity and type 2 diabetes. The serum levels of CCL7 and GDF15 were increased in Zucker-fatty rats compared with Zucker-lean rats. Moreover, serum CCL7 levels were positively correlated with body weight. On the other hand, serum GDF15 levels were strongly correlated with parameters of lipid and carbohydrate metabolism and renal function. Further studies are needed to determine the potential usefulness of serum CCL7 and GDF15 as novel biomarkers for insulin resistance.

研究分野：分子生物学

キーワード：インスリン抵抗性

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病の発症にはインスリン分泌不全とインスリン抵抗性が関わっている。糖尿病・耐糖能異常は血糖・HbA1C測定、経口ブドウ糖負荷試験等により診断される。インスリン抵抗性の指標としてはHOMA-IR (Homeostasis Model of Assessment-Insulin Resistance)が使われている。しかしながら、糖尿病・耐糖能異常の発症前からインスリン標的組織で起こっているインスリン抵抗性の指標となる血中バイオマーカーは開発されていない。そのような血中マーカーが実用化されれば、糖尿病・耐糖能異常の発症以前から患者に介入することが可能となり、糖尿病の予防につながる。また、糖尿病治療で用いられているインスリン抵抗性改善薬の薬効をモニターすることも可能となる。肥満においては、減量・運動に伴うインスリン抵抗性の改善を評価することができるようになる。

インスリン抵抗性の発症にはミトコンドリア機能障害と小胞体ストレスが深く関与している。過剰なエネルギー摂取、肥満等により、肝・筋肉・脂肪細胞等インスリン標的細胞内でミトコンドリア機能障害、小胞体ストレスが誘導され、細胞内インスリンシグナル伝達が抑制されることにより、インスリン抵抗性が生じる。

ミトコンドリア病はミトコンドリア・核DNAの変異が原因となる難治性先天性疾患であり、ミトコンドリアの機能障害によるエネルギー代謝異常によって、主にエネルギー需要の高い組織で症状を呈する。我々は、代表的なミトコンドリア病であるMELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes) 症候群のモデル細胞を用いて、ミトコンドリア病の診断マーカーの同定と治療法の開発を目指した研究を行ってきた。これまでに、モデル細胞のトランスクリプトーム・メタボローム解析等を行い、ミトコンドリア病ではミトコンドリア機能障害に加えて小胞体ストレス応答が誘発されていること等を報告している (Mitochondrion 2012 12:644-53, Mitochondrion 2007 7:80-8)。最近になり、ミトコンドリア機能障害と小胞体ストレス応答を反映する血中バイオマーカーの候補として23種類の分泌タンパクを同定した。その中でも、growth differentiation factor 15 (GDF15)は、MELAS患者の血中で増加していた。このようにインスリン抵抗性とミトコンドリア病では、基盤となる病態にミトコンドリア機能障害と小胞体ストレス応答という共通した分子機構が存在することから、GDF15を含む23種類の分泌タンパクがインスリン抵抗性の血中バイオマーカーの候補となる可能性を着想した。

2. 研究の目的

インスリン抵抗性の指標となる血中バイオマーカーの開発は、糖尿病をはじめ代謝性疾患の予防や治療に重要である。インスリン抵抗性に関与するミトコンドリア機能障害と小胞体ストレスを反映する分泌タンパクの候補をミトコンドリア病の研究から同定している。本研究では、これら候補からインスリン抵抗性のバイオマーカーとして有用な分泌タンパクをその細胞・動物モデルを用いて同定する。また、細胞モデルでRNA-Seq法による遺伝子発現解析を行い、インスリン抵抗性に関与する分泌タンパクを新たに同定し、有用性を検証する。これらの方法によりインスリン抵抗性の指標となる新規血中バイオマーカーの同定を目指す。

3. 研究の方法

(1) インスリン抵抗性細胞モデルを用いたバイオマーカー候補遺伝子の探索

マウスC2C12筋芽細胞を低血清培地で培養し、筋管細胞に分化誘導した。筋管形成を確認した後、500 μ Mパルミチン酸含む培養液に培地交換し、8時間培養した。細胞を回収し、QIAGEN社miRNeasy mini kitを用いてRNAを抽出した。Thermo Fisher Scientific社Ion Total RNA-Seq kit v2及びIon PI OT2 200 Kit v2を用いてライブラリを作製した。次に、Ion ProtonシステムとIon PI chipを用いてシーケンシングを実施した。TOMY DIGITAL BIOLOGY社次世代シーケンスデータ解析ソフトウェアStrand NGSでRNA-Seqデータの解析を行った。

(2) 高脂肪食摂取マウスの骨格筋で発現変化を示す遺伝子の探索

リサーチダイエツト社の超高脂肪飼料D12492 (60 Kcal%fat) を給餌した高脂肪食誘発性の肥満モデルマウス (日本チャールス・リバー社) から、長指伸筋とヒラメ筋を採取した。QIAGEN社miRNeasy mini kitを用いてRNAを抽出し、TOYOBO社ReverTra Ace qPCR RT Master Mix、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix、Thermo Fisher Scientific社StepOnePlusリアルタイムPCRシステムを用いて定量RT-PCR解析を実施した。

(3) Zuckerラットの血中タンパクの解析

Zuckerラットはレプチン受容体の遺伝子変異を原因とする肥満モデル動物であり、多食による肥満、高脂血症、高インスリン血症、高レプチン血症、耐糖能異常を呈する。本研究では、病因遺伝子をホモに持つ個体Zucker-fattyラット及び肥満を示さない野生型Zucker-leanラットを使用した。11-12週齢のラットから全採血を行い、血清を採取した。血清の一部は、オリエンタ

ル酵母株式会社に依頼し、血液生化学検査を実施した。また、血中 CCL7 濃度は abcam 社 MCP3 ELISA kit、血中 GDF15 濃度は R&D システムズ社 Mouse/Rat GDF-15 Quantikine ELISA Kit を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) インスリン抵抗性細胞モデルを用いたバイオマーカー候補遺伝子の探索

肥満により血中で増加する飽和脂肪酸は、インスリン抵抗性の発症に密接に関係している。飽和脂肪酸の一種であるパルミチン酸を処理した細胞はインスリン抵抗性のモデルとして広く用いられている。そこで、パルミチン酸を処理したマウス C2C12 筋管細胞の RNA-Seq 解析を行い、インスリン抵抗性モデルにおいて発現増加を示す遺伝子の探索を行った。その結果、パルミチン酸を処理した C2C12 細胞では、未処理の細胞と比較して、341 種類の遺伝子の発現が増加した。Gen Ontology (GO) term (GO: 0005576, extracellular region) を元に、それらの中から細胞外タンパクをコードする遺伝子を精査した結果、38 種類の遺伝子が得られた。その中でも発現変化が大きい上位 20 遺伝子をバイオマーカー候補遺伝子として選抜した。これらの中には、Angiopoietin-like protein 4 (Angptl4)、C-C motif chemokine ligand 2 (Ccl2)、Fibroblast growth factor 21 (Fgf21) など、既にインスリン抵抗性や糖尿病との関係が報告されている遺伝子も含まれていた (表 1)。

一方、インスリン抵抗性の発症・進行にはミトコンドリア機能異常が深く関与している。我々はミトコンドリア病の研究から、ミトコンドリア機能異常により遺伝子発現が増加する分泌タンパクを 23 種類同定している。その中でも、Gdf15 と Stanniocalcin 2 (Stc2) はパルミチン酸を処理した C2C12 細胞でも遺伝子発現が増加していた。

表 1 代表的なバイオマーカー候補遺伝子のリスト

Gene Symbol	Description	Fold change
Angptl4	angiopoietin-like 4	8.7
Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	3.7
Stc2	stanniocalcin 2	3.6
Fgf21	fibroblast growth factor 21	3.0
Gdf15	growth differentiation factor 15	2.5
Inhba	inhibin beta-A	1.8
Ccl7	chemokine (C-C motif) ligand 7	1.8

(2) 高脂肪食摂取マウスの骨格筋で発現変化を示す遺伝子の探索

高脂肪食摂取による肥満モデルマウスから骨格筋を採取し、Angptl4、Gdf15、Stc2、Inhibin beta-A (Inhba) の遺伝子発現レベ

ルを調べた。その結果、通常食群と比較して高脂肪食群では、ヒラメ筋において Inhba の発現が増加し、Gdf15 の発現に増加傾向が見られた。また、長指伸筋において Stc2 の発現に増加傾向が認められた。

(3) バイオマーカー候補遺伝子 Ccl7 と Gdf15

バイオマーカー候補遺伝子の中から、未だインスリン抵抗性との関連が十分に検討されていない、Chemokine (C-C motif) ligand 7 (Ccl7) と Gdf15 に着目した。CCL7 は monocyte chemotactic protein-3 (MCP-3) として知られるケモカインの一種である。CCL7 は単球の傷害部位への集積に関与し、炎症応答に関係することが報告されている。また、T 細胞、NK 細胞、樹状細胞、好塩基球、好酸球等を含む様々な免疫細胞の遊走を制御することが示唆されている。CCL7 の受容体として CCR1、CCR2、CCR3、CCR5 が同定されている。

GDF15 は TGF-スーパーファミリーに属する分泌たんぱくであり、通常は胎盤、前立腺、膀胱、腎臓、腸などの上皮に発現している。しかしながら、他の臓器・組織においても、虚血や傷害などにより遺伝子発現が誘導されることが知られている。また、がんや心疾患をはじめとする種々の疾患で血中 GDF15 が増加することが報告されている。我々は、ミトコンドリア機能異常が主因であるミトコンドリア病の患者で血中 GDF15 が増加することを明らかにし、診断マーカーとしての有用性を報告した。GDF15 とインスリン抵抗性、糖尿病との関連を示唆する報告があるが、その意義やバイオマーカーとしての有用性は十分に検討されていない。

(4) Zucker ラットの血中タンパクの解析

肥満・インスリン抵抗性と CCL7 及び GDF15 との関連を明らかにするために、Zucker-fatty ラット及び Zucker-lean ラットの血液生化学検査及び ELISA 法による血中 CCL7、GDF15 の測定を行なった。その結果、Zucker-fatty ラットでは、血糖値、総コレステロール、中性脂肪、HDL-コレステロールが顕著に増加しており、脂質・糖代謝異常が確認された。また、尿素窒素、カリウム、無機リンの増加、ナトリウム、クロールの減少が認められ、腎機能の低下が疑われた。さらに、ALT、アミラーゼの増加から、肝炎と膵炎も発症している可能性が考えられた。そして、Zucker-fatty ラットは、Zucker-lean ラットと比較して、血中 CCL7 及び GDF15 が増加していた (図 1)。

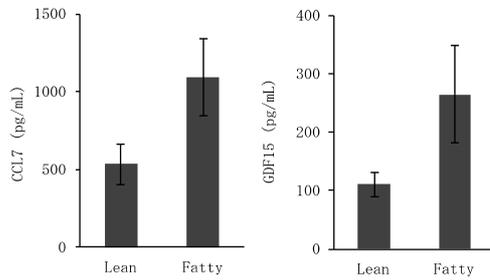


図1 Zuckerラットの血中CCL7とGDF15

次に、血液生化学検査項目と血中 CCL7、GDF15 との相関を検討した結果、CCL7 は体重、無機リンと強い正の相関を示した(表 2)。血中 GDF15 は、血糖値、総コレステロール、中性脂肪、尿素窒素、無機リン、アミラーゼと強い正の相関、クロームと強い負の相関を示した(表 2)。したがって、血中 CCL7 は体重との関連が強く、肥満に伴って増加する脂肪量を反映している可能性が考えられた。実際に、肥満者の脂肪組織中で CCL7 の遺伝子発現が増加していることが報告されている(Huber et al. J Clin Endocrinol Metab. 93:3215-21, 2008)。一方、血中 GDF15 は、脂質・糖代謝異常、腎機能低下との関連が示唆された。また、インスリン抵抗性 Zucker-fatty ラットは前糖尿病状態である耐糖能異常モデルとしても位置付けられていることから、血中 GDF15 はインスリン抵抗性の指標または将来のインスリン抵抗性・糖尿病を予測する因子になる可能性が考えられた。肥満者を対象とした臨床研究により、血中 GDF15 が将来のインスリン抵抗性や糖尿病の発症と関連する報告がある(Eur J Endocrinol 2012 167:671-8)。GDF15 は腎機能障害との関連が報告されており、本研究においても血中 GDF15 は腎機能低下と強い相関を示した。このことから、血中 GDF15 が骨格筋、肝臓、脂肪などにおけるインスリン抵抗性を反映しているのではなく、過食、肥満に伴う腎機能低下を反映している可能性も考えられる。

今後、より詳細な解析を行い、血中 CCL7 と GDF15 のインスリン抵抗性マーカーとしての有用性を検証する。

表2 血中CCL7及びGDF15と生化学検査項目との相関

	相関係数	
	CCL7	GDF15
体重	0.840	0.706
グルコース	0.647	0.789
総コレステロール	0.734	0.835
中性脂肪	0.693	0.817
尿素窒素	0.662	0.887
無機リン	0.834	0.788

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3件)

Fujita Y, Taniguchi Y, Shinkai S, Tanaka M, Ito M. Secreted growth differentiation factor 15 as a potential biomarker for mitochondrial dysfunctions in aging and age-related disorders. *Geriatr Gerontol Int* 16 Suppl 1:17-29, 2016. doi: 10.1111/ggi.12724. (査読有)

Yatsuga S, Fujita Y, Ishii A, Fukumoto Y, Arahata H, Kakuma T, Kojima T, Ito M, Tanaka M, Saiki R, Koga Y. Growth differentiation factor 15 as a useful biomarker for mitochondrial disorders. *Ann Neurol* 78:814-23, 2015. doi: 10.1002/ana.24506. (査読有)

Fujita Y, Ito M, Kojima T, Yatsuga S, Koga Y, Tanaka M. GDF15 is a novel biomarker to evaluate efficacy of pyruvate therapy for mitochondrial diseases. *Mitochondrion* 20:34-42, 2015. doi: 10.1016/j.mito.2014.10.006. (査読有)

[学会発表] (計5件)

Shoji Shinkai, Yu Taniguchi, Satoshi Seino, Akihiko Kitamura, Yasunori Fujita, Masashi Tanaka, Masafumi Ito. Serum Concentrations of GDF15 Predict Mortality in a General Population of Older Japanese. 2016 GSA Annual Scientific Meeting. 2016.11.16-20. New Orleans (USA).

藤田泰典、谷口優、新開省二、田中雅嗣、伊藤雅史、地域在住高齢者の血中 GDF15 と負の健康アウトカムとの関連解析、第 39 回日本基礎老化学会大会、2016 年 5 月 27 日、伊勢原市民文化会館(神奈川県伊勢原市)

藤田泰典、伊藤雅史、小島俊男、八ツ賀秀一、古賀靖敏、田中雅嗣、網羅的遺伝子発現解析によるミトコンドリア病の新規バイオマーカーの同定、第 14 回日本ミトコンドリア学会年会、2014 年 12 月 4 日、九州大学百年講堂(福岡県福岡市)

八ツ賀秀一、石井亜紀子、藤田泰典、小島俊男、伊藤雅史、田中雅嗣、角間辰之、古賀靖敏、GDF-15 & FGF-21: ミトコンドリア病の新規バイオマーカー、第 14 回日本ミトコンドリア学会年会、2014 年 12 月 4 日、九州大学百年講堂(福岡県福岡市)

藤田泰典、伊藤雅史、小島俊男、八ツ賀秀一、古賀靖敏、田中雅嗣、ミトコンドリア機能異常を反映するバイオマーカーの探索、第37回日本基礎老化学会大会、2014年6月26日、あいち健康プラザ(愛知県知多郡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 泰典 (FUJITA, Yasunori)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：30515888