

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460652

研究課題名(和文)レジスチンが1型糖尿病に関連するメカニズムの解明と、インスリン依存予知法の確立

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanisms of the association between resistin and type 1 diabetes. &#8211; The establishment of novel laboratory procedure for prediction of insulin dependent diabetes mellitus -

研究代表者

高田 康徳 (TAKATA, YASUNORI)

愛媛大学・医学系研究科・講師

研究者番号：20432792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ボランティアの血中レジスチン高値群および低値群の末梢血から単球を単離し、RNAを抽出、DNA arrayおよびRNA seqとバイオインフォマティクスを用いた遺伝子解析を行った。その結果、レジスチン高値群では、サイトカインレセプターXの下流に存在し、1型糖尿病発症に関連することが報告されている因子A、Bの遺伝子発現が増加していた。更に、これら1型糖尿病関連因子の遺伝子および蛋白レベルは、血中レジスチンレベルと優位な正の相関があった。

レジスチンは、サイトカインレセプターXのシグナルを増強させ、その下流にある1型糖尿病関連因子A、Bを増加させることによりインスリン分泌不全をきたすと考えられた。

研究成果の概要(英文)：First, we isolated total RNA from monocyte derived from subjects with high serum resistin level and low resistin levels. And then we compared the difference of gene expression by DNA array, RNA-seq and bioinformatics approach. It revealed that gene expression of two factors related to type1 diabetes were increased in the subjects with high resistin group. Furthermore, we found that serum resistin level is associated with gene expression and protein level of these two factors related to type1 diabetes. Our results suggest that resistin level is associated with type1 diabetes related two factors, and it may induce impaired insulin secretion independent of GAD antibody.

研究分野：医学

キーワード：1型糖尿病 レジスチン 1型糖尿病関連因子

1. 研究開始当初の背景

今までの、複数の研究結果から、本邦において1型糖尿病は、全糖尿病患者数の約5%をしめており、実際はかなりの症例数が存在するはずであるが、2型糖尿病と誤診されていることも多い。その原因として、1型糖尿病の多彩な病状と診断の困難さがあげられる。現在、成人1型糖尿病の検査として、C-peptide、GAD抗体、HLA検査が行われている。例えば、GAD抗体が陽性であれば、1型糖尿病 type1A と診断される。しかし、すべての症例において、C-peptide 分泌が低下(枯渇)し、血糖が増悪するわけではなく、C-peptide 分泌は保たれ、血糖コントロールが比較的良好な症例(緩徐進行1型糖尿病、SPT1DM)も多く存在する。SPT1DMでは、早期からのインスリン導入により、長期予後の改善が得られることが報告されており、治療方針を決めるうえでも正確な診断が重要である。更に、臨床的に問題になるのはGAD抗体が陰性のインスリン依存である1型糖尿病 type1B である。この場合は、HLA検査などを併用するが、2型糖尿病との鑑別診断は困難である。

近年、海外から少人数のレポートではあるが、小児1型糖尿病では、対象の正常小児に比較し、血中レジスチンが高値であることが報告された。そこで、我々は成人の1型糖尿病患者156名と2型糖尿病患者256名の血中レジスチン値を比較した。その結果、血中レジスチン値は、2型糖尿病患者に比し、1型糖尿病患者で有意に高値であった。以上の結果から、レジスチンはインスリン抵抗性を介した2型糖尿病の発症だけでなく、免疫系を介して1型糖尿病と関連する可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、血中レジスチンやレジスチン遺伝子多型の、1型、2型糖尿病の診断や鑑別における意義を明らかにする。更に、レジスチンが1型糖尿病(特にGAD抗体陰性、インスリン依存のtype1B)に関連するメカニズムをDNAアレイ、microRNAアレイや定量的RT-PCR: quantitative reverse transcriptase real-time PCR (QRTPCR)を用いて遺伝子発現レベル、ならびにバイオインフォマティクスを用いた遺伝子ネットワーク解析により解明する。これらを臨床検査に応用し、新たな糖尿病の病型分類やインスリン依存発症予知法を確立する。

3. 研究の方法

健常ボランティア、1型糖尿病、2型糖尿病の血清、DNAサンプルを用いて、GAD抗体、C-peptide、レジスチン、最近我々がDNA arrayで見いだした1型糖尿病関連因子A、Bの血中濃度の測定、更にヒトレジスチン SNP-420を解析し、1型糖尿病の検査、インスリン依存となるハイリスク者の予知、及びGAD抗体

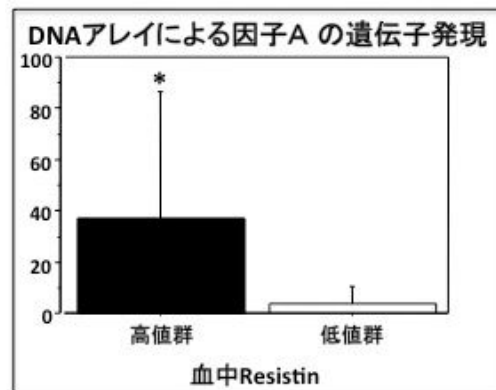
陰性の糖尿病の病型分類におけるレジスチンあるいはそのSNPsの意義を解明する。また、レジスチンが1型糖尿病に関連するメカニズムを明らかにするために、先の対象者の末梢血単核球から表面抗体により単球を単離し、1型糖尿病関連遺伝子の発現プロファイルが血中レジスチンレベルやレジスチン遺伝子多型あるいは病状によって異なるかをDNAアレイ、RNA-seqや定量的RT-PCR、バイオインフォマティクスを用いた遺伝子ネットワーク解析を用いて遺伝子レベルで解明する。

更に、メカニズムを明らかにするために、ヒト由来単核球培養細胞(THP-1)を用いたin vitroの研究をおこなう。この実験では、培養THP-1をレコンビナントレジスチンで刺激し、レジスチンの濃度依存性に1型糖尿病関連遺伝子の発現が増えるか検討する。

4. 研究成果

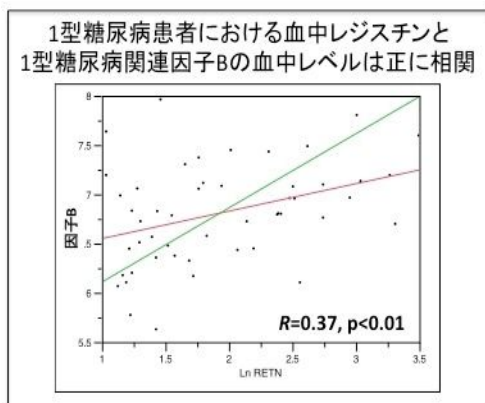
健常ボランティア(1010名)、1型糖尿病(160名)、2型糖尿病(280名)の血中レジスチンの測定を行った。このうち、年齢、性、BMIを調節した血中レジスチン高値群(高位25%)および低値群(低位25%)サンプルについて、末梢血から単球を単離し、RNAを抽出、DNAアレイおよびRNAseqによる遺伝子解析を行った。更に、70名の対象者の末梢血から単球を単離し、RNAを抽出した。DNAアレイおよびRNAseqの結果を、バイオインフォマティクスを用いた遺伝子ネットワーク解析を用いて検討した。

その結果、血中レジスチン高値群では低位群に比較し、糖尿病の発症に関連することが報告されているサイトカインレセプターXの下流に存在し、かつ、1型糖尿病に関連することが既に報告されている因子A、Bの遺伝子発現が上昇していることを明らかにした。



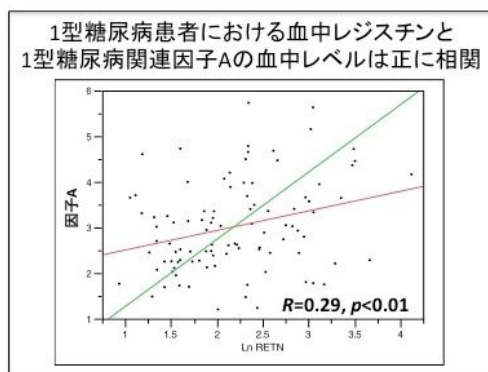
更に、単球内でのこれら1型糖尿病関連因子の遺伝子発現について quantitative reverse transcriptase real-time PCR (QRTPCR)で解析した。その結果、1型糖尿病関連因子A、Bの遺伝子発現は、血中レジスチン蛋白およびレジスチン mRNA 発現と統計学的に有意な正の相関があった。また、将来の臨床検査への応用のため、同様な QRTPCR

解析をPAXgene採血管を用いて得た、全血RNAについての検討を行った。全血から得たRNAにおいても、レジスチン遺伝子発現はレジスチン SNP-420 により規定されていた。また、ELISAにより得られた血中レジスチンレベルと、PAXgene採血管を用いて得た全血RNA中のレジスチン遺伝子発現は有意な正の相関があった。次に、全血から得たRNAにおいて1型糖尿病関連因子A、Bの遺伝子発現をおこない、血中レジスチンレベルとの関連を検討した。その結果、1型糖尿病関連因子A、Bの遺伝子発現は、血中レジスチンおよびレジスチン mRNA レベルと有意な正の相関があ



った。

更に、これら1型糖尿病関連因子A、BについてELISAを用いた蛋白レベルの検討を行った(N=362例)。その結果、血中レジスチンおよびレジスチン mRNA レベルはこれら1型糖尿病関連因子A、Bの蛋白、mRNAレベルと関連をみとめた。特に、1型糖尿病患者の血中レジスチンと1型糖尿病関連因子Bの関



連が強かった。

次に、ヒト単球培養細胞 (THP-1) を用いた in vitro の研究をおこなった。THP-1 をヒトの血中濃度に近いレコンビナントレジスチンで刺激し、レジスチンの濃度依存性に1型糖尿病関連遺伝子の発現が増えるかQRTPCRで確認した。その結果、培養細胞によるレジスチンの刺激実験においても、1型糖尿病関連因子A、Bは濃度依存的に発現が増加し、生体内の反応を再現できた。

以上の結果から、レジスチンは単球において、サイトカインレセプターXのシグナルを増強させ、その下流にある1型糖尿病関連因子A、Bを血中に増加させ、これらが、膵beta

細胞の炎症を引き起こすことにより、インスリン分泌不全をきたすと考えられた。これらの結果から、GAD抗体陽性Type1Aのような自己免疫1型糖尿病以外の免疫、例えば、膵beta細胞の炎症によるインスリン分泌低下にレジスチンが関与している可能性があり、そのためにGAD抗体陰性のType1Bの1型糖尿病に関連している可能性、また、その障害の程度により、2型糖尿病と診断されている可能性が示唆された。

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)

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 康徳 (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

大沼 裕 (Onuma, Yu)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 00294794

吉永 佳代 (Yoshinaga, Kayo)

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10537088

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

川村 良一 (Kawamura, Ryoichi)
愛媛大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90533092

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()