

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：32705

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01876

研究課題名(和文)新規血中miRNAによる糖尿病進行ステージと合併症リスクの迅速早期診断と治療応用

研究課題名(英文)Rapid early diagnoses for diabetes progression stage and the complications risk by novel circulating miRNAs, towards the therapeutic applications

研究代表者

伊藤 太二 (Ito, Taiji)

鎌倉女子大学・家政学部・准教授

研究者番号：60343109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、既に同定済みのインスリン抵抗性特異的に血中発現量が変動する49種類のmicro(mi)RNAのうち、インスリン抵抗性特異的に発現増加し絶対量も多い13種類に注目して標的遺伝子群をTargetscanとmiRDBで予測し、12種類が複数の遺伝子群を一括して発現抑制して、インスリン分泌低下、インスリン抵抗性、小胞体ストレス亢進、動脈硬化発症等と関連があることを明らかにした。さらに、モデル動物としてゼブラフィッシュに着目し、インドシアニングリーンを用いた高精細な動脈硬化巣の蛍光動画造影法も確立した。現在、糖尿病進行度特異的miRNAマーカーの最終的な絞り込みと機能解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

miRNAは、様々な遺伝子の発現を一括して抑制する働きをもち、唾液、尿、血液等の体液中にも存在する。miRNAを疾患の診断に用いるメリットは、用いる血液が極めて少量であり、被験者への侵襲度が極めて低い点にある。本研究の成果により、ヒト血液中の分泌型miRNAを活用して、糖尿病の全進行ステージにわたって継続的に糖尿病病態をモニターできる新たな診断用miRNAマーカーセットの開発へと結びつくと考えられる。さらに、核酸クロマト法等を活用した簡便・迅速・高精度な新規のPOCT診断法へと展開したい。

研究成果の概要(英文)：In this study, targeting genes were predicted by Targetscan and miRDB, focusing on 13 micro(mi)RNAs with increased expression specifically for insulin resistance and higher absolute levels among 49 miRNAs with variable expression levels specifically for insulin resistance. 12 miRNAs suppressed expression of multiple genes collectively and were found to be associated with decreased insulin secretion, insulin resistance, increased endoplasmic reticulum stress, and development of atherosclerosis. In addition, in this study, we focused on zebrafish as a disease model animal and established a fluorescence video imaging method of high-definition arteriosclerosis foci using indocyanine green. We are now finalizing and analyzing the function of diabetes progression-specific miRNA markers.

研究分野：栄養医科学

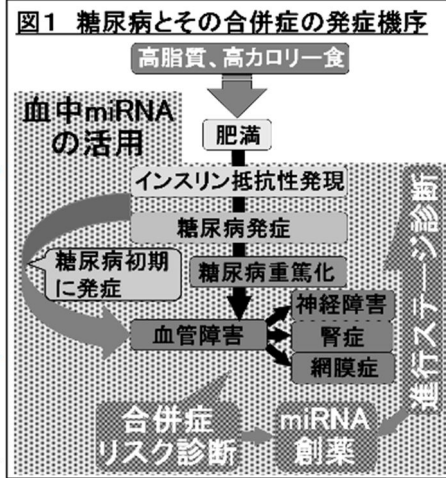
キーワード：血中分泌型miRNAマーカー インスリン抵抗性 糖尿病進行ステージ 糖尿病合併症リスク 糖尿病治療用エクソソーム ゼブラフィッシュ インドシアニンググリーン 動脈硬化巣のリアルタイムイメージング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

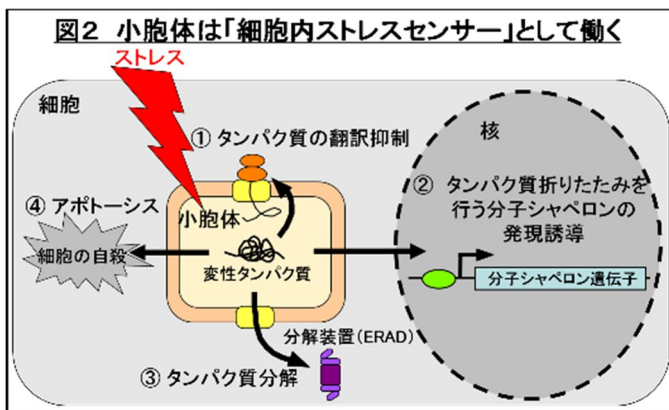
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

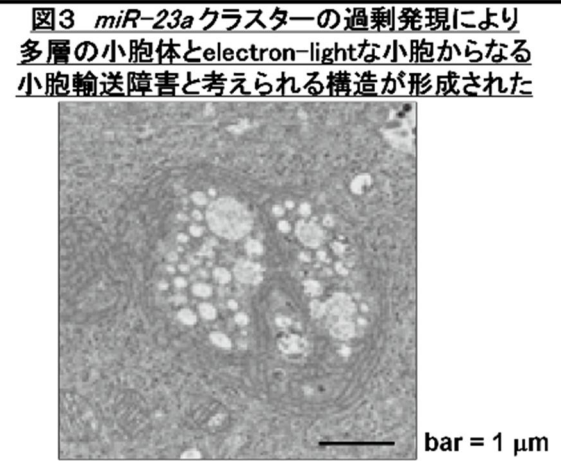
(1) 2型糖尿病はインスリン抵抗性獲得が主な起因である (Hirosumi J, et al. Nature 420, p333 (2002))。このインスリン抵抗性により膵β細胞でのインスリン生合成が慢性的に活性化し、インスリンのプロセッシングを行う膵β細胞内小胞体に対する負荷の増大を招き、膵臓の疲弊が起これと考えられている(図1)。日本人では、膵臓のインスリン分泌予備能が欧米人に比べて少ないため、早期にインスリン療法を導入し膵臓の疲弊を防ぐことが重要である。従って、2型糖尿病初期に、インスリン分泌低下を迅速かつ高感度に診断できるマーカーが必要である。



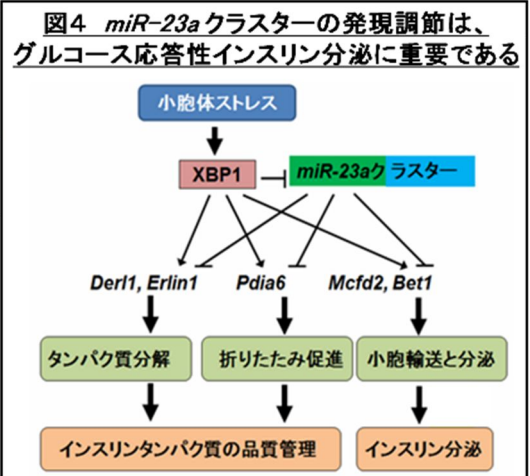
(2) 高血糖は血管障害を惹起するが、最近、正常血糖状態でもインスリン抵抗性は血管障害、そして動脈硬化の要因となることが報告された(DeFronzo RA Diabetologia 53, p1270 (2010), 図1)。すなわち、従来考えられていたタイミングよりも早期から血管障害を迅速かつ高感度に診断することで、三大合併症の発症を予防でき、予後改善に直結する。



(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、翻訳抑制、タンパク質折りたたみを司る分子シャペロンの発現誘導、変性タンパク質の分解除去、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低下が起これと考えられている (Volchuk A and Ron D Diabetes Obes Metab Suppl 2, p48 (2010))。



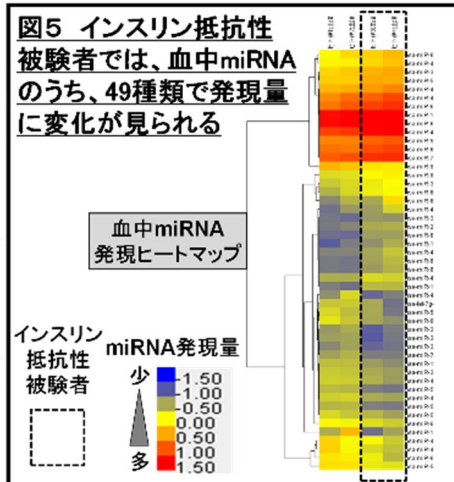
(4) 申請者は、micro(mi)RNA を介した小胞体ストレス応答がグルコース応答性のインスリン分泌に重要であることを突き止めた。miRNA は、様々な遺伝子の発現を一括して抑制する働きをもつ低分子 RNA である。小胞体ストレス応答は転写制御因子である小胞体ストレス応答メディエーター (XBP1, ATF4, ATF6α, ATF6β) による遺伝子発現調節を介して行われるが、miRNA の関与については全く不明であった。申請者は、XBP1 が、miR-23a クラスターの発現抑制を介してインスリン分泌に関わる小胞輸送関連遺伝子群の発現を最適化し、グルコース応答性インスリン分泌に重要であることを明らかにした (図3, 図4)。



(5) miRNA は細胞外に分泌されるものもあり、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応用されている (Kosaka N, et al. Cancer Sci 101, p2087 (2010))。そして、miRNA は血液中で

エクソソームや 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ことが報告された (Mittelbrunn M, et al. Nat Commun 2, p282 (2011)、Vickers KC, et al. Nat Cell Biol 13, p423 (2011))。

(6) 申請者は、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血清中の miRNA 発現を miRNA マイクロアレイにより網羅的に解析した。そして、インスリン抵抗性特異的に発現量が 1.5 倍以上変動する miRNA を 49 種類同定した (図 5)。これらの miRNA 群を組み合わせることで、インスリン分泌低下のみならず、糖尿病合併症に関わる血管障害をも総合的に評価できる早期診断マーカーになると考えられる。



(7) 以上から申請者は、インスリン抵抗性特異的に発現変動する miRNA 群に焦点を当て、進行ステージの異なる様々な糖尿病患者を対象に、血中での miRNA 発現のプロファイリングと共に、これら miRNA の標的遺伝子の機能予測を行えば、迅速、高感度かつ低侵襲で糖尿病とその合併症の病態や発症リスクの診断が可能なマーカーとして活用でき、さらにこれらの診断用 miRNA に対する阻害分子等を設計しエクソソームデリバリーと組み合わせることで治療応用も可能であると着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では血中 miRNA に注目し、糖尿病とその合併症に関わる種々の病態を迅速、高感度かつ低侵襲で診断できる miRNA マーカーの開発と治療応用を目的とする (図 1)。そのため、以下の(1)により、既に同定済みのインスリン抵抗性特異的 miRNA 49 種類について、健常者及び様々な進行ステージにある糖尿病患者の血中での発現解析を行い、miRNA 標的遺伝子の機能予測と併せて、糖尿病進行ステージと合併症リスクの診断用 miRNA マーカーを決定し、進行ステージや合併症リスク評価の具体的な数値指標として確立する。そして(2)により、これらの miRNA に対する阻害分子等を設計し、病態治療用エクソソームを作製する。そして、マウスやヒトの培養細胞と「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、種々の病態に対する治療効果を検証する。

- (1) 2 型糖尿病患者の病態と分泌型 miRNA 発現との相関解析による診断用 miRNA マーカーの絞込と最適化
- (2) 診断用 miRNA マーカーに対する阻害分子等設計とエクソソームデリバリーによる病態改善効果の検証

3. 研究の方法

- (1) 2 型糖尿病患者の病態と分泌型 miRNA 発現との相関解析による診断用 miRNA マーカーの絞込と最適化

(a) 臨床検査に基づく糖尿病患者の分類

(a-1) インスリン分泌能による分類

糖尿病患者について、血液及び尿の生化学検査により、血糖値関連 (空腹時血糖値、HbA1c、糖負荷試験) 及びインスリン分泌関連 (IRI) の各検査を行い、インスリン分泌能を推測し分類した。

(a-2) 糖尿病合併症の病態評価による分類

血圧検査、血清脂質検査 (TG、TC、HDL-C、LDL-C) を (a-1) と併せて行った。必要に応じて、糖尿病の合併症について病態を評価し、糖尿病患者を分類した。(a-1) と (a-2) の各患者について採血を行い血清を分離して (b) の miRNA 単離・濃縮に用いた。

(b) 分泌型 miRNA の単離・濃縮と定量的 RT-PCR 法による miRNA 発現解析

(a) で得られた糖尿病患者血清から、MNA 社製 NucleoSpin miRNA Plasma キットにより血清中の全分泌型 miRNA を単離・濃縮した。得られた全分泌型 miRNA のうち、既に同定済みのインスリン抵抗性特異的に発現変動する 49 種類の miRNA について、血清中の発

現量をThermofisher社製 PikoReal 96 Real-Time PCR Systemにより定量するための条件検討を行った。

(c) 病態特異的分泌型miRNAの標的遺伝子機能予測

(b) の分泌型 miRNA に対し、標的遺伝子を TargetScan や miRDB 等のソフトで予測した。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、代謝等の機能別分類 (GO 解析) を行い、情報を統合した。

(2) 診断用 miRNA マーカーに対する阻害分子等設計とエクソソームデリバリーによる病態改善効果の検証

(a) ゼブラフィッシュを用いた疾患モデルの構築

ゼブラフィッシュを用いた血管障害の改善効果の検証のためのシステムとして、ICG を用いた血管動画造影による動脈硬化評価法を確立した。

4. 研究成果

(1) 2 型糖尿病患者の病態と分泌型 miRNA 発現との相関解析による診断用 miRNA マーカーの絞込と最適化

(a) 研究方法 (1-a) に従って、インフォームドコンセントの得られた計 15 名の被験者を、「インスリン抵抗性であるが、糖尿病でない」群と「糖尿病であるが、合併症の併発はみられない」群と「糖尿病であり合併症も併発している」群の 3 群に各群 5 名ずつ分類した。さらに、インフォームドコンセントを得て、健常被験者の追加を行った。すなわち、血液生化学検査等により、血糖値とインスリン分泌能、脂質代謝能等について評価し健常被験者として選抜した。各被験者について採血を行い、血清を分離して (b) の miRNA 精製に用いた。

(b) (a) で得られた血清から、血清中の全分泌型 miRNA を精製した。まず、同定済みのインスリン抵抗性特異的に発現変動する 49 種類の miRNA のうち、インスリン抵抗性特異的に発現上昇しかつ発現絶対量の多い 9 種類に注目し、定量的 RT-PCR の条件を確立した。そして、これら 9 種類の miRNA について、(a) の 15 名の被験者血清中の発現量を定量中である。さらに、分注作業を自由にデザインできる自動分注ロボットシステムを導入し、ハイスループットで再現性の高い miRNA 精製と定量的 RT-PCR システムを構築した。そして、得られた血清から、自動分注ロボットシステムを用いて血清中の全分泌型 miRNA を精製するための条件検討も行った。

(c) これまでに申請者は、マイクロアレイにより、インスリン抵抗性特異的に発現量が 1.5 倍以上変動する miRNA を 49 種類同定していた (図 5)。その中で、インスリン抵抗性特異的に発現上昇しかつ絶対量の多い 12 種類の miRNA に注目した。これらの miRNA に対して、Targetscan と miRDB を用いた標的遺伝子予測を行い、マト

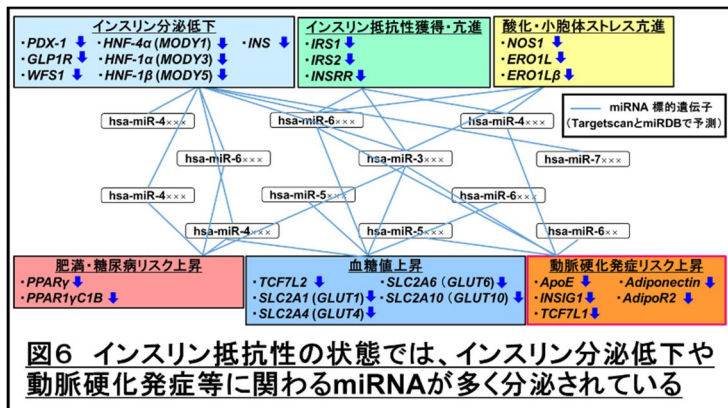


図6 インスリン抵抗性の状態では、インスリン分泌低下や動脈硬化発症等に関わるmiRNAが多く分泌されている

リックスを作成した。その結果、これら 12 種類の miRNA は、互いに相乗的に動脈硬化やインスリン分泌低下等に働きうる事が示唆された (図 6)。具体的には、これらの miRNA 群の中に、ApoE, Adiponectin, AdipoR2 等の発現抑制を介して動脈硬化発症に関わる可能性のある一群を見出した。すなわち、インスリン抵抗性は血管障害のリスクを高め、これらの miRNA 群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ある。また、miRNA 群には、インスリン遺伝子の転写因子である PDX-1、インクレチンである GLP-1 に対する受容体 GLP1R、MODY1、3、5 としてそれぞれ知られる HNF-4a、HNF-1a、HNF-1b 等の発現抑制を介してインスリン分泌低下に関わると考えられる一群も見出された。これらは、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がある。

以上の結果から、インスリン抵抗性をもつ糖尿病予備軍の患者に対し、上記の miRNA 群を組み合わせて診断マーカーとして適用すれば、糖尿病発症段階で、インスリン分泌低下のみならず、糖尿病合併症に関わる血管障害のリスクも総合的に評価することが可能になると期待される。この研究成果に対して、第 74 回日本栄養・食糧学会大会トピックス賞が授与された。

(2) 診断用 miRNA マーカーに対する阻害分子等設計とエクソソームデリバリーによる病態改善効果の検証

ゼブラフィッシュ野生型に高脂質食を摂取させ、動脈硬化を発症していると考えられる肥満モデルを作出した。インドシアニングリーンをこのモデルの背側大動脈に注入して血管造影を行った。

野生型ゼブラフィッシュを用いて、ICG 注入 30 分後に、普通食群と高脂質食群のゼブラフィッシュ腹部での ICG 蛍光強度と特異性を比較した。高脂質食群では、普通食群に比べて、動脈硬化巣と考えられる特定部位の ICG 蛍光が有意に強く検出された

(図 7)。次に、高脂質食群の野生型ゼブラフィッシュを用いて、ICG 注入 30 分後と 150 分後での腹部の ICG 蛍光を比較し蛍光強度の経時変化を調べたところ、注入 30 分後で蛍光が強く観察される傾向があった(図 8)。さらに、野生型ゼブラフィッシュを用いて、ICG 注入 30 分後に、腹部の近赤外蛍光を動画撮影し、普通食群と高脂質食群で比較したところ、高脂質食群で、血管内に動脈硬化巣が存在し、血流がやや滞っていることが観察された (図 9)。背側大動脈の径は約 300 μ m、背側大動脈から分岐した血管の径は約 100 μ m であることが報告されている。動画を拡大して観察すると、10~20 μ m 程度の ICG 蛍光が散在して観察された(図 10)。ICG はコレステロールと特異的に結合する性質を持っていることを考えると、この散在性の蛍光は、動脈硬化巣の可能性が高いと考えられ、ゼブラフィッシュの動脈硬化過程の高精細なリアルタイムイメージングが可能となった。現在(1-b)の miRNA を阻害する S-TuD の設計を行っており、ゼブラフィッシュに導入して動脈硬化抑制効果を評価する。

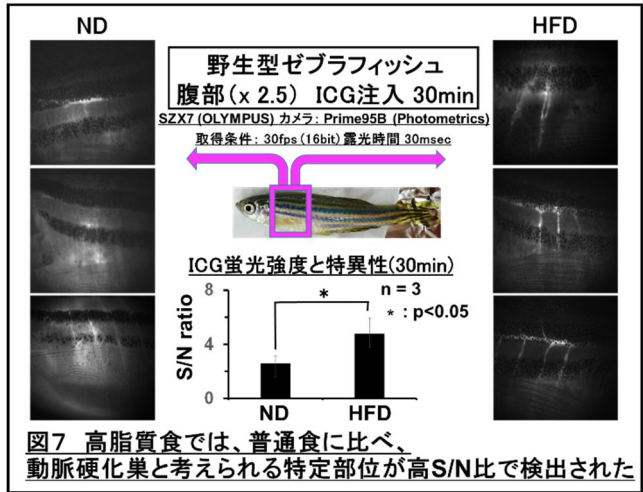


図7 高脂質食では、普通食に比べ、動脈硬化巣と考えられる特定部位が高S/N比で検出された

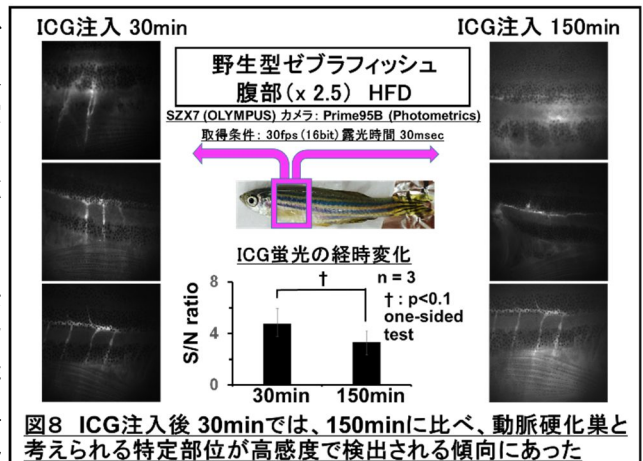


図8 ICG 注入後 30min では、150min に比べ、動脈硬化巣と考えられる特定部位が高感度で検出される傾向にあった

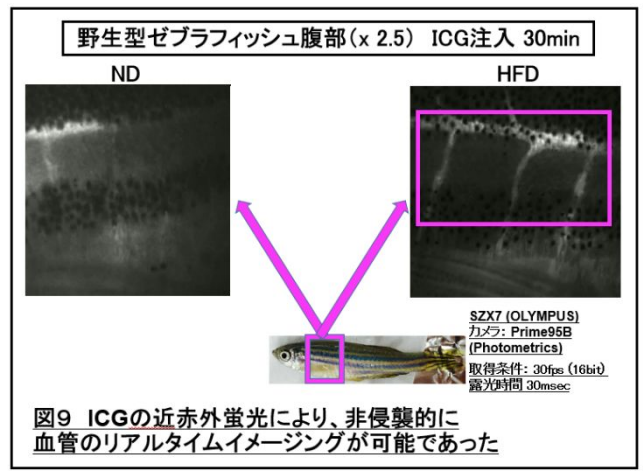


図9 ICG の近赤外蛍光により、非侵襲的に血管のリアルタイムイメージングが可能であった

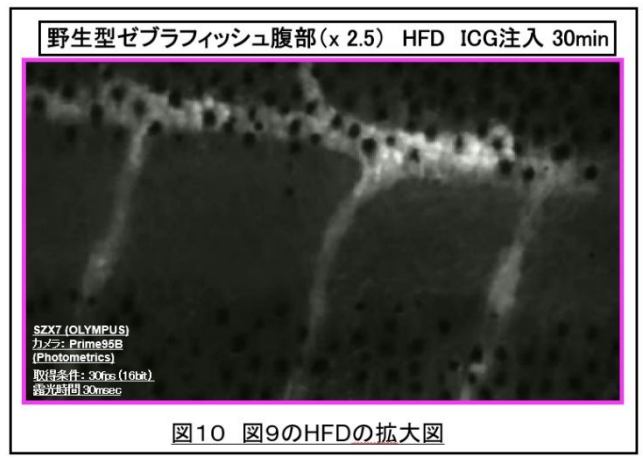


図10 図9のHFDの拡大図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名	伊藤 太二, 菅原 沙恵子, 宇田川 美優, 小川 結稀, 奥田 彩乃, 草柳 波南, 平井 杏奈, 船越 由衣, 間山 美久, 大村 正史, 高橋 君子
2. 発表標題	インドシアニングリーンのNIRFを活用した、肥満モデルゼブラフィッシュの動脈硬化巣の高精細なリアルタイムイメージング
3. 学会等名	第51回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	赤田 このみ, 相田 萌花, 菅原 沙恵子, 櫻井 浩平, 大橋 由奈, 小野 詩織, 鈴木 さくら, 中谷 桃子, 酒造 麻実, 三村 明穂, 大村 正史, 高橋 君子, 中谷 弥栄子, 伊藤 太二
2. 発表標題	ゼブラフィッシュを用いた加速度脈波、心電、及びICG蛍光イメージングを組み合わせた総合的糖尿病合併症評価法
3. 学会等名	第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	大橋 由奈, 小野 詩織, 菅原 沙恵子, 櫻井 浩平, 相田 萌花, 赤田 このみ, 鈴木 さくら, 中谷 桃子, 酒造 麻実, 三村 明穂, 大村 正史, 高橋 君子, 中谷 弥栄子, 伊藤 太二
2. 発表標題	インスリン抵抗性特異的な血中分泌型miRNAの網羅的同定と標的遺伝子予測による、糖尿病と合併症の新たな診断マーカーの探索
3. 学会等名	第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	伊藤 太二, 和久津 昌紀, 太田 一樹, 青木 友香, 伊藤 紗良, 宇多 梓, 神山 夏菜子, 後藤田 千智, 鈴木 風音, 鈴木 瑞彩, 中西 美春, 大村 正史, 山崎 俊介
2. 発表標題	ゼブラフィッシュを用いたインドシアニングリーンによる非侵襲的血管造影法の確立-動脈硬化の迅速・簡便・高精度な検出法の開発-
3. 学会等名	第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名 宇多 梓, 青木 友香, 伊藤 太二, 菅原 沙恵子, 伊藤 紗良, 神山 夏菜子, 後藤田 千智, 鈴木 風音, 鈴木 瑞彩, 中西 美春, 宇田川 美優, 小川 結稀, 奥田 彩乃, 草柳 波南, 平井 杏奈, 船越 由衣, 間山 美久, 大村 正史, 高橋 君子, 山崎 俊介
2. 発表標題 肥満モデルゼブラフィッシュを用いた、インドシアニングリーンによる動脈硬化薬の非侵襲的で高精細なリアルタイムイメージング
3. 学会等名 第33回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤太二, 和久津昌紀, 太田一樹, 小池和瑞, 近藤佑子, 佐川まり子, 佐藤日向子, 高安春那, 田中蘭世, 温田真実, 丸下怜華, 門間菜摘, 山本樹里, 大村正史, 山崎俊介
2. 発表標題 肥満モデルゼブラフィッシュにおける非侵襲型心電計測とパワースペクトル解析による高感度な糖尿病性自律神経障害評価法の確立
3. 学会等名 第60回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 T. Ito, M. Wakutsu, K. Ota, M. Koike, Y. Kondo, M. Sagawa, H. Sato, H. Takayasu, R. Tanaka, M. Nukuda, R. Marushita, N. Monma, J. Yamamoto, M. Omura and S. Yamazaki
2. 発表標題 Establishment of a zebrafish system for diabetes complications by novel acceleration plethysmogram and electrocardiogram.
3. 学会等名 The 9th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊藤太二, 和久津昌紀, 太田一樹, 小池和瑞, 近藤佑子, 佐川まり子, 佐藤日向子, 高安春那, 田中蘭世, 温田真実, 丸下怜華, 門間菜摘, 山本樹里, 青木友香, 伊藤紗良, 宇多 梓, 鈴木瑞彩, 中西美春, 大村正史, 山崎俊介
2. 発表標題 インスリン抵抗性特異的な血中分泌型miRNAの網羅的同定とその標的遺伝子予測による、糖尿病合併症の新たな診断マーカーの探索
3. 学会等名 第32回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊藤大二, 和久津昌紀, 太田一樹, 小池和瑞, 近藤佑子, 佐川まり子, 佐藤日向子, 高安春那, 田中蘭世, 温田真実, 丸下怜華, 門間菜摘, 山本樹里, 神山夏菜子, 後藤田千智, 鈴木風音, 大村正史, 山崎俊介
2. 発表標題 肥満モデルゼブラフィッシュを用いた、脈波と心電による動脈硬化評価法と神経障害評価法の確立
3. 学会等名 第32回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>教員情報-伊藤大二 https://www.acoffice.jp/kmwuhp/KgApp?resId=S000078 第74回日本栄養・食糧学会大会（仙台）にて、演題名「インスリン抵抗性特異的な血中分泌型miRNAの網羅的同定と標的遺伝子予測による、糖尿病と合併症の新たな診断マーカーの探索」に対して、トビックス賞が授与された。</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	親泊 政一 (Oyadomari Seiichi) (90502534)	徳島大学・先端酵素学研究所(プロテオ)・教授 (16101)	
研究協力者	宇治原 誠 (Ujihara Makoto)		
研究協力者	重松 絵理奈 (Shigematsu Erina)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	太田 一樹 (Ota Kazuki) (50594587)	鎌倉女子大学・家政学部・教授 (32705)	
連携研究者	大村 正史 (Omura Masashi) (60639441)	鎌倉女子大学・家政学部・教授 (32705)	
連携研究者	山崎 俊介 (Yamazaki Shunsuke) (80410025)	鎌倉女子大学・家政学部・教授 (32705)	
連携研究者	長谷川 輝美 (Hasegawa Terumi) (70775155)	鎌倉女子大学・家政学部・准教授 (32705)	