

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15419

研究課題名(和文) FABP4のインスリン抵抗性・分泌能への臨床的検討および直接作用の検討

研究課題名(英文) Clinical and direct effects of FABP4 on insulin resistance and secretion

研究代表者

藤岡 洋平 (FUJIOKA, Yohei)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10791048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病患者29名、非糖尿病ボランティア23名にグルコースクランプ試験によるインスリン抵抗性評価および、食事負荷試験を行った。2型糖尿病患者では、インスリン抵抗性が高いこと、空腹時FABP4が高値であること、食事負荷によるFABP4の低下に乏しく、非糖尿病とは動態が異なることを見出した。マウス骨格筋細胞C2C12を用いた基礎的検討では、FABP4添加により、インスリンシグナルの低下を介した細胞への糖取り込みの抑制を認め、インスリン抵抗性を生じることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インスリン抵抗性は2型糖尿病における主病態の一つであるが、インスリン抵抗性を規定する因子は様々なものが報告されており、その病態解明およびインスリン抵抗性改善薬の創薬は重要な課題である。本研究によりFABP4が2型糖尿病におけるインスリン抵抗性に直接的に関与することが確認されたことは、学術的には2型糖尿病の病態解明に貢献しており、また、FABP4がインスリン抵抗性改善薬の新しい治療標的となり得ると考えられるため、社会的にも貢献したと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We performed glucose clamp test and meal tolerance test on 29 type 2 diabetic patients and 23 non-diabetic volunteers to investigate the role of FABP4 in type 2 diabetes. We found that type 2 diabetic patients had high insulin resistance, high fasting FABP4 level, and poor FABP4 decline due to meal load, and their kinetics were different from those of non-diabetics. We found that FABP4 suppressed the glucose uptake into cells via a decrease in insulin signal and caused insulin resistance in a basic study using mouse skeletal muscle cells C2C12. We conclude that this study confirmed that FABP4 is directly involved in insulin resistance in type 2 diabetes, which may contribute to elucidation of the pathology of type 2 diabetes.

研究分野：糖尿病

キーワード：2型糖尿病 インスリン抵抗性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の病態はインスリンの作用不全であり、インスリン作用不全はインスリン分泌不全と、インスリン抵抗性に大別される。インスリン抵抗性、インスリン分泌能を規定する因子として、アディポネクチンをはじめ様々な液性因子が報告されているが、何が最も影響するのかについては不明な部分が多い。また、インスリン抵抗性に関与する因子として、体組成での内臓脂肪、脂肪肝、脂肪筋などが考えられているが、これについても、どの因子がどの程度影響するかは不明な部分が多い。さらにサルコペニア肥満、フレイルなどが注目されているが、骨格筋のインスリン抵抗性、脂肪筋などを規定する因子として明らかな物はまだない。インスリン抵抗性改善薬として糖尿病治療に使用されている薬剤としてはメトホルミン、ピオグリタゾンがあるが、副作用もあり、使用が制限される症例もあるため、インスリン抵抗性を改善させる新たな治療標的が期待される。

インスリン抵抗性、インスリン分泌能、体組成に関する因子が不明であり、治療応用にも難渋している背景から、我々はインスリン抵抗性、インスリン分泌能、体組成に最も関与する液性因子を検討したいと考えた。

これまでに我々は、2型糖尿病患者12例、非糖尿病ボランティア18例において、インピーダンス法を用いた体組成、およびグルコースクランプ試験を用いたインスリン抵抗性の評価を行い、ヒトにおいてインスリン抵抗性、脂肪筋に対する因子として報告されている、アディポネクチン、IGF-1、IL-6、IL-15、オートタキシン、アイリシン、FABP4などのうち、FABP4が最もインスリン抵抗性に影響する因子であることを報告した (Nakamura R. Plos One, 2017)。

今回、我々はFABP4のヒトの糖代謝に与える臨床的意義を検討するとともに、FABP4の筋細胞への糖代謝に関する直接作用について、マウス筋細胞株を用いて検証したいと考えた。

2. 研究の目的

2型糖尿病の病態に関連する液性因子は複数報告されているが、我々はFABP4が、インスリン抵抗性に強く影響を与える因子であることを報告している。本研究の目的は、2型糖尿病患者においてFABP4がインスリン抵抗性に関連すること、またFABP4の筋細胞への直接作用について検証することである。糖代謝におけるFABP4の役割を解明することにより、糖尿病の病態解明および病態診断に大きく貢献することが考えられる。またFABP4が新たな糖代謝のマーカーとして、日常臨床に貢献することも考えられる。さらにFABP4がインスリン抵抗性改善のための新規の治療標的となり、その創薬が行われれば世界中の糖尿病の日常臨床に大きく貢献すると考える。

3. 研究の方法

本研究の目的は、FABP4がインスリン抵抗性に関与することを証明することである。これまでは我々は2型糖尿病患者12例、非糖尿病ボランティア18例においてインピーダンス法を用いた体組成、およびグルコースクランプ試験を用いたインスリン抵抗性の評価および液性因子の測定を行い、最もインスリン抵抗性に影響する因子としてFABP4を候補として報告した (Nakamura R. Plos One, 2017)。今後インスリン抵抗性へのFABP4の影響を検討するために、さらに糖尿病患者13人、非糖尿病ボランティア7人で計50人の検査を行う。また、マウス由来であり、骨格筋細胞に分化するC2C12細胞を用いて、FABP4の骨格筋細胞への直接的な作用について検討する。

(1) 食事負荷試験

鳥取大学医学部附属病院外来通院中、入院中の2型糖尿病患者および非糖尿病ボランティアに標準食を用いて、食事負荷試験を行う (Yoshino G, et al. Journal of the Japan Diabetes

Society, 2006)。評価項目は、血糖値、インスリン値、血中Cペプチド値(0、30、60、120、180分)を測定する。FABP4は空腹時及び食後120分で測定を行う。

(2) グルコースクランプ法

インスリン抵抗性評価として、人工膵臓(日機装 STG-55)を用いて、正常血糖高インスリンクランプ法を行い、インスリン抵抗性指数 GIR(Glucose Infusion Rate)を求める。この GIR は主に筋肉のインスリン抵抗性を評価する値である。当施設でのグルコースクランプ法は順天堂大学と提携して、血中インスリン濃度を 200 $\mu\text{g/ml}$ にするプロトコルを用いる(Tamura Y, J Clin Endocrinology Metabolism, 2005)。

(3) 細胞実験

マウス由来であり、骨格筋細胞に分化する C2C12 細胞を用いて FABP4 の骨格筋への作用を検証する。細胞活性は C2C12 細胞培養液中に FABP4 を添加し、WST-8 アッセイを用いて検証する。糖代謝、インスリンシグナルの重要物質である、GLUT4 の発現、Akt のリン酸化などについてウエスタンブロッティングを用いて検証する。また、筋の代謝に重要な働きを持つ、AMPK の活性化についても検証する。糖代謝の低下を検討するため、培養液中のグルコース濃度の変化を検証する。さらに、グルコースのアイソトープ体を用いて、筋細胞内に取り込まれるグルコース量の評価を行う。

4. 研究成果

2 型糖尿病患者 29 名、非糖尿病ボランティア 23 名に対して、グルコースクランプ試験および食事負荷試験を行った。

グルコースクランプ試験におけるインスリン抵抗性指標である GIR は、2 型糖尿病患者では非糖尿病ボランティアと比較して低下を認めた(5.8vs9.8、 $p<0.05$)。食事負荷試験では、空腹時の FABP4 は 2 型糖尿病患者において優位に高値であり(32.1vs12.6、 $p<0.05$)、空腹時の FABP4 濃度は GIR との相関を認めた。さらに非糖尿病ボランティア群では、全例で食後に FABP4 の低下を認めたが、2 型糖尿病群では 9 症例において食後に FABP4 の増加を認め、2 型糖尿病患者では食事による FABP4 の動態が異なることを見出した。

基礎的検討としては、マウス骨格筋細胞 C2C12 細胞培養液中に FABP4 を添加し、細胞活性の低下およびインスリン刺激による糖取り込みの低下を認めた。またウエスタンブロッティングでは Akt のリン酸化低下を認めたが AMPK の活性化の低下は認めなかった。以上から、FABP4 は骨格筋細胞に対して、インスリンシグナルの低下を介して、細胞への糖取り込みを抑制することから、インスリン抵抗性を生じることを見出した。本結果については論文投稿予定である。

また研究期間中に肝インスリン分解が強い患者では C ペプチドを用いたインスリン抵抗性指数がグルコースクランプ試験の結果と強く相関することを報告した(Okura T. Plos One, 2018)。本研究により臨床的に 2 型糖尿病患者において FABP4 の食事より動態が非糖尿病ボランティアと異なること、また骨格筋細胞への直接的作用を有し、インスリン抵抗性に関与する機序について明らかとなったことは、2 型糖尿病の病態解明に貢献したと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okura T, Nakamura R, Fujioka Y, Kawamoto-Kltao S, Ito Y, Matsumoto K, Shoji K, Sumi K, Matsuzawa K, Izawa S, Ueta E, Kato M, Imamura T, Taniguchi S, Yamamoto K	4. 巻 13
2. 論文標題 CPR-IR Is an Insulin Resistance Index That Is Minimally Affected by Hepatic Insulin clearance-A Preliminary Research	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plos One	6. 最初と最後の頁 e0197663
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0197663	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----