

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07913

研究課題名(和文) エキソソーム解析による新規インスリン抵抗性・2型糖尿病治療標的の探索

研究課題名(英文) Research for the novel therapeutic target of insulin resistance and type 2 diabetes by analyzing of exosome

研究代表者

大倉 毅 (OKURA, Tsuyoshi)

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号：80510073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肥満外科手術の前後での血中因子の解析を行い、エキソソームの炎症性の低下が認められた。培養肝臓細胞を用いて、過剰な脂質など生活習慣病に関連する刺激を行ったところ、エキソソームの炎症性が亢進した。これらの結果から、エキソソームは生活習慣病において慢性炎症に重要な役割をはたしていると考えられた。また、研究期間中、血糖値が高い日本人2型糖尿病患者では食後の肝臓でのインスリン分解が亢進している事をアメリカ糖尿病学会誌BMJ Diabetes research and care誌に報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高血糖で肝臓でのインスリン分解が亢進する事を臨床的に論文にした事で、糖尿病の新たな病態について報告することができ、糖尿病領域において、学術的、社会的に意義のある研究報告ができたと考えている。また、エキソソームが生活習慣病、慢性炎症に重要であると考えられ、学術的意義がある研究となったと考えられた。詳細なデータ解析の後、英語論文として国際的学術誌に投稿予定であり、掲載された際の学術的意義は大きな物になると考えている。

研究成果の概要(英文)：The serum inflammatory exosome was decreased after bariatric surgery. We reported that hepatic insulin clearance is increased in the patients with poor controlled type 2 diabetes.

研究分野：糖尿病学

キーワード：糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病の患者数は世界的に爆発的な増加をしており、日本でも成人の約 4 人に 1 人は糖尿病と考えられており、その合併症として起こる人工透析や心血管イベントによる社会的損失は大きな社会問題となっている。したがって、糖尿病の早期発見・早期治療が世界的に重要課題となっている。糖尿病の原因はインスリン分泌が低下するインスリン分泌不全とインスリンの効果が減弱するインスリン抵抗性である。2 型糖尿病ではインスリン抵抗性がインスリン分泌不全に先行し、インスリンの分泌量が相対的にインスリン抵抗性に打ち勝てなくなった時に 2 型糖尿病を発症すると考えられている。欧米人に比べて、日本人はインスリン分泌量が少なく、また、軽度の肥満でインスリン抵抗性も生じやすいと考えられているが、その分子機構は不明な点が多い。また、インスリン抵抗性の治療薬としては現在、メトホルミン、ピオグリタゾンくらいしか存在せず、それぞれ乳酸アシドーシス、心不全などの副作用も多いため、新規のインスリン抵抗性の治療ターゲットが切望される。

インスリン抵抗性を評価する方法はグルコースクランプ試験が最も精密であるが、大量のインスリンとブドウ糖を静注し、2 時間以上かかる、非常に煩雑な検査である。我々はこれまでに血中の C ペプチドと空腹時血糖を用いて、グルコースクランプ試験の結果を推定できる新規インスリン抵抗性指標を報告してきた(Ohkura T, et. al, Cardiovascular diabetology, 2013; Okura T, et.al, PLOS ONE, 2018)。本研究では平成 26 年度科学研究費若手研究、平成 28 年度科学研究費基盤 C を獲得し、研究を行っている。また、本研究期間中、日本人では BMI が 23 でグルコースクランプ法によるインスリン抵抗性を示す事を報告した(Okura T, et. al, PLOS ONE, 2018)。アメリカ糖尿病学会ではアジア人は BMI23 で糖尿病のリスクとして糖負荷試験等スクリーニングを行う事を推奨しており、この結果は合致する物であった。このアジア人の非肥満、低インスリン分泌、インスリン抵抗性の特殊な病態は「Asian Diabetes」というフィールドとして扱われている。

しかし、アジア人が肥満は軽度でもインスリン抵抗性を生じる分子メカニズムについては不明な点が多い。一つのメカニズムとして、遺伝的に皮下脂肪が少なく、内臓脂肪がたまりやすいため、低アディポネクチン血症が起こりやすく、インスリン抵抗性を来しやすいと考えられている。しかし、全ての症例に当てはまるわけではなく、我々は様々な因子を検討した結果、低アディポネクチン血症よりも血中 FABP4 が高値を示す患者ではグルコースクランプ法におけるインスリン抵抗性が強い事を報告した(Nakamura R, Okura T, et. al, PLOS ONE, 2017)。FABP4 は肝臓でのインスリン抵抗性を惹起する事が報告されている(Furuhashi M, et al. Nature 2007)。

これらの研究中、FABP4 がエキソソームマーカーとなる事から(Ferrante SC, et al. Pediatr Res. 2015)、エキソソームのインスリン抵抗性への関連に注目した。エキソソームは血液や尿などに検出され、肝臓がん、肺がんなどの生検に大きな侵襲を伴う組織のマーカーとして、「Liquid biopsy」として注目されている。また、近年、インスリン抵抗性は肝臓、脂肪などの慢性炎症が重要と考えられており、その原因として臓器間、細胞間ネットワークを担う微小膜小胞エキソソームが注目されている(W. Ying, M. Cell, 2017)。しかし、未解明の部分が多い領域であり、新規インスリン抵抗性治療標的となるエキソソームを検証したいと考えた。

## 2. 研究の目的

上記の研究中、日本人の軽度肥満でもインスリン抵抗性、糖尿病を生じるアジア人の病態に興味を持ち、これは世界的にも深く検証している者は少なく、欧米人と日本人の違いを明らかにする必要があると考えた。シンシナティ小児病院では、2016 年に小児肥満研究を促進する目的として、Helmrath 博士、Divanovic 博士、中村能久先生が Co-Principal Investigators となり、The Pediatric Diabetes and Obesity Center (PDOC) を設立した。アメリカでは重度小児肥満患者に対し、有効な治療である肥満手術が行われる。本手術の主目的は体重減少であるが、体重が減る前から糖・脂質代謝が劇的に改善する。しかし、その機序は不明で、分子機構の解明が望まれる。PDOC では、小児肥満患者の手術前後の検体を解析し、糖代謝改善の分子基盤解析を主な目的にしており、中村先生は、肥満外科手術検体を用いたエキソソーム解析を通し、炎症反応やインスリン抵抗性・2 型糖尿病への関与について主にマウス初代肝細胞、マクロファージを用いて解析を行っている。

これらの研究環境から、シンシナティ小児病院にてアメリカ人の高度肥満患者、健常者の血清エキソソームの解析を行い、さらにインスリン抵抗性、糖尿病に關与する因子の機能を肝細胞、マクロファージで解析し、さらに、日本人の成人2型糖尿病患者、非糖尿病・非肥満健常者のグルコースクランプ結果と対比する事でインスリン抵抗性の原因が探求できるのではないかと考えた。

前述の共同研究を中村先生に提案したところ、承諾を得られた。これら鳥取大学医学部附属病院内分泌代謝内科にてのグルコースクランプ法による臨床研究、シンシナティ小児病院における肥満臨床研究、肝細胞、マクロファージを用いたエキソソーム基礎研究という共同研究体制で、世界的にも独自性のあるインスリン抵抗性研究ができるのではないかと考えた。

これら一連の研究で、アジア人の軽度肥満・インスリン抵抗性の病態の基礎的なメカニズムをエキソソーム解析を通じて解明できれば、日本人のみならず、アジア人、世界中の2型糖尿病患者に貢献する研究と考えられ、日本国内のみならず、国際共同研究が必須な研究であると考えた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 【鳥取大学医学部における臨床研究】

鳥取大学医学部附属病院にて成人2型糖尿病患者、非糖尿病・非肥満健常者にグルコースクランプを行った。食事負荷試験を行い、インスリン分泌を測定すると共に、血中Cペプチドを測定し、インスリン分解を求めた。エキソソーム解析のため検体を保存した。

テストミールAを用いた食事負荷試験を行い、食前、食後30, 60, 120, 180分の血糖、インスリン、血中Cペプチド(CPR)を測定。食事負荷試験の二日後、人工膵臓を用いた高インスリン正常血糖クランプ(インスリン注入量 100 mU/m<sup>2</sup>・min)を行い、インスリン感受性指数 GDR(glucose disposal rate)を求めた。GDRを検査終了時のインスリン値で補正したM/I値も検証した。また、食前、食後のGLP-1、GIP、グルカゴンも測定した。肝インスリン分解の指標には、HIC=CペプチドAUC/インスリンAUCを用いた。

インスリン分泌の指標としてHOMA- $\beta$ 、Insulinogenic indexを測定した。さらにインスリン抵抗性の指標として、HOMA-IR、Insulin sensitivity indexを測定した。

#### (2) 【シンシナティ小児病院研究】

シンシナティ小児病院にて、肥満外科手術糖尿病患者血清と、非肥満健常者血清を用いてエキソソーム、エキソソーム内total RNA、蛋白、脂質を解析した。肥満外科手術の前後で正常化する因子を解析し、インスリン抵抗性、糖尿病に關与を検証した。

臨床検体から得られた因子について培養細胞を用いて機能解析を行った。ヒト初代培養肝細胞を用いて、脂質過剰など、生活習慣病に關連する因子で刺激を行い、エキソソームを回収した。回収したエキソソームについてウエスタンブロット、RNAシーケンス、プロテオームを行い、炎症性因子の解析を行った。

### 4. 研究成果

対象は食事療法のための2型糖尿病患者21例。日本人の臨床研究にて、肝臓でのインスリン分解に影響する因子を検討した。HbA1cと肝インスリン分解HICは有意に正の相関を認め、高血糖で肝インスリン分解は亢進していると考えられた(図1)。BMIとHICは負の相関を認め、肥満では肝インスリン分解は低下、やせでは亢進と考えられた。HICとHOMA-IR、M/Iともに相関を認め、インスリン抵抗性が高ければ、肝インスリン分解は低下と考えられた。GTPはHICと有意な相関を示し、肝インスリン分解が低値ならば脂肪肝になりやすいと考えられた。グルカゴンとHICは有意な負の相関を示し、高グルカゴン状態では肝インスリン分解は低下していると考えられた。HOMA-beta, Insulinogenic indexとも有意な相関を認め、肝インスリン分解はインスリン分泌能低値で亢進していると考えられた。

図 1 . 各因子と HIC との相関

	<i>r</i>	P value
年齢	0.24	N.S.
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	-0.51	<0.05
空腹時血糖	0.04	N.S.
食後 2 時間血糖	0.17	N.S.
HbA1c	0.58	<0.01
AST	-0.31	N.S.
ALT	-0.29	N.S.
Gamma-GTP	-0.61	<0.005
HOMA-IR (肝インスリン抵抗性)	-0.66	<0.005
GDR (グルコースクランプ：筋感受性)	0.27	N.S.
M/I (クランプ：筋感受性/インスリン補正)	0.46	<0.05
HOMA-beta	-0.77	<0.01
Insulinogenic index	-0.70	<0.001
GLP-1 AUC	0.20	N.S.
GIP AUC	-0.17	N.S.
Glucagon AUC	-0.67	<0.005

Tsuyoshi Okura et al. BMJ Open Diab Res Care 2020;8:e001149 より改変

アメリカ人小児肥満外科手術の前後での血中因子の解析を行い、エキソソームの炎症性の低下が認められた。培養肝臓細胞を用いて、過剰な脂質など生活習慣病に関連する刺激を行ったところ、エキソソームの炎症性が亢進した。これらの結果から、エキソソームは生活習慣病において慢性炎症に重要な役割をはたしていると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okura Tsuyoshi, Fujioka Yohei, Nakamura Risa, Anno Mari, Ito Yuichi, Kitao Sonoko, Matsumoto Kazuhisa, Shoji Kyoko, Sumi Keisuke, Matsuzawa Kazuhiko, Izawa Shoichiro, Okura Hiroko, Ueta Etsuko, Noma Hisashi, Kato Masahiko, Imamura Takeshi, Taniguchi Shin-Ichi, Yamamoto Kazuhiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Hepatic insulin clearance is increased in patients with high HbA1c type 2 diabetes: a preliminary report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMJ Open Diabetes Research & Care	6. 最初と最後の頁 e001149 ~ e001149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmjdr-2019-001149	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 -

〔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
研究分担者	藤岡 洋平 (FUJIOKA Yohei) (10791048)	鳥取大学・医学部附属病院・助教  (15101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	シンシナティ小児病院		