

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460641

研究課題名(和文)糖代謝マーカーとしての高密度リポ蛋白質HDLとアポリポ蛋白M

研究課題名(英文)High-density lipoprotein HDL and apolipoprotein M as the glucose metabolism marker

研究代表者

木村 孝穂(Kimura, Takao)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：90396656

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)：本研究では若年者と中年者の75gOGTT検査に加え、血中脂質代謝マーカーならびにアポM濃度を測定し、これらとの関連を解析した。血中アポM濃度はこれまでの他のグループの報告と同様にHDL-C、TCと有意な正の相関を示すと同時に75gOGTT実施によって積算できる全身のインスリン感受性を評価するMatsuda Indexと有意な正の相関を認めた。この事実は空腹時に血中アポMを1回測定するのみで全身のインスリン感受性を評価できるマーカーと成り得る可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：We assessed the oral glucose tolerance test (OGTT) and lipid metabolism among young and middle aged Japanese subjects. We also measured the serum concentration of apolipoprotein M (ApoM) using ELISA. Serum ApoM concentrations were positively correlated with total cholesterol (TC) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C). Serum ApoM concentrations were positively correlated with Matsuda Index which represents both hepatic and peripheral tissue sensitivity to insulin. Matsuda Index is simple to calculate and provides a reasonable approximation of whole-body insulin sensitivity from the OGTT. OGTT needs four times of drawing blood. Therefore to calculate Matsuda Index needs four times of drawing blood. The positive correlation between serum ApoM concentration and Matsuda Index indicates that serum ApoM concentration might reflect whole-body insulin sensitivity. In summary, whole-body insulin sensitivity might be assessed by measurement of serum ApoM concentration.

研究分野：代謝学(動脈硬化)

キーワード：経口血糖負荷試験 動脈硬化症 糖代謝 高密度リポ蛋白 アポリポ蛋白

## 1. 研究開始当初の背景

我々は高密度リポ蛋白質 (HDL) の抗動脈硬化作用として HDL 中に高濃度に蓄積されているスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) と血管内皮細胞に発現する S1P 受容体の重要性を指摘してきた。加えて S1P が膵  $\beta$  細胞に作用してインスリン分泌を促進させることも報告してきた。近年、HDL が膵  $\beta$  細胞のインスリン分泌を促進する一方で高インスリン血症が血中 HDL を低下させること、また HDL 中のアポリポ蛋白 M (アポ M) が S1P の主要なキャリア蛋白であることが報告され注目されている。更に Owen (英) らにより 2 型糖尿病で血中アポ M の低下が報告され、糖代謝マーカーとしての HDL、アポ M、S1P の生理的意義の解明が課題となっている。我々の開発した S1P 測定法は大量のサンプルを測定するのは困難であるが S1P の主要なキャリア蛋白であるアポ M を HDL と同時に測定することで HDL、アポ M、S1P の生理機能の一端を解明できると思われ、我々は ELISA 法によるアポ M 測定法の開発を進めている。

## 2. 研究の目的

本研究ではこれまで我々が提唱してきたコレステロール逆輸送と独立した HDL 作用の 1 つとしてのインスリン分泌刺激作用と S1P 及びアポ M との関係を解析し、「糖代謝にかかわる HDL 作用」の存在意義を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 健常者、境界型糖尿病群、糖尿病群の血中アポ M 濃度測定により血中成分と HDL、アポ M 濃度の関係を解析し糖代謝マーカーとしての HDL、アポ M 測定の生理的意義を明らかにする。耐糖能と血中アポ M、HDL の関連を調べるため以下の検討を行う。

糖尿病の診断目的や健康診断で 75gOGTT 検査を受ける方で血中アポ M 測定の臨床研究に参加の同意がえられたものを対象に以下のものを測定し解析する：75gOGTT、血中アポ M、HDL、LDL、中性脂肪、総コレステロール、CRP、インスリン、C-ペプチド、HbA1c の測定を行う。

\* 我々は地域貢献事業で健康調査を実施しており、この調査項目に 75gOGTT も含まれている。75gOGTT 実施の際にアポ M 測定の臨床研究の説明を行い同意が得られた方を対象とする。既に糖尿病で治療中の患者さんで血中アポ M 測定の臨床研究に対して同意の得られたものを対象に以下のものを解析する：血中アポ M、HDL、LDL、中性脂肪、総コレステロール、CRP、インスリン、C-ペプチド、HbA1c を測定し糖尿病の状態との関連を解析する。実施人数は健常者、耐糖能

障害、糖尿病各群 100 名以上で合計 300 名以上の解析を予定している。この検討は平成 26 年から 3 年間での実施完了を目指している。

血液流動性を毛細血管モデル中の全血通過時間を測定する Micro Channel array Flow Analyzer (MC-FAN) という機器を用いて全血を使用して ex vivo で血液流動性を評価し、血中アポ M 濃度を血液流動性の関係を解析する。血液流動性は全血が MC-FAN のシリンジを通過するまでの時間を全血通過時間として評価した。通過時間が長いほど血液流動性が低く、通過時間が長いほど血液流動性が高いと評価できる。

中高年者における 75gOGTT 検査結果の解析：50 歳以上で糖尿病治療歴、胃切歴および女性ホルモン補充療法歴がなく本研究への同意が得られた人を対象に 75gOGTT を実施した。対象者は 417 人 (男性 144 人、女性 273 人)。

(2) インスリン分泌細胞を用いて HDL 及び S1P によるインスリン分泌制御機構の解明を行う。インスリン分泌制御に関わる S1P 受容体とその下流のシグナル伝達機構の解明を細胞レベルで明らかにする。また HDL によるインスリン分泌促進作用における HDL 中 S1P 及びアポ M と S1P 受容体の役割を明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1)

若年健常者における糖代謝関連検査結果：結果は mean  $\pm$  S.D. で記載。若年健常者 (男性 300 名、女性 187 名、24.3  $\pm$  2.7 歳) における検査結果は以下の通りであった。HbA1c 5.25  $\pm$  0.21 %、ブドウ糖負荷前の血糖値、インスリン値、C-ペプチド値および脂質代謝マーカーはそれぞれ 90.9  $\pm$  6.6 mg/dl、6.9  $\pm$  7.4 IU/L、1.45  $\pm$  0.69 ng/ml、総コレステロール (TC) 値 185.6  $\pm$  28.90 mg/dl、LDL コレステロール (LDL-C) 値 101.4  $\pm$  26.86 mg/dl、HDL コレステロール (HDL-C) 64.74  $\pm$  14.19 mg/dl、中性脂肪 (TG) 78.52  $\pm$  58.66 mg/dl であった。データ欠損があったため実際に 75gOGTT の評価をできたものは 487 名であった。そのうち 470 名が正常耐糖能、17 名が境界型であった。境界型の内訳は 16 名が耐糖能異常 (IGT) で 1 名が空腹時血糖異常 (IFG) があった。負荷後血糖値の変動パターンに基づき正常耐糖能群 470 名を I~IV の 4 群に分類した。I: ブドウ糖負荷後 30 分の血糖値が負荷前の血糖値より低下、II: ブドウ糖負荷後 60 分の血糖値が負荷前の血糖値より低下、III: ブドウ糖負荷後 120 分の血糖値が負荷前の血糖値より低下、IV: ブドウ糖負荷後の血糖値が負荷前の血糖値より低下しない。各群の人数は I: 20 名 (4.3%)、II: 84 名 (17.9%)、III: 124 名 (26.4%) で IV: 226 名 (48.1%) であった。負荷前血糖値、負荷前インスリン値、HbA1c 値、HOMA-R は群間に有意差を認め

なかった一方、負荷後血糖値、負荷後インスリン値、インスリン分泌指数および HDL-C については群間で有意差を認めた。105 名のデータにおいて血中アポ M 濃度との相関を調べた。アポ M と TC および HDL 濃度との間に有意な正の相関を認めた。また 75gOGTT の測定データから算出できるインスリン感受性の指標である Matsuda index と血中アポ M 濃度との間に有意な正の相関を認めた。

【考察】米国で 2445 名の非糖尿病患者を対象に本研究と同様な方法で 75gOGTT の血糖変動パターンごとに 7-8 年経過観察をしたところ、血糖低下までの時間が長い III および IV の群では新規糖尿病の発症リスクが増加したとの報告がある。本研究でも血糖が低下するまでの時間が長いほどインスリン分泌量の増加やインスリン感受性の低下が認められた。さらにこのような群では HDL-C が低いことも示された。インスリンの作用不足は耐糖能障害を惹起するだけでなく、リポプロテインインリパーゼ等の活性低下を通じて HDL-C を低下させることが知られている。血糖変動パターンの違いにより HDL-C が異なることは、耐糖能障害が顕在化する前段階から、血糖低下に要する時間の延長や脂質代謝異常を生じていることを示したと考えられる。血中アポ M 濃度と全身のインスリン感受性の指標である Matsuda index との間に有意な正の相関を認めたことは血中アポ M 濃度の測定が全身のインスリン感受性の指標と成り得る可能性を示唆している。この結果については現在、原著論文として発表すべく投稿準備を進めている。

MC-FAN を用いての血液流動性と血中糖代謝マーカー、脂質代謝マーカーならびにアポ M との関係の解析結果: 研究の同意を得た若年成人についてインスリン抵抗性と血液流動性の関連について解析した。インスリン抵抗性は空腹時のインスリン濃度と血糖値から算出した HOMA-IR と、空腹時のインスリン濃度と中性脂肪(TG)濃度から算出した McAuley 指数を指標として評価した。回帰分析を用いてインスリン抵抗性と血液流動性との関連を解析した。本研究は群馬大学医学部臨床研究倫理審査委員会の許可を得て実施した。【結果】単回帰分析では、空腹時インスリン濃度と HOMA-IR および McAuley 指数はヘマトクリット(Hct)、ヘモグロビン(Hb)、フィブリノーゲン、TG、高密度リポ蛋白コレステロール(HDL-C)、低密度リポ蛋白コレステロール(LDL-C)/HDL-C 比、体重、BMI および全血通過時間の長さとは有意な相関を示した。全血通過時間の長さは空腹時インスリン濃度、HOMA-IR、McAuley 指数、Hct、Hb、白血球数(WBC)、血小板数(Plt)、フィブリノーゲン、LDL-C/HDL-C 比、体重および BMI と有意な相関を示した。重回帰分析では Hct、WBC、フィブリノーゲンが全血通過時間と有意な

相関を示した。アポ M は TC、HDL-C、LDL-C、プラスミノーゲン活性、血小板数および PT と正の相関を示した。

【考察】若年成人において血液レオロジーがインスリン抵抗性と有意に相関することが初めて明らかとなった。Hct およびフィブリノーゲンなどの血液学的検査はインスリン抵抗性や血液レオロジーのマーカーと強い相関があり、メタボリック症候群の早期発見に役立つマーカーになりうると考えられた。一方で血中アポ M 濃度は血液流動性との相関は認めなかったが、血液流動性と相関のある TC、HDL-C、LDL-C、プラスミノーゲン活性、血小板数および PT と有意な相関が認められた。この事実はアポ M が脂質代謝等を介して間接的に血液流動性に影響していることを示唆している。この結果は発表論文でアポ M を除いた研究結果を発表している。アポ M と凝固系のマーカーについての検討結果は論文として発表した。国際学会ではとして発表した。

歳以上で糖尿病治療歴のない 417 人に 75gOGTT を実施した。417 人中 55 人(13.2%)が糖尿病型か境界型であった。糖尿病型でなかった 362 人をブドウ糖負荷後の血糖値が負荷前の血糖値未満に低下するまでの時間で の若年者での検討と同様に I-IV 群に分けた。I:2 名(0.5%)、II:25 名(6.9%)、III:45 名(12.4%)、IV:290 名(80.1%)であった。先行研究である米国の研究グループの報告では III、IV 型の糖尿病発症リスクが I、II 型に対して約 3 倍高かったとされる。米国の中高年を対象とした研究で約 80%が糖尿病発症リスクの高い III 型か IV 型に分類された。負荷前血糖値、負荷前インスリン値、負荷後血糖値、負荷後インスリン値、インスリン分泌指数および Disposition Index については群間で有意差を認めた。一方で脂質代謝マーカーでは有意差を認めなかった。222 名の対象者の血中アポ M 濃度と Matsuda index との間に有意な正の相関を認めた。更にこの 222 人と若年者 105 人を合わせた解析でも血中アポ M 濃度と Matsuda index との間に有意な正の相関を認めた。

【考察】本研究では 20 歳代の若年者で既に III+IV 型に相当する対象者が 74.5%の割合であり、日本人では 20 歳代で米国の中高年者と同じ糖尿病発症リスクがあることが明らかになった。また、日本人の中高年における検討では 92.5%が糖尿病発症リスクが高い III+IV 型に分類され、高齢化とともに糖尿病発症リスクが上昇することが示唆された。若年成人では各群間で HDL-C に有意差を認めたが中高年者では有意差を認めなかった。原因として既に脂質代謝改善薬であるスタチンを服用している対象者が多く含まれていたため脂質代謝が改善していたためと考えられた。若年者でも中高年者でも血中アポ M 濃度と全身のインスリン感受性を反映する Matsuda index との間に有意な正の相関を

認めたことは血中アポ M 濃度の測定により 75gOGTT のような時間と手間のかかる検査を実施せず、ワンポイントの採血で全身のインスリン感受性を評価できる可能性を示唆している。

## (2) 培養細胞における検討結果

当初、培養細胞として MIN6 を用意し、実験を開始した。HDL および S1P 刺激によりインスリン分泌が確認できたが、その応答が不安定であり当初想定していた解析が実施できなかった。そこでインスリン分泌細胞として 8TC という別の培養細胞を用意して実験を開始している。HDL によりインスリン分泌が確認できている。現在、HDL 刺激によるインスリン分泌制御機構の解析を進めている。

## 本研究のまとめ

本研究では若年者と中高年者の 75gOGTT 検査に加え、血中アポ M 濃度を測定し、これらとの関連を解析した。血中アポ M 濃度はこれまでの他のグループの報告と同様に HDL-C、TC と有意な正の相関を示すと同時に 75gOGTT 実施によって積算できる全身のインスリン感受性を評価する Matsuda Index と有意な正の相関を認めた。この事実は空腹時に血中アポ M を 1 回測定するのみで全身のインスリン感受性を評価できるマーカーと成り得る可能性を示唆している。現在この内容を論文発表するべく準備を進めている。

## 5 . 主な発表論文等 (計 7 件)

Yoshida K, Kimura T, Aoki T, Tsunekawa K, Araki O, Shoho Y, Nara M, Sumino H and Murakami M. Fasting serum insulin levels and insulin resistance are associated with blood rheology in Japanese young adults without diabetes. *J Int Med Res*. 2016 Jun;44(3):496-507. (査読あり)

Yoshida K, Kimura T, Shimizu T, Sato K, Aoki T, Sumino H, Tsunekawa K, Miyazaki O, Fukamachi I, Nakajima K, Okajima F, Murakami M. Serum apolipoprotein M levels are correlated with biomarkers of coagulation. *The KITAKANTO Medical Journal* 2016 Jun;44(3):496-507. doi:

10.1177/0300060515627561 (査読あり)

Yagi H, Sumino H, Yoshida K, Aoki T, Tsunekawa K, Araki O, Kimura T, Nara M, Nakajima K, Murakami M. Biological Antioxidant Potential Negatively Correlates with Carotid Artery Intima-Media Thickness. *International Heart Journal* 2016 Mar 22;57(2):220-5. doi: 10.1536/ihj.15-389. (査読あり)

Yagi H, Sumino H, Aoki T, Tsunekawa K, Araki O, Kimura T, Nara M, Ogiwara T, Murakami M. Impaired blood rheology is associated with endothelial dysfunction in patients with coronary risk factors. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2016;62(2):139-50. doi: 10.3233/CH-151960. (査読あり)

Aoki T, Tsunekawa K, Araki O, Ogiwara T, Nara M, Sumino H, Kimura T, Murakami M. Type 2 Iodothyronine Deiodinase Activity is Required for Rapid Stimulation of PI3K by Thyroxine in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Endocrinology*. 2015;156(11):4312-24. (査読あり)

Aoki T, Yagi H, Sumino H, Tsunekawa K, Araki O, Kimura T, Nara M, Ogiwara T, Nakajima K, Murakami M. Relationship between carotid artery intima-media thickness and small dense low-density lipoprotein cholesterol concentrations measured by

homogenous assay in Japanese subjects. Clin Chim Acta. 2015 Mar 10;442:110-4. doi:

10.1016/j.cca.2015.01.010. Epub 2015 Jan 17. (査読あり)

Tsunekawa K, Yanagawa Y, Aoki T, Morimura T, Araki O, Kimura T, Ogiwara T, Kotajima N, Yanagawa M, Murakami M. Frequency and clinical implication of the R450H mutation in the thyrotropin receptor gene in the Japanese population detected by Smart Amplification Process 2. Biomed Res Int. 2014;2014:964635. doi: 10.1155/2014/964635. Epub 2014 May 5. (査読あり)

〔学会発表〕(計7件)

Kamiyama K, Kimura T, Machida T, Murakami M. The sodium glucose co-transporter 2 receptor inhibitors, the newest class of drugs for type 2 diabetes, attenuated the results of leukocytes tested by urine dipsticks. The 32nd World Congress of the International Federation of Biomedical Laboratory Science (神戸 神戸国際会議場 2016年9月1日)

Aoki T, Kimura T, Tsunekawa K, Araki O, Nara M, Yoshida A, Machida T, Murakami M. Assessment of the glucose tolerance among young Japanese subjects - by the shape of plasma glucose concentration curve during OGTT - The 32nd World Congress of the International Federation of Biomedical Laboratory Science (神戸 神戸国際会議場 2016年9月1日)

Kimura T, Tsunekawa K, Aoki T, Shimizu T, Miyazaki O, Fukamachi I, Sumino H, Nakajima K, Okajima F, Murakami M. Clinical significance of apolipoprotein M: apolipoprotein M may be a biomarker of coagulation and fibrinolysis. The 9th Cherry Blossom

Symposium International Conference of Clinical Laboratory Automation and Robotics (横浜 横浜赤煉瓦倉庫 2014年4月15日)

Tsunekawa K, Aoki T, Araki O, Ogiwara T, Kimura T, Nara M, Sumino H, Machida T, Murakami M. Association between the effect of physical exercise in glucose metabolism and the polymorphism of type 2 iodothyronine deiodinase. The 9th Cherry Blossom Symposium International Conference of Clinical Laboratory Automation and Robotics (横浜 横浜赤煉瓦倉庫 2014年4月15日)

Aoki T, Kimura T, Simizu T, Sumino H, Miyazaki O, Fukamachi I, Nakajima K, Okajima F, Murakami M. Clinical implication of apolipoprotein M: apolipoprotein M may be a biomarker of coagulation and fibrinolysis. 82th European Atherosclerosis Society Congress (Madrid. マドリードコンベンションセンター 2014年6月1日)

木村孝穂、正保佳史、常川勝彦、角野博之、青木智之、桑原敦志、小磯博美、奈良誠人、町田哲男、村上正巳 若年成人におけるインスリン抵抗性と血液レオロジーの関連の解析 第63回日本臨床検査医学会学術集会 神戸 神戸国際会議場 2016年9月1日

木村孝穂、青木智之、清水知、宮崎修、深町勇、角野博之、中嶋克行、岡島史和、村上正巳 血清中アポリポ蛋白M濃度測定の意義 アポリポ蛋白Mと凝固線溶系マーカーの関連の解析 第46回日本動脈硬化学会 東京 京王プラザホテル 2014年7月10日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

なし

○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

木村 孝穂 (KIMURA Takao)  
群馬大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：90396656

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4)研究協力者

( )