

2 型糖尿病原因遺伝子レジスチン SNP を標的とした サルコペニア肥満予備群の早期抽出と個別化予防戦略

池 田 陽 介* 川 村 良 一* 高 田 康 徳*
大 澤 春 彦*

EARLY IDENTIFICATION AND PERSONALIZED PREVENTION STRATEGIES FOR PRE-SARCOPENIC OBESITY TARGETING RESISTIN GENE SNPS ASSOCIATED WITH TYPE 2 DIABETES

Yosuke Ikeda, Ryoichi Kawamura, Yasunori Takata,
and Haruhiko Osawa

Key words: sarcopenic obesity, resistin, insulin resistance, SNP.

緒 言

サルコペニアは筋肉量の喪失、筋力の低下、更に身体活動の低下を伴う疾患概念である。特に、サルコペニアと肥満を伴うサルコペニア肥満では、心血管疾患やその関連死のリスクが高い。更に、サルコペニア肥満はインスリン抵抗性（血糖値を下げるホルモンであるインスリンの”効き”が悪いく）を悪化させ、2 型糖尿病の発症を増加させる。本邦では加齢に伴ってサルコペニア肥満を合併した 2 型糖尿病患者が増加している。

レジスチンは、数少ないインスリン抵抗性関連遺伝子である。著者らの教室は、レジスチン遺伝子転写調節領域の一塩基多型(single nucleotide polymorphism; SNP)-420が、血中濃度を非常に強く規定し、インスリン抵抗性を介して、2 型糖尿病のリスクを高めることを見いだした^{4,5)}。加えて、SNP-420と同じ転写調節領域に位置する SNP-358 の組み合わせ（ハプロタイプ）が、SNP-420G/

SNP-358A（G-A ハプロタイプ）の場合に、血中レジスチンは最も高かった^{1,3)}。最近、著者らは、地域一般住民のコホート研究において、G-A ハプロタイプホモでは、握力が低下した内臓脂肪型肥満（サルコペニア肥満予備群）のオッズ比が高いことを見いだした⁵⁾。これまでに G-A ハプロタイプに特徴的な表現型は特定されておらず、SNP を標的とした高精度医療の独自のモデルとなりうる。

本研究では、レジスチンハプロタイプという「遺伝因子」に、サルコペニア肥満という「時間的因子」が加わることで、将来のインスリン抵抗性に及ぼす影響・効果を検証する。その際に影響しうる標的分子群の同定を試み、メカニズム解明につなげる。更に、本研究では、地域一般住民のサルコペニア肥満類似集団に対して階層型クラスタリングを用いて探索する。これにより、疾患発症早期予防の高精度医療の確立を目指す。

* 愛媛大学医学部附属病院糖尿病内科 Department of Diabetes and Molecular Genetics, Ehime University Graduate School of Medicine, Ehime, Japan.

方 法

A. 研究倫理コンプライアンス

本研究は愛媛大学医学部倫理委員会の承認を得て実施し（承認番号：170511, 31-4）、すべての参加者から書面によるインフォームド・コンセントを得た。本研究は、性別やジェンダーの公平性に配慮した SAGER ガイドラインに準拠している。

B. 研究対象集団（東温ゲノムスタディ）

愛媛県東温市の住民を対象とした地域住民コホート「東温ゲノムスタディ」の参加者のうち、2009年から2012年のベースライン調査および5年後の追跡調査の両方に参加し、十分な臨床データ（75 g 経口ブドウ糖負荷試験（oral glucose tolerance test; OGTT）結果、身体組成データ等）が得られた803名（平均年齢62歳）を解析対象とした。

C. 身体組成の評価とサルコペニア肥満の定義

身体組成の測定には多周波バイオ電気インピーダンス分析装置（MC-780A, タニタ社製）を用い、四肢骨格筋量（appendicular skeletal muscle mass; ASM）および内臓脂肪スコアを評価した。筋肉量の指標として、肥満者においても筋量を正確に反映しやすい「ASM/体重（Wt）比」を採用した。本研究では、以下の基準に基づき参加者を4つのグループに分類した：

- ①対照群：内臓脂肪スコア < 10（内臓脂肪面積 100 cm²未満に相当）かつ ASM/Wt 比 Q 2-Q 4（上位75%）
- ②潜在的低筋肉量群：内臓脂肪スコア < 10かつ ASM/Wt 比 Q 1（下位25%）
- ③内臓脂肪型肥満群：内臓脂肪スコア ≥ 10（内臓脂肪面積100 cm²以上に相当）かつ ASM/Wt 比 Q 2-Q 4
- ④潜在的サルコペニア肥満群：内臓脂肪スコア ≥ 10かつ ASM/Wt 比 Q 1

D. 糖代謝能およびインスリン抵抗性の評価

75 g OGTT を実施し、空腹時および負荷後1時間、2時間の血漿グルコースおよびインスリン濃度を測定した。インスリン抵抗性の指標として HOMA (homeostasis model assessment) 2-IR (insulin resistance) を、定常状態のβ細胞機能の指標として HOMA2-B を算出した。

E. SNP タイピングとハプロタイプの判定

TaqMan 法およびパイロシーケンス法を用い、*RETN* SNP-420および SNP-358の遺伝子型を決定した。得られた遺伝子型に基づき、参加者を G-A ハプロタイプ保有者（ヘテロ接合体およびホモ接合体）と非保有者に分類した。

F. クラスター解析（階層的クラスター解析）

身体組成（ASM/Wt 比、握力、内臓脂肪スコア）および糖代謝パラメータ（OGTT 時の血糖値・インスリン値）をモデル変数とし、Ward 法を用いた階層的クラスター解析を行った。これにより、臨床的に意味のある特徴をもつ5つのクラスターを同定した。

G. RNA-seq および定量的 RT-PCR 解析

G-A ハプロタイプホモ接合体 (n = 25) と、年齢・性別・BMI (body mass index) をマッチングさせた SNP-420C/SNP-358G (C-G ハプロタイプ) ホモ接合体 (n = 33) の全血細胞から RNA を抽出し、RNA-seq (sequencing) による網羅的遺伝子発現解析および KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) パスウェイ解析を行った。抽出された有意な変動遺伝子については、定量的 RT-PCR (qRT-PCR) を用いて検証した。

結 果

A. G-A ハプロタイプと潜在的サルコペニア肥満の相互作用

横断的解析において、G-A ハプロタイプ保有者は血中レジスチン値が最も高かった。この結果については先行研究と矛盾しないものであった¹⁾。一方で、HOMA2-IR については、G-A ハプロタイプの有無にかかわらず変化はなかった（図1）。潜在的サルコペニア肥満は、他の群と比べて、血糖値、インスリン値ともに有意に高値であった（表1）。重回帰分析の結果、5年間の HOMA2-IR の変化（ΔHOMA2-IR）に対して、G-A ハプロタイプと潜在的サルコペニア肥満の間に有意な交互作用が認められた。具体的には、G-A ハプロタイプを保有し、かつ潜在的サルコペニア肥満（低筋肉量+内臓脂肪型肥満）を合併している群においてのみ、5年後のインスリン抵抗性が著しく悪化していた（図2）。

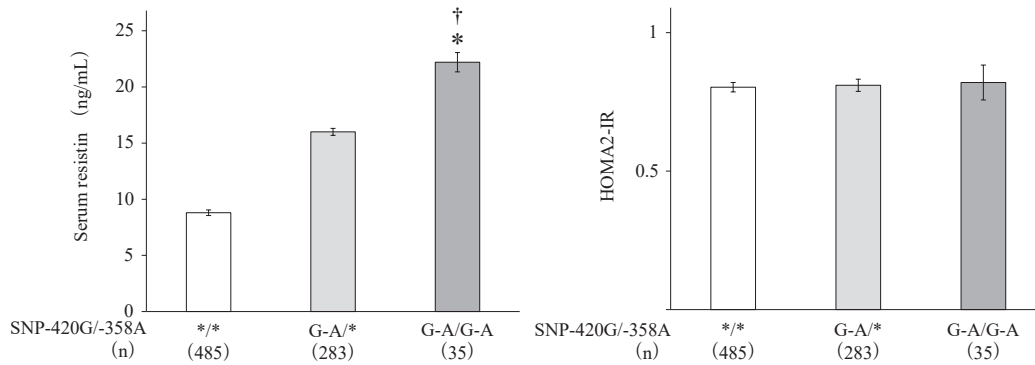


図1. G-A ハプロタイプは血中レジスチン値が高いが、HOMA2-IR は差がなかった

Fig.1. Subjects with the homozygotes of SNP-420G/-358A haplotype had the increased in serum resistin but not in HOMA2-IR. Subjects were divided into 3 groups by SNP-420/-358 haplotype. ANCOVA involving serum resistin and HOMA2-IR as dependent variables, and age and sex as independent variables was performed. Mean $\pm$ standard error (SE). Tukey's honestly significant difference (HSD) test: * vs **/, $P < 0.0001$; † vs G-A/*, $P < 0.0001$. SNP; single nucleotide polymorphism, HOMA2-IR; homeostasis model assessment 2-insulin resistance.

表1. サルコペニア肥満は最もインスリン抵抗性が悪化していた

Table 1. In the 75 g oral glucose tolerance test, latent skeletal muscle loss and visceral fat obesity showed the highest insulin resistance.

Group No.	Low ASM/weight and VFA $\geq 100 \text{ cm}^2$				<i>P</i> value			
	1	2	3	4				
	ASM/Wt Q2-4 & obesity (-) (n = 440)	ASM/Wt Q1 & obesity (-) (n = 83)	ASM/Wt Q2-4 & obesity (+) (n = 181)	ASM/Wt Q1 & obesity (+) (n = 99)				
Variable					ANCOVA	1 vs 4	2 vs 4	3 vs 4
Fasting glucose (mg/dL)	95.0 $\pm$ 0.9	97.5 $\pm$ 1.7	97.7 $\pm$ 1.1	100.8 $\pm$ 1.4	0.0098	0.0010	0.1368	0.0785
1-h glucose (mg/dL)	148.3 $\pm$ 2.8	148.8 $\pm$ 5.4	151.1 $\pm$ 3.6	161.6 $\pm$ 4.5	0.0972	0.0164	0.0635	0.0614
2-h glucose (mg/dL)	127.5 $\pm$ 2.7	136.3 $\pm$ 5.3	135.8 $\pm$ 3.5	146.7 $\pm$ 4.5	0.0054	0.0006	0.0508	0.1319
Fasting insulin (μ IU/mL)	4.8 $\pm$ 0.3	5.6 $\pm$ 0.5	7.0 $\pm$ 0.4	9.4 $\pm$ 0.4	3.00×10^{-14}	5.61×10^{-16}	7.76×10^{-8}	2.01×10^{-5}
1-h insulin (μ IU/mL)	49.6 $\pm$ 2.5	52.1 $\pm$ 4.9	65.8 $\pm$ 3.3	76.0 $\pm$ 4.2	3.51×10^{-6}	3.47×10^{-7}	1.98×10^{-4}	6.12×10^{-4}
2-h insulin (μ IU/mL)	45.9 $\pm$ 2.2	49.9 $\pm$ 4.3	62.5 $\pm$ 2.8	75.2 $\pm$ 3.6	1.18×10^{-9}	6.78×10^{-11}	5.24×10^{-6}	4.56×10^{-5}

Subjects were divided into 4 groups: group 1, VFA $< 100 \text{ cm}^2$ and ASM/Wt Q2-4; group 2, VFA $< 100 \text{ cm}^2$ and ASM/Wt Q1; group 3, VFA $\geq 100 \text{ cm}^2$ and ASM/Wt Q2-4; and group 4, VFA $\geq 100 \text{ cm}^2$ and ASM/Wt Q1.

Mean $\pm$ standard error (SE). ANCOVA involving blood glucose and insulin as dependent variables, and age and sex as independent variables were performed using Tukey's honestly significant difference (HSD) test as post-hoc analyses.

ASM; appendicular skeletal muscle mass, VFA; visceral fat area.

B. 階層的クラスター解析による高リスク群の同定

データ駆動型のアプローチであるクラスター解析により、参加者を5つのクラスターに分類したところ、「クラスター2」が最も高いリスクを示した(図3)。このクラスターは、低筋肉量、内臓脂肪型肥満、および高いインスリン抵抗性を特徴としていた。注目すべき点として、このクラスター2に属するG-Aハプロタイプ保有者は、他のハプロタイプ保有者と比較して、追跡期間中にインスリン抵抗性が更に顕著に増悪することが確認された。

C. RNA-seqによるミトファジー関連遺伝子の発現変化

G-Aハプロタイプがインスリン抵抗性を悪化させる分子機序を探索するため、RNA-seq解析を実施した。これに基づくpathway解析の結果、G-Aホモ接合体ではC-Gハプロタイプホモ接合体と比較して、細胞内の不要なミトコンドリアを分解・除去するプロセスであるミトファジー(Mitophagy)に関連する遺伝子群の発現が有意に変動していることが明らかとなった(表2)。

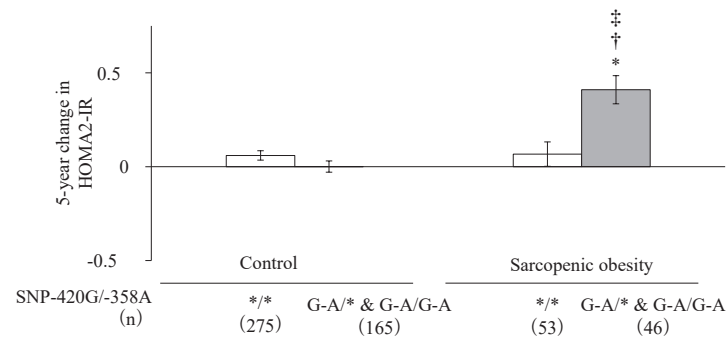


図2. サルコペニア肥満かつ G-A ハプロタイプは5年間で最もインスリン抵抗性が増悪した

Fig.2. The increase in insulin resistance was highest when low ASM/Wt and visceral fat obesity were accompanied by the G-A haplotype over a five-year period.

The increase in insulin resistance was highest when the G-A haplotype was accompanied by low ASM/Wt and visceral obesity over a 5-year period. Glucose metabolism was evaluated at baseline and 5-year follow-up, and body composition was assessed at 5-year follow-up. Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Tukey's honestly significant difference (HSD) test: *, vs control with */*, $P < 0.0001$; †, vs control with G-A/* and G-A/G-A, $P < 0.0001$; ‡, vs sarcopenic obesity with */*, $P < 0.05$.

SNP; single nucleotide polymorphism, HOMA2-IR; homeostasis model assessment 2-insulin resistance. ASM; appendicular skeletal muscle mass.

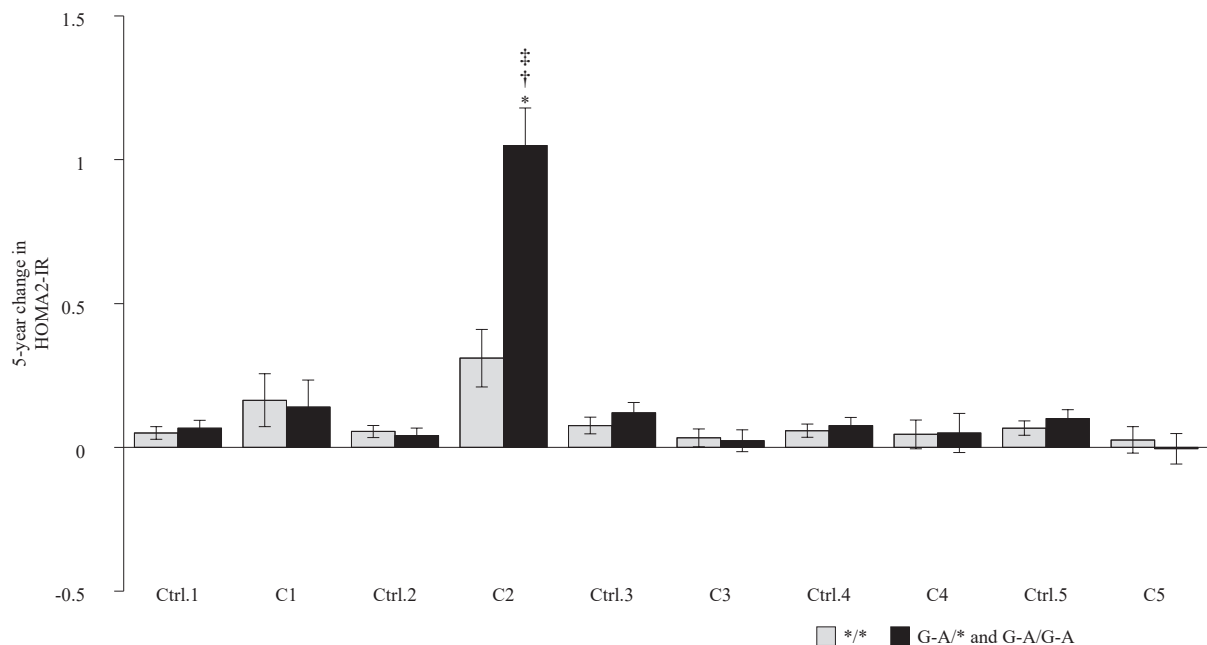


図3. クラスター2かつ G-A ハプロタイプは5年間で最もインスリン抵抗性が増悪した

Fig.3. Cluster 2, characterized by latent skeletal muscle loss, visceral fat obesity, and insulin resistance, with the G-A haplotype, demonstrated the equivalent deterioration in insulin resistance over a 5-year period.

Cluster 2, characterized by latent skeletal muscle loss, visceral obesity and insulin resistance, with the G-A haplotype, demonstrated deterioration in insulin resistance over a 5-year period. Ctrl (control) denotes four clusters, excluding those located on the right side of number of clusters (e.g. Ctrl.1 includes clusters 2–5). ANCOVA, $P = 9.41 \times 10^{-14}$. Tukey's honestly significant difference (HSD) test for post hoc analyses: * $P < 0.001$ vs Ctrl.2 with */*, † $P < 0.001$ vs Ctrl.2 with G-A/* and G-A/G-A; ‡ $P < 0.001$ vs C2 with */*.

HOMA2-IR; homeostasis model assessment 2-insulin resistance.

考 察

本研究により、G-A ハプロタイプという「遺伝因子」に、潜在的サルコペニア肥満という「時間的・環境的因子」が加わることで、将来のインスリン抵抗性が顕著に増悪することが縦断的に示さ

れた。これまでの知見では、SNP-420単独では必ずしもインスリン抵抗性と直接関連しないことが報告されていたが⁵⁾、本研究の結果はこの乖離を埋めるものである。すなわち、高レジスチン血症を規定する遺伝子型が病態として顕在化するためには、加齢等に伴う筋肉量低下や内臓脂肪蓄積と

表2. Pathway解析の結果、G-A ハプロタイプで発現変化していた上位5つの経路

Table 2. Top 5 pathways in pathway analysis and altered expression of mitophagy-related genes in whole blood cells from G-A homozygotes compared to C-G homozygotes.

Pathway	P value	Involved genes
Mitophagy	2.7×10^{-4}	<i>BNIP3L, GABARAPL2, PGAM5, PRAS2, TBK1, ATG9A, FIS1, FOXO3, MFN1, UBA52</i>
Ubiquitin mediated proteolysis	3.4×10^{-3}	<i>ANAPC1, ANAPC11, ANAPC15, BIRC3, CDC34, CUL7, ELOB, KEAP1, RBX1, UBA52, UBA7, UBE3B</i>
Glycosylphosphatidylinositol – anchor biosynthesis	6.9×10^{-3}	<i>DPM2, PIGG, PIGO, PIGU, PIGX</i>
Nucleotide excision repair	0.011	<i>POLE2, ERCC4, MNAT1, POLR2D, XPA, GTF2H3, RBX1</i>
Autophagy	0.026	<i>GABARAPL2, PRAS2, RB1CC1, PRAGB, TBK1, TSC2, ATG9a, CTSB, PIK3CB, STK11, UBA52</i>

Pathway analysis was performed by comparing homozygotes of the G-A haplotype defined by resistin SNP-420 and SNP-358 with those of the C-G haplotype using DAVID, a tool for providing functional interpretation of large lists of genes derived functional interpretation. SNP; single nucleotide polymorphism, DAVID; database for annotation, visualization and integrated discovery.

いった身体組成の変化が必要条件となることが示唆された。

更に、全血細胞を用いた解析から、G-A ハプロタイプ保有者におけるマイトファジー関連遺伝子の発現変化が判明したことは極めて重要である。レジスチンはTLR 4 受容体を介して炎症反応やオートファジー抑制に関与することが他研究でも示唆されており²⁾、本研究の結果は、ミトコンドリア機能不全がサルコペニア肥満における糖尿病発症の分子メカニズムの鍵であることを示している。今後は、これらのマイトファジー関連遺伝子の変動がどの細胞種で主に生じているか、また介入によって回復可能かについての追加解析が必要である。

臨床的な意義として、遺伝子型 (SNP-420/-358) と簡易的な身体組成測定 (ASM/Wt 比, 内臓脂肪スコア) を組み合わせることで、将来の糖尿病発症リスクが極めて高い集団を早期に「予備群」として抽出できることが示された。これは、画一的な予防法ではなく、個人の遺伝的背景に基づいた「精密医療 (precision medicine)」を生活習慣病領域で実現するための重要なステップとなる。

本研究では、地域一般住民における将来のインスリン抵抗性増悪をきたすサルコペニア肥満に類似したクラスターを同定できた。一方で、このクラスターがインスリン抵抗性増悪をきたす分子メカニズムについては、追加解析によって解明する必要がある。

総 括

本研究を通じて、2 型糖尿病感受性遺伝子であるレジスチン G-A ハプロタイプに基づく遺伝子・環境因子の相互作用を背景とした、サルコペニア肥満・インスリン抵抗性増悪のメカニズムを解明した。特に、潜在的な段階でのスクリーニングが重要であることを強調したい。今後は本知見に基づき、特定のハプロタイプ保有者に対する運動療法や栄養介入の効果を検証し、サルコペニア肥満および2 型糖尿病の個別化予防戦略の高精度化を目指していく。

謝 辞

本研究にあたり寛大な援助をいただきました公益財団法人明治安田厚生事業団に深く御礼申し上げます。研究遂行にご尽力いただいた愛媛大学大学院医学系研究科糖尿病・分子遺伝学講座の医局員一同にも深く感謝いたします。また、東温ゲノムスタディのスタッフ、特に健診のサポートおよび本研究への技術的支援をいただいた方々にも心より感謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Ikeda Y, et al. (2023): Resistin G-A haplotype at SNP-420/-358 is associated with the latent sarcopenic obesity index in the toon genome study. *J Diabetes Investig*, **14**(5), 686-694.
- 2) Miao J, et al. (2018): Resistin inhibits neuronal autophagy through Toll-like receptor 4. *J Endocrinol*, **238**(1), 77-89.
- 3) Onuma H, et al. (2010): A at single nucleotide polymorphism-358 is required for G at -420 to confer the highest plasma resistin in the general Japanese population. *PLoS One*, **5**(3), e9718.

- 4) Osawa H, et al. (2004): The G/G genotype of a resistin single-nucleotide polymorphism at -420 increases type 2 diabetes mellitus susceptibility by inducing promoter activity through specific binding of Sp1/3. *Am J Hum Genet*, **75**(4), 678-686.
- 5) Osawa H, et al. (2007): Plasma resistin, associated with single nucleotide polymorphism -420, is correlated with insulin resistance, lower HDL cholesterol, and high-sensitivity C-reactive protein in the Japanese general population. *Diabetes Care*, **30**(6), 1501-1506.