

国際医療福祉大学審査学位論文（博士）
大学院医療福祉学研究科博士課程

循環マイクロ RNA 測定による II 型糖尿病の
診断・病期分類

2022 年度
保健医療学専攻・臨床検査学分野・臨床検査学領域
氏名：高田勇吉

循環マイクロ RNA 測定による II 型糖尿病の診断・病期分類

高田勇吉

【要旨】

2 型糖尿病 (T2DM) は、世界で最も一般的な疾患の一つであり、微小血管障害をはじめとした臓器障害、癌などの多様な合併症を引き起こす。そのため、病態特異的な新規バイオマーカーが望まれている。

本研究では T2DM 患者 50 名と健常者 15 名を対象に血清中マイクロ RNA をアレイ解析および RT-qPCR 法を用いて解析した。

マイクロ RNA アレイ解析の結果、T2DM 患者では健常人と比較し、19 種類のマイクロ RNA が 2 倍以上、71 種類のマイクロ RNA が 0.5 倍未満の発現を示した。

また、T2DM に特異的であると報告されているマイクロ RNA の中で解析に十分な発現量を確認した 4 種類のマイクロ RNA について RT-qPCR による解析を行った。miR-126-3p は T2DM で有意に低下し、miR-10a は有意に上昇していた。

単一のマイクロ RNA は臨床データおよび病状と有意な相関は見られなかったが、複数のマイクロ RNA を組み合わせることで T2DM を高感度で判別することができた。本研究により、マイクロ RNA のペア解析が T2DM の診断に有用であることを明らかにした。

【キーワード】 2 型糖尿病, 血清中マイクロ RNA, バイオマーカー, 病期診断

Diagnosis and staging of type II diabetes mellitus by measuring circulating microRNA

Yukichi Takada

【Abstract】

Type 2 Diabetes mellitus (T2DM) is one of the most common diseases in the world and its prevalence ratio is still increasing. Patients with T2DM have diverse pathophysiological changes such as macrovascular, microvascular diseases, cancers as well as abnormal glucose metabolism. Thus, there are urgent needs to develop relevant biomarkers for the broad range of pathophysiology in patients with T2DM.

We analyzed the signatures of serum miRNAs with the miRNA array analysis and reverse-transcription based quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) in 50 patients with type 2 DM (T2DM) and 15 normal subjects. Array analysis showed that 19 miRNAs were up-regulated more than 2-fold and 71 miRNAs were down-regulated less than 0.5 in T2DM in comparison with normal subjects. Top 5 of up-regulated miRNAs were miR-3619-3p, miR-557, miR-6850-5p, miR-3648, miR-4730, and 5 of most down-regulated miRNAs were miR-5100, miR-4454, miR-1260b, miR-7975, miR-6131.

We selected 4 miRNAs for validation analysis with RT-qPCR based on the abundance enough for reliable analyses and disease-specificities reported in previous reports. Serum miR-126-3p was down-regulated (3.21-fold, $p < 0.05$) in T2DM, and miR-10a up-regulated (1.94-fold, $p < 0.05$). However, none of single miRNA had significant correlation with clinical data and state.

Data of the paired miRNAs: miR-10a and miR-200c or miR-126 and miR-10a, clearly differentiated T2DM patients from normal subjects ($p < 0.05$). Our study showed the paired-miRNA analyses as the more relevant diagnostics for T2DM than the single miRNA analysis.

【Key Words】 Type 2 DM, Serum miRNAs, Biomarker, Staging

【目次】

I	緒言	・・・1
II	目的	・・・2
III	対象	・・・2
IV	倫理的配慮	・・・2
V	方法	
	V-i	血液の採取および保存 ・・・3
	V-ii	RNA の抽出 ・・・3
	V-iii	マイクロ RNA アレイ解析 ・・・3
	V-iv	RT-qPCR を用いた血清 マイクロ RNA の定量的測定 ・・・4
	V-v	$2^{-\Delta\Delta CT}$ 法を用いたマイクロ RNA 解析 ・・・4
	V-vi	統計解析 ・・・5
VI	結果	
	VI-i	T2DM 患者の臨床データ ・・・6
	VI-ii	循環血清マイクロ RNA のアレイ解析 ・・・7～8
	VI-iii	RT-qPCR 法を用いた T2DM における血清マイクロ RNA の定量的解析 ・・・9～10
	VI-iv	T2DM における病期ごとのマイクロ RNA 発現 ・・・11～12
	VI-v	複数のマイクロ RNA を用いた T2DM の診断 ・・・13～14
VII	考察	・・・15～16
VIII	課題と今後の展望	
IX	結語	・・・17
X	謝辞	・・・17
XI	参考文献	・・・18～26

I 緒言

2型糖尿病(T2DM)は世界で最も一般的な疾患の1つであり、罹患者数は現在も増加傾向にある^{1),2)}。糖尿病(DM)は2種に大別される^{1),3)}。1型糖尿病(T1DM)は自己免疫疾患の1種であり、膵臓β細胞の機能障害によるインスリンの分泌不全が特徴である^{4),5)}。それに対しT2DMは遺伝的要因、運動不足をはじめとした環境要因等、複数の原因が複合的に作用することで発症し、インスリン抵抗性の増加や分泌不全を起こす¹⁻³⁾。DMの95%はT2DMであり、世界中で4億人以上が罹患している^{1),3)}。T2DMの診断は血糖値および糖化ヘモグロビン(HbA1c)を用いた糖代謝異常の診断によって行われる^{1),6)}。T2DM患者の10%が診断時に糖尿病性ケトアシドーシスを呈している²⁾が、T2DMにおける生命予後およびQOLは糖尿病性血管障害(CVD)⁷⁻¹⁰⁾および糖尿病性慢性腎疾患(CKD)^{8),11)}に大きく左右される^{12),13)}。CVDはT2DM患者の32.2%が発症し、T2DMにおける死亡原因の9.9%を占めている¹⁰⁾。T2DM患者の心不全発生率は0.5%であり、健常者の約3倍である³⁾。また、CKDはT2DM患者の42.3%が発症する。非T2DM患者の発症率は9.4%であり、T2DMの死亡率を増加させる重要な要素の1つである¹³⁾。T2DM患者のQOLは上記のCVD、CKDの他網膜症や感染症、癌などによって脅かされる^{1),2),14),15)}。従ってT2DMの病態を幅広く把握することのできるバイオマーカーはT2DMの治療に大きく寄与することができる。

マイクロRNA(miRNAs)は短鎖非コードRNAであり、標的であるメッセンジャーRNA(mRNA)の分解や翻訳を阻害することで遺伝子発現を調節している^{16),17)}。生体機能としては発生や細胞増殖、分化、アポトーシス、腫瘍形成に関与していることが報告されている^{18),19)}。マイクロRNAの1部は細胞外や循環血液中に放出される。

細胞外小胞(EV)は、ナノサイズ(50~1,000nm)の粒子であり、産生細胞から離れた臓器の細胞にマイクロRNAを輸送している^{20),21)}。このように、循環しているマイクロRNAは、細胞間のコミュニケーションに重要な分子であり、循環マイクロRNAの解析によってT2DM患者の病態把握を向上させることが可能であると考えられる。先行論文においても、マイクロRNAが糖尿病性神経障害や腎症に関与する可能性があると報告されている²²⁻²⁷⁾。そこで本研究では、T2DM患者の早期診断および合併症に関連するバイオマーカーとしての循環マイクロRNAに着目して研究を行った。

II 目的

本研究では、T2DM の早期発見、合併症診断に寄与できるバイオマーカーの探索を目指し、1. T2DM の診断に利用できるマイクロ RNA の探索 2. T2DM の合併症と高く相関するマイクロ RNA の探索の 2 点を目的とした

III 対象

本研究では、T2DM 患者 50 名、健常人 15 名を対象とした。T2DM 患者の診断と臨床病期分類は、日本糖尿病学会の基準に従って行った²⁸⁾。健常人 15 名は、21 歳から 56 歳の男性 9 名、女性 6 名であり、T2DM および特筆すべき疾患のない者とした。

IV 倫理的配慮

本研究は、国際医療福祉大学倫理審査委員会(承認番号:19-Ifh-070)および高邦会高木病院研究倫理委員会(承認番号:333)により承認され、すべての被験者から同意書によるインフォームドコンセントを得て実施した。

V 方法

V-i 血液の採取および保存

血清は 25 °C、30 分間の血液凝固後、室温で 3,500 rpm、10 分間の遠心分離を行い採取した。その後ポアサイズ 0.45 μm のメンブレンフィルターに通し、使用するまで-80 °C で保存した^{29),30)}。

V-ii RNA の抽出

血清サンプルからのマイクロ RNA 抽出は、NucleoSpin miRNA Plasma (タカラバイオ) を用いて、添付プロトコルに従って行った。300 μL の血清に 90 μL のライシスバッファを加えた後、血清を 5 秒間ボルテックスし、チューブスタンドで 3 分間静置した。次に 30 μL のタンパク質変性剤を添加し、5 秒間ボルテックスした。その後 11000 rpm で 3 分間遠心分離し、タンパク質の沈殿を除去して上清を得た。300 μL の上清を新しいチューブに移し 400 μL のイソプロパノールと 3 μL の線虫 miR-39 (cel-miR-39:1 fmol/ μL) と混合した。700 μL の混合液を新しいチューブにセットしたカラムに移し、11000 rpm で 30 秒間遠心分離した。カラムに付着した DNA を洗浄バッファで除去した後、30 μL の RNase-free-water をカラムに加え、11000rpm、1 分間遠心分離して、RNA 溶液を得た。抽出した RNA は測定まで-80°Cの冷凍庫で保存した^{29),30)}。

V-iii マイクロ RNA アレイ解析

マイクロ RNA アレイ解析用のサンプルとして、健常人および T2DM の血清 5 例 (HbA1c:8.4-9.7%) をそれぞれ等量混合しプール血清とした。アレイ解析はプール血清から抽出した RNA を用いて DNA Chip 3D-Gene (東レ株式会社) で行った。DNA Chip は 2632 種のプローブを有しており、マイクロ RNA を網羅的に解析することが可能である³⁰⁾。

V-iv RT-qPCR を用いた血清 マイクロ RNA の定量的測定

抽出した マイクロ RNA から High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて相補的 DNA (cDNA) を作製した。0.1 μL dNTPs (100mM)、1 μL MultiScribe Reverse Transcriptase (50U/ μL)、5 μL 10X RT buffer および 4.225 μL RNase-free-water を混合しマスターミックスを作製した。マスターミックス 7 μL 、ターゲットマイクロ RNA に特異的なプライマー 3 μL 、cDNA 溶液 5 μL を混合し逆転写反応を行った。逆転写反応は、サーマルサイクラー (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。反応条件は、16°C 30 分、42°C 30 分、85°C 5 分とした。cDNA は-20°Cで保存した。定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) は、TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific) とリアルタイム PCR 装置 (ABI7500fast:Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。1 サンプルあたり、10 μL 2X TaqMan™ Fast Advanced Master Mix と 7.67 μL RNase-free-water をチューブ内で混合し Master Mix を作製した後、17.67 μL Master Mix、1 μL primer according to target マイクロ RNA および 1.33 μL template を混合し qPCR を行った。qPCR 条件は、95°C 10 分、95°C 15 秒、60°C 60 秒を 40 サイクルとした^{29),32)}。

V-v $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法を用いたマイクロ RNA 解析

$2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法は、マイクロ RNA 定量解析の代表的な方法の 1 つである。各サンプルの Threshold Cycle (CT) 値は、検出可能な蛍光シグナルを示す最小のサイクル数として定義される。ターゲットマイクロ RNA の CT 値からスパイクインした cel-miR39 (1 fmol/ μL) の CT 値を差し引き、さらに差し引いた後の CT 値の差 (ΔCT) を用いて $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 値を算出することで、健常者と T2DM 患者のマイクロ RNA 発現量を比較した³²⁾。

V-vi 統計解析

Mann-Whitney U 検定：Mann-Whitney U 検定による有意差検定を行った。マイクロ RNA は通常、一定の分布に依存しないため、2 群間における一般的なパラメトリック検定である t 検定よりも適切である。

ピアソンの相関係数：ピアソンの相関係数は、2 つのグループの相関強度を見つけるための一般的な解析手法である。本研究では、健常者と T2DM の複数のマイクロ RNA の相関を解析するために使用した。

ロジスティック回帰分析：ロジスティック回帰分析は、2 つのグループを分離するための主要な解析手法であり、散布図においてランダムサンプルが特定のグループに属するか否かを予測するのに有用である。本研究では、健常者と T2DM を統計的に分離するために使用した。

VI 結果

VI- i T2DM 患者の臨床データ

T2DM 患者 50 名（男性 34 名、女性 16 名）を対象とした (Table1)。平均年齢は 65.32 歳 (32~93 歳) であり、BMI の平均は 25.7 (17.4~39.4) であった。糖代謝指標の平均は、空腹時血糖値 168.9 mg/dL (76~364)、HbA1c 7.8% (5.3~11.0)、糖化アルブミン (GA) 21.1 % (14.6~36.5) といずれも高値であった。日本糖尿病学会、日本眼科糖尿病学会の基準により、50 名中 32 名 (64%) に神経障害、18 名 (36%) に網膜症、34 名 (68%) に腎症が認められた (Table1) ³³⁾。また、血液検査項目 (AST、ALT、 γ -GT、HDL コレステロール、LDL コレステロール、中性脂肪、赤血球数、白血球数、血小板数) や尿検査項目 (尿蛋白、ケトン体、ウロビリノゲン、尿潜血) の臨床データも得た。

Table1
Clinical data of 50 T2DM patients

Indexes	Number
Age	65.32 (32-93)
Sex	
Male	34 (68%)
Female	16 (32%)
BMI*	25.71 (17.4-39.4)
glucose(mg/dL)	168.94 (76-364)
HbA1c(%)	7.81 (5.3-11.0)
GA(%)	21.07 (14.6-36.5)
Complications	
Neuropathy	32/50 (64%)
Retinopathy	18/50 (36%)
Nephropathy	34/50 (68%)
Dosage	
Insulin	22/50 (44%)

* BMI, Body Mass Index

VI- ii 循環血清マイクロ RNA のアレイ解析

T2DM に特異的な血清マイクロ RNA を明らかにするために、コントロール群 (n=5) と T2DM 患者 (n=5) のプール血清を用いてアレイ解析を行った。アレイ解析には Human miRNA Oligo chip (3D Gene)を用いて、合計 2632 個のマイクロ RNA を解析した。

解析によって補正された発現量が 100 以上の値を用いて解析した結果、平均値は 25 であり、19 のマイクロ RNA が 2 倍以上増加し、71 のマイクロ RNA が 0.5 倍以下に減少した。T2DM 患者で最も上昇した上位 5 つのマイクロ RNA は、miR-3619-3p、miR-557、miR-6850-5p、miR-3648、miR-6850-5p、miR-4730 であり、最も低下した 5 つは miR-5100、miR-4454、miR-1260b、miR-7975、miR-6131 であった。

Table 2
Up- and down-regulated serum miRNAs in patients with T2DM

Up-regulated			Down-regulated		
rank	miRNA	ratio	rank	miRNA	ratio
1	hsa-miR-3619-3p	7.665	1	hsa-miR-5100	0.086
2	hsa-miR-557	5.972	2	hsa-miR-4454	0.117
3	hsa-miR-6850-5p	4.210	3	hsa-miR-1260b	0.137

VI-iii RT-qPCR 法を用いた T2DM における血清マイクロ RNA の定量的解析

T2DMにおける臓器機能障害と血清マイクロRNAの相関を検証するため、アレイ解析のデータおよびT2DMにおける臓器障害とマイクロRNAとの関係を報告した先行論文を参考に、4つのマイクロRNA(miR-126-3p, miR-21, miR-10a, miR-200c)を選択し、解析を行った。

アレイ解析の結果では、健常者のmiR-126-3pは2632のマイクロRNAのうち320位であり、miR-21、miR-10a、miR-200cは検出されなかった。T2DM群(1.96 + 2.27, n=50)では、健常者群(6.17 + 1.85, n=50)より有意に血清miR-126レベルが低下していた(p<0.01)(Figure1A)。また、AUC(Area Under the Curve)は0.98(Figure1B)であり、最適カットオフ値は3.56であった(感度0.92、特異度0.94)。対してmiR-10aは健常群に比べ有意に増加し(p<0.05)、AUCは0.74であった。miR-21とmiR-200cは、対照群とT2DM患者との間に有意な差は認められなかった(Figure1A)。

また、血清マイクロRNAと臨床データの相関を確認したところ、血清マイクロRNAと臨床データとの強い相関は見られなかった(Table2)。

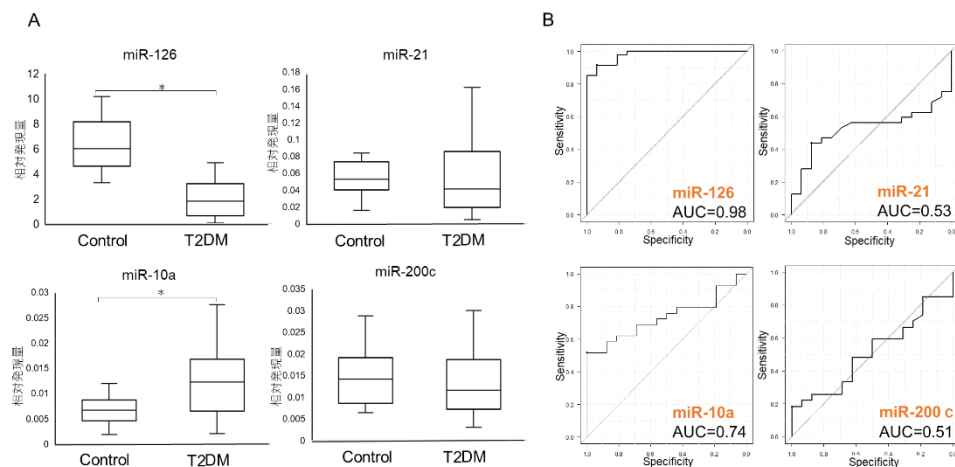


Figure1 RT-qPCR法を用いたT2DMにおける血清マイクロRNAの定量的解析

健常人とT2DMの血清中マイクロRNA発現量比較。縦軸は外部コントロール(cel-miR-39)に対する相対発現量であり、アスタリスクはU検定による有意差があることを示している(p=0.05)(A)。各マイクロRNAにおけるROC曲線(Receiver Operating Characteristic curve)。(B)

Table3

Correlation of miRNAs and clinical states

	HbA1c	GA	9	miR-126	miR-21	miR-10a	miR-200c
Age	0.42*	0.49*	-0.05	0.21	0.26	-0.30	
BMI	0.01	-0.24	-0.01	-0.01	-0.18	0.05	
Disease duration (Years)	0.40*	0.22	0.07	-0.12	0.12	-0.10	
Glucose (mg/dL)	0.36	0.61*	0.16	0.31	0.15	0.10	

T2DM 患者 50 名において、血清中の miR-126 は低下し、miR-10a は上昇したが、2 種のマイクロ RNA の発現量は、HbA1c や GA などの臨床データとの有意な相関を示さなかった (Table3)。そこで、2 種のマイクロ RNA を異なる臨床ステージで評価した。臨床病期は、日本糖尿病学会の基準に従って、HbA1c と GA を用いて行った。50 名の患者のうち、HbA1c 値が 6.9 mg/dL 未満の患者は 9 名、7.0 から 7.9 の患者は 20 名、8.8 以上の患者は 21 名であった。

血清 miR-126 は、HbA1c 値が 7.0 を超えると有意に増加したが ($p < 0.05$)、その値は健常者よりもまだ低かった (Figure2A)。miR-10a は、HbA1 値が 7.0% を超えて高い T2DM の中等度または重度の病期でのみ増加していた (Figure2A)。GA 値による病期分類では、miR-10a のみが GA 値と高い相関を示した (Figure2B)。miR-21 と miR-200c は、HbA1c と GA 値との間に有意な相関は見られなかった。

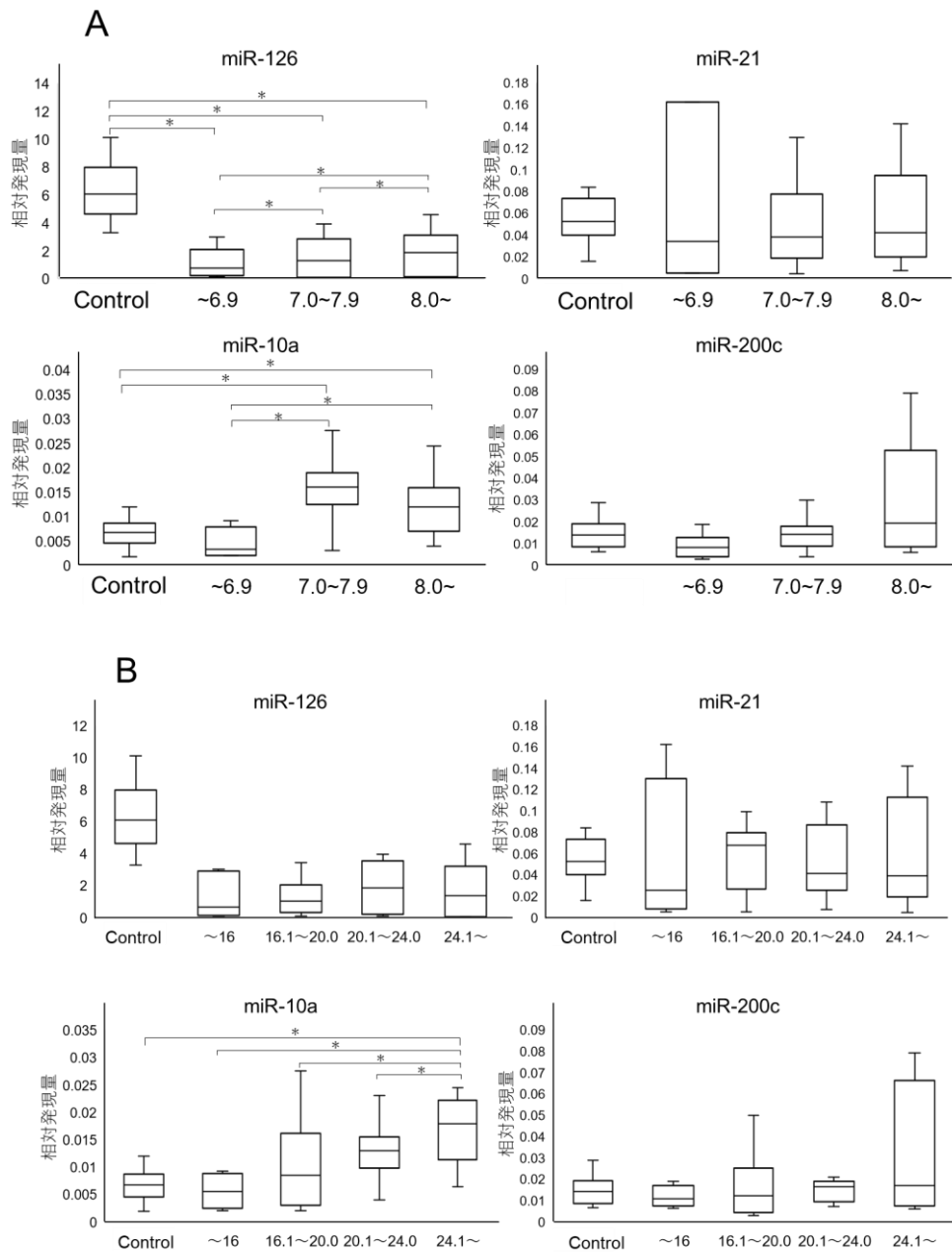


Figure2 T2DMにおける病期ごとのマイクロ RNA 発現

病期ごとの健常人と T2DM の血清中マイクロ RNA 発現量比較。縦軸は外部コントロール(cel-miR-39)に対する相対発現量であり、横軸は HbA1c(A)および GA(B)による病期分類(ステージング)である。アスタリスクは U 検定による有意差があることを示している (p=0.05)(A、B)。

VI-v 複数のマイクロ RNA を用いた T2DM の診断

T2DM 患者では、miR-126 と miR-10a の 2 つのマイクロ RNA が有意に変動していた。また、miR-21 と miR-200c は、血清中の濃度に有意な変化は見られなかった (Table3)。一方で、複数のマイクロ RNA で T2DM 患者と健常者を比較すると、miR-21 vs miR-126, miR-21 vs miR-10a, miR-10a vs miR-126, miR-126 vs miR-200c という組み合わせにおいて、散布図解析上の異なる位置で発現することが確認された (Figure3)。ロジスティック回帰分析において、これらの 2 つのグループが統計学的に有意に分離していることが示された ($p < 0.05$)。miR-21 vs miR-200c、miR-10a vs miR-200c の場合、2 群に分かれるプロットはなかった (Figure3)。

また、健常人と T2DM という分離の他にも T2DM 間で臓器障害の有無にも焦点を当てて判別の可否を確認したが、臓器障害を判別できるようなマイクロ RNA の組み合わせは得られなかった。

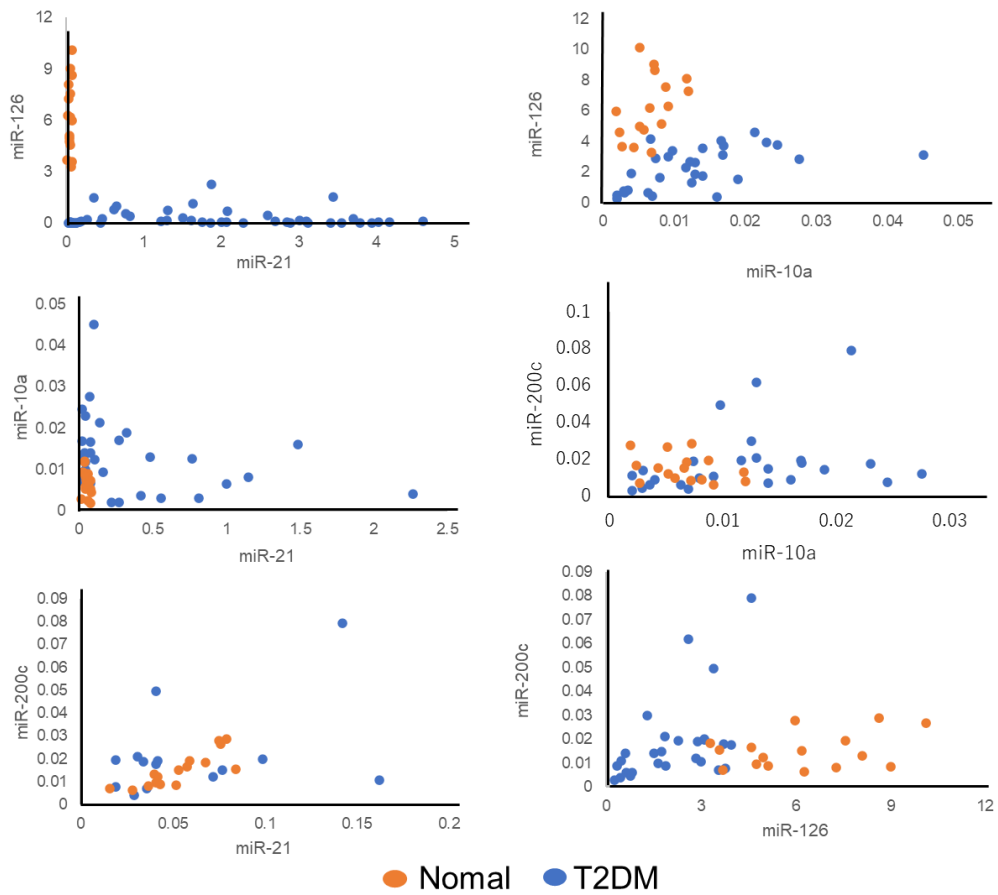


Figure3 複数のマイクロ RNA を用いた T2DM の診断
 複数のマイクロ RNA の組合わせによって描かれた散布図。縦軸および横軸は外部コントロール(cel-miR-39)に対する相対発現量を示している。

VII 考察

本研究では、T2DM の診断や病期分類における血清中循環マイクロ RNA 測定の有用性を検証した。

HbA1c 高値の T2DM 患者 5 人のプール血清を用いたマイクロ RNA のマイクロアレイ解析では、19 のマイクロ RNA が健常者のプール血清と比較して 2 倍以上発現が増加していることが示された。高値であったマイクロ RNA の中で T2DM 以外の疾患で報告されているものとして、甲状腺乳頭癌や食道小細胞癌における miR-3619-3p^{34),35)}、骨肉腫や膵管腺癌における miR-557^{36),37)}、漿液性卵巣癌における miR-6850³⁸⁾が挙げられる。一方、T2DM 患者におけるマイクロ RNA の臓器機能障害では、miR-100 の発現増加および miR-126-3p 発現の低下が報告されている^{39),40)}。

そこで我々は、アレイ解析のデータと T2DM におけるマイクロ RNA の臓器障害に関する先行論文を総合的に調査し、4 つのマイクロ RNA (miR-126、miR-21、miR-10a、miR-200c) を選択して T2DM 患者 50 人について RT-qPCR 法で定量的に解析した。その結果、T2DM 患者において血清中の miR-126 が低下していることが示された。miR-126 は血小板や血管内皮細胞に多く存在し、マクロファージの貪食能を活性化するメカニズムに関与していると報告されている^{41),42)}。また、miR-126 の低下は冠動脈疾患のリスクを高めることも報告されている⁴³⁾。本研究では、36%の患者に網膜症が、34%の患者に神経障害があり、糖尿病性微小血管症を合併していることが示唆された (Table1)。それに加え miR-126 は腎臓病や骨髄異形成症候群 (MDS) で増加することが知られており、T2DM の病期が進行することにより miR-126 が上昇している可能性が示唆された^{44),45)}。miR-10a は腎障害のマーカーとして知られており⁴⁶⁾、腎症における尿細管障害で増加すると報告されている⁴⁷⁾。本研究で 68%の患者に観察された腎症は、miR-10a の上昇と関連している可能性が考えられる。このように、miR-126 と miR-10a 発現の有意な変動は、T2DM 患者における血管障害 (microvascular damage) を反映している可能性が示唆された。

血清 miR-126 と他の T2DM 病期分類のマーカーとの間に相関は見られなかった。従って、miR-126 は現行の T2DM マーカーとは独立したバイオマーカーである可能性が考えられる。我々のデータにおいて、miR-126 は T2DM の進行したステージで相対的に高い値を示したため、miR-126 は T2DM 患者における血管合併症を予測する有用なバイオマーカーである可能性がある。しかし、血清 miR-126 は高齢者において高値を示すことも報告されている⁴⁸⁾。そのため、年齢による miR-126 の上昇である可能性を排除するために、より大規模な研究が推奨される。

miR-10a は、糖尿病および高脂血症のラットにおいて、血管の高負荷と臓器障害を促進するマイクロ RNA の一つであると報告されている^{49),50)}。我々のデータにおいて、miR-10a は糖代謝や脂質代謝の指標と有意な相関は見られなかった。しかし、内皮細胞由来の細胞外小胞(EV)に含まれる miR-10a は単球に移行し、NF- κ B 経路を阻害することで炎症性シグナルを抑制することが知られている⁵¹⁾。T2DM における血清 miR-10a の上昇は病期依存的であることから、T2DM における血管障害に対する生体反応を反映している可能性がある。

miR-21 は、癌疾患の病態において最も重要なマイクロ RNA の一つである⁵²⁻⁵⁴⁾。近年では、多くの研究により癌分野以外でも様々な疾患における miR-21 異常発現が報告されている。T2DM 患者は、幅広い合併症を伴う大血管症および微小血管症を有している²⁾ため、様々な体内動態を大きく反映する miR-21 においては T2DM と健常者との間で有意差が確認されなかった可能性がある⁵²⁻⁵⁷⁾。

複数の研究において、miR-200c が T2DM における腎症および肺癌の発症に寄与していることが報告されている⁵⁸⁻⁶¹⁾が、本研究では T2DM における miR-200c の発現量に有意な差は認められなかった。

本研究では、血清マイクロ RNA のプロファイル解析を用いた簡便な T2DM の検査法の開発にも焦点を当てた。落谷らのグループは、複数の血清マイクロ RNA を複合的に解析することにより、高い感度と特異性で複数の早期癌を検出することができることを示した⁶²⁾。しかし、癌と同様に世界的に罹患人口の多い疾患の 1 つである T2DM においては、同様のアプローチは未だ確立されていない。本研究にて、複数のマイクロ RNA を組み合わせた解析は、T2DM 患者を有意に層別化できることが示された。T2DM の病態は、血糖値異常だけでなく、血管内皮の障害や動脈硬化、血管外の臓器障害が複合的に発症する。また、1 つのマイクロ RNA は数百の標的遺伝子を持ち、1 つの遺伝子は異なるマイクロ RNA に対して複数の結合部位を持つ^{16),17)}ため、複数のマイクロ RNA を組み合わせた解析は、単一のマイクロ RNA の発現解析よりも、マイクロ RNA の調節異常をより適切に示す解析法であると期待される⁶²⁾。本研究においては、血清中のマイクロ RNA のレベルと臨床データに相関は見られなかった。

VIII 課題と今後の展望

本研究における対象症例数は 50 名で有意な結果を得るには限界があり、さらに大規模な研究が必要である。また T2DM に関連する臓器障害、たとえばより詳細な臨床像（エコーや血管硬度測定など血管障害にかかわる測定値、眼底所見など）とマイクロ RNA 測定値との関連の解析など、より包括的な研究が必要である。

IX 結語

本研究により、T2DM の病態を診断するツールとして複数のマイクロ RNA による解析の有用性が示唆された。一方、本研究では、T2DM 患者 50 名と対照者 15 名のみの解析でありさらなる有用性検討のためより大規模な検討が必要である。

X 謝辞

本研究を行うにあたり、高邦会高木病院、小野恭裕先生には貴重な臨床解析の機会を与えていただいた。ここに深謝いたします。国際医療福祉大学大学院保健医療学専攻臨床検査学分野教授、梅村創先生には指導教員として本研究の機会を与えて戴き、その遂行にあたって終始ご指導を戴いた。ここに深謝いたします。また、国際医療福祉大学福岡保健医療学部医学検査学科講師、澁田樹先生には研究の直接的な指導、ご教授を戴いた。ここに深謝いたします。統計解析においては、佐賀大学医学部付属病院特任教授、高守史子先生にご指導を戴いた。ここに深謝いたします。

XI 参考文献

1. IDF. Diabetes Atlas, 7th ed. Brussels, Belgium
International Diabetes Federation; 2015. pp. 1–114.
2. Jessica L Harding et al. (2019)
Global trends in diabetes complicationsa review of current evidence.
Diabetologia 62(1):3-16.
3. Maria J Redondo et al. (2020)
The clinical consequences of heterogeneity within and between different diabetes
types.
Springer Link 10.1007/s00125-020-05211-7.
4. Mark A Atkinson et al. (2014)
Type 1 diabetes.
The lancet 383(9911):69-82
5. Jill M Norris et al. (2020)
Type 1 diabetes-early life origins and changing epidemiology.
The lancet 8(3):226-238
6. Shu-Fen Lee et al. (2021)
Personality as a predictor of HbA1c level in patients with type 2 diabetes mellitus.
Medicine 100(27):e26590
7. M Fujishima et al. (1994)
Diabetes and cardiovascular disease in a prospective population survey in Japan: The
Hisayama Study.
Diabetes Suppl 3:S14-6
8. Maarten P Rozing et al. (2019)
Changes in HbA1c during the first six years after the diagnosis of Type 2 diabetes
mellitus predict long-term microvascular outcomes.
PLOS ONE 14(11):e0225230
9. Robert E Heinig. (2006)
The patient with diabetes: preventing cardiovascular complications.
Clinical Cardiology II13-20

10. Thomas R. Einarson, Annabel Acs, Craig Ludwig, Ulrik H. Panton. (2018)
Prevalence of cardiovascular disease in type 2 diabetes: a systematic literature review of scientific evidence from across the world in 2007–2017.
Cardiovasc Diabetol 17:83.
11. Josef Coresh et al. (2014)
Decline in estimated glomerular filtration rate and subsequent risk of end-stage renal disease and mortality.
JAMA 311(24):2518-2531
12. Radica Z Alicic et al. (2017)
Diabetic Kidney Disease: Challenges, Progress, and Possibilities.
Clinical Journal of The American Society of Nephrology 12(12):2032-2045
13. Maryam Afkarian, Michael C. Sachs, Bryan Kestenbaum, Irl B. Hirsch, Katherine R. Tuttle, Jonathan Himmelfarb, Ian H. de Boer. (2013)
Kidney Disease and Increased Mortality Risk in Type 2 Diabetes.
J Am Soc Nephrol 24: 302–308, doi: 10.1681/ASN.2012070718
14. Amro M Stino et al. (2017)
Peripheral neuropathy in prediabetes and the metabolic syndrome.
Journal of Diabetes Investigation 10.1111/jdi.12650
15. Rao Kondapally Seshasai S, Kaptoge S et al. (2011)
Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death.
N Engl J Med 364:829–841
16. Shuibin Lin et al. (2015)
MicroRNA biogenesis pathways in cancer.
nature reviews 15(6):321-33
17. Sean M Hartig et al. (2015)
The miRNA Interactome in Metabolic Homeostasis.
Trends in Endocrinology & Metabolism 26(12):733-745
18. Scott M Hammond. (2015)
An overview of microRNAs.
Advanced Drug Delivery Reviews 87:3-14

19. Boxue He et al. (2020)
miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in Cancer.
International Journal of Biological Sciences 16(14):2628-2647
20. Giannella et al. (2017)
Circulating levels and characterization of microparticles in patients with different degrees of glucose tolerance.
Cardiovasc Diabetol 16:118, doi: 10.1186/s12933-017-0600-0
21. Marcelo A. Mori, Raissa G. Ludwig, Ruben Garcia-Martin, Bruna B. Branda, C. Ronald Kahn.(2019)
Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease.
Cell Metabolism, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.07.011>
22. Rama Natarajan et al. (2013)
MicroRNAs and Diabetic Complications. *Journal of Cardiovascular Translational Research* 5(4):413.
23. Andreas Zietzer et al.(2022)
microRNA-mediated vascular intercellular communication is altered in chronic kidney disease.
Cardiovascular Research 118: 316-333, doi: 10.1093/cvr/cvaa322
24. Yameng Li et al. (2021)
Construction and Bioinformatics Analysis of the miRNA-mRNA Regulatory Network in Diabetic Nephropathy.
Journal of Healthcare Engineering 2021:8161701
25. Beata Franczyk et al. (2022)
miRNA biomarkers in renal disease.
International Urology and Nephrology 54(3):575-588
26. Aleksandra Gasecka et al. (2020)
Early Biomarkers of Neurodegenerative and Neurovascular Disorders in Diabetes.
Journal of Clinical Medicine 9(9):2807
27. Ying-Bo Li et al. (2017)
miR-199a-3p is involved in the pathogenesis and progression of diabetic neuropathy through downregulation of SerpinE2.
Molecular Medicine Reports 16(3):2417-2424

28. Eiichi Araki et al. (2020)
Japanese Practice Guideline for Diabetes 2019 Japanese Diabetic Society.
Diabetology International 11:165-223.
29. Yukichi Takada et al. (2021)
Pre-Analytical Modification of Serum miRNAs: Diagnostic Reliability of Serum miRNAs in Hemolytic Diseases.
Journal of Clinical Medicine 10(21):5045
30. Hiromichi Shiotsu et al. (2018)
The Influence of Pre-Analytical Factors on the Analysis of Circulating MicroRNA.
MicroRNA 7(3):195-203
31. Fardokht A Abulwerdi et al. (2016)
Microarray-based technologies for the discovery of selective, RNA-binding molecules.
Methods 103:188-95
32. Thomas D Schmittgen et al. (2008)
Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method.
Nature protocols 3(6):1101-8
33. Motohiro Kamei (2020)
Diabetic Retinopathy Clinical Practice Guidelines (1st Edition).
Journal of Japanese Ophthalmological Society 124:955-981 (in Japanese)
34. Yu S, Cao S, Hong S, Lin X, Guan H, Chen S, Zhang Q, Lv W, Li Y, Xiao H. (2019)
miR-3619-3p promotes papillary thyroid carcinoma progression via Wnt/ β -catenin pathway.
Ann Transl Med. 2019 Nov;7(22):643. doi: 10.21037/atm.2019.10.71.
35. Okumura T, Shimada Y, Omura T, Hirano K, Nagata T, Tsukada K.(2015)
MicroRNA profiles to predict postoperative prognosis in patients with small cell carcinoma of the esophagus.
*Anticancer Res.*Feb;35(2):719-27.

36. Qiao Z, Li J, Kou H, Chen X, Bao D, Shang G, Chen S, Ji Y, Cheng T, Wang Y, Liu H. (2022)
Hsa-miR-557 Inhibits Osteosarcoma Growth Through Targeting KRAS.
Front Genet. Jan 11;12:789823. doi: 10.3389/fgene.2021.789823.
37. Zhang Y, Zhang R, Ding X, Ai K. EFNB2(2018)
acts as the target of miR-557 to facilitate cell proliferation, migration and invasion in pancreatic ductal adenocarcinoma by bioinformatics analysis and verification.
Am J Transl Res. Nov 15;10(11):3514-3528.
38. Yoshida K, Yokoi A, Matsuzaki J, Kato T, Ochiya T, Kajiyama H, Yamamoto Y. (2021)
Extracellular microRNA profiling for prognostic prediction in patients with high-grade serous ovarian carcinoma.
Cancer Sci. Dec;112(12):4977-4986. doi: 10.1111/cas.15154.
39. Fabiola Olivieri, Liana Spazzafumo, Massimiliano Bonafe, Rina Recchioni, Francesco Prattichizzo, Fiorella Marcheselli, Luigina Micolucci, Emanuela, Angelica Giuliani, Gabriele Santini, Mirko Gobbi, Raffaella Lazzarini, Massimo Boemi, Roberto Testa, Roberto Antonicelli, Antonio Domenico and Anna Rita Bonfigli. (2015)
MiR-21-5p and miR-126a-3p levels in plasma and circulating angiogenic cells: relationship with type 2 diabetes complications.
Oncotarget 6, 34:35372-35382, 2015
40. Araldi E, Suarez Y. (2017)
MicroRNAs as regulators of endothelial cell functions in cardiometabolic diseases.
Bioche Biophys Acta 2016, 1861:2094-2103. Doi:10.1016/j.bbali.2016.01.013.
41. Giannella et al. (2017)
Circulating levels and characterization of microparticles in patients with different degrees of glucose tolerance.
Cardiovasc Diabetol 16:118, doi: 10.1186/s12933- 412 017-0600-0

42. Benoit Laffont, Aurelie Corduan, Helene Ple, Anne-Claire Duchez, Nathalie Cloutier, Eric Boilard, Patrick Provost. (2013)
Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2•microRNA complexes to endothelial cells via microparticles.
Blood 2013;122(2):253- 261, DOI 10.1182/blood-2013-03-492801.
43. Jansen F, Wang H, Przybilla D, Franklin BS, Dolf A, Pfeifer P, Schmitz T, Flender A, Endl E, Nickenig G, Werner N.(2016)
Vascular endothelia microparticles-incorporated microRNAs are altered in patients with diabetes mellitus.
Cardiovasc Diabetol, 15:49 doi 10.1186/s12933-016-0367-8
44. Cristina Beltrami et al. (2018)
Association of Elevated Urinary miR-126, miR-155, and miR-29b with Diabetic Kidney Disease.
The American Journal of Pathology 188(9):1982-1992
45. Huafeng Wang et al. (2021)
Targeting miR-126 disrupts maintenance of myelodysplastic syndrome stem and progenitor cells.
Clinical and Translational Medicine 11(10):e610
46. Qun Shan et al. (2016)
Epigenetic modification of miR-10a regulates renal damage by targeting CREB1 in type 2 diabetes mellitus.
Toxicology and applied pharmacology 1;306:134-43. doi: 10.1016
47. Nan Wang et al. (2012)
Urinary microRNA-10a and microRNA-30d serve as novel, sensitive and specific biomarkers for kidney injury
PLoS One 7(12):e51140. doi: 10.1371
48. Bonafe M, Oliverri F. (2015)
Circulating microRNAs in aging.
Oncotarget, 6:1340-1341

49. Tao Li, Guang-ming Yang, Yu Zhu, Yue Wu, Xiang-yun Chen, Dan Lan, Kun-lun Tian, and Liang-ming Liu. (215)
Diabetes and hyperlipidemia induce dysfunction of VSMCs: contribution of the metabolic inflammation/miRNA pathway.
Am J Physiol Endocrinol Metab 308: E257–E269. doi:10.1152/ajpendo.00348.2014.
50. Yun Fanga, Congzhu Shia, Elisabetta Manduchib,c, Mete Civeleka,d, and Peter F. Daviesa.(2010)
MicroRNA-10a regulation of proinflammatory phenotype in atherosusceptible endothelium in vivo and in vitro.
PNAS 107: 13450–13455, doi/10.1073/pnas.1002120107
51. Makon-Sebastien Njock, Henry S. Cheng, Lan T. Dang, Maliheh Nazari-Jahantigh, Andrew C. Lau, Emilie Boudreau, Mark Roufaiel, Myron I. Cybulsky, Andreas Schober, Jason E. Fish. (2015)
Endothelial cells suppress monocyte activation through secretion of extracellular vesicles containing anti-inflammatory microRNAs.
Blood 125(20):3202-3212, DOI 10.1182/blood-2014-11-611046.
52. Kirsten Nguyen Knudsen et al. (2018)
miR-21 expression analysis in budding colon cancer cells by confocal slide scanning microscopy.
Clin Exp Metastasis 35:819-830. Doi: 10.1007/s10585-018-9945-3.
53. Hui Wang et al. (2019)
microRNA-21 promotes breast cancer proliferation and metastasis by targeting LZTFL1.
BMC cancer 27;19(1):738
54. Akiko Kunita et al.(2018)
MicroRNA-21 in cancer-associated fibroblasts supports lung adenocarcinoma progression.
Scientific Reports 8(1):8838

55. Canfrán-Duque A, Rotllan N, Zhang X, Fernández-Fuertes M, Ramírez-Hidalgo C, Araldi E, Daimiel L, Busto R, Fernández-Hernando C, Suárez Y. (2017)
Macrophage deficiency of miR-21 promotes apoptosis, plaque necrosis, and vascular inflammation during atherogenesis.
EMBO Mol Med 9:1244–1262. doi: 10.15252/emmm.201607492
56. Wei Liu et al. (2021)
Modulation of Vascular Smooth Muscle Cell Multiplication, Apoptosis, and Inflammatory Damage by miR-21 in Coronary Heart Disease.
Computational and Mathematical Methods in Medicine 6942699
57. Congcong Chen et al. (2017)
Urinary miR-21 as a potential biomarker of hypertensive kidney injury and fibrosis.
Scientific Reports 7(1):17737
58. Vishal Patel et al. (2012)
MicroRNAs and fibrosis.
Current opinion in nephrology and hypertension 21(4):410-6
59. Yongfeng Song et al. (2021)
MiR-200c-3p targets SESN1 and represses the IL-6/AKT loop to prevent cholangiocyte activation and cholestatic liver fibrosis.
Laboratory Investigation 10.1038/s41374-021-00710-6
60. Wenrui Duan et al. (2021)
MiRNA-200C expression in Fanconi anemia pathway functionally deficient lung cancers.
Scientific Reports 11(1):4420
61. Yuree Byun et al. (2019)
MiR-200c downregulates HIF-1 α and inhibits migration of lung cancer cells.
Cellular & Molecular Biology Letters 24:28

62. Wataru Usuba, Fumihiko Urabe, Yusuke Yamamoto, Juntaro Matsuzaki, Hideo Sasaki, Makiko Ichikawa, Satoko Takizawa, Yoshiaki Aoki, Shumpei Niida, Ken Kato, Shin Egawa, Tatsuya Chikaraishi, Hiroyuki Fujimoto, Takahiro Ochiya.(2019)
Circulating miRNA panels for specific and early detection in bladder cancer.
Cancer Science 2019;110:408–419. DOI: 10.1111/cas.13856