

「テーラーメイド医療を目指したゲノム情報活用基盤技術」
平成14年度採択研究代表者

武田 純

(岐阜大学大学院医学研究科分子・構造学講座内分泌代謝病態学分野 教授)

「転写調節系の分子解剖による糖尿病素因の探索」

1. 研究実施の概要

欧米人の2型糖尿病が「肥満型インスリン抵抗性」であるのに対し、日本人では「非肥満型インスリン分泌不全」を一義的な特徴とする。本研究では、日本人に特有な2型糖尿病素因を同定し、罹患体質のテーラーメイド診断法を開発する。研究戦略は、高次に選別した候補遺伝子のSNP集中解析である。

SNPを用いた大規模な関連解析において重要なことは、良質の糖尿病患者とコントロールのDNA試料と医療情報を大きく集積することである。前年度より糖尿病内科の臨床研究拠点が新たに岐阜大学に形成され、DNA試料と臨床情報の収集基盤が充実された。当該機関における本計画実施の倫理審査も承認され、地域コホートを対象とした大規模DNAの収集が開始された。一方、先行している候補遺伝子解析では、疾患感受性を増大させる遺伝子候補をいくつか同定している。現在、その責任サイトの確認作業を急いでいるところである。また、責任転写因子に関する実験モデル動物も順調に作成されており、インスリン分泌に関する生理学的解析も平行して実施されている。

2. 研究実施内容

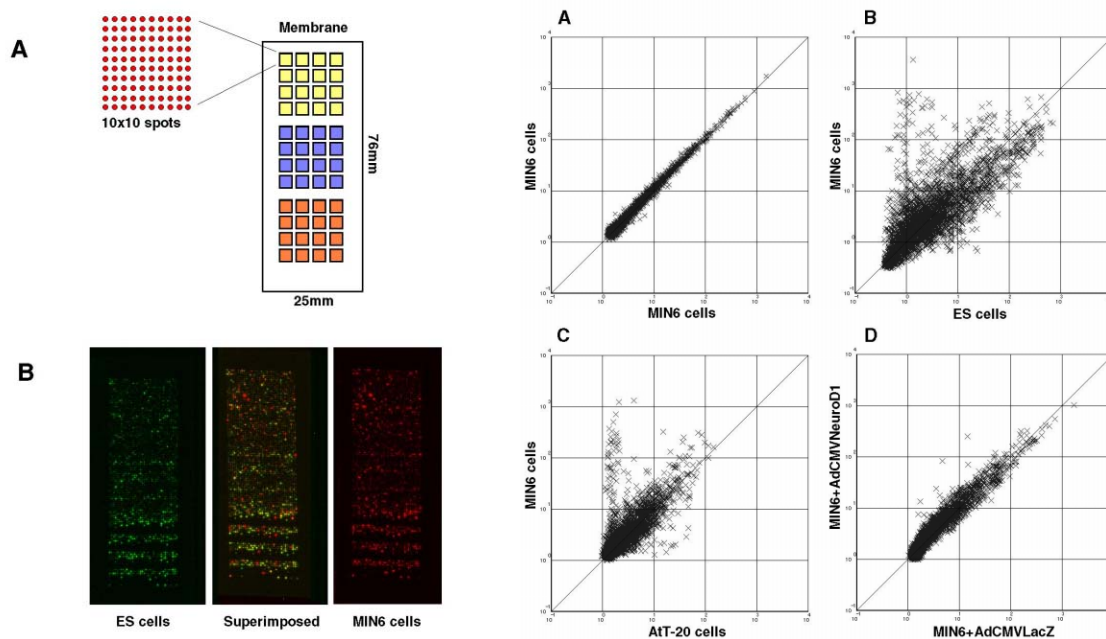
HNF-SHP ネットワークの転写因子遺伝子の解析

一連のHNF転写因子の異常は常染色体優性遺伝の若年糖尿病(MODY)の成因となる。また、これらの転写因子は、肝における胆汁酸コレステロール代謝に重要な遺伝子発現の制御を担っていることも明らかにされてきた。重度の遺伝子異常は単独で単因子異常型の糖尿病を、軽度の異常は多因子型の発症リスクになる可能性を想定し、既に明らかにされた種々のHNF転写因子の遺伝子多型について再解析を試みた。その結果、HNF-4 α (MODY1)のT130I多型と2型糖尿病が有意に関連することを明らかにした。しかし、血糖、インスリン、HOMA指数、HbA1cなどの糖尿病に関するサブ表現型とは有意の関連は認めず、興味深いことに、HDLコレステロール値と有意の関連を認めた。変異蛋白の機能解析を行なったところ、膵ベータ細胞では野生型と有意差は認められなかったが、一方、肝細胞においては有意な機能低下が認められた。すなわち、転写イベントに両組織では異なる共役分子がリクルートされることによって組織特異的な機能の差異が発揮されることが明らかとなっ

た。

膵島・小腸EST収集とマイクロアレイの作成

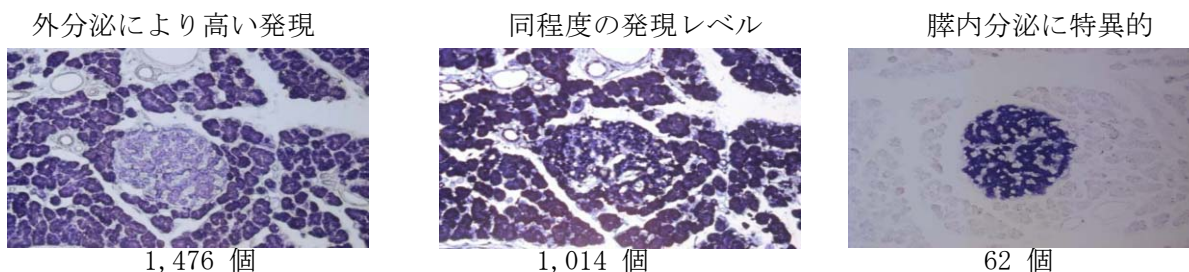
MODY (maturity-onset diabetes of the young) 遺伝子は発生原基が共通である膵島と小腸でともに発現している。日本人の2型糖尿病は、非肥満とインスリン分泌不全を特徴とするMODYと臨床像が類似するので2型糖尿病の感受性遺伝子も相当部分がこの両組織で発現していると考える。その観点から、現在までにヒト、マウス、ラット組織（膵島、インスリン産生細胞、小腸）からそれぞれ51,000個、41,000個、37,000個の発現遺伝子をESTとして収集した(DDBJ BP383879-398856, 423025-433029, 464981-504629)。次いでクラスタリング解析により重複しない発現遺伝子セットを作成した。特に、マウスクローンについては全長cDNAを採用したユニークなDNAマイクロアレイを開発した。下図のように、MIN6細胞、ES細胞、遺伝子導入細胞を用いたアレイ精度の検定でも良好な成績が得られている。これらの変化遺伝子は発現実験に直結する全長遺伝子にリンクするので、研究者にとって有用な解析ツールとなるであろう。本アレイは今年度中に商品化の予定である。



大規模in situ hybridization

インスリン、グルカゴン分泌による膵島細胞の血糖調節機構を理解するためには、膵島特異的な調節分子を網羅同定して機能解析を行なうことが重要である。一方、これらの参与分子のコード遺伝子は糖尿病遺伝子の重要候補でもある。我々はハイスループットなEST in situ hybridization の系を確立したので、同法と上記のラットESTを用いて膵島特異的な発現遺伝子の網羅的解析に着手した。15年度は、2,552個の遺伝子を解析することができた。成績は以下の3つの発現パターンに分類された。その結果、62個の膵島限局遺

伝子を獲得することに成功したので、本アプローチは特異的遺伝子の同定に対して有効と考えられる。さらなる収集作業は現在も進行中である。



インスリン分泌・作用に関する重要蛋白のダブル欠失マウスの作成と解析

膵β細胞のインスリン分泌に重要なATP感受性K⁺チャンネルを構成するKir6.2の欠失マウスを、標的組織でのインスリンシグナル伝達に重要なリン酸化基質IRS1の欠失マウスと交配させ、インスリン分泌障害と抵抗性を有するダブル異常マウスの作製を試みた。同マウスの耐糖能を糖負荷試験で検討したところ、驚くことに耐糖能障害は全く認められなかった。インスリン負荷試験と骨格筋への糖取込みを調べたところ、ダブル欠失マウスの骨格筋への糖取込みは、正常マウスより明らかに亢進していた。そこで、Kir6.2遺伝子破壊により糖取込みが亢進するメカニズムを解析した。まず骨格筋の主要な糖輸送担体GLUT4の発現とIRS1下流のインスリン作用シグナルPI3Kの活性を調べたが、いずれもKir6.2遺伝子破壊による機能亢進は認められなかった。さらに、糖取込みに重要な役割をはたすAkt/PKBのリン酸化と、近年骨格筋での糖取込みの制御分子として注目されているAMPキナーゼを検討したが、両者には異常を認めなかった。以上の結果から、Kir6.2遺伝子破壊による糖取込みの亢進は、IRS1、PI3K、Akt/PKBを介するリン酸化経路とも、AMPK活性化を介する経路とも異なるあらたなメカニズムを介していると結論された。今後は、この新しい経路に関する分子の同定と作用機構の解明を行なう。

耐糖能障害の高頻度地域の発見と健康調査チームの構築

生活習慣病の種々の病態は互いに密接に関連するので、感受性素因を個々に分離同定することは困難である。岐阜県は男性の長寿県であり（全国7位、町村別の上位20位に県内4町村が含まれる）、健康障害因子は他府県より少ない。女性は全国平均であることから遺伝素因の関与が考えられる。しかし恵那保健所管内では、男性の脳梗塞死亡率は全国平均より著明に高く（人口10万対死亡率：全国66.6に対し平均103.4 [81.0-239.0]）、周辺健康地域との間に大きな体質コントラストが存在する。しかも、糖尿病の要指導群（HbA1c 5.5-6.0）の比率が全国平均の10.6%に比して、同地域は14.4%と有意に高い。そこで16年度は、人口移動の少ない恵那高密度地域を対象として、糖尿病に焦点を絞った住民の健康障害に関する情報とDNAを大規模集積することに着手する。本研究チームと県寄付講座「健康障害半減講座（岐阜県）」を中核拠点として、保健管理センター、県と市

の保健行政、地元医師会、管轄保健所を加えた連携調査チームを構築した。県寄付講座が平成16年7月に発足するので、本計画の開始も同期とした。

3. 研究実施体制

(1) 遺伝素因解析グループ

- 1) 分担グループ長：武田 純（岐阜大学医学部 教授）
- 2) 研究項目：糖尿病発症に関する遺伝子型・表現型の関連解析

(2) 遺伝子多型解析グループ

- 1) 分担グループ長：武田 純（群馬大学生体調節研究所 教授）（兼任）
- 2) 研究項目：糖尿病候補遺伝子のSNP解析

(3) モデル動物解析グループ

- 1) 分担グループ長：三木隆司（千葉大学医学部 助教授）
- 2) 研究項目：遺伝子操作動物の作成と解析

(4) ゲノム創薬グループ

- 1) 分担グループ長：城森孝仁（三和科学研究所 所長）
- 2) 研究項目：負荷薬剤の合成とリガンド創薬

上記の研究状況を踏まえ、平成16年度も各研究チームは密接に連携して以下の作業を継続遂行する予定である。

- 1) マイクロアレイシステムを用いた転写標的のスクリーニング
- 2) 大規模in situ hybridizationによる候補選別
- 3) 転写因子に関する遺伝子操作動物の作成と生理学的解析
- 4) 転写因子遺伝子のSNPハプロタイプを用いた関連解析
- 5) 糖尿病高密度地域の健康調査とDNA収集

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Horikawa Y, Oda N, Yu L, Fujiwara K, Makino M, Seino Y, Itoh M, Takeda J: Genetic variations in *CAPN10* are not a major factor in the occurrence of type 2 diabetes in Japanese. **J Clin Endocrinol Metab** 88: 244-247, 2003
- Hayashi M, Yamada H, Uehara S, Morimoto R, Muroyama A, Yatsushiro S, Takeda J, Yamamoto A, Moriyama Y: Secretory granule-mediated co-secretion of L-glutamate and glucagon triggers glutamatergic signal transmission in islets of Langerhans. **J Biol Chem** 278: 1966-1974, 2003
- Zhu Q, Yamagata K, Miura A, Shihara N, Horikawa Y, Takeda J,

Miyagawa J, Matsuzawa Y: T130I mutation in HNF-4 α gene is a loss-of-function mutation in hepatocytes and is associated with late-onset Type II diabetes mellitus in Japanese subjects.

Diabetologia 46: 567-573, 2003

- Tanaka T, Ikari K, Furushima K, Okada A, Tanaka H, Furukawa K, Yoshida K, Ikeda T, Ikegawa S, Hunt S, Takeda J, Toh S, Harata S, Nakajima T, Inoue I: Genomewide linkage and linkage disequilibrium analyses pinpoint the ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine to *COL6A1* locus on chromosome 21.

Am J Hum Genet 73: 812-822, 2003

- Smith AN, Lovering RC, Futai M, Takeda J, Brown D, Karet FE: Revised nomenclature for mammalian vacuolar-type H⁺-ATPase subunit genes.

Mol Cell 12: 801-803, 2003

- Lin J, Wang H, Narita T, Kikuno R, Ohara O, Shihara N, Nishigori T, Horikawa Y, Takeda J: Expression profile of mRNAs from human pancreatic islet tumors.

J Mol Endocrinol 31: 519-528, 2003

- So WY, Ng MC, Horikawa Y, Njolstad PR, Li JK, Ma RC, Bell GI, Chan JC: Genetic variants of hepatocyte nuclear factor-1beta in Chinese young-onset diabetic patients with nephropathy.

J Diabetes Complications 17: 369-73, 2003

- Weedon MN, Schwarz PE, Horikawa Y, Iwasaki N, Illig T, Holle R, Rathmann W, Selisko T, Schulze J, Owen KR, Evans J, Del Bosque-Plata L, Hitman G, Walker M, Levy JC, Sampson M, Bell GI, McCarthy MI, Hattersley AT, Frayling TM: Meta-analysis and a large association study confirm a role for calpain-10 variation in type 2 diabetes susceptibility.

Am J Hum Genet 73: 1208-1212, 2003

- Zhou YP, Sreenan S, Pan CY, Currie KP, Bindokas VP, Horikawa Y, Lee JP, Ostrega D, Ahmed N, Baldwin AC, Cox NJ, Fox AP, Miller RJ, Bell GI, Polonsky KS: A 48-hour exposure of pancreatic islets to calpain inhibitors impairs mitochondrial fuel metabolism and the exocytosis of insulin.

Metabolism 52: 528-534, 2003

- Minami K, Morita M, Saraya A, Yano H, Terauchi Y, Miki T, Kuriyama T, Kadowaki T, Seino S: ATP-sensitive K⁺ channel-mediated glucose uptake is independent of IRS-1/phosphatidylinositol 3-kinase signaling.

Am J Physiol Endocrinol Metab 285: E1289-1296, 2003

- Gong B, Legault D, Miki T, Seino S, Renaud JM: KATP channels depress force

by reducing action potential amplitude in mouse EDL and soleus muscle.

Am J Physiol Cell Physiol 285: C1464-1474, 2003

- Gumina RJ, Pucar D, Bast P, Hodgson DM, Kurtz CE, Dzeja PP, Miki T, Seino S, Terzic A: Knockout of Kir6.2 negates ischemic preconditioning-induced protection of myocardial energetics.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 284: H2106-2113, 2003

- Suzuki M, Saito T, Sato T, Tamagawa M, Miki T, Seino S, Nakaya H: Cardioprotective effect of diazoxide is mediated by activation of sarcolemmal but not mitochondrial ATP-sensitive potassium channels in mice.

Circulation 107:682-685, 2003

- Saito T, Okada S, Yamada E, Ohshima K, Shimizu H, Shimomura K, Sato M, Pessin JE, Mori M: Syntaxin 4 and Synip (syntaxin 4 interacting protein) regulate insulin secretion in the pancreatic beta HC-9 cell.

J Biol Chem 278: 36718-36725, 2003

- Araki O, Morimura T, Ogiwara T, Mizuma H, Mori M, Murakami M: Expression of type 2 iodothyronine deiodinase in corticotropin-secreting mouse pituitary tumor cells is stimulated by glucocorticoid and corticotropin-releasing hormone.

Endocrinology 144: 4459-4465, 2003

- Tsuchiya T, Shimizu H, Shimomura K, Mori M: Troglitazone inhibits isolated cell proliferation, and induces apoptosis in isolated rat mesangial cells.

Am J Nephrol 23: 222-228, 2003

- Nagai T, Imamura M, Takai Y, Mori M: Insulinoma accompanied by diabetes mellitus.

Diabetes Res Clin Pract 60: 19-23, 2003

- Nagai T, Imamura M, Iizuka K, Mori M: Hypoglycemia due to nateglinide administration in diabetic patient with chronic renal failure.

Diabetes Res Clin Pract 59: 191-194, 2003

- Okada S, Mori M, Pessin JE: No abstract Introduction of DNA into 3T3-L1 adipocytes by electroporation.

Methods Mol Med 83: 93-6, 2003

- Takeda J: Plump genes and diabetes: HNF/SHP regulatory network and common metabolic disorders.

Clin Pediatr Endocrinol 12: 29-34, 2003.

(2) 特許出願

平成15年度特許出願 なし