

「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

糖尿病の患者数は急増した。厚労省の調査によると、糖尿病患者は740万人、予備軍が880万人と推定される。これは成人6.3人に1人の割合である。さらに、最新の久山町の住民調査（糖負荷試験）によると、40歳以上では糖尿病は4人に1人であり、軽症の耐糖能障害を含めると約半数にも達した。

欧米人の2型糖尿病が「肥満インスリン抵抗性」であるのに対し、日本人では「非肥満インスリン分泌不全」を特徴とする。従って、日本人に特異的な何らかの糖尿病素因が存在するものと思われる。合併症でも細小血管障害が日本人で多いという特徴がある。一方、心血管障害などの大血管障害も重要な合併症であり、欧米人ではインスリン抵抗性が関与するとされる。

本研究では、日本人に特有な2型糖尿病素因を同定し、罹患体質と合併症のテーラーメイド診断法を開発する。研究の主戦略は、病態の詳細な解析に基づいた、高次に選別した候補遺伝子のSNP関連解析である。また、トランスクリプトームを活用した病態解析も展開する。

SNP関連解析において重要なことは、均質の糖尿病群と良質のコントロール群の設定と詳細な医療情報を集積することである。一昨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調査活動が開始された。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。また、責任転写因子に関する実験モデル動物も作成されており、インスリン分泌に関する生理学的解析が平行して実施されている。

2. 研究実施内容

転写因子LRH-1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ている。膵と肝で共通する

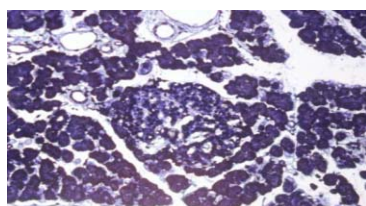
HNF転写因子の標的遺伝子をマイクロアレイで同定し、遺伝子解析を行なった。MODY遺伝子を含め、膵β細胞の発生と分化に重要なHNF-3βによって正に発現が制御される核内受容体LRH-1遺伝子に着目した。HNF-4α (MODY1) の抑制因子であるオーファン受容体SHPが2型糖尿病の感受性遺伝子であることを既に明らかにしている。LRH-1はSHP遺伝子の制御因子であり、HNF-1α (MODY3) とHNF-4α (MODY1) 遺伝子を正に発現誘導することから候補遺伝子として解析した。

エクソン領域の直接解析の結果、MODYの原因となる異常は見出せなかった。次いで、全領域をシーケンスして頻度の高い21個のSNPを獲得した。連鎖不平衡解析の結果、同領域で4個のLDブロックを見出した。ハプロタイプ解析の結果、プロモーター領域ブロックのハプロタイプにおいて有意の関連を見出した (p=0.0006)。ディプロタイプ解析では、111/111と121/121においてそれぞれオッズ比0.43 (0.23-0.80)と2.64 (1.06-6.62)を得た。同領域の詳細な解析により、プロモーター領域のSNP-14が原因サイトの候補と考えられた。そこで、変異導入プロモーターを作成してレポーターアッセイとEMSAを行なった結果、同変異は転写因子の結合を阻害して発現レベルを有意に低下させることが判明した。膵前駆細胞の性格を有するAR42J細胞を用いた解析では、発生初期の分化誘導に関連する転写因子群の制御にLRH-1が重要であると考えられた。プロモーター変異によるLRH-1遺伝子発現の多寡が膵β細胞の機能成熟に影響を与えることがリスク増大の機序である可能性が示唆された。

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、膵島特異的な遺伝子を網羅して機能解析を行なうことが直接的である。これらの特異的遺伝子のプロモーター領域のシス配列を認識するトランス因子を解析することは新規の転写因子を得ることに繋がる。また、これらの特異的遺伝子および調節遺伝子は糖尿病遺伝子の新たな重要候補にもなる。昨年、我々はハイスループットなEST in situ hybridizationの系を確立し、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。現在までに、4,280個の遺伝子を解析することができた。成績をハウスキーパーと特異的遺伝子に分類した結果、81個の膵島限局遺伝子を獲得することに成功した。現在、未知遺伝子を中心にさらなる収集作業が進行中である。

同程度の発現レベル



4,280 個

膵内分泌に特異的



81 個

遺伝子改変マウスを用いたインスリン分泌制御機構の解明

膵に発現する転写因子は、膵の発生や機能維持に重要な役割を果たしており、その機能異常は糖尿病発症に深く関与している。最近、このような転写因子であるHNF-3 β やHNF-4 α (MODY1)の機能を阻害すると、K_{ATP}チャネルの発現が変化しインスリン分泌異常が引き起こされると報告された。我々はK_{ATP}チャネルによるインスリン分泌制御機構を詳細に解析する目的で、K_{ATP}チャネル遺伝子欠損マウスを用いて種々の条件での種々のインスリン刺激に対する分泌応答を解析した。この結果、通常の条件下ではK_{ATP}チャネルはグルコースによるインスリン分泌制御に必須な分子であるが、細胞内cAMP濃度が上昇したような条件下ではK_{ATP}チャネルがない状態でもグルコース応答性のインスリン分泌が引き起こされることが明らかになった。従って、HNF-3 β やHNF-4 α の機能障害によるインスリン分泌の異常は、K_{ATP}チャネルの発現低下だけでは説明がつかず、さらに別の標的分子の発現変化も関与している可能性が示唆された。K_{ATP}チャネル遺伝子欠損マウスにおけるインスリン分泌制御については、cAMP上昇時に、グルコース由来のどのようなシグナルがインスリンを惹起するのか、またcAMPの標的分子は何かを次年度に明らかにする予定である。

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。従って、注目する表現型の高頻度地域を選別して疫学的に病態解析を行ない、表現型の量的形質との相関を解析することが効果的と考える。

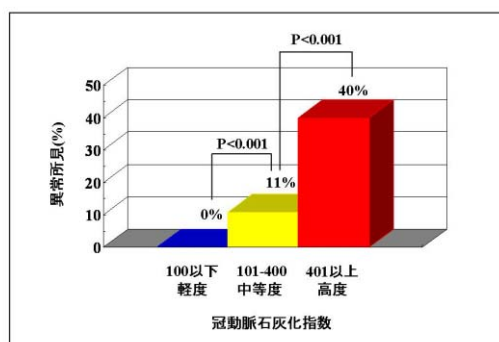
岐阜県は男性の長寿県であり（全国7位、町村別の上位20位に県内4町村が含まれる）、健康障害因子は他府県より少ない。女性は全国平均以下であることから長寿には遺伝素因の関与が考えられる。しかし恵那保健所管内では、男性の脳梗塞死亡率は全国平均より著明に高く（人口10万対死亡率：全国66.6に対し平均103.4 [81.0-239.0]）、周辺健康地域との間に大きな体質コントラストが存在する。しかも、糖尿病の要指導群（HbA1c 5.5-6.0）の比率が全国平均の10.6%に比して、同地域は14.4%と高い。そこで人口移動の少ない恵那高密度地域を対象として、糖尿病に焦点を絞った住民の健康障害に関する情報集積に着手した。本調査は、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により実施された。境界型に相当する要指導群の住民100人について75g経口糖負荷試験とインスリン値を測定し、HOMA-R indexを算出したところ、インスリン抵抗性はみられなかった。すなわち、欧米人とは異なりインスリン分泌不全と直接リンクした日本人固有の動脈硬化素因が存在すると推定された。候補SNPとの相関解析を行なうためには、動脈硬化を定量化することが必要である。

冠動脈の石灰化は動脈硬化の早期より出現し、進展とともに高度となる。多列検出器型マルチスライスCTの開発により、空間分解能と時間分解能が飛躍的に向上し、石灰化病変の定量評価が可能となった。石灰化スコアを算出することにより、血管イベントの危険性を推定できる。冠動脈石灰化の検出と定量評価は、心電図同期をかけた16列検出器型マルチ

スライスCT (LightSpeed Ultra16、GE社)を使用した。1回の呼吸停止下で気管分岐部より下方へ3mmのスライス幅で連続50枚を撮像し、解析用ソフトSmartScoreを搭載した独立型画像解析ワークステーション(AW4.2、GE社)で解析した。CT値が130 Hounsfield Unit以上で石灰化面積が0.51 mm²(2 pixels)以上を有意な石灰化と定義し、その面積と最大CT値を計測した。



冠動脈石灰化像



心筋負荷シンチとの関連

最大CT値が130~199=1、200~299=2、300~399=3、400以上=4とスコア化し、石灰化面積とスコアの積を冠動脈ごとに合計して得られた値をAgatston冠動脈石灰化スコアとした。負荷心筋シンチと対比すると、100以下では心筋虚血は認めなかった。101以上では11%、401以上では40%に心筋虚血を認めた。このように動脈硬化を再現性良く定量する方法を確立した。DICOMビューワーソフトであるe-film(Merge社)をWindows Xpに搭載し、AW4.2とネットワークで接続して他社製の画像解析も可能となったので、多施設共同による大規模研究も可能となった。

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 (岐阜大学大学院医学研究科 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：堀川幸男 (群馬大学生体調節研究所 助教授)
 - 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 (神戸大学大学院医学研究科 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17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。

ただし、群馬大チームは縮小して大量シーケンスを主体とした人員のみを残し、大半は岐阜大チームに統合する予定である。

- 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

(1) 論文発表

- Y Shimamoto, J Ishida, K Yamagata, T Saito, H Kato, T Matsuoka, K Hirota, H Daitoku, M Nangaku, K Yamagata, H Fuji, J Takeda and A Fukamizu.
Inhibitory effect of small heterodimer partner hepatocyte nuclear factor-4 mediates bile acid-induced repression of human angiotensinogen gene.
J Biol Chem 279: 7770-7776, 2004.
- Y Kim, H-J Kim, H-A Seong, K-C Park, S Sanyal, J Takeda, H Ha, M Shong, M-J Tsai and H-S Choi.
Orphan nuclear receptor SHP, a novel corepressor for a basic Helix-Loop-Helix (bHLH) transcription factor BETA2/NeuroD.
Mol Endocrinol 18: 776-790, 2004.
- N Shihara, Y Horikawa, T Onishi, M Ono, K Kashimada and J Takeda.
Identification of a *de novo* case of hepatocyte nuclear factor-1 β mutation with highly varied phenotypes.
Diabetologia 47: 1128-1129, 2004.
- T Kawamoto, Y Horikawa, T Tanaka, J Takeda and M Mikuni.
Genetic variations in the WFS1 gene in Japanese with type 2 diabetes and bipolar disorder.
Mol Genet Metab 82: 238-245, 2004.
- T Tanaka, Y Horikawa, T Kawamoto, N Kabe, J Takeda and M Mikuni.
Expression profile of mRNAs from rat hippocampus and its application to microarray.
Mol Brain Res 129: 20-32, 2004.
- SM Echwald, KL Andersen, TA Sørensen, LH Larsen, TI Andersen, N Tonooka, H

Tomura, J Takeda and O Pedersen

Mutation analysis of *NROB2* among 1,545 Danish men identifies a novel G93D variant with reduced functional activity.

Hum Mut 24: 381-387, 2004.

- N Gu, N Suzuki, J Takeda, T Adachi, G Tsujimoto, N Aoki, A Ishihara, K Tsuda and K Yasuda.

Effect of mutations in HNF-1 α and HNF-1 β on the transcriptional regulation of human sucrase-isomaltase (SI) in Caco2 cells.

Biochem Biophys Res Commun. 325: 308-313, 2004.

- M Nishimura, T Miki, N Yokoi, Y Horikawa, H Yoshioka, J Takeda, O Ohara and S Seino.

Construction of a multi-functional cDNA library specific for normal mouse pancreatic islets and its application to microarray.

DNA Res 11: 315-323, 2004.

- M Enya, Y Kanoh, T Mune, M Ishizawa, H Sarui, M Yamamoto, N Takeda, K Yasuda, M Yasujima, S Tsutaya and J Takeda.

Depressive state and paresthesia dramatically improved by intravenous MgSO₄ in Gitelman's syndrome

Intern Med 43: 140-144, 2004.

- JD Johnson, Z Han, K Otani, H Ye, Y Zhang, H Wu, Y Horikawa, S Misler, GI Bell and KS Polonsky.

RyR2 and calpain-10 delineate a novel apoptosis pathway in pancreatic islets.

J Biol Chem 279: 24794-802, 2004.

- K Otani, DH Han, EL Ford, PM Garcia-Roves, H Ye, Y Horikawa, GI Bell, JO Holloszy and KS Polonsky.

Calpain system regulates muscle mass and glucose transporter GLUT4 turnover.

J Biol Chem 279: 20915-20920, 2004.

- MS Remedi, JC Koster, K Markova, S Seino, T Miki, BL Patton, ML McDaniel and CG Nichols.

Diet-induced glucose intolerance in mice with decreased beta-cell ATP-sensitive K⁺ channels.

Diabetes 53: 3159-3167, 2004.

- M Matsumoto, T Miki, T Shibasaki, M Kawaguchi, H Shinozaki, J Nio, A Saraya, H Koseki, M Miyazaki, T Iwanaga and S Seino.

Noc2 is essential in normal regulation of exocytosis in endocrine and exocrine cells.

Proc Natl Acad Sci USA 101: 8313-8, 2004.

- H Morita, Y Isomura, T Mune, H Daido, R Takami, N Yamakita, T Ishizuka, N Takeda, K Yasuda, and CE Gomez-Sanchez.

Plasma cortisol and cortisone concentrations in normal subjects and patients with adrenocortical disorders.

Metabolism 53: 89-94, 2004.

- K Kajita, T Mune, Y Kanoh, Y Natsume, M Ishizawa, Y Kawai, K Yasuda, C Sugiyama and T Ishizuka.

TNF α reduces the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) via the production of ceramide and activation of atypical PKC.

Diabetes Res Clin Pract 66: S79-83, 2004.

- M Tsuchiya, E Suzuki, K Egawa, Y Nishio, H Maegawa, S Inoue, K Mitsunami, S Morikawa, T Inubushi and A Kashiwagi.

Stiffness and impaired blood flow in lower-leg arteries are associated with severity of coronary artery calcification among asymptomatic type 2 diabetic patients.

Diabetes Care 27: 2409-2415, 2004.

- T Ishizuka, K Kajita, Y Natsume, Y Kawai, Y Kanoh, A Miura, M Ishizawa, Y Uno, H Morita and K Yasuda.

Protein kinase C (PKC) β modulates serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)--effect of overexpression of PKC β on insulin signal transduction.

Endocr Res 30: 287-99, 2004.

- HC Chen, M Rao, MP Sajan, M Standaert, Y Kanoh, A Miura, RV Farese Jr and RV Farese.

Role of adipocyte-derived factors in enhancing insulin signaling in skeletal muscle and white adipose tissue of mice lacking Acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase 1.

Diabetes 53: 1445-51, 2004.

- ML Standaert, MP Sajan, A Miura, Y Kanoh, HC Chen, RV Farese RV Jr and RV Farese.

Insulin-induced activation of atypical protein kinase C, but not protein kinase B, is maintained in diabetic (ob/ob and Goto-Kakazaki) liver. Contrasting insulin signaling patterns in liver versus muscle define phenotypes of type 2 diabetic and high fat-induced insulin-resistant states.

J Biol Chem 279: 24929-24934, 2004.

- G Bandyopadhyay, ML Standaert, MP Sajan, Y Kanoh, A Miura, U Braun, F Kruse,

M Leitges and RV Farese.

Protein kinase C- λ knockout in embryonic stem cells and adipocytes impairs insulin-stimulated glucose transport.

Mol Endocrinol 18: 373-383, 2004.

- K Minami, T Miki, T Kadowaki and S Seino.

Roles of ATP-sensitive K⁺ channels as metabolic sensors: studies of Kir6.x null mice.

Diabetes 53: S176-80, 2004.

- GC Kane, A Behfar, S Yamada, C Perez-Terzic, F O'Coilain, S Reyes, PP Dzeja, T Miki, S Seino and A Terzic.

ATP-sensitive K⁺ channel knockout compromises the metabolic benefit of exercise training, resulting in cardiac deficits.

Diabetes 53: S169-75, 2004.

- XK Liu, S Yamada, GC Kane, AE Alekseev, DM Hodgson, F O'Coilain, A Jahangir, T Miki, S Seino and A Terzic.

Genetic disruption of Kir6.2, the pore-forming subunit of ATP-sensitive K⁺ channel, predisposes to catecholamine-induced ventricular dysrhythmia.

Diabetes 53: S165-8, 2004.

- S Kawachi, N Takeda, A Sasaki, Y Kokubo, K Takami, H Sarui, M Hayashi, N Yamakita and K Yasuda.

Circulating insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-3 are associated with early carotid atherosclerosis.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 25: 617-621, 2005.

- H Morita, T Hirota, T Mune, T Suwa, T Ishizuka, T Inuzuka, K Tanaka, M Ishimori, S Nakamura and K Yasuda.

Paraneoplastic neurologic syndrome and autoimmune Addison disease in a patient with thymoma.

Am J Med Sci 329: 48-51, 2005.

- N Iwasaki, Y Horikawa, T Tsuchiya, Y Kitamura, T Nakamura, Y Tanizawa, Y Oka, K Hara, T Kadowaki, T Awata, M Honda, K Yamashita, N Oda, L Yu, N Yamada, M Ogata, N Kamatani, Y Iwamoto, L Del Bosque-Plata, MG Hayes, NJ Cox and GI Bell.

Genetic variants in the calpain-10 gene and the development of type 2 diabetes in the Japanese population.

J Hum Genet 50: 92-98, 2005.

- T Saito, T Sato, T Miki, S Seino and H Nakaya.

Role of ATP-sensitive K⁺ channels in electrophysiological alterations

during myocardial ischemia: a study using Kir6.2-null mice.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 288: H352-357, 2005.

- C Choeiri, W Staines, T Miki, S Seino and C Messier.

Glucose transporter plasticity during memory processing.

Neuroscience 130: 591-600, 2005.

- T Miki, K Minami, H Shinozaki, K Matsumura, A saraya, H Ikeda, Y Yamada, JJ Holst and S Seino.

Distinct effects of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-1 on insulin secretion and gut motility.

Diabetes 54: 1056-1063, 2005.

- E Yamada, S Okada, T Saito, K Ohshima, M Sato, T Tsuchiya, Y Uehara, H Shimizu and M Mori.

Akt2 phosphorylates Synip to regulate docking and fusion of GLUT4-containing vesicles.

J Cell Biol 168: 921-928, 2005