

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 転写調節系の分子解剖による糖尿病素因の探索

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

武田 純 (岐阜大学大学院医学系研究科 教授)

主たる共同研究者

志原 伸幸 (群馬大学生体調節研究所 助教)

三木 隆司 (千葉大学大学院医学研究院 教授)

城森 孝仁 ((株)三和化学研究所 所長)

3. 研究内容及び成果

糖尿病人口は急増しており、大半を2型糖尿病が占める。将来全ての患者を医療機関が治療することは医療経済上困難であるので、病態解明による発症予防は重要である。欧米の2型糖尿病が主として「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(あるいは軽度肥満)インスリン分泌不全」を特徴とし、疾患発症の遺伝素因には顕著な民族差が存在する。本研究は、日本人に特有な糖尿病素因を同定することによって、罹患体質の解明とテーラーメイド医療の開発を目指した。

常染色体優性遺伝の若年発症の糖尿病 MODY は非肥満インスリン分泌不全を特徴とするので、日本人の2型糖尿病のモデル疾患である。現在までに6種類の原因遺伝子が同定されており、研究チームは世界で最初の MODY 遺伝子を含む3種類を発見している。原因遺伝子は一連の HNF 関連の転写因子をコードして (HNF-1 α , -1 β , -4 α , Pdx1, Beta2)、連携ネットワークにより膵 β 細胞のインスリン分泌を制御する。続いて、HNF-4 α (MODY1)に結合する転写抑制因子 SHP の異常が逆にインスリン過分泌を介して、出生児過体重、若年肥満、インスリン抵抗性を生じることを明らかにした。一方、HNF-SHP ネットワークは肝の転写ネットワークともリンクして高脂血症や高血圧に関連し、脂質代謝や PPAR γ を介して動脈硬化にも関連することが示された。従って、病態が共通する2型糖尿病の遺伝素因が MODY 転写ネットワークに関連することは疑いない。すなわち、転写調節の重度障害で単一遺伝子異常の糖尿病が惹起され、一方、軽度障害は他因子と協調して2型糖尿病リスクとなるという図式が想定される。

本研究戦略は、基本的にゲノム全域スクリーニングではなく、膵 β 細胞の転写調節カスケードに焦点を絞って選別した遺伝子の多型 (SNP) 関連解析である。転写因子を選択した理由は上記の通りであり、候補遺伝子に特化した理由は、表現型 (病態) が生じる機序の解明と理解が比較的容易であろうこと、本研究のミッションであるテーラーメイド医療への応用に直結しやすいことが挙げられる。従って、以下で得られた候補遺伝子多型を用い、疾患発症あるいはサブ表現型との関連解析を主として行なった。本遺伝子解析の基本シーズは独自収集した膵島 EST プールである。転写因子は細胞内で発現を亢進あるいは抑制させると下流標的遺伝子の発現レベルはそれぞれ応答して変化する。そこで本研究では、一連の MODY 転写因子の発現を変化させ、EST マイクロアレイ解析により協調因子や下流の標的因子を網羅した。細胞特異的な転写因子は、特異的機能であるインスリン合成・分泌に関連する遺伝子発現を制御すると考えられるので、正常細胞とインスリン分泌能を欠失した膵 β 細胞株の mRNA 発現プロファイルを比較して異なる遺伝子を求めた。膵島特異的な遺伝子は特異的転写因子によって制御されるので、膵組織切片と実験動物 EST プローブを用いた大規模 in situ hybridization (ISH) により、転写標的となる遺伝子を求めた。候補遺伝子の欠失マウスを作成し、病態解析と新たな候補獲得に供した。続いて、関心遺伝子や標的エフェクター分子を欠失させたモデル動物を用いて発症機序と病態を解析した。

膵β細胞の転写制御を網羅的に解析するには、発現遺伝子のデータベース化と遺伝子発現を解析するためのマイクロアレイの開発は極めて有用である。まず、ヒト、ラット、マウスの膵島と細胞株について約 10 万個の EST を収集し、マウス独立クローンを用いて EST メンブレンアレイを開発した。MODY 関連の HNF 転写因子を培養細胞で過剰発現、あるいは岐阜大学が開発した効率的 siRNA を用いて発現を抑制させて転写下流ターゲットの発現変化遺伝子をアレイ解析によって求めた。一方、膵内分泌に関連する遺伝子は特異的転写因子で制御される。そこで正常膵島とインスリン分泌能を欠失した RINm-5F 細胞を用いて発現プロファイルを比較解析して特異的機能に関連する遺伝子も探索した。膵内分泌特性に関連する遺伝子プロモーター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獲得することに繋がり、これらの特異的遺伝子および調節因子は糖尿病遺伝子の新たな候補にもなる。次いで、研究チームはハイスループットな EST in situ hybridization 解析系を確立し、膵島発現の網羅的解析を実施した結果、比較的特異性が高い178個の遺伝子を得た。これらについてエクソンスクリーニングを行ない、605 cSNPs を見出して疾患の解析に供した。

若年発症した非1型糖尿病は、MODY のように重度の遺伝子異常の単独あるいは少数によって発症すると想定される。そこで、上記の候補遺伝子について若年糖尿病患者の全エクソン領域を直接スクリーニングした結果、RPH3AL においてナンセンス変異を見出した。一方、MODY3,5 遺伝子において2種類のアリル欠失を見出したので、CNV に起因する糖尿病が存在することを明らかにした。一方、58 個の2型糖尿病の候補遺伝子と 30 個の関連遺伝子を SNP スクリーニングし、頻度の高い 264 SNPs を関連解析に供した結果、転写因子 HIF-1 α 、LRH1、TCF7L2 において疾患発症と有意の関連を認めた。SHP の協調因子である LRH1 については、プロモーター多型によって生じるトランス因子のリクルート有無が疾患発症に関連する。LRH1 は膵島形成の初期に機能する転写因子を制御する。欠失マウスの解析により胎生期の膵島形成不全が生じる可能性が示唆されたので、ヒトではプロモーター多型により遺伝子発現の量的変化が生じ、膵β細胞の分泌予備能の形成不全で疾患感受性を増大する可能性が考えられた。LRH1 は肝脂質代謝においても HNF 転写因子を介して重要遺伝子を制御するので、他の代謝異常との体質リンクの解析を進めている。一方、正常膵島とインスリン分泌能を欠失した RIN 細胞との mRNA 比較解析では、分泌蛋白をコードして血中診断や創薬に応用できる脂質代謝関連分子を見出した。コード遺伝子多型は2型糖尿病と有意な関連を示したので、血中レベルや応答性との相関解析は臨床応用の観点から興味深い。

転写因子遺伝子の改変動物の作成と解析も病態を理解する上で、また新たな候補遺伝子を獲得する上で重要である。Otx3 は他のファミリー因子とヘテロダイマーを構成して転写抑制を示し、さらに欠損マウスの解析により、遺伝性肥満・糖尿病モデルマウスである Ay マウスの肥満・糖尿病に重要であることを見いだした。同遺伝子との相同性に基づき、膵原基が発生する前腸を含む腸管に特異的なホメオドメイン転写因子 (Mgx1) を同定した。欠損マウスでは膵島の形態異常は認めなかったが、膵β細胞株に強制発現させると膵細胞分化に必須の転写因子 Pdx1 (MODY4) の発現が著明に低下したので、組織特異性の維持に関与する可能性が示唆された。

膵β細胞の転写因子群は、下流標的である K_{ATP} チャネル発現を制御してグルコース応答インスリン分泌に寄与している。欠失マウスを用いて種々の分泌刺激を解析したところ、チャネル活性を欠損しても細胞内 cAMP が増加した状態では応答性インスリン分泌を惹起できることを明らかにした。本知見は、MODY のみならず、同分泌が障害された日本人病態をインクレチン療法で治療できる可能性を示す。

膵β細胞の転写因子の解析により、膵島特異的なトランスクリプトームシーズを開発することができ、多くの遺伝子多型の集積につながった。また、臨床分野の利点を活かして、定量的な臨床情報が充実した患者と対照の DNA セットも確立できたことは、テーラーメイド医療への展開基盤が本研究によって確立されたと言える。

4. 事後評価結果

4 - 1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

国内の糖尿病人口は急増しており、大半を2型糖尿病が占めるが、2型糖尿病発症の遺伝素因には顕著な

民族差が存在する。本研究課題では、日本人に特有な糖尿病素因を同定することにより、罹患体質を解明してテーラーメイド医療を確立することを目的とした。

本研究では、膵β細胞の転写調節カスケードに焦点を絞って選別した遺伝子の多型(SNP)関連解析を研究戦略とした。まず、1)MODY 転写因子の発現を変化させて協調因子、下流の標的因子を網羅し、正常細胞とインスリン分泌能を欠失した膵β細胞で異なる mRNA 発現プロファイルを示す遺伝子(細胞特異的転写因子)を探し、膵島特異的遺伝子は膵組織切片と実験動物 EST プローブを用いた ISH により特異的転写因子の標的となる遺伝子として選定した。これらの候補遺伝子についての検討から、2)若年糖尿病患者では、RPH3AL においてナンセンス変異を見出し、MODY3、5 遺伝子では、2 種類のアリル欠失を見出し CNV に起因する糖尿病の存在を明らかにした。一方、2 型糖尿病の候補遺伝子及び関連遺伝子に関する検討からは、転写因子 HIF-1 α 、LRH1、TCF7L2 において疾患発症と有意の関連が認められた。また、転写因子遺伝子改変動物では、3)Otx3 が遺伝性肥満・糖尿病モデルである Ay マウスの発症に不可欠であること、K_{ATP} チャネル活性を欠損させても細胞内の cAMP が増加した状態では、グルコースによるインスリン分泌を惹起できることを明らかにした。この知見は、インスリン分泌が失われた日本人の 2 型糖尿病にインクレチン療法が適用できることを示す。

これらの研究成果は、113 編の原著論文(及び 53 件の口頭、ポスター発表)として発表されている。転写調節系に的を絞った解析から、2 型糖尿病と有意に関連する多数の遺伝子を発見したことは特記すべき成果であろう。

4 - 2 . 成果の戦略目標・科学技術への貢献

日本の糖尿病人口は急増しており、大半を本研究課題が対象とする 2 型糖尿病が占めている。2 型糖尿病の病態が解明されその発症が予防できれば、医療行政の負担の大幅な軽減につながることになる。欧米でも同様の研究が進められているが、糖尿病発症の遺伝素因には著しい民族差が存在するため、日本人に固有の糖尿病素因を同定する必要がある。

本研究では、転写調節系に的を絞って解析することにより、研究期間内に多数の感受性遺伝子候補を同定することができた。これらの遺伝子についての機能解析が進み疾病との関連が確認されれば、研究目標である糖尿病発症の予防に大きく貢献することができるであろう。充実した臨床情報を含む患者、対照の DNA を収集できたことも大きな成果であり、また、共同研究チームでは、インクレチン分解酵素の阻害剤の開発も始まっている。今後の研究の進展に期待している。

4 - 3 . その他の特記事項(受賞歴など)

転写調節系に的を絞った解析はユニークであり、転写調節系の遺伝子ネットワークに関する研究、膵島の発生に関する研究など非常に質の高い研究が進められている。最終目標の達成には、更に時間を要するものと思われるが、テーラーメイド医療の実現に向けた注力を継続してもらいたい。