

「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。合併症でも網膜症など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（転写因子とその標的遺伝子）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転写調節系の経路解析による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も開始された。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

LRH-1 のプロモーター多型と糖尿病との関連：

研究のねらい：常染色体優性遺伝の MODY (maturity-onset diabetes of the young) は、非肥満でインスリン抵抗性がなく、インスリン分泌不全を基本的な病態とするので日本人 2 型糖尿病のモデル疾患である。MODY1, 3-6 の成因遺伝子（転写因子をコードする）に関連する HNF-SHP 転写調節ネットワークには、未知の MODY 遺伝子と日本人 2 型糖尿病のメジャー感受性遺伝子が属する可能性が大である。従って、HNF 転写因子の標的を網羅的に知ることは 2 型糖尿病遺伝子を同定するために有効な戦略である。

研究結果：インスリン細胞 MIN6 で HNF-4 α (MODY1) と HNF-1 α (MODY3) を過剰発現したところ、LRH-1 遺伝子発現が正に応答した。転写因子 LRH-1 は SHP と結合して SHP 遺伝子そのものを転写制御するとともに、肝の胆汁酸合成のネガティブフィードバックとして CYP7A1 遺伝子を制御する。そこで、LRH-1 遺伝子を有力候補として全域スクリーニングし、高頻度の 22 個の SNP を同定した。遺伝子領域は 4 つの LD ブロックで構成され、5' 端ブロックのハプロタイプ SNP-18, 14, 17 の 111 型は糖尿病と有意に関連した ($p=0.0006$) ; SNP-14 単独では $p=0.0058$ であった。ハプロタイプ型 111/111 と 121/121 は各々防御性と感受性を示した (OR 0.43 [0.23-0.80], 2.64 [1.06-6.62])。SNP-14 (C/T) はプロモーター領域にあり、LD ブロック内には他に成因となりうる部位は存在しなかった。そこで、塩基置換の有無についてレポーター解析を行なった結果、T アリルは C アリルに比して有意に低活性であった。ゲルシフト解析により、T アリルは結合蛋白をリクルートできないことがその背景であることが判明した。In situ hybridization により、LRH-1 の膵島発現は成人よりも胎生期に強いことが明らかとなった。多くの MODY 転写因子が膵島形成に関与するので分化の観点から、AR42J 細胞を用いてその意義を検討した。同細胞は膵前駆細胞の性格を有し、アクチビンとベータセルリン刺激によってインスリン細胞に分化誘導される。この過程で LRH-1 は Pax4 とリンクすることが判明した。そこで、九大の名和田らとの共同研究でヘテロ欠失マウスを解析した結果、膵島サイズは有意に小さく分泌予備能は減少すると推定された。膵島の形成障害が 2 型糖尿病リスクになるという初めてのエビデンスである。興味深いことに、感受性アリルは日本人の 30%に見られるが、欧米白人では全く認められなかった。SHP と同様に、本調節経路の障害は日本人固有の糖尿病素因を形成している可能性がある。

HIF-1 α の P582S 変異と糖尿病との関連：

研究のねらい：日本人は欧米人と比べて網膜症の頻度が高いので、網膜での発現というキーワードを加えることで新たな候補遺伝子の絞り込みが望める。

研究結果：ラット網膜と膵島の EST 比較で 123 種類の共通遺伝子を同定した。その中で低

酸素下に VEGF や解糖系酵素を活性化する Hypoxia inducible factor (HIF)-1 α 遺伝子を選択し、糖尿病網膜症の候補として解析した。もともと HIF-1 α 遺伝子は、1993 年に本研究の代表者がヒト膵島 EST の中からクローンを提供し、機能解析された分子である。まず HIF-1 α 遺伝子領域に 3 個のミスセンス変異を含む 35 個の SNP を同定した。頻度の高い 24 個の SNP について糖尿病 440 名と正常 572 名を用いて関連解析し、2 型糖尿病と関連するハプロタイプを同定した ($p=5.536E-11$)。さらに、同ハプロタイプと連鎖不平衡にある転写制御ドメインの P582S が疾患と有意に関連することを見出した ($p=0.0028$)。ロジスティック回帰分析で年齢、性差、BMI で補正しても有意であった ($p=0.0048$)。さらに同変異は HIF-1 α の標的遺伝子の転写活性を特に低酸素下で上昇させることを VEGF レポーター解析で明らかにした。

膵島 EST の大規模 in situ hybridization :

研究のねらい : 既知の特異的遺伝子群はほぼ解析しつくされ、現況では候補が枯渇しつつあると言える。そこで、申請者が独自集積した 12,000 種類の膵島 EST から選別したプロンプと正常膵島切片を用い、大規模 in situ hybridization により膵 β 細胞に特異的な新しい遺伝子群を獲得し、解析する。特異的遺伝子のプロモーターを認識するトランス因子は新たな候補となる。

現在の進捗状況と研究結果 : 膵内分泌に特異的な遺伝子は重要な候補遺伝子であり、その発現の調節因子も重要候補である。膵島特異的遺伝子を網羅的に同定するために膵 in situ hybridization を行っており、ラット膵島 EST 6,000 種類のうち、5,191 個を終了した。膵内分泌組織 (膵島) に特異的な遺伝子、膵外分泌または内分泌のいずれかに発現が優位な共通遺伝子、発現が両組織で同レベルの遺伝子 (ハウスキーパー) の 3 群に分類すると、それぞれ 2.5%, 41%, 46.5%であった。

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 :

研究のねらい : HNF-SHP ネットワークに属する転写因子および標的遺伝子の過剰発現マウスや欠失マウスを作成し、その表現型を解析すると共に膵島組織をマイクロアレイ解析に供することによって新たな候補遺伝子を得る。

小腸の HNF 転写因子の下流標的であるインクレチン遺伝子 (小腸ホルモン GIP, GLP-1) のインスリン産生細胞における各々の作用機序と関連分子を実験動物で解析する。独自に、または群馬大グループと共同でいくつかの遺伝子改変動物を作成した (Noc2 など)。

現在の進捗状況 : MODY6 蛋白である Beta2/NeuroD の直接標的である K_{ATP} チャネル遺伝子を欠失したマウスを中心に、インスリン分泌調節における意義の解析を進めている。インス

リン分泌を制御するグルカゴン、インクレチン、アドレナリンなどの G 蛋白共役受容体との関連シグナルの解析を進めている。アレイ解析で得られたホメオボックス蛋白 Otx3 の KO マウスの樹立に成功したので表現型の解析に着手した。

研究結果： 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重要であるが、グルコース以外の刺激における役割は不明である。そこで、栄養素を経口摂取した際に分泌されインスリン分泌を増強するインクレチン (GIP, GLP-1) 効果を、チャネル欠損マウスで解析した。GIP あるいは GLP-1 で前処置し経口糖負荷試験を行ったところ、野生型マウスでは GIP 群と GLP-1 群いずれにおいてもインスリン分泌が増強し血糖上昇が抑制された。一方、KO マウスでは血糖上昇は GIP 群では全く抑制されなかったが、GLP-1 群では抑制された。その際のインスリン分泌は GIP 群で著明に障害されていた。2 型糖尿病では GLP-1 補充により明らかな血糖降下が見られるものの、GIP は効果がない。本成績は、同じく G 蛋白受容体を介するにも関わらず GIP と GLP-1 は異なる機構を介して血糖上昇を抑制することを示しており、インクレチンを標的とした新たな治療法の確立に有用と考えられた。

Noc2 は、Rab のエフェクター分子である rabphilin3 に相同性のある分子であり、その作用は G 蛋白受容体以降の Gi/o シグナルを介する。野生型マウスはストレスに対しインスリン分泌を増強して正常血糖を維持するのに対し、Noc2 欠損マウスではストレス下での分泌増強がおこらず、血糖を正常に維持できないことを明らかにした。生活ストレスはインスリン過分泌を生じ、その結果生じる膵 β 細胞の疲弊は糖尿病リスクを増大させるが、本研究で初めてその感受性モデル動物が作成された。

3. 研究実施体制

遺伝素因解析グループ

- ①研究分担グループ長：武田 純（岐阜大学、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

遺伝子多型解析グループ

- ①研究分担グループ長：志原 伸幸（群馬大学、助手）
- ②研究項目：糖尿病候補遺伝子の SNP 解析

モデル動物解析グループ

- ①研究分担グループ長：三木 隆司（神戸大学、助教授）
- ②研究項目：遺伝子操作動物の作成と解析

ゲノム創薬グループ

①研究分担グループ長：城森 孝仁（三和科学研究所、所長）

②研究項目：液性因子薬剤の合成とインクレチン創薬

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文（原著論文）発表

- M Isaji, T Mune, N Takada, Y Yamamoto, T Suwa, H Morita, J Takeda and PC White.
Correlation between left ventricular mass and urinary sodium excretion in specific genotypes of CYP11B2.
J Hypertens 23: 1149-1157, 2005.
- H Wang, Y Horikawa, L Jin, T Narita, S Yamada, N Shihara, K Tatamoto, M Muramatsu, T Mune, and J Takeda
Gene expression profile in rat pancreatic islet and RINm5F cells
J Mol Endocrinol 35: 1-12, 2005.
- N Yamada, Y Horikawa, N Oda, K Iizuka, N Shihara, S Kishi and J Takeda.
Genetic variation in the HIF-1 α gene is associated with type 2 diabetes in Japanese
J Clin Endocrinol Metab 90: 5841-5847, 2005.
- H Ueno, Y Yamada, R Watanabe, E Mukai, M Hosokawa, A Takahashi, A Hamasaki, H Fujiwara, S Toyokuni, M Yamaguchi, J Takeda and Y Seino.
Nestin-positive cells in adult pancreas express amylase and endocrine precursors cells.
Pancreas 31: 126-131, 2005.
- H Tanahashi, T Mune, Y Takahashi, M Isaji, T Suwa, H Morita, N Yamakita, K Yasuda, T Deguchi, PC White, and J Takeda.
Association of Lys173Arg polymorphism with CYP11B2 expression in normal adrenal glands and aldosterone-producing adenomas.
J Clin Endocrinol Metab. 90: 6226-6231, 2005.
- Y Nakano, H Furuta, A Doi, S Matsuno, T Nakagawa, H Shimomura, S Sakagashira, Y Horikawa, M Nishi, H Sasaki, T Sanke and K Nanjo.
A functional variant in the human betacellulin gene promoter is associated with type 2 diabetes.
Diabetes. 54: 3560-3566, 2005.
- B Liss, O Haeckel, J Wildmann, T Miki, S Seino and J Roeper.
K-ATP channels promote the differential degeneration of dopaminergic midbrain neurons.

- Nat Neurosci.** 8: 1742–1751, 2005.
- K Matsumura, T Miki, T Jhomori, T Gonoï and S Seino.
Possible role of PEPT1 in gastrointestinal hormone secretion.
Biochem Biophys Res Commun. 336: 1028–1032, 2005.
 - M Thabet, T Miki, S Seino, and JM Renaud.
Treadmill running causes significant fiber damage in skeletal muscle of KATP channel-deficient mice.
Physiol Genomics. 22: 204–212, 2005.
 - T Miki and S Seino.
Roles of KATP channels as metabolic sensors in acute metabolic changes.
J Mol Cell Cardiol. 38: 917–925, 2005.
 - K Kimura, T Miki, T Shibasaki, Y Zhang, M Ogawa, H Saisho, M Okuno, T Iwanaga, and S Seino.
Functional analysis of transcriptional repressor Otx3/Dmbx1.
FEBS Lett. 579:2926–2932, 2005.
 - S Oh-I, H Shimizu, T Sato, Y Uehara, S Okada, and M Mori.
Molecular mechanisms associated with leptin resistance: n-3 polyunsaturated fatty acids induce alterations in the tight junction of the brain.
Cell Metab. 1: 331–341, 2005.
 - H Shimizu and M Mori.
The brain–adipose axis: a review of involvement of molecules.
Nutr Neurosci. 8: 7–20, 2005.
 - H Shimizu, S Oh-I, S Okada, and M Mori.
Inhibition of appetite by nasal leptin administration in rats.
Int J Obes (Lond) 29: 858–863, 2005.
 - RM Deacon, RC Brook, D Meyer, O Haeckel, FM Ashcroft, T Miki, S Seino, and B Liss.
Behavioral phenotyping of mice lacking the K(ATP) channel subunit Kir6.2.
Physiol Behav. 87: 723–733, 2006.
 - HS Sun, ZP Feng, T Miki, S Seino, and RJ French.
Enhanced Neuronal Damage After Ischemic Insults in Mice Lacking Kir6.2–Containing ATP-Sensitive K⁺ Channels.
J Neurophysiol. 95: 2590–2601, 2006.
 - C Zhang, T Miki, T Shibasaki, M Yokokura, A Saraya and S Seino.

Identification and characterization of a novel member of the ATP-sensitive K⁺ channel subunit family, Kir6.3, in zebrafish.

Physiol Genomics. 24: 290–297, 2006.

- H Shimizu, S Oh-I, T Tsuchiya, KI Ohtani, S Okada, and M Mori.

Pioglitazone increases circulating adiponectin levels and subsequently reduces TNF- α levels in Type 2 diabetic patients: a randomized study.

Diabet Med. 23: 253–257, 2006.

- Kasahara T, Tsunekawa K, Seki K, Mori M and Murakami M.

Regulation of iodothyronine deiodinase and roles of thyroid hormones in human coronary artery smooth muscle cells.

Atherosclerosis. 186: 207–214, 2006.

- Iizuka K, Miller B and Uyeda K.

Deficiency of a carbohydrate-activated transcription factor, ChREBP, prevents obesity and improves plasma glucose control in leptin deficient (ob/ob) mice.

Am J Physiol Endocrinol Metab. (In press), 2006