

「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系研究科 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

日本人の2型糖尿病は欧米人に比して比較的痩せ型でインスリン分泌不全を特徴とする。インスリン分泌細胞である膵β細胞に発現している転写因子遺伝子の機能異常は様々な膵β細胞の機能障害を招来し、糖尿病の発症に寄与している。我々は膵β細胞に発現する転写因子遺伝子を網羅的に集積し、これらの遺伝子の機能連携や下流標的遺伝子群の複雑なネットワークの詳細を明らかにし、候補遺伝子の多型を用いて糖尿病発症との関連解析を行っている。実際、発現プロファイル解析、マイクロアレイによる発現比較解析、膵島ESTを用いた大規模 *in situ hybridization* による局所発現解析などのトランスクリプトーム戦略により多くの有力候補を集積することができ、さらに、連鎖不平衡を利用した SNP ハプロタイプ解析により、いくつかの感受性遺伝子を同定することに成功した。次段階として、病態のサブ表現型との関連を求め、臨床応用を考慮した特異的診断ツールへの展開を図っている。一方、関心遺伝子 (SHP, LRH-1 など) については遺伝子改変のマウスモデルを解析することにより、インスリン分泌不全の分子メカニズムを明らかにすることを試みている。特に、 $K_{ATP}$  チャネル欠失動物の解析ではインクレチン刺激によるインスリン分泌調節経路の存在を明らかにすることができた。これらの知見プールは、日本人2型糖尿病の感受性体質の診断法の開発のみならず、創薬対象のシーズ発掘にも繋がるものと期待される。

## 2. 研究実施内容

### 転写因子遺伝子および標的遺伝子の SNP タイピングと関連解析

転写因子遺伝子17個 (chrebp, nr3c1, tcf7l2など) を含む24種類の遺伝子をスクリーニングした。95 SNPタイピング (1個につき1,052サンプルを用いた) と関連解析の結果、転写因子tcf7l2遺伝子の3種類のSNP (rs7903146, rs12255372, rs11196205) において糖尿病と有意の関連を認めた ( $p=0.0038$ ,  $p=0.0067$ ,  $p=0.0117$ ) (95% CI 0.948 [0.910-0.988], 0.471 [0.279-0.796], 0.577 [0.387-0.859])。一方、これらのSNPはBMIなど他の表現型とは有意の関連を見なかった。

局所のコルチゾール再活性化機構である11 $\beta$ 水酸化ステロイド脱水素酵素タイプ1 (HSD11B1)・ヘキソース6リン酸脱水素酵素 (H6PD) 両遺伝子と血糖値や内臓脂肪蓄積等との関連を検討した。1,537例(臍部CT解析を行なった症例 812例)で、HSD11B1 /intron 3 T/G多型、intron 4 C/T多型、H6PD Ala212 G/A多型をタイピングし、疾患・腹部脂肪や脂質代謝について関連を解析した。T/G多型のGアリルは空腹時高血糖(P=0.015)や高血圧(P=0.043)で有意に高頻度、R/Q多型のQアリルも高血圧で有意に高頻度であった。血圧正常者では、T/G多型のGG型で内臓脂肪面積V及びV/皮下脂肪面積比が低値であった。HDLコレステロールはT/G多型のGG型で高値であった。コルチゾールの再活性化能が低いと想定されるアリル(G・Q)保有者は細胞内コルチゾールが相対的に低く、内臓脂肪蓄積が軽度で肝HDL産生能も高いと考えられた。HSD11B1・H6PDの多型は、内臓脂肪蓄積やHDL・高血圧、などいわゆるメタボリック症候群の判断基準に含まれるリスクファクターに関連することが示唆された。

#### 転写因子をコードする糖尿病遺伝子のゲノム欠損の解析

【目的】 SNPに加えて、ゲノム領域の欠落によるアリル異常(CNV: copy number variation)が新たに注目を浴びている。若年発症の糖尿病において、MODY 遺伝子スクリーニングにおいて変異を認めなかった症例を対象として転写因子遺伝子を再検討した。

【方法と研究成果】 転写因子をコードする糖尿病遺伝子について CNV スクリーニングをshort fluorescent fragments (QMPSF)法により行なった。転写因子 HNF-1 $\alpha$ と HNF-1 $\beta$ 遺伝子において部分ゲノム欠損を数例認めた。従来の一塩基のエクソン変異に加えて、新たなアリル欠失異常による糖尿病が存在することが判明した。

【今後の展望】 出現頻度が高かったため、従前スクリーニングで CNV を見落としていた可能性を考えて、現在までに検討した転写因子遺伝子をすべてリスククリーニングすることに着手した。最終年度中には完了の予定である。

#### 膵島 EST の大規模 in situ hybridization :

【目的と方法】 独自集積した 12,000 種類のラット膵島 EST から選別した cRNA プローブと正常膵島切片を用い、大規模 in situ hybridization により膵 $\beta$ 細胞に特異的な新しい遺伝子群を探索した。これらは有力な糖尿病遺伝子の候補である。また、特異的遺伝子のプロモーターを認識するトランス転写因子を得て、コード遺伝子を新たな候補とする。

【研究成果】 膵島特異的遺伝子を同定するために膵 in situ hybridization を行なった。約 6,000 遺伝子のうち、2,796 個の遺伝子においてシグナルを認めた。他にシグナルを認めなかった原因として、発現レベルが低いことと検出感度に依るものと考えられた。134 遺伝

子が膵内分泌組織（膵島）に特異的なハイブリダイゼーションを呈した（既知遺伝子 43、未知遺伝子 91）。このうち、40 遺伝子を選別し、現時点で合計 477 エクソンの SNP スクリーニングを終了し、530 SNP を同定した（新規 SNP 313 個、ミスセンス cSNP 98 個）。

【今後の展望】 これらの SNP について糖尿病発症との関連解析を遂行中であり、次年度末までに有意の関連を呈する遺伝子同定を目指す。

### モデル動物解析研究

【目的と方法】 膵β細胞に発現している  $K_{ATP}$  チャンネルは、インスリンのグルコースによるインスリン分泌制御に重要な分子であるが、腸管ホルモンでの刺激下では  $K_{ATP}$  チャンネル非依存性にグルコース応答性にインスリン分泌が惹起されることが明らかになった。このインスリン分泌惹起には細胞内 cAMP の上昇が必要であることが示唆されたため、今年度はその分子メカニズムを明らかにすることを目指した。現在では細胞内 cAMP の上昇以降の細胞内シグナルとして、PKA の活性化によるタンパクリン酸化、cAMP-GEFII による Rap1 活性化、あるいは cAMP によるイオンチャンネルの直接的な活性制御など複数の標的分子を介する経路が考えられている。そこで、 $K_{ATP}$  チャンネル欠損マウスの膵灌流実験により個々の経路の関与を検討した。

【研究成果】 cAMP によるイオンチャンネルの直接的な活性制御については、cGMP 処置によってグルコース応答性インスリン分泌が引き起こされなかったことから、cAMP と cGMP に感受性がある HCN チャンネルや CNG チャンネルの関与は否定された。さらに cAMP-GEFII の関与を明らかにする目的で cAMP-GEFII と  $K_{ATP}$  チャンネルを両方欠損したダブルノックアウト (DKO) マウスで検討を行った。DKO マウスでは cAMP によるグルコース応答性インスリン分泌は明らかに減弱していた。このことから cAMP-GEFII が  $K_{ATP}$  チャンネルの開閉によらないインスリン分泌に関与していることが明らかになった。また、NMG により細胞外  $Na^+$  イオンを除去しても分泌は引き起こされることから、 $Na^+$  チャンネルや TRP チャンネルを介した細胞外からの細胞外  $Na^+$  イオン流入は関与していないことが示された。

【今後の展望】 cAMP により誘導される新たなグルコース感知メカニズムについて、 $K_{ATP}$  チャンネル欠損マウス以外の遺伝子改変マウスも用いて詳細な解析を行い、グルコース応答性を担うイオンチャンネルの同定を目指す。様々な薬剤をもちいた分泌実験や電気生理学的などの手法を用いて、最終年度は候補と考えられるイオンチャンネルの関与を確認する予定である。

### 3. 研究実施体制

#### (1) 病態解析と研究総括グループ

##### ① 研究者名

武田 純 (岐阜大学 教授)

##### ② 研究項目

- ・ 転写因子の標的遺伝子の包括的アレイ解析
- ・ 膵島特異的発現遺伝子のプロモーター解析とトランス因子の同定
- ・ インスリン分泌能の分化に関する転写因子の解析
- ・ 糖尿病のサブ表現型 (インスリン分泌不全、抵抗性、動脈硬化) との関連解析

#### (2) 遺伝素因解析研究グループ

##### ① 研究者名

武田 純 (群馬大学 教授)

志原伸幸 (群馬大学 助手)

##### ② 研究項目

- ・ 候補となる転写因子遺伝子の SNP 多型のスクリーニング
- ・ 肥満と食欲に関する調節因子の解析
- ・ 肥満型糖尿病におけるアディポサイトカインの解析

#### (3) モデル動物解析研究グループ

##### ① 研究者名

三木隆司 (神戸大学 助教授)

##### ② 研究項目

- ・ KATP チャンネル遺伝子改変動物のインスリン分泌能に関する解析
- ・ 転写因子欠失マウスの作成とインスリン分泌能に関する解析
- ・ 膵β細胞のインクレチン受容機構とインスリン分泌調節の解析

#### (4) ゲノム創薬研究グループ

##### ① 研究者名

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
- ・ インクレチン創薬
- ・ ミグリトールの膵島と心筋保護作用の解析
- ・ DPP-IV 阻害薬の開発と膵島再生作用の解析

#### 4. 研究成果の発表等

##### (1) 論文発表(原著論文)

- Yokoi N, Kanamori M, Horikawa Y, Takeda J, Sanke T, Furuta H, Nanjo K, Mori H, Kasuga M, Hara K, Kadowaki T, Tanizawa Y, Oka Y, Iwami Y, Ohgawara H, Yamada Y, Seino Y, Yano H, Cox NJ, and Seino S.  
Association studies of variants in the genes involved in pancreatic  $\beta$ -cell function in type 2 diabetes in Japanese.  
*Diabetes* 55: 2379-2386, 2006.
- Gu N, Adachi T, Matsunaga T, Takeda J, Tsujimoto G, Ishihara A, Yasuda K and Tsuda K.  
Mutant HNF-1 $\alpha$  and mutant HNF-1 $\beta$  identified in MODY3 and MODY5 downregulate DPP-IV gene expression in Caco-2 cells.  
*Biochem Biophys Res Commun* 346: 1016-1023, 2006.
- Gu N, Adachi T, Takeda J, Aoki N, Tsujimoto G, Ishihara A, Tsuda K and Yasuda K.  
Sucrase-isomaltase gene expression is inhibited by mutant hepatocyte nuclear factor (HNF)-1 $\alpha$  and mutant HNF-1 $\beta$  in Caco-2 cells.  
*J Nutr Sci Vitaminol* 52: 105-112, 2006.
- Isomura Y, Mune T, Morita H, Suwa T, Takada N, Yamamoto Y and Takeda J.  
Physiologic roles of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in kidney.  
*Metabolism* 55: 1352-1357, 2006.
- Yoshimura T, Suzuki E, Egawa K, Nishio Y, Maegawa H, Morikawa S, Inubushi T, Hisatomi A, Fujimoto K and Kashiwagi A.  
Low blood flow estimates in lower-leg arteries predict cardiovascular events in Japanese patients with type 2 diabetes with normal ankle-brachial indexes.  
*Diabetes Care*. 29: 1884-1890, 2006.
- Oyama K, Minami K, Ishizaki K, Fuse M, Miki T and Seino S.  
Spontaneous recovery from hyperglycemia by regeneration of pancreatic  $\beta$ -cells in Kir6.2G132S transgenic mice.  
*Diabetes* 55: 1930-1938, 2006.
- Choeiri C, Staines WA, Miki T, Seino S, Renaud JM, Teutenberg K and Messier C.  
Cerebral glucose transporters expression and spatial learning in the K-ATP Kir6.2(-/-) knockout mice.  
*Behav Brain Res*. 172: 233-239, 2006.
- Kane GC, Behfar A, Dyer RB, O'Coilain DF, Liu XK, Hodgson DM, Reyes S, Miki T, Seino S and Terzic A.  
KCNJ11 gene knockout of the Kir6.2 KATP channel causes maladaptive remodeling and

heart failure in hypertension.

Hum Mol Genet 15: 2285-2297, 2006.

- Yamada S, Kane GC, Behfar A, Liu XK, Dyer RB, Faustino RS, Miki T, Seino S and Terzic A.  
Protection conferred by myocardial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in pressure overload-induced congestive heart failure revealed in KCNJ11 Kir6.2-null mutant.  
J Physiol. 577: 1053-1065, 2006.
- Kane GC, Lam CF, O'Coirlain F, Hodgson DM, Reyes S, Liu XK, Miki T, Seino S, Katusic ZS and Terzic A.  
Gene knockout of the KCNJ8-encoded Kir6.1 K<sub>ATP</sub> channel imparts fatal susceptibility to endotoxemia.  
FASEB J. 20: 2271-2280, 2006.
- Okada S, Ohshima K, Uehara Y, Shimizu H, Hashimoto K, Yamada M and Mori M.  
Synip phosphorylation is required for insulin-stimulated Glut4 translocation.  
Biochem Biophys Res Commun. 356: 102-106, 2006.
- Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, Eguchi H, Yamamoto M, Imaki T, Hashimoto K, Tsuchiya T, Monden T, Horiguchi K, Yamada M and Mori M.  
Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus.  
Nature. 443: 709-712, 2006.
- Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nagata C, Takeda J, Sarui H, Kawahito Y, Yoshida N, Suetsugu A, Kato T, Okuda J, Ida K and Yoshikawa T.  
Nonalcoholic fatty liver disease is a novel predictor of cardiovascular disease.  
World J Gastroenterol. (In press)