

日本人のインスリン抵抗性に関与する遺伝子の同定

●春日 雅人1) ◆岩本 安彦2)

1) 神戸大学大学院医学系研究科 2) 東京女子医科大学

〈研究の目的と進め方〉

我が国における糖尿病患者の急増は憂慮すべき問題であり、その遺伝素因を明らかにすることは糖尿病の発症予防や新しい治療法の開発に多大の貢献をすることになる。2型糖尿病の発症にはインスリン抵抗性とインスリン分泌不全の2つの病態が関与するが、我々はインスリン抵抗性に着目し、研究を行う。すなわち、インスリンの作用において重要な働きをする新しい分子をDNAマイクロアレイ等を用いて明らかにし、続いて当該分子の細胞レベルにおける働きを明らかにする。インスリンの作用に重要な働きをしていることが細胞レベルで明らかにされた分子については、当該分子の個体レベルでの機能を解明するために遺伝子欠損マウスを作製してその表現型を解析するとともに、糖尿病患者での当該遺伝子の変異あるいはSNPの頻度を明らかにする。

〈研究開始時の研究計画〉

- 1) 細胞レベルにおいて、インスリン情報伝達ならびにインスリン依存性遺伝子発現制御に関与する分子をDNAマイクロアレイ等を用いて見つけ出し、その機序を解明する。
- 2) 個体レベルにおいて、アデノウイルスベクターによる肝臓特異的遺伝子発現の手法や臓器特異的ノックアウトマウスの作成によりインスリン作用機序を解明する。
- 3) インスリン抵抗性に関与する遺伝子について、遺伝子多型を同定し、患者対照研究により糖尿病感受性遺伝子を同定する。なお2型糖尿病患者200名と対照コントロール200名のDNAを収集する。研究分担者の岩本も東京女子医科大学糖尿病センターに通院する糖尿病患者の中から、2型糖尿病患者200名を選択し、対照コントロール200名も含めてそのDNAを収集する。

〈研究期間の成果〉

細胞レベルにおける解析

- 1) インスリンによるSREBP-1のm-RNAレベルの増加がIRS-1/PI 3キナーゼを介していること、ならびに肝細胞ではこの情報伝達系がIRS-1と特異的に共役していることを見出した。すなわち、インスリンの情報伝達系において、そのシグナル伝達のコンパートメント化が生じている可能性を見出した。(発表論文6)
- 2) 小胞と細胞膜との融合に重要な働きをするMunc 18cを欠損するマウスを作成した。本マウスは胎生致死であったため、13.5日の胎児より線維芽細胞を作成しそれを脂肪細胞に分化させてこの蛋白の

機能を解析した。その結果、Munc 18cはインスリン依存性糖輸送において抑制的な働きをしていることを見出した。(発表論文15)

- 3) 肝臓においてPI 3キナーゼの優位抑制型変異体をアデノウイルスベクターを用いて発現することにより、インスリン依存性のPI 3キナーゼ活性化を阻害すると、高血糖、高インスリン血症、脂質代謝異常を生じることを見出した。すなわち、PI 3キナーゼは肝臓でもインスリン作用の発現に重要な役割を果たしていることを明らかにした。(発表論文9)
- 4) PI3-キナーゼの下流で機能する分子として蛋白キナーゼPDK-1の機能が注目されているが、そのインスリン作用への関与は十分に明らかではなかった。そこで、PDK-1遺伝子にloxP配列を有するマウスを相同組換え法にて作成し、本マウスから得られた不死化培養脂肪細胞株を用いて、PDK-1のインスリン作用への関与を検討した。その結果、PDK-1欠損脂肪細胞ではインスリン依存性及びPI3-キナーゼ依存性の糖輸送の活性化が生じないことを見出し、PDK-1がインスリンの代謝調節作用の発現に必須の分子であることを明らかにした。(発表論文11)

個体レベルにおける解析

- 5) 肝臓特異的にPKC λ を欠損するマウスを作成した。本マウスは、肝臓におけるSREBP-1cを含む脂肪酸合成系遺伝子の発現低下及び中性脂肪蓄積の低下に加え、インスリン感受性の増強を示した。培養細胞系での検討ともあわせて、PKC λ は肝臓における脂肪酸合成制御に必須の役割を果たすとともに、個体レベルでのインスリン感受性の制御にも関与することを明らかとした。(発表論文12)

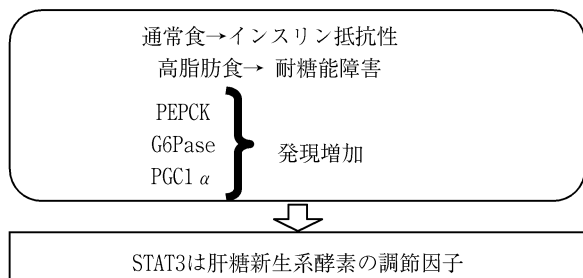
肝特異的PKC λ 欠損マウス (発表論文12)



- 6) 転写因子であるSTAT3を肝特異的に欠損したマウスを作成した。本マウスは、通常食飼育下でインスリン抵抗性を示し、高脂肪食飼育により耐糖能障害を呈した。本マウスの肝では糖新生に関わるPEPCKやG6Pase、また、これらの遺伝子の制御

因子である転写コアクチベーターPGC1 α の発現が増加していた。培養肝細胞を用いた実験でもSTAT3が、これらの遺伝子の発現に関与していることを示した。以上より、STAT3は肝における糖新生系酵素の生理的な調節因子であることを示した。(発表論文13)

肝特異的STAT3欠損マウス(発表論文13)



- 7) 膵 β 細胞特異的にPKC λ を欠損するマウスを作成した。本マウスはグルコース応答性のインスリン分泌の障害をきたし、耐糖能異常を示した。PKC λ が、膵 β 細胞においてHNF3(、ヘキソキナーゼ、SUR1、Kir6.2、Glut2などの β 細胞機能に重要な遺伝子発現の調節を介して、グルコース応答性のインスリン分泌を制御していることを明らかとした。(発表論文14)
- 8) 糖尿病モデルマウス(IRS-2 K.O.マウスならびにdb/dbマウス)の膵 β 細胞でCDKインヒビターp27kip1の発現が増加していることを見出した。そこで、これらのマウスでp27kip1遺伝子を欠損させたところ膵 β 細胞量は大幅に増加し、血中インスリン値の増加および血糖値の正常レベルへの低下を示した。p27kip1が膵 β 細胞に蓄積することにより、膵 β 細胞の増殖が抑制され、これらの糖尿病モデルマウスにおける糖尿病発症に関与することを明らかにした。(発表論文16)

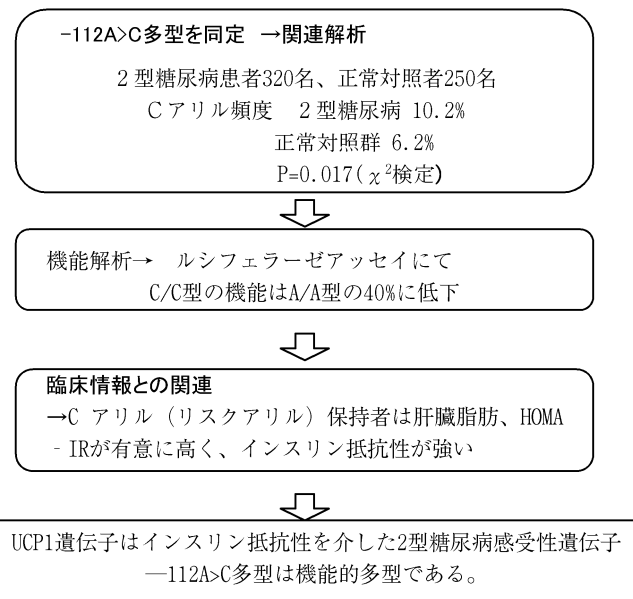
ヒトの遺伝子多型の解析

- 9) UCP1遺伝子に関して、5'UTRに存在するA>C多型とMet229Leu多型を同定した。両者は連鎖不平衡の関係にあった。2型糖尿病患者320名、正常対照者250名に関して多型頻度を解析したところ、前者に関して糖尿病群ではA/A:257名、A/C:61名、C/C:2名でCアレル頻度は10.2%あったが、正常対照群ではA/A:220名、A/C:29名、C/C:1名でCアレル頻度は6.2%であり頻度に有意差を認めた。(P=0.017、 χ^2 検定) A/A型とC/C型の機能をルシフェラーゼアッセイを用いて解析したところ、C/C型の機能はA/A型の40%に低下していた。以上からUCP1遺伝子の5'UTR内の-112A>C多型はUCP1の発現低下や2型糖尿病発症との関連を有することが示された。(発表論文1)
- 10) インスリン受容体キナーゼの基質のひとつであるIRS-2について検討した。IRS-2遺伝子はそのプロモーター領域の構造を明らかにしてその転写制御機構について考察するとともにプロモーター領域のSNPについて検討した。その結果、いくつかのSNPを見い出したが、糖尿病の発症とはcase-control association studyで有意な関連は見い出し

えなかった。(発表論文8)

- 11) 候補遺伝子のSNP解析において患者対照関連解析を行うとともに、magnetic resonance spectroscopy (MRS)により骨格筋細胞内脂肪含量(IMCL)や肝細胞内脂肪含量(HLC)などを測定し、これらを含む詳細な臨床情報との関連を検討した。UCP1遺伝子の5'UTRに存在する-112A>C多型が2型糖尿病と関連があることを報告した(発表論文1)が、2型糖尿病患者93名でこのSNPと詳細な臨床情報との関連を検討した結果、Cアレル(リスクアレル)保持者はHLC、HOMA-IR(インスリン抵抗性指数)が有意に高く、インスリン抵抗性が強いことを認めた。

UCP1遺伝子(発表論文1)



- 12) 患者と対照コントロールについて、予定数のDNAサンプルを収集した。候補遺伝子アプローチとして、CPT1A、CPT1B、SREBP1、FATP4をとりあげ、それらのSNPを同定するとともに、2型糖尿病患者450名、正常対照者360名を用いて、同定したSNPについてcase-control相関解析を行った。しかしながら、いずれのSNPも2群間でアレル頻度に有意差はなかった。

なおこれらの研究は、以下のように倫理問題に対応して行われた。

ノックアウトマウスに関する研究に関しては、神戸大学大学院医学系研究科の動物実験倫理委員会および組み換えDNA委員会の承認を得ている。

ヒトゲノムを用いた研究に際し、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づき研究計画書を策定し神戸大学大学院医学系研究科遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得た。検体収集に関しては、同指針に則りインフォームドコンセントを書面にて得ている。個人情報保護のための匿名化を行い、漏洩防止のために十分な措置を講じている。

研究分担者の岩本らは、日本人256組の罹患同胞対を用いて連鎖解析を行い、染色体上の12ヵ所で2型糖尿病の

発症に有意な部位を認めた。(発表論文19)

また、Calpain10遺伝子多型が日本人2型糖尿病のリスクを修飾することを示した。(発表論文18)

〈国内外での成果の位置づけ〉

細胞レベル、個体レベルにおける解析

PKC λ 遺伝子欠損マウス、STAT-3遺伝子欠損マウス、p27kip1遺伝子欠損マウスについての成績は、世界に先駆けてのものであり、新たな知見を示すことができた。

ヒトの遺伝子多型の解析

より詳細な臨床情報を用いることにより、疾患感受性だけでなくインスリン抵抗性など臨床指標との関係も検討することができた。特に、magnetic resonance spectroscopy (MRS)により骨格筋細胞内脂肪含量 (IMCL) や肝細胞内脂肪含量 (HLC) などを検討した患者群についての検討は、国内外においてほとんど行われていない。また様々な候補遺伝子の関連解析は、諸外国でも行われているが、遺伝子多型については人種差があることが明らかになっており、わが国独自の検討が必要である。わが国で同定した感受性遺伝子について、今後各種の民族においても確認されることが望まれる。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

細胞レベル、個体レベルにおける解析

aP2プロモーターを用いて脂肪細胞特異的にCreを発現したトランスジェニックマウスの働きが悪かったので、脂肪細胞特異的遺伝子欠損マウスは十分に解析できなかった。今後はaP2プロモーター以外を用いて脂肪細胞特異的にCreを発現するマウスを作製する必要がある。

ヒトの遺伝子多型の解析

糖尿病感受性遺伝子同定については、進捗が不十分であった。これには、世界中の研究者が予想以上の困難さを感じているのが実情である。糖尿病感受性遺伝子としての意義を明らかにするために、詳細な臨床情報を伴った検体の収集が多数必要である。特に生活習慣（食事・運動）に関する客観性のある定量化できる情報が不足していた。

〈今後の課題〉

細胞レベル、個体レベルにおける解析

2型糖尿病にはインスリン作用に関わる数多くの分子が関わっている。現在までに、種々の病態における各種の臓器におけるDNAマイクロアレイを用いた解析から、インスリン作用に関与する新たな分子を同定している。それらの役割を細胞レベル、個体レベルで解明していく。

ヒトの遺伝子多型の解析

2型糖尿病の疾患感受性遺伝子一つ一つが持つ効果は小さく、発症には環境因子の関与も大きいことから、糖尿病関連遺伝子の同定について、世界的に苦戦をしいられ

ている。多因子疾患であり、環境因子を考慮して解析する必要があるが、すなわち、食事や運動を長期間にわたり客観的に評価する方法に乏しく、患者さんや対象者に受け入れられるこれらの方法の開発がまず重要である。また臨床情報との関連、臨床情報によるサブグループ化、遺伝子同士さらには環境因子との相互作用など、さまざまな詳細な解析を行うことが必要であるが、その方法論や解析ツール開発なども今後の課題である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 0202221528 Mori, H., Okazawa, H., Iwamoto, K., Maeda, E., Hashiramoto, M., Kasuga, M. A polymorphism in the 5' untranslated region and a Met229→Leu variant in exon 5 of the human UCPI gene are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. (2001) *Diabetologia*, 44:373-376.

2) 0202221539 Matsumoto, M., Ogawa, W., Hino, Y., Furukawa, K., Ono, Y., Takahashi, M., Ohba, M., Kuroki, T., and Kasuga, M. Inhibition of insulin-induced Activation of Akt by a kinase-deficient mutant of the ϵ isozyme of protein kinase C. (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 14400-14406.

3) 0602091558 Nakae, J., Kitamura, T., Ogawa, W., Kasuga, M., and Accili, D. Insulin regulation of gene expression through the forkhead transcription factor foxo1 (fkhr) requires kinases distinct from Akt. (2001) *Biochemistry*. 40:11768-11776.

4) 0602091602 Tsuchida, A., Nakagawa, T., Itakura, Y., Ichihara, J., Ogawa, W., Kasuga, M., Taiji, M., Noguchi, H. The effects of brain-derived neurotrophic factor on insulin signal transduction in the liver of diabetic mice. (2001) *Diabetologia*. 44:555-566.

5) 0602091611 Sakaue, H., Konishi, M., Ogawa, W., Asaki, T., Mori, T., Yamasaki, M., Takata, M., Ueno, H., Kato, S., Kasuga, M., Itoh, N. Requirement of fibroblast growth factor10 in development of white adipose tissue. (2002) *Genes Dev.* 16:908-912.

6) 0307231136 Matsumoto, M., Ogawa, W., Teshigawara, K., Inoue, H., Miyake, K., Sakaue, H., Kasuga, M. Role of the IRS-1 and PI 3-kinase signaling pathway in insulin-induced expression of SREBP-1c and glucokinase genes in rat hepatocytes. (2002) *Diabetes*. 51:1672-1680.

7) 0602091614 Tamori, Y., Masugi, J., Nishino, N., and Kasuga, M. Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. (2002) *Diabetes*. 20:2045-2055.

8) 0307231204 Iwamoto, K., Mori, H., Okazawa, H., Hashiramoto, M., and Kasuga, M. Identification of a single nucleotide polymorphism showing no insulin-mediated suppression of the promoter activity in the human insulin receptor substrate 2 gene. (2002) *Diabetologia*. 45:1182-95.

9) 0307231141 Miyake, K., Ogawa, W., Mastumoto, M., Nakamura, T., Sakaue, H., Kasuga, M.

Hyperinsulinemia, glucose intolerance, and dyslipidemia induced by acute inhibition of phosphoinositide 3-kinase signaling in the liver. (2002) *J. Clin. Invest.* 110:1483-1491.

1 0) 0602091616 Kasuga, M., Ogawa, W., and Ohara, T. Tissue glycogen content and glucose intolerance. (2003) *J. Clin. Invest.* 111:1282-1284.

1 1) 0307231502 Sakaue, H., Nishizawa, A., Ogawa, W., Teshigawara, K., Mori, T., Takashima, Y., Noda, T. and Kasuga, M. Requirement for 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PKD-1) in insulin-induced glucose uptake in immortalized brown adipocytes. (2003) *J. Biol. Chem.* 278:38870-38874.

1 2) 0307231454 Matsumoto, M., Ogawa, W., Akimoto K., Inoue, H., Miyake, K., Furukawa, K., Hayashi, Y., Iguchi, H., Matsuki, Y., Hiramatsu, R., Shimano, H., Yamada, N., Ohno, S., Kasuga, M. and Noda, T. Protein kinase C λ in liver mediates insulin-induced SREBP-1c expression and determines both hepatic lipid content and overall insulin sensitivity. (2003) *J. Clin. Invest.* 112:935-944.

1 3) 0404151346 Inoue, H., Ogawa, W., Ozaki, M., Haga, S., Matsumoto, M., Furukawa, K., Hashimoto, N., Kido, Y., Mori, T., Sakaue, H., Teshigawara, K., Jin, S., Iguchi, H., Hiramatsu, R., Leroith, D., Takeda, K., Akira, S and Kasuga, M. Role of STAT-3 in regulation of hepatic gluconeogenic genes and of carbohydrate metabolism in vivo. (2004) *Nature Med.* 10:168-174.

1 4) 0602091619 Hashimoto N, Kido Y, Uchida T, Matsuda T, Suzuki K, Inoue H, Matsumoto M, Ogawa W, Maeda S, Fujihara H, Ueta Y, Uchiyama Y, Akimoto H, Ohno S, Noda T, and Kasuga M. PKC λ regulates glucose-induced insulin secretion through modulation of gene expression in pancreatic beta cells. (2005) *J. Clin. Invest.* 115:138-145.

1 5) 0602091632 Kanda H, Tamori Y, Shinoda H, Yoshikawa M, Sakaue M, Udagawa J, Otani H, Tashiro F, Miyazaki J, and Kasuga M. Adipocytes from Munc18c-null mice show increased sensitivity to insulin-stimulated GLUT4 externalization. (2005) *J. Clin. Invest.* 115:291-301.

1 6) 0602091622 Uchida T, Nakamura T, Hashimoto N, Matsuda T, Kotani K, Sakaue H, Hayashi Y, Nakayama KI, White MF, and Kasuga M. Deletion of Cdkn1b gene ameliorates hyperglycemia by maintaining compensatory hyperinsulinemia in diabetic mice. (2005) *Nature Med.* 11:175-182.

1 7) 0602091626 Teshigawara, K., Ogawa, W., Mori, T., Matsuki, Y., Watanabe, E., Hiramatsu, R., Inoue, H., Miyake, K., Sakaue, H., Kasuga, M. Role of Kruppel-like factor 15 in PEPCK gene expression in the liver. (2005) *Biochem.Biophys.Res.Commum.* 327:920-926.

1 8) 0503291442 Naoko Iwasaki, Yukio Horikawa, Takafumi Tsuchiya, Yutaka Kitamura, Takahiro

Nakamura, Yukio Tanizawa, Yoshitomo Oka, Kazuo Hara, Takashi Kadowaki, Takuya Awata, Masashi Honda, Katsuko Yamashita, Naohisa Oda, Li Yu, Norihiro Yamada, Makiko Ogata, Naoyuki Kamatani, Yasuhiko Iwamoto, Laura del bosque-Plata, M. Geoffrey Hayes, Nancy J Cox, Graeme I. Bell. Genetic variants in the calpain-10 gene and the development of type 2 diabetes in the Japanese population. (2005) *J Hum Genet* 50 : 92-98

1 9) 0301061548 Naoko Iwasaki, Nancy J Cox, Yan-Qing Wang, Peter EH Schwartz, Graeme I Bell, Masashi Honda, Mitsuo Imura, Makiko Ogata, Masayuki Saito, Naoyuki Kamatani, Yasuhiko Iwamoto. Mapping genes influencing Type 2 diabetes Risk and body mass index in Japanese. (2003) *Diabetes* 52:209-213

2 0) 0203261907 Makiko Ogata, Takeo Awaji, Naoko Iwasaki, Syunichi Miyazaki, Yasuhiko Iwamoto. Nuclear Translocation of SHP and Visualization of Interaction with HNF-4 α in Living Cells. (2002) *Bioch Bioph Res Com* 292:8-12

2 1) 0111101633 Naoko Iwasaki, Ichirou Okabe, Hiroshi Ohashi, Makiko Ogata, Mariko Momoi, Hirohide Yokokawa, Yasuhiko Iwamoto. A Novel Splice Site Mutation in the Hepatocyte Nuclear Factor-1b Gene, IVS2nt+1G>A, Associated with Maturity-Onset Diabetes of the Young, Agenesis of the Left Kidney and Bicornuate Uterus. (2001) *Diabetologia* 44: 387-388

2 2) 0202142241 Naoko Iwasaki, T. Babazono, O. Tomonaga, M. Ogata, H. Yokokawa, Y. Iwamoto. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1b (MODY5) gene are not a major factor contributing to end-stage renal disease in Japanese people with diabetes mellitus. (2001) *Diabetologia* 44: 127-128

2 3) 0202252350 M. Hara, X. Wang, V.P. Paz, N. Iwasaki, M. Honda, Y. Iwamoto, G. I. Bell. Identification of three missense mutations in peroxisome proliferator-activated receptor α in Japanese subjects with MODY but no association with diabetes (2001) *Hum Genet* 46:285-288