

ゲノムマッピングと候補遺伝子による日本人2型糖尿病原因遺伝子の同定とその機能解析

●門脇 孝¹⁾ ◆原 一雄¹⁾ ◆山内 敏正¹⁾ ◆窪田 直人¹⁾ ◆戸辺 一之¹⁾

1) 東京大学・医学部附属病院糖尿病・代謝内科学

〈研究の目的と進め方〉

(1)全ゲノム解析と候補遺伝子アプローチの両者を組み合わせた解析による2型糖尿病感受性遺伝子の同定：

罹患同胞対法による全ゲノム解析によって得られた日本人における2型糖尿病感受性遺伝子座に位置し、糖代謝に重要な役割を担っていることが我々の作製・解析したモデル動物で明らかとなった遺伝子についてSNPを利用した相関解析を行い、日本人における多因子病としての2型糖尿病感受性遺伝子を同定する。

(2)日本人2型糖尿病感受性遺伝子の遺伝子改変動物を利用した個体レベルでの機能解析と病態の解明：

(1)で解明された日本人の2型糖尿病感受性遺伝子について発生工学的手法を用いた遺伝子欠損マウスを作製し、その表現型を詳細に解析することによって日本人における2型糖尿病の発症・進展の分子メカニズムを個体レベルで明らかにする。作製したモデル動物については各臓器別にDNAチップによる発現プロファイリングを行い、日本人2型糖尿病の分子メカニズムの全体像を解明するとともに、2型糖尿病治療薬のターゲットとなる分子を系統的・網羅的に探索する。

(3)2型糖尿病の遺伝的素因と分子病態を標的とした治療法・薬剤の開発：

(1),(2)で明らかになった日本人2型糖尿病感受性遺伝子そのものや当該遺伝子の作用を媒介したり、同一の細胞内情報伝達経路にある関連遺伝子などを標的とする2型糖尿病の根本的な治療法の開発に着手する。

〈研究開始時の研究計画〉

(1)全ゲノム解析と候補遺伝子アプローチの両者を組み合わせた解析による2型糖尿病感受性遺伝子の同定：

日本人159家系、359人、224組の2型糖尿病罹患同胞対を利用した全ゲノム解析を行い、感受性遺伝子の近傍のマイクロサテライトマーカーの罹患同胞対間の共有アリル数について遺伝統計学的検討を行って、2型糖尿病と連鎖する領域を同定する。同定した日本人2型糖尿病原因遺伝子座について、我々の作成した糖尿病モデル動物の機能解析によって糖代謝に重要な役割を担っていることが示唆される遺伝子が位置していることがゲノムデータベースを利用して分かった場合には当該遺伝子のSNPを直接シーケンス法によって検索した上で、それらのSNPを利用した患者対照相関解析を行い、日本人2型糖尿病感受性遺伝子としての意義を検討する。2型糖尿病と有意に相関するSNPについては独立したDNAパネルで再現性を確認する。これと平行して、罹患同胞対法による全ゲノム解析によって同定した日本人2型糖尿病感受性遺伝子座についてdbSNP、JSNPなどのSNPデータベースによって検索しSNPによるdense mapを作製する。SNP単独やSNPの組み合わせによるハプロタイプを利用した患者対照相関解析によって2型糖尿病感受性

遺伝子の絞込みを行う。

(2)日本人2型糖尿病感受性遺伝子の遺伝子改変動物を利用した個体レベルでの機能解析と病態の解明：

(1)で解明された日本人の2型糖尿病感受性遺伝子について発生工学的手法を用いた遺伝子欠損マウスを作製する。インスリン感受性・インスリン分泌機能など、日本人2型糖尿病の基礎的病態について詳細に解析することによって当該遺伝子の日本人における2型糖尿病の発症・進展における役割、2型糖尿病の発症・進展の分子メカニズムを個体レベルで明らかにする。作製したモデル動物については各臓器別にAffymetrix社のDNAチップによって2型糖尿病・インスリン抵抗性で発現が増減する遺伝子を網羅的に検索し、2型糖尿病感受性遺伝子座の位置情報など他の情報も組み合わせて、2型糖尿病発症・進展における鍵分子の候補遺伝子を同定し、2型糖尿病治療薬のターゲットとなる分子を系統的・網羅的に探索する。

(3)2型糖尿病の遺伝的素因と分子病態を標的とした治療法・薬剤の開発：

高脂肪食による肥満・インスリン抵抗性惹起を媒介する候補遺伝子で2型糖尿病感受性遺伝子であること、その機能を低下させることがインスリン抵抗性・2型糖尿病の治療となりうることを明らかにしたPPAR γ の拮抗薬を開発しモデル動物に投与して、その薬効を確認する。これと平行して(1),(2)で明らかになった日本人2型糖尿病感受性遺伝子そのものや当該遺伝子の作用を媒介したり、同一の細胞内情報伝達経路にある関連遺伝子などを標的とする2型糖尿病の根本的な治療法の開発に着手する。

〈研究期間の成果〉

(1)全ゲノム解析と候補遺伝子アプローチの両者を組み合わせた解析による2型糖尿病感受性遺伝子の同定：

日本人224組の2型糖尿病罹患同胞対を利用した全ゲノム解析によって、2型糖尿病原因遺伝子座として有望である領域を1p36-p32, 2q34, 3q26-q28, 6p23, 7p22-p21, 9p, 11p13-p12, 15q13-q21と20q12-q13と9箇所の染色体領域に同定した(図1)(Diabetes 51: 1247-1255, 2002)(成果1)。その一つ一つの領域について以下に述べるようにSNPを利用した相関解析によって複数の2型糖尿病感受性遺伝子を同定した。

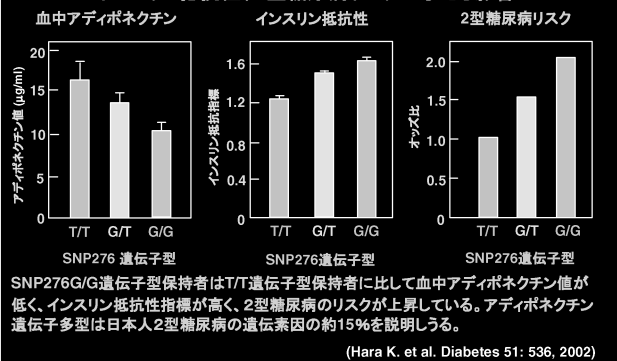
図1. 罹患同胞対法を利用した全ゲノムマッピングにより日本人2型糖尿病との連鎖が示唆された染色体領域

糖尿病感受性領域	LOD値 (P)	他の研究での連鎖	候補遺伝子
T2DM1 1p36-p32	1.53 (.00699)		AMPK α 2
T2DM2 2q34	1.68 (.00470)	◎	
T2DM3 3q26-q28	1.38 (.01002)	◎	アディポネクチン、GLUT2, P13キナーゼ
T2DM4 6p23	1.52 (.00718)	◎	
T2DM5 7p22-p21	1.80 (.00354)		
T2DM6 9p	2.40		
T2DM7 11p13-p12	3.08 (.00017)	◎	Pax6
T2DM8 15q13-q21	2.19 (.00136)	◎	カルバイン3
T2DM9 20q12-q13	1.67 (.00489)	◎	HNF4 α

◎ 日本人
◎ 欧米人

染色体3番の領域3q26-q28 β 染色体3番の3q26-28の領域には、先に我々が作製したインスリン感受性モデル動物PPAR γ ヘテロ欠損マウスのDNAチップ解析によりインスリン感受性物質であることが示唆されたアディポネクチン遺伝子が存在した。更に本領域はフランス白人、アメリカ白人における罹患同胞対法による全ゲノム解析によって2型糖尿病・メタボリックシンドロームとの連鎖が報告されており、民族・人種によらない普遍的な2型糖尿病感受性遺伝子が存在することが示唆された。そこでアディポネクチン遺伝子についてプロモーター領域を含めた領域について直接シーケンス法によってSNPを網羅的に検索し、比較的頻度の高いSNPを計11個同定した。更に、患者対照相関解析によって2型糖尿病原因遺伝子としての意義を検討したところ、アディポネクチン遺伝子のイントロン2に存在するSNP276のGG遺伝子型保持者はTT遺伝子型に比して血中アディポネクチンが低値でHOMA(homeostasis model assessment)によるインスリン抵抗性指標が高値であり、更に2型糖尿病発症リスクが約2倍と有意に上昇していた。このことよりアディポネクチン遺伝子SNP276は、血中アディポネクチン低値を介してインスリン抵抗性を惹起し、2型糖尿病発症リスクを高めることを明らかにした(図2)(Diabetes 15:536-540, 2002)(成果2)。本遺伝子多型は比較的頻度が高いため発症リスクは2倍とmoderateでありながら、日本人における2型糖尿病の遺伝素因に占める役割は大きいと考えられた。

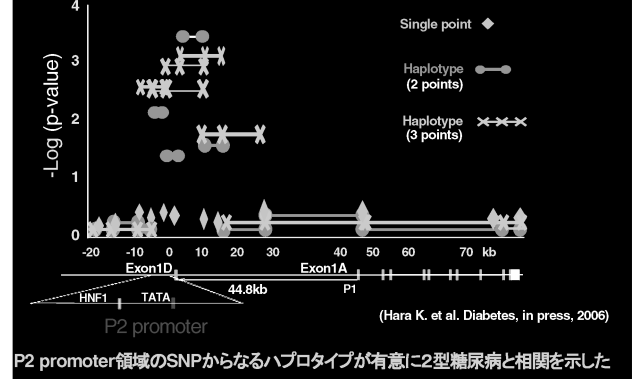
図2. アディポネクチン遺伝子SNP276の血中アディポネクチン値、インスリン抵抗性、2型糖尿病リスクに与える影響



染色体20番の領域(20q12-q13) β 染色体20番の領域(20q12-q13)は複数の民族で2型糖尿病との連鎖が一致して報告されており、若年発症の糖尿病患者が同一家系内に多発する糖尿病の一亜型MODY(maturity onset diabetes of the young)の原因遺伝子HNF-4 α 遺伝子が存在する。そこでHNF-4 α 遺伝子のSNPによる相関解析を行ったところ、特異的なプロモーターに存在するSNPの組

み合わせによるハプロタイプが有意に2型糖尿病と相関を示した。個々のSNPと2型糖尿病との相関は認めなかったことから、本領域に糖尿病感受性を真に規定する未知の機能的SNPが存在するか、ハプロタイプを構成するSNPが協調的に働いて2型糖尿病の疾患感受性に影響を与えていることが示唆された(図3)(Diabetes, in press, 2006)(成果3)。単独のSNPのみならずハプロタイプによる相関解析を行うことが多因子病としての2型糖尿病感受性遺伝子同定のために有効であることが示された。諸外国から出された複数の報告も本遺伝子のP2プロモーターが2型糖尿病感受性に影響を与えていることを示しており、我々の結果と合致している。

図3. HNF4 α 遺伝子のハプロタイプ解析 -1st Case-control サンプル-



染色体1番の領域(1p36-p32) β 染色体1番(1p36-p32)の領域についてはAMPキナーゼ α 2サブユニット(PRKAA2)のSNP(rs2051040)がインスリン抵抗性と有意に相関し、更にrs2051040を含むハプロタイプが有意に2型糖尿病と相関することからインスリン抵抗性を介する2型糖尿病感受性遺伝子であることが明らかになった(Diabetes, in press, 2006)(成果4)。染色体11番の領域(11p13-p12) β 染色体11番の領域(11p13-p12)は他のグループによる日本人を対象とした全ゲノム解析によっても2型糖尿病との連鎖を認めており有望な領域である。現在、本領域について等間隔で比較的頻度が高いSNPによる相関解析を行い2型糖尿病感受性遺伝子座の絞込みを行っている。

アディポネクチン受容体遺伝子(ADIPOR1, ADIPOR2) β また、我々が初めて単離・同定し、2型糖尿病鍵分子であることを明らかとしたアディポネクチン受容体(ADIPOR1, ADIPOR2)(後述)についてもSNPを利用した患者対照解析を行って日本人2型糖尿病感受性遺伝子としての意義を検討したが、インスリン抵抗性・2型糖尿病と一貫して有意に相関するSNPは認められなかった(Diabetologia 48:1307-14, 2005)(成果5)。このことからアディポネクチン受容体遺伝子多型は日本人の2型糖尿病の遺伝素因の主要な部分を占めるとは考えにくいことが示唆された。

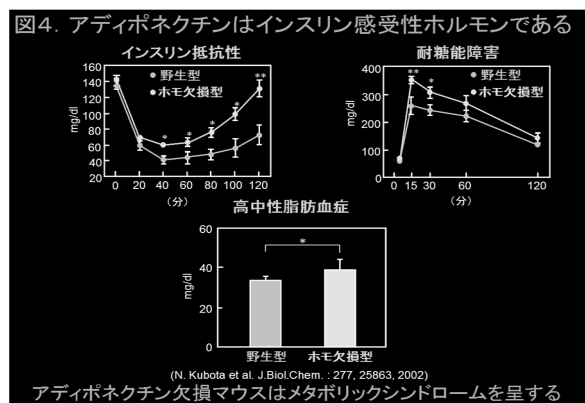
PGC-1遺伝子 β PGC-1(peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1)遺伝子は特にげっ歯類では、ミトコンドリア機能に不可欠な遺伝子の発現を調節する転写因子であるnuclear respiratory factor(NRF)の発現の上昇とミトコンドリアの数を増加させ、褐色脂肪組織における熱産生に重要な働きを担っていること、インスリン抵抗性の責任臓器である骨格筋では糖の取り込みに、肝臓においては糖新生に重要な役割を担っているということ、骨格筋においては糖の取り込みの鍵分子であるGlut4の発現を骨格筋特異的な転写因子であるMEF2(myocyte

enhancer factor-2)を介して上昇させること、肝臓では糖新生の重要な鍵分子であるPEPCK, fructose 1,6-bisphosphatase, glucose-6-phosphataseなどの遺伝子発現を上昇させ糖新生に重要な働きを担っていることが次々と判明している。そこで我々はPGC-1遺伝子がインスリン抵抗性・2型糖尿病感受性遺伝子の機能的候補遺伝子であると考え、PGC-1遺伝子のSNPを検索しGly482Ser多型を同定した。本多型のSerアリル保持者は非保持者に比して有意に空腹時インスリンレベルとインスリン抵抗性の指標であるHOMA-IRが高いことを明らかにした(Diabetologia 45:740-743, 2002) (成果6)。その後他のグループから本多型Ser482アリル保持者は非保持者に比して、加齢によるPGC-1遺伝子発現レベルの低下が大きいたことが報告された。また、健康人と2型糖尿病患者の骨格筋のDNAチップによる網羅的発現プロファイルの結果を、遺伝子の機能や情報伝達経路により網羅的発現解析を行った遺伝子をいくつかのセットに分けることによって、そのセットに含まれている遺伝子の微妙な変化を捉えることが出来るというアルゴリズムGSEA(Gene Set Enrichment Analysis)で解析したところ、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化を行っている遺伝子群の発現レベルがmildに低下しており、その上流にPGC-1遺伝子が位置していることが報告され、PGC-1の遺伝子多型などによる機能低下がインスリン抵抗性・2型糖尿病の病態形成に重要な働きを担っていることが明らかになりつつある。

(2)遺伝子改変動物の作製による2型糖尿病の発症機序・進展の全体像の解明:

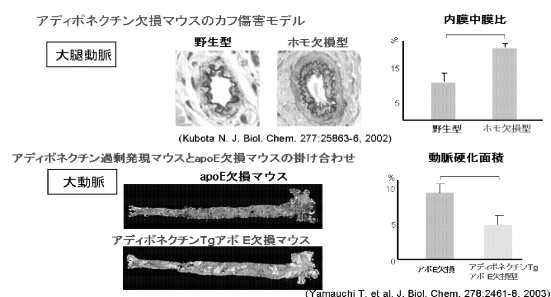
全ゲノム解析と候補遺伝子アプローチの両者を組み合わせた解析によってアディポネクチン遺伝子が2型糖尿病感受性遺伝子であることを明らかにした。実際に糖尿病モデル動物のKKAyマウスに遺伝子組み換えアディポネクチンを投与したところ、インスリン抵抗性や高中性脂肪血症が著明に改善した(Nature Medicine 7:941-946, 2001) (成果7)。そこでアディポネクチンの生物学的作用を個体レベルで明らかにするため、発生工学的手法によってアディポネクチン欠損マウスを作製しその表現型を解析した。アディポネクチンヘテロ欠損マウスはインスリン抵抗性を、ホモ欠損マウスはインスリン抵抗性と耐糖能障害を呈し、実際にアディポネクチンがインスリン感受性の調節に重要であることを個体レベルではじめて明らかにした(図4)(J Biol Chem 277: 25863-25866, 2002) (成果8)。アディポネクチンのインスリン感受性亢進作用の分子メカニズムを明らかにするために糖尿病モデル動物への投与実験を行った。アディポネクチンはAMPキナーゼ(5'-AMP-activated protein kinase)を活性化することによって、骨格筋においては脂肪酸燃焼と糖の取り込みを、肝臓では糖新生を抑制しインスリン抵抗性を改善することを初めて明らかにした(Nature Medicine 8:1288-1295, 2002) (成果9)。更に、アディポネクチンの動脈硬化における役割を解明するために、動脈硬化のモデル動物であるApoE欠損マウスとアディポネクチン過剰発現マウスを交配し(ApoE(-/-)×AdipoTgマウス)その表現型を解析した。アディポネクチンのインスリン抵抗性改善・脂質プロファイル改善作用の影響を除外し、動脈硬化に対する作用を直接解析するためインスリン抵抗性や脂質プロファイルに影響を与えない程度の血中アディポネクチン濃度上昇をきたす程度のApoE(-/-)×AdipoTgマウスについて解析を行った。ApoE(-/-)×AdipoTgマウスは、ApoE欠損マウスにみられる動脈硬化

巣の面積、内膜中膜比が減少していたことから、アディポネクチンが直接血管に作用して動脈硬化を抑制する作用があることを個体レベルで明らかにした(図5)(J. Biol. Chem. 278:2461-2468, 2003) (成果10)。



アディポネクチン欠損マウスはメタボリックシンドロームを呈する

図5. アディポネクチンは直接的に血管障害抑制作用を持っている

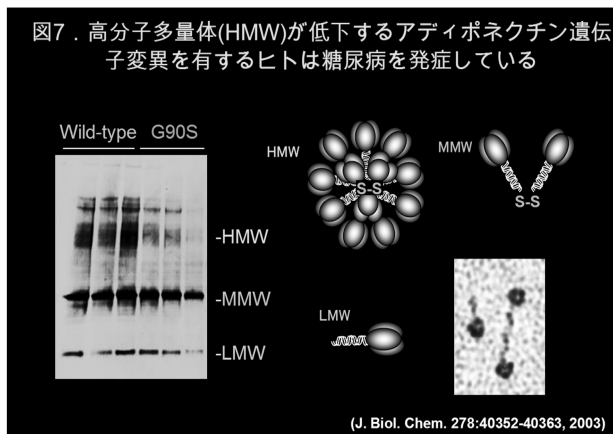
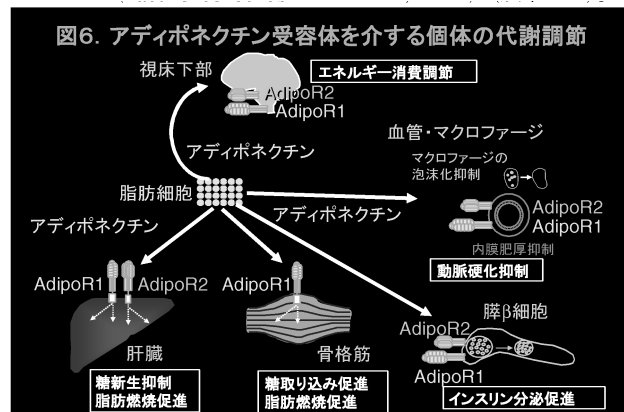


このように本研究プロジェクトによってアディポネクチンが肝臓では糖新生の抑制と糖取り込みの促進を、骨格筋では脂肪酸燃焼と糖の取り込みの促進によってインスリン抵抗性を改善する作用を持つこと、インスリン感受性亢進を介した間接的な改善効果に加えて、直接血管に作用して動脈硬化を抑制する作用を持っていることを個体レベルで初めて明らかにした。他の未発表のデータと合わせてアディポネクチンは種々の臓器で多彩な抗生活習慣病・抗心血管病作用をもっていることが明らかになった(図6)。

このようにアディポネクチンが糖尿病・生活習慣病・心血管疾患の発症・進展に重要な役割を担っていることが明らかになったため、アディポネクチンの血中レベルの測定が、糖尿病・生活習慣病・心血管疾患の新規診断法へ応用可能と考えた。アディポネクチンは血中ではmonomer, dimer, trimer, 6量体, 12-18量体と様々な多量体構造をとっており、大まかに低分子量(low molecular weight: LMW)、中分子量(middle molecular weight: MMW)、高分子量(high molecular weight: HMW)に分類するのが一般的である。各フォームの生物学的活性・病態への関与などは不明であったが、まず細胞レベルの実験では、HMWが最も細胞膜への結合親和性が高く、アディポネクチンの作用を媒介しているAMPキナーゼの活性化能が高いことを明らかにした。更に糖尿病・メタボリックシンドロームのモデル動物KKAyマウスでは野生型のKKマウスに比較してHMW、HMWの総アディポネクチンに対する比率(HMWR: ratio of high-molecular-weight adiponectin to total adiponectin)が低い。このKKAyマウスにインスリン抵抗性改善薬のチアゾリジン誘導体を投与するとHMWとHMWRが著明に上昇する。また、ヒトの2型糖尿病における食事療法に匹敵する食餌制限によってもHMWとHMWRが上昇することからも、

高分子量アディポネクチンの低下が糖尿病・メタボリックシンドロームの発症・進展に重要な役割を担っていることが示唆された。更に、ヒトにおいてはHMWが形成されなくなるアディポネクチン遺伝子変異Gly90Serが報告されており、本変異保持者が2型糖尿病発症者であることから、ヒトにおいてもHMWの低下が重要であることが示唆された(図7)(J Biol Chem 278:40352-40363, 2003)(成果11)。そこで、HMW-Adを特異的に測定することが出来れば、糖尿病・メタボリックシンドロームの病態を正確に診断することが出来ると考え、簡便にHMW-Adを測定する系を開発し、その臨床的有用性について検討を行った。新たに開発したHMW-Ad測定法の原理を簡単に述べると、検体をProteinase-Kで30分間前処理することにより、HMW以外のフォームは分解されるため、残ったものを通常のELISAで測定することによってHMWあるいはHMWRが測定できるというものである。実際に300名弱の入院患者について本測定法を使用してHMW, HMWRを測定し、インスリン抵抗性の診断(インスリン抵抗性の簡便な指標であるHOMA-IR(homeostasis model assessment)が2.5以上とした)や、メタボリックシンドロームの診断にとって総アディポネクチンの血中レベルと比較しても有用であるかについてROC(receiver operator characteristics)解析を行ったところ、HMWRが総アディポネクチンと比較しても最もAUC(area under the curve)の面積が大きく、従って優れた診断法であることが示唆された。我々の結果と一致して、糖尿病患者に対するチアゾリジン誘導体治療によるインスリン抵抗性改善の度合いが、総アディポネクチンレベルではなくHMWRの変化と有意に相関していることが報告されている。また、ブドウ糖負荷試験の2時間値とHMWRが総アディポネクチン値と比べても有意に相関していることも報告されており、高分子量アディポネクチン測定法の優れた臨床的有用性が確認されつつあるといえる。

種々の転写因子の共通の転写共役因子であるCBP(cAMP response element binding protein(CREB) binding protein)のヘテロ欠損マウスでは、高脂肪食下での脂肪細胞の肥大化やインスリン抵抗性の惹起の抑制がPPAR γ ヘテロ欠損マウスに比しても顕著であった。このことより、脂肪細胞の肥大化にはPPAR γ に依存した経路とPPAR γ に依存しない経路の2つの経路があることを明らかにした(Nature Genetics 30:221-226, 2002)(成果12)。

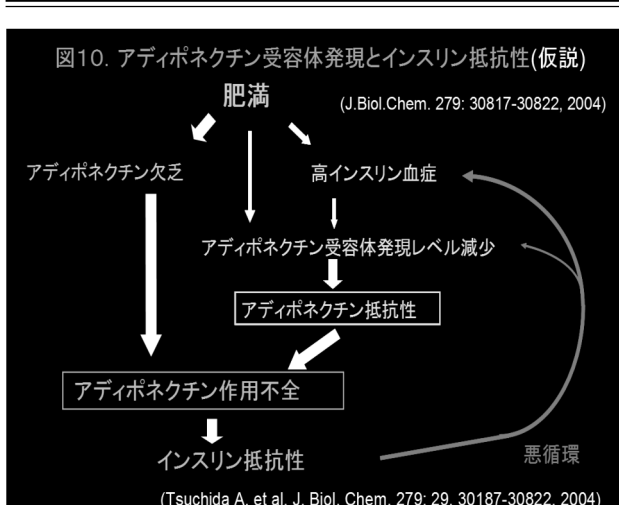
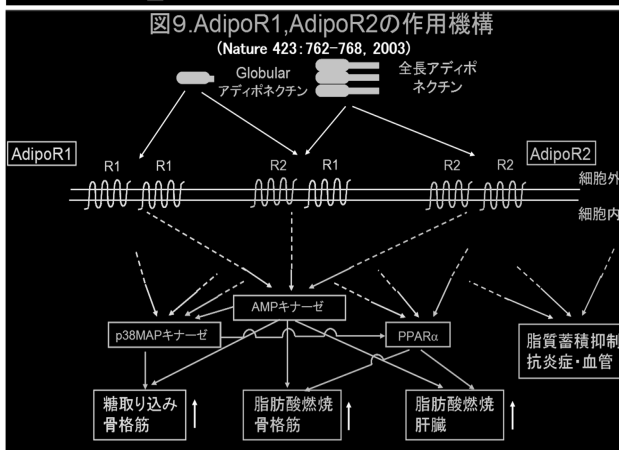
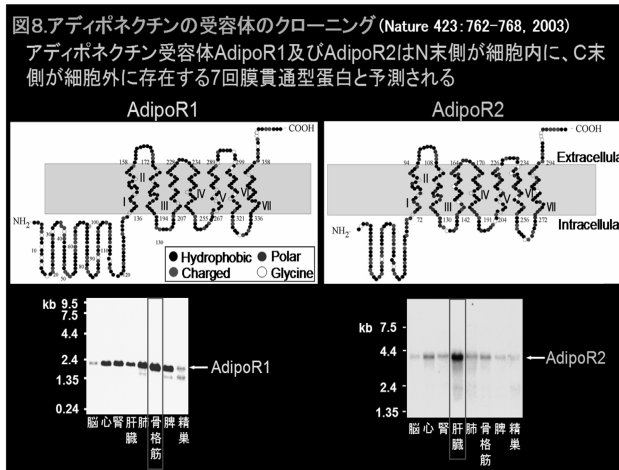


(3) 2型糖尿病の遺伝的素因と分子病態を標的とした治療法・薬剤の開発:

(2)で述べたように、アディポネクチン受容体のアゴニストはエネルギー燃焼を促進し生活習慣病の根本的治療法となると考えられたため、アディポネクチン受容体のクローニングを試みた。骨格筋のcDNAライブラリー中の個々のcDNAを単一のBaF細胞にtransfectionし、蛍光色素でラベルしたgAdiponectin(globular adiponectin)に結合している細胞をFACS(fluorescence-activated cell sorter)を利用して分離した。さらに別の色素でラベルしたアディポネクチンで置き換えられ、アディポネクチンに特異的に結合していると考えられる細胞のみを選択することによってアディポネクチン受容体(AdipoR1)をクローニングすることに成功した(Nature 423:762-769, 2003)(成果13)。更にゲノムデータベースでホモロジー検索を行ったところAdipoR1は種を超えて存在し酵母にまでさかのぼることができた。しかもこのホモログ(YOL002c)を欠損した酵母は脂肪酸の利用が出来なくなることからYOL002cは脂肪酸酸化に重要な役割を果たすことが既に報告されていた。このことは、AdipoR1が脂肪酸燃焼促進作用を持つアディポネクチンの受容体であることを強く支持していた。また、AdipoR1と高い相同性(アミノ酸レベルで66.7%)を示す遺伝子が哺乳動物では1遺伝子存在し、これをAdipoR2と命名した。AdipoR1は骨格筋に多く発現が認められたのに対し、AdipoR2は肝臓に多く発現が認められた。アミノ酸の一次配列からSOSUI(<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosui/menu0.html>)などの二次構造予測プログラムによってその二次構造を予測したところAdipoR1とR2は共に7回膜貫通型の構造を有し、G蛋白質共役型受容体(GPCR:G protein coupled receptor)である可能性が考えられた(図8)。しかしながら受容体のN末端ならびにC末端を免疫染色することによって、N末端側が細胞内、C末端側が細胞外とな

る topology をとることが判明し、更に、GPCR の既知のセカンドメッセージに変化が認められなかったことから、AdipoR1, AdipoR2 は GPCR とは異なった受容体ファミリーに属するものと考えられた。AdipoR1 もしくは AdipoR2 の培養細胞への発現は、globular アディポネクチン及び全長アディポネクチンの特異的結合を増加させ、アディポネクチンによる AMPK、p38MAPK 及び PPAR α の活性化を増強し、脂肪酸燃焼及び糖取り込みの促進を増強した。更にアディポネクチンによる AdipoR を介した脂肪酸燃焼及び糖取り込みの促進作用は、優性抑制型 AMPK あるいは p38MAPK の特異的阻害剤によって、部分的ではあるが抑制された。これらの結果より、アディポネクチンは AdipoR を介した AMPK 及び p38MAPK の活性化によって少なくとも一部、脂肪酸燃焼及び糖取り込みを促進していることが示唆された。逆に siRNA を用いて内因性 AdipoR1 もしくは R2 の発現レベルを低下させると、globular アディポネクチン及び全長アディポネクチンの細胞膜表面への特異的結合が減少し、アディポネクチンによる PPAR α の活性化や脂肪酸燃焼・糖取り込み促進効果が減弱した。以上の結果から AdipoR1, R2 が確かにアディポネクチンの作用を伝達するアディポネクチン特異的受容体であることが確認された (図 9)。更に、肥満に伴う高インスリン血症で Foxo1 が活性化され、アディポネクチン受容体の発現レベルが低下し、in vivo におけるアディポネクチン受容体数が減少することによって、アディポネクチン抵抗性が惹起され、アディポネクチン欠乏とあいまってインスリン抵抗性を更に増強するという、生活習慣病発症・進展の悪循環メカニズムを初めて提唱した (図 10) (J. Biol. Chem. 279: 30817-22, 2004) (成果 14)。

アディポネクチン受容体の特異的アゴニストを同定するために、アディポネクチンの立体構造解析を行い、植物性生体防御ペプチドのオスモチンがアディポネクチンと立体構造上のホモロジーを示すことを明らかにした。更に、オスモチンの酵母における受容体 PHO36 (YOL002c) が AdipoR1 とホモロジーを有すること、オスモチンが哺乳類アディポネクチン受容体を介して糖・脂質代謝に重要な AMP キナーゼを活性化すること、更にはオスモチンが血糖降下作用があることを初めて明らかにした。オスモチンが消化・分解されにくくかつ吸収されることから、経口可能なアディポネクチン受容体アゴニストとして期待できることを明らかにした (Molecular Cell. 17:171-80, 2005) (成果 15)。オスモチンとその類似物質が自然界に存在しヒトが日常的に摂取している野菜・果物に豊富に存在するという事実から、オスモチン類似の化合物のスクリーニングによって、アディポネクチン作動薬を開発できる可能性が高まったと考えられる。



〈国内外での成果の位置づけ〉

日本人における 2 型糖尿病感受性遺伝子座を罹患同胞対法による全ゲノム解析によって計 9 箇所の染色体領域にマップできたのは我々のグループが初めてである。その後これまで日本人を対象とした罹患同胞対による 2 型糖尿病の全ゲノム解析は計 3 つのグループ (門脇、岩崎、笹月ら) によってなされているが、染色体 1 番の領域 (11p13-p12) は門脇、笹月らによる検討で、一致して 2 型糖尿病との連鎖を認めており、しかも LOD 値がそれぞれ 3.08, と高く、有望な領域である。今後 SNP を利用した相関解析などによる本領域に位置する 2 型糖尿病感受性遺伝子の同定が期待される。染色体 1 1 番以外には染色体 2 番、6 番の領域で門脇、岩崎らによる検討で、互いに比較的近い領域に 2 型糖尿病との連鎖を認めており、我々の結果が一部確認できたと考えられる。また、2 型糖尿病感受性遺伝子として明らかにしたアディポネクチン

ン遺伝子欠損マウスを作製・解析しアディポネクチンの生理的な役割を初めて解明した。アディポネクチン欠損マウスはその後他のグループによっても作製・解析されたが我々と同様の結果が得られており、アディポネクチン欠損によってインスリン抵抗性が惹起されることが確認されたと考えられる。

このように日本人2型糖尿病感受性遺伝子座を罹患同胞対法による全ゲノム解析によって計9箇所の領域にマップし、そのうち染色体1番、3番、20番の領域については2型糖尿病感受性遺伝子そのものを同定しえたのは、我々のアプローチが有効であることを示している。血中アディポネクチン低値が将来の2型糖尿病、心筋梗塞の発症リスクを上昇させることが、ヒトの前向き研究によっても、明らかになっており、アディポネクチン遺伝子多型などに起因する遺伝素因や高脂肪食などによる環境因子によって血中アディポネクチン低値となることが、インスリン抵抗性を惹起し、2型糖尿病を発症させやすくしているという「アディポネクチン仮説」(成果16)は世界的にもコンセンサスを得ている。更に我々は、アディポネクチンの特異的な受容体が単離・同定できれば、アディポネクチン受容体アゴニストの開発等、2型糖尿病・インスリン抵抗性の根本的治療薬の開発に直結すると考え、発現クローニング法によって初めてヒトアディポネクチンの特異的な受容体を単離・同定することに成功し、世界的にも極めて高い評価を受けている。更に、自然界に存在し、我々が日常的に摂取している植物性ペプチドの立体構造がアディポネクチンに類似し、実際にアディポネクチン受容体に結合してその作用を発揮することを見出したことは、今後アディポネクチン受容体アゴニストの開発が高い確率で期待できることを示唆しており、画期的な成果である。染色体3番、20番、1番以外の領域については、特に11番についてdense SNPを利用した連鎖不平衡マッピングを遂行しており、興味深いSNPを同定しており、今後最終的な2型糖尿病感受性遺伝子の同定が期待できる。今後もこれまでのアプローチを継続・発展させて2型糖尿病感受性遺伝子の全面的な同定を目指す。また、アディポネクチン受容体とそのCo-factorを同定し、アディポネクチンのシグナル伝達機能の全面的な解明を行って行く。その上で、2型糖尿病感受性遺伝子やアディポネクチンの作用を伝達する鍵分子を標的とする2型糖尿病の根本的治療薬を開発する。研究遂行のため、今後も3省庁による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する論理指針」を遵守し、研究を遂行する。我々はSNPの遺伝子型など、究極の個人情報ともいえる情報が第三者に漏洩することがないように、独自に特殊シールを利用した個人情報匿名化システム (J. Hum. Genet.48:327-30, 2003) (成果17) を開発した。本システムは東京大学医学部附属病院で行われる全てのヒトゲノム・遺伝子解析研究に利用されておりこれまで多数の利用実績を積んでいる。

9.達成できなかったこと、予想外の困難、その理由：

染色体1番、3番、20番以外の染色体領域についてはこれまでのところ2型糖尿病感受性遺伝子の同定までは至っていない。これらの領域には明確な候補遺伝子がないか、あっても既にSNPによる相関解析の結果が否定的であった。そのような場合には当該領域をcoverするSNPによるマップを作製し、網羅的に相関解析を行う必要があり、最終的に感受性遺伝子の同定まで至るには時間がかかるためである。しかしながら染色体11番の領域については日本人における比較的高頻度のSNPからなる

evenly spaced SNP mapを利用した相関解析によって2型糖尿病感受性遺伝子の絞込みを効率よく遂行しており、今後はDNAチップによる発現解析などによる情報も取り入れて、2型糖尿病感受性SNPとしての事前確率を上げた上で患者対照相関解析を引き続き進めて行く。

10.今後の課題：

日本人2型糖尿病感受性遺伝子の染色体上の位置情報と、糖尿病モデル動物や、ヒト組織を利用したDNAチップ解析による発現情報などを有機的に統合することにより、罹患同胞対法で同定した9箇所の日本人2型糖尿病感受性遺伝子座で染色体1、3、20番以外の領域についても2型糖尿病感受性遺伝子の全面的な同定を目指す。また、アディポネクチン受容体とそのCo-factorを同定し、アディポネクチンのシグナル伝達機能の全面的な解明を行って行く。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 0304241542
Mori Y, Otabe S, Dina C, Yasuda K, Populaire C, Lecoeur C, Vatin V, Durand E, Hara K, Okada T, Tobe K, Boutin P, Kadowaki T, Froguel P. Genome-wide search for type 2 diabetes in Japanese affected sib-pairs confirms susceptibility genes on 3q, 15q, and 20q and identifies two new candidate loci on 7p and 11p. *Diabetes* 51:1247-1255 (2002)
- 0304241548
Hara K, Boutin P, Mori Y, Tobe K, Dina C, Yasuda K, Yamauchi T, Otabe S, Okada T, Eto K, Kadowaki H, Hagura R, Akanuma Y, Yazaki Y, Nagai R, Taniyama M, Matsubara K, Yoda M, Nakano Y, Tomita M, Kimura S, Ito C, Froguel P and Kadowaki T. Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes* 51:536-540 (2002)
- Hara K, Horikoshi M, Kitazato H, Ito C, Noda M, Ohashi J, Tokunaga K, Nagai R, and Kadowaki T. Association of Hepatocyte Nuclear Factor-4 α P2 Promoter Haplotypes With Type 2 Diabetes in the Japanese Population. *Diabetes*, in press, 2006
- Horikoshi M, Hara K, Ohashi J, Miyake K, Ito C, Kasuga M, Nagai R and Kadowaki T. A polymorphism in the AMPK α 2 subunit gene is associated with insulin resistance and type 2 diabetes in Japanese. *Diabetes*, in press (2006)
- Hara K, Horikoshi M, Kitazato H, Yamauchi T, Ito C, Noda M, Ohashi J, Froguel P, Tokunaga K, Nagai R, Kadowaki T. Absence of an association between the polymorphisms in the genes encoding adiponectin receptors and type 2 diabetes. *Diabetologia* 48:1307-14 (2005)
- 0304241552
Hara K, Tobe K, Okada T, Kadowaki H, Akanuma Y, Ito C, Kimura S, Kadowaki T. A genetic variation in the PGC-1 gene could confer insulin resistance and susceptibility to Type II diabetes. *Diabetologia* 45:740-743 (2002)
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson

- C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. *Nature Medicine* 7:941-946 (2001)
8. 0304241544
Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M, Matsui J, Eto K, Yamashita T, Kamon J, Satoh H, Yano W, Froguel P, Nagai R, Kimura S, Kadowaki T and Noda T. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J. Biol. Chem.* 277: 25863-25866 (2002)
 9. 0304241536
Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB and Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine* 8:1288-1295 (2002)
 10. 0304241533
Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimozawa N, Hioki K, Uchida S, Ito Y, Matsui J, Eto K, Komeda K, Tsunoda M, Murakami K, Ohnishi Y, Yamamura K, Ueyama Y, Froguel P, Kimura S, Nagai R and Kadowaki T. Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and apoE deficient mice from atherosclerosis. *J. Biol. Chem.* 278: 2461-2468 (2003)
 11. 0404162303
Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, Hara K, Hada Y, Vasseur F, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J. Biol. Chem.* 278:40352-40363 (2003)
 12. 0304241546
Yamauchi T, Oike Y, Kamon J, Waki H, Komeda K, Tsuchida A, Date Y, Li MX, Miki H, Akanuma Y, Nagai R, Kimura S, Saheki T, Nakazato M, Naitoh T, Yamamura K and Kadowaki T. Increased insulin sensitivity despite lipodystrophy in Crebbp heterozygous mice. *Nature Genetics* 30: 221-226 (2002)
 13. 0404162248
Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423:762-769 (2003)
 14. Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, Hada Y, Maki T, Takekawa S, Kamon J, Kobayashi M, Suzuki R, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Froguel P, Nakae J, Kasuga M, Accili D, Tobe K, Ueki K, Nagai R, Kadowaki T. Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J. Biol. Chem.* 279: 30817-30822 (2004)
 15. Narasimhan ML, Coca MA, Jin J, Yamauchi T, Ito Y, Kadowaki T, Kim KK, Pardo JM, Damsz B, Hasegawa PM, Yun DJ, Bressan RA. Osmotin is a homolog of mammalian adiponectin and controls apoptosis in yeast through a homolog of mammalian adiponectin receptor. *Molecular Cell* 17:171-80 (2005)
 16. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *26:439-51*, (2005)
 17. 0404162255
Hara K, Ohe K, Kadowaki T, Kato N, Imai Y, Tokunaga K, Nagai R, Omata M. Establishment of a method of anonymization of DNA samples in genetic research. *J Hum Genet* 48:327-330 (2003)
 18. Mori T, Sakaue H, Iguchi H, Gomi H, Okada Y, Takashima Y, Nakamura K, Nakamura T, Yamauchi T, Kubota N, Kadowaki T, Matsuki Y, Ogawa W, Hiramatsu R, Kasuga M. Role of Kruppel-like factor 15 (KLF15) in transcriptional regulation of adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 280: 12867-12875 (2005)
 19. Suzuki R, Tobe K, Aoyama M, Sakamoto K, Ohsugi M, Kamei N, Nemoto S, Inoue A, Ito Y, Uchida S, Hara K, Yamauchi T, Kubota N, Terauchi Y, Kadowaki T. Expression of DGAT2 in white adipose tissue is regulated by central leptin action. *J. Biol. Chem.* 280:3331-7 (2005)
 20. Oishi Y, Manabe I, Tobe K, Tsushima K, Shindo T, Fujii K, MD; Nishimura, Maemura K, Yamauchi T, Kubota N, Suzuki R, Kitamura T, Akira S, Kadowaki T, Nagai R. Kruppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. *Cell Metabolism* 1: 27-39 (2005)
 21. Kamon J, Yamauchi T, Muto S, Takekawa S, Ito Y, Hada Y, Ogawa W, Itai A, Kasuga M, Tobe K, Kadowaki T. A novel IKKbeta inhibitor stimulates adiponectin levels and ameliorates obesity-linked insulin resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323:242-8 (2004)
 22. Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Kita S, Ito Y, Hada Y, Uchida S, Tsuchida A, Takekawa S, and Kadowaki T. Generation of globular fragment of adiponectin by leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1. *Endocrinology* 146: 790-6 (2004)
 23. Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Yano W, Suzuki R, Ueki K, Takamoto I, Satoh H, Maki T, Kubota T, Moroi M, Okada-Iwabu M, Ezaki O, Naigi R, Ueta Y, Kadowaki T, Noda T. Insulin receptor substrate-2 plays a crucial role in β cells and the hypothalamus. *J. Clin. Invest.* 114:917-927 (2004)
 24. Matsui J, Terauchi Y, Kubota N, Takamoto I, Eto K, Yamashita T, Komeda K, Yamauchi T, Kamon J, Kita S, Noda M, Kadowaki T. Pioglitazone reduces islet triglyceride content and restores impaired glucose-stimulated insulin secretion in heterozygous PPAR β -deficient mice on a high-fat diet. *Diabetes* 53: 2844-2854, (2004)
 25. Terauchi Y, Matsui J, Kamon J, Yamauchi T, Kubota N, Komeda K, Aizawa S, Akanuma Y, Tomita M, Kadowaki T Increased serum leptin protects from adiposity despite the increased glucose uptake in white adipose tissue in mice lacking p85alpha PI 3-kinase. *Diabetes* 53: 2261-2270 (2004)
 26. Suzuki R, Tobe K, Aoyama M, Yamauchi T, Kamon J,

- Kubota N, Terauchi Y, Yoshimitsu H, Matsuhisa M, Nagasaka S, Ogata H, Tokuyama K, Nagai R, Kadowaki T. Both insulin signaling defects in the liver and obesity contribute to insulin resistance and cause diabetes in IRS2-/- mice. *J. Biol. Chem.* 279: 25039-25049 (2004)
27. Tsuchida A, Yamauchi T, Kadowaki T. Nuclear receptors as targets for drug development: molecular mechanisms for regulation of obesity and insulin resistance by peroxisome proliferator-activated receptor gamma, CREB-binding protein, and adiponectin. *J. Pharmacol. Sci.* 97:164-70 (2005)
28. Kadowaki T, Kubota N. Protective Role of Imatinib in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 24:801-803 (2004)
29. Sasaoka T, Wada T, Fukui K, Murakami S, Ishihara H, Suzuki R, Tobe K, Kadowaki T, Kobayashi M. SH2-containing inositol phosphatase 2 predominantly regulates akt2, and not akt1, phosphorylation at the plasma membrane in response to insulin in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 279:14835-14843 (2004)
30. Shimoaka T, Kamekura S, Chikuda H, Hoshi K, Chung U, Akune T, Maruyama Z, Komori T, Matsumoto M, Ogawa W, Terauchi Y, Kadowaki T, Nakamura K, Kawaguchi H. Impairment of bone healing by insulin receptor substrate-1 deficiency. *J. Biol. Chem.* 279:15314-15322 (2004)
31. Yamashita T, Eto K, Okazaki Y, Yamashita S, Yamauchi T, Sekine N, Nagai R, Noda M, and Kadowaki T. Role of UCP-2 up-regulation and TG accumulation in impaired glucose-stimulated insulin secretion in a β -Cell lipotoxicity model overexpressing SREBP-1c. *Endocrinology* 145:3566-3577 (2004)
32. Yamauchi T, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Froguel P, Nagai R, Kadowaki T. Dual roles of adiponectin/Acrp30 in vivo as an anti-diabetic and anti-atherogenic adipokine. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 3:243-254, 2003
33. Kadowaki T, Hara K, Yamauchi T, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R. Molecular mechanism of insulin resistance and obesity. *Exp. Biol. Med.* 228:1111-1117 (2003)
34. Vasseur F, Helbecque N, Dina C, Lobbens S, Delannoy V, Gaget S, Boutin P, Vaxillaire M, Lepretre F, Dupont S, Hara K, Clement K, Bihain B, Kadowaki T, Froguel P. Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. *Hum Mol Genet* 11:2607-2614 (2002)
35. Hara K, Noda M, Waki H, Tobe K, Yamauchi T, Kadowaki H, Satou H, Tsukamoto K, Nagamatsu S, Yamagata K, Matsuzawa Y, Akanuma Y, Kimura S, Kadowaki T. Maturity-onset diabetes of the young resulting from a novel mutation in the HNF-4alpha gene. *Intern Med* 41:848-852 (2002)
36. Kadowaki T, Hara K, Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Yamauchi T, Eto K, Kadowaki H, Noda M, Hagura R, Akanuma Y. The role of PPAR gamma in high-fat diet-induced obesity and insulin resistance. *J Diabetes Complications* 16:41-45 (2002)
37. Mori H, Ikegami H, Kawaguchi Y, Seino S, Yokoi N, Takeda J, Inoue I, Seino Y, Yasuda K, Hanafusa T, Yamagata K, Awata T, Kadowaki T, Hara K, Yamada N, Gotoda T, Iwasaki N, Iwamoto Y, Sanke T, Nanjo K, Oka Y, Matsutani A, Maeda E, Kasuga M. The Pro12->Ala substitution in PPAR-gamma is associated with resistance to development of diabetes in the general population: possible involvement in impairment of insulin secretion in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* 50:891-894 (2001)
38. Okada T, Tobe K, Hara K, Yasuda K, Kawaguchi Y, Ikegami H, Ito C, Kadowaki T. Variants of neurogenin 3 gene are not associated with Type II diabetes in Japanese subjects. *Diabetologia* 44:241-244 (2001)
39. Oike Y, Akao M, Yasunaga K, Yamauchi T, Morisada T, Ito Y, Urano T, Kimura Y, Kubota Y, Maekawa H, Miyamoto T, Miyata K, Matsumoto SI, Sakai J, Nakagata N, Takeya M, Koseki H, Ogawa Y, Kadowaki T, Suda T. Angiopoietin-related growth factor antagonizes obesity and insulin resistance. *Nature Medicine* 11: 400-8 (2005)
- (出願特許)
- 1) 発明の名称：2型糖尿病の診断又は検査方法
 ①発明者：原 一雄、門脇 孝 他3名
 ②特許番号：特開2004-049033
 ③出願日：2002年7月17日
 ④出願人：科学技術振興事業団
- 2) 発明の名称：アディポネクチンの新規用途
 ①発明者：門脇孝、山内敏正、高田誠、他1名
 ②出願日：2003年5月20日
 ③出願人：門脇孝、住友製薬(株)
- 3) 発明の名称：試料の前処理方法及びこれを利用する免疫学的測定方法
 ①発明者：海老沼宏幸、矢後弘和、秋元優夏、他3名
 ②出願日：2003年10月15日
 ③出願人：第一化学薬品(株)、門脇孝
- 4) 発明の名称：多量体アディポネクチンの分別測定法
 ①発明者：海老沼宏幸、矢後弘和、秋元優夏、他3名
 ②出願日(予定時期)：2003年10月15日
 ③出願人：第一化学薬品(株)、門脇孝
- 5) 発明の名称：多量体アディポネクチンの分別測定法
 ①発明者：海老沼宏幸、矢後弘和、秋元優夏、他3名
 ②出願日：2003年10月15日
 ③出願人：第一化学薬品(株)、門脇孝
- 6) 発明の名称：A homolog of human adiponectin receptor controls osmotin-induced apoptosis in yeast
 ①発明者：Narasimhan ML, Yun DJ, Bressan RA, 山内敏正、門脇孝
 ②出願日：2004年9月30日
 ③出願人：Narasimhan ML, Yun DJ, Bressan RA, 山内敏正、門脇孝