

糖尿病発症関連遺伝子の解明

●岡 芳知¹⁾ ◆鈴木 進¹⁾ ◆檜尾 好徳²⁾ ◆石原 寿光²⁾ ◆平井 完史²⁾ ◆片桐 秀樹³⁾

1) 東北大学大学院医学系研究科分子代謝病態学分野 2) 病院・糖尿病代謝科 3) 大学院医学系研究科創生応用医学研究センター

〈研究の目的と進め方〉

糖尿病の大多数を占める2型糖尿病は遺伝的背景に環境因子が加わって発症する疾患であるが、その病態からは、インスリン分泌障害とインスリン作用障害（インスリン抵抗性）による疾患ということが出来る。したがって、2型糖尿病の遺伝素因の解明には、インスリン分泌とインスリン作用における重要分子の遺伝子（候補遺伝子）を取り上げて検討するのが有力な方法のひとつである。しかし、糖尿病発症関連遺伝子として報告されている陰に、膨大なネガティブデータが存在するのも事実である。一方、全ゲノムで変異を調べるアプローチもあるが、たとえばSNPを調べるとすると膨大な仕事量となり、ましてや1研究室ではとうてい完遂できない。しかし、全ゲノムへのアプローチ法のひとつであるsib-pair解析からは、糖尿病発症関連遺伝子が存在すると思われる遺伝子座がいくつか報告されている。そこで、これらを組み合わせ、候補遺伝子座に存在する候補遺伝子に着目してcase-control study（症例－対照解析）を進めることで、「ヒット」率を高めようと考えた。また、新たにインスリン分泌・作用に重要と判明した遺伝子については、適宜、候補遺伝子として、case-control studyを進めることとした。

本研究では2型糖尿病候補遺伝子を絞り込むために、もうひとつ別のアプローチも取ることにした。2型糖尿病は進行性疾患である。最初は食事・運動療法だけで血糖コントロールが可能であるが、次には経口糖尿病薬が必要となり、次第に強力なものに切り替えざるを得ず、最終的には、インスリン注射が必要となることも多い。このような疾患の進行性は、膵β細胞機能の進行性低下のためであることが知られているが、その実態は膵β細胞量の減少であるとの説が有力になりつつある。したがって、膵β細胞の維持・再生に関わる遺伝子は2型糖尿病発症関連遺伝子の有力な候補と考えられる。我々は1998年に世界に先駆けて糖尿病をきたす遺伝性疾患ウオルフラム症候群の遺伝子のクローニングに成功し、WFS1と名づけた。この症候群では膵β細胞が進行性に減少することから、WFS1は膵β細胞の維持・再生機構に関わることが推測され、WFS1の機能解析から明らかになるWFS1関連遺伝子は有力な糖尿病候補遺伝子と考えられる。そこで、我々は同症候群の病態ならびにWFS1蛋白の機能を解析する目的でWFS1欠損マウスの作成し、解析を進めた。

〈研究開始時の研究計画〉

2型糖尿病発症関連遺伝子の解明

(1) 候補遺伝子アプローチ

我々が収集した2型糖尿病患者と、正常対照者として60歳以上で糖尿病を発症しておらず、2親等内に糖尿病患者がいない者（いわばスーパーノーマル者）の間で、候補遺伝子について解析する。すなわち、case-control studyを行う。さらに、遺伝子変異（多型）と糖尿病の臨床像との関連を検討する。また、糖負荷試験時に血中インスリンも同時に測定した耐糖能正常者ではインスリン分泌不

全とインスリン抵抗性が評価できるので、この群でも遺伝子変異（多型）がインスリン分泌不全あるいはインスリン抵抗性と関連するかを検証する。これによって、case-control studyの結果を、さらに補強することができる。

(2) 膵β細胞維持再生機構からみた候補遺伝子

ウオルフラム症候群原因遺伝子WFS1の機能解析から明らかになるWFS1関連遺伝子は糖尿病発症関連遺伝子の有力な候補と考えられる。そこでWFS1欠損マウスを作成し、マウス個体の病態解析ならびにWFS1蛋白の機能解析を進める。これによって、糖尿病発症機構についての新しい領域を開拓するとともに、新たな候補遺伝子を見出すことができる。

なお、本研究は、3省庁合同指針「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠して、計画、実施される。糖尿病患者、正常対照者は遺伝子解析研究について、自由意志による同意を得たA群資料とする。いつでも同意撤回は可能である。個人情報の保護に留意して、個人情報管理者により、連結可能匿名化（糖尿病患者）、連結不可能匿名化（正常対照者）して、遺伝子解析が実施される。必要により、また患者の希望により遺伝カウンセリングを実施し、患者の心理的ケアを計る（遺伝カウンセリング担当：鈴木進）。本研究での遺伝子解析に関しては、平成13年9月17日の東北大学医学部倫理委員会で承認されている（承認番号2001-068）

〈研究期間の成果〉

(1) 候補遺伝子アプローチ

1) 糖尿病発症関連遺伝子としてのglutamate dehydrogenase (GLUD1) 遺伝子の意義

glutamate dehydrogenaseは膵β細胞からのインスリン分泌に重要であり、その活性変化はインスリン分泌変化をきたしうる。我々は日本人新生児低血糖症のなかに本遺伝子の変異(Y266C)を見出し、これが恒常的に活性型となる遺伝子変異であり、そのためのインスリン分泌過剰による低血糖であることを明らかにした。そのインスリン分泌における役割を培養細胞での過剰発現系を用いて解析したところ、特に低いグルコース濃度（2-5mM）でのインスリン分泌において、インスリン分泌増加を生じる役割を果たしていることが明らかとなった（論文業績10）。この酵素の活性低下をきたす遺伝子変異（多型）はインスリン分泌不全型の2型糖尿病をきたすことが予想されるが、case-control studyでは有意な変異（多型）を見出すことができなかった（未発表）。おそらく、その頻度は少なく、数百例の解析では見出せないことが推測された。

2) Urotensin II (UTS2), およびUrotensin II受容体 (GPR14) 遺伝子多型と2型糖尿病発症

Urotensin II (UTS2)は日本人2型糖尿病の候補遺伝子座の一つ、1p36-p32に存在し、最も強力な脈管作働物質で

ある。そこで、2型糖尿病におけるUTS2遺伝子多型の関与を検討した。2型糖尿病患者152例、対照群の超正常者（60歳以上で糖尿病を発症しておらず、2親等内に糖尿病患者なし）122例、耐糖能正常者（normal glucose tolerance: NGT）268例を対象として、同意を得た上で遺伝子解析を施行した。各群30名を対象にUTS2遺伝子領域をPCR直接シーケンス法で変異を検索し、アミノ酸置換を伴う多型、T21MとS89Nを同定した。次に、全対象者において、この遺伝子多型をPCR-RFLP法で同定し、以下の結果を得た。

・S89N多型のアレル頻度は、2型糖尿病患者で超正常者およびNGT症例に比べて有意に高かった（それぞれP=0.0018、P=0.0011）。これに対し、T21M多型のアレル頻度は2型糖尿病患者、超正常者、NGT者間に差異を認めなかった。

・次に、NGT者のなかで比較すると、89Nアレルを有する者のHbA1c値（P=0.0056）、GTT120分血糖値（P=0.0071）、GTT前インスリン値（P=0.0032）、GTT120分のインスリン値（P=0.0016）、GTT時の血糖値総和（P=0.0041）、GTT時のインスリン値総和（P=0.0089）、およびHOMA(R)（P=0.0063）は、89Sアレルを有する者に比べて有意に高値であった。すなわち、89Nアレルを有

する者は正常耐糖能であっても、89Sアレルを有する者に比べてインスリン抵抗性が強い。一方、T21M多型とGTT時の血糖値、インスリン値との関連性は認めなかった。

・以上の結果より、UTS2の89N多型を有する者はインスリン抵抗性が高く、2型糖尿病を発症しやすいと考えられる。これらの結果は論文業績20として発表した。

・正常者で検討するとS89N多型は野生型に比べて、血漿および尿中Urotensin II濃度が高値であった。2型糖尿病患者では正常者に比べて血漿および尿中Urotensin II濃度は高値となるが、2型糖尿病患者の中で、S89N多型を有する症例は野生型症例に比べて、血漿および尿中Urotensin II濃度が有意に低値であることが明らかになった。

・Urotensin II受容体、GPR14遺伝子多型を検索し、非翻訳領域に2つのSNPを同定した。糖尿病患者と正常者間でSNP頻度に差がなく、また耐糖能正常者の検討でも、インスリン感受性やインスリン分泌能にSNPとの関連性を認めなかった。UTS2とは異なり、GPR14遺伝子は2型糖尿病発症に関与が少ないことが示唆された（論文業績27）。

Table 1. Urotensin II遺伝子S89N 多型の頻度

| Genotype | Elderly controls | NGT | Type 2 diabetes |
|------------|------------------|-------------|-----------------|
| 89Asn/Asn | 3 (2.4%) | 16 (6.0%) | 11 (7.2%) |
| 89Ser/Asn | 38 (31.2%) | 74 (27.6%) | 69 (45.4%) |
| 89Ser/Ser | 81 (66.4%) | 178 (66.4%) | 72 (47.4%) |
| Sum | 122 | 268 | 152 |
| P value | 0.0042 | 0.0005 | |
| Allele | Elderly controls | NGT | Type 2 diabetes |
| 89Asn | 44 (18.0%) | 106 (19.8%) | 91 (29.9%) |
| 89Ser | 200 (82.0%) | 430 (80.2%) | 213 (70.1%) |
| Sum | 244 | 536 | 304 |
| χ^2_c | 9.70 | 10.6 | |
| Pc value | 0.0018 | 0.0011 | |
| Odds ratio | 1.94 | 1.73 | |

Means ± SD. (vs. type 2 diabetes)

3) GPLD1遺伝子多型と2型糖尿病発症

2型糖尿病候補遺伝子座の一つ6p22.3-p22.2にある、GPLD1 (Glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D1)は、細胞膜の GPI-glycanを水解し、inositol-glycanを遊離する酵素である。

・アミノ酸置換をとまなうGPLD1遺伝子多型6箇所を同定し、そのひとつのV30I多型では、30Iのアレル頻度が、糖尿病患者では対照群の高齢健常者（60歳以上で糖尿病を発症しておらず、2親等内に糖尿病患者なし）に比べて有意に高く(p=0.012)。また、別の対照である、糖負荷試験で耐糖能が正常であった者に比べても有意に高い(p=0.02)ことを見出した。

・糖負荷試験が行われた耐糖能正常者で検討すると、30Iを有する者のinsulinogenic indexは、30Vを有する者に比べて有意に低値であった(p=0.015)。また、GTT時の血糖値の総和も30Iを有する者が有意に高値であった(p=0.02)

・30Iを有する者は、初期インスリン分泌反応が低く、耐糖能が悪いため糖尿病発症する頻度が高くなる可能性が推測される。GPLD1活性が膵β細胞からのインスリン分泌に関わることを示唆する報告もあることから、日本人2型糖尿病の特徴であるインスリン分泌の第1相の障害がGPLD1多型により一部説明できる可能性が示唆された。

4) 甘味受容体遺伝子多型と2型糖尿病発症

甘味受容体はTAS1R2とTAS1R3のヘテロダイマーで構成される。甘味シグナルの下流分子として、

TRPM5(Transient Receptor Potential like Channel 5)が同定された。TAS1R3とTRPM5は膵β細胞に高発現しており、インスリン分泌に関与することが想定されている。また、TAS1R2とTAS1R3は日本人2型糖尿病の候補遺伝子座の一つ、1p36-p32に存在する。今回、2型糖尿病発症におけるTAS1R2、TAS1R3とTRPM5遺伝子多型の関与について検討した。

・対象は、2型糖尿病患者388例、高齢健常者176例、耐糖能正常者240例

・翻訳領域内にTAS1R2 遺伝子多型を13個同定した。内、8個はアミノ酸置換を伴った。317番アミノ酸ArgまたはGlyがAlaに変異する950C多型のアレル頻度は、2型糖尿病患者で高齢健常者(p=0.0022)、耐糖能正常者(p=0.00023)に比べて有意に高かった。耐糖能正常者で検討すると、950Cアレルを有する症例は950Cアレルを有しない症例に比べて、insulinogenic indexが低く(p=0.0004)、かつ、GTT60、90、120分のIRIとΣIRI(p=0.02)が有意に高い。GTT 0分と120分の血糖値とインスリン濃度で規定されるインスリン感受性指数、ISI compositeは、950C症例で有意に低値であった(p=0.002)。すなわち、950C多型はインスリン初期分泌低下、過剰遅延反応の表現型を示し、2型糖尿病感受性に関連すると想定された。

さらに、健常人を対象とした甘み感受性検査で950Cアレルを有する症例は、有しない症例に比べて甘み感受性が有意に低いことが明らかになった。

Table 2. TAS1R2遺伝子950G/C多型の頻度

| Genotype | Elderly control | NGT | Type 2 |
|-------------|-----------------|-------------|-------------|
| C/C | 0 (0%) | 0 (0%) | 2 (0.5%) |
| C/G | 8 (4.5%) | 10 (4.2%) | 50 (12.9%) |
| G/G | 168 (95.5%) | 230 (96.5%) | 336 (86.6%) |
| Sum | 176 | 240 | 388 |
| χ^2_c | 7.74 | 11.2 | |
| p_c value | 0.021 | 0.0037 | |
| Allele | Elderly control | NGT | Type 2 |
| C | 8 (2.3%) | 10 (2.1%) | 54 (7.0%) |
| G | 344 (97.7%) | 470 (98.3%) | 722 (93.0%) |
| Sum | 352 | 480 | 776 |
| χ^2_c | 9.35 | 13.6 | |
| p_c value | 0.0022 | 0.00023 | |
| Odds ratio | 3.21 | 3.52 | |

(vs Type 2 diabetes)

- ・TAS1R3 遺伝子多型18個を同定したが、いずれのSNPとも2型糖尿病との関連性を認めなかった。
- ・TRPM5遺伝子多型7個を同定したが、いずれのSNPとも2型糖尿病と対照群間で頻度に有意の差異を認めなかった。高血糖の影響のない耐糖能正常者群における検討で、TRPM5遺伝子Ser235Asn多型で、A/Aジェノタイプを有する群は、有しない群に比べ、インスリン抵抗性指数、HOMA(R) が有意に低く(p=0.00000025)、またインスリン感受性指数、ISI0値が有意に高い(p=0.028)。235Nアレルは235Sアレルに比べ、ISI0値が有意に高い(p=0.011)。また、TRPM5遺伝子Ala578Thr多型で、G/Gジェノタイプを有する群は、有しない群に比べ空腹時インスリン濃度が有意に低く(p=0.018)、かつISI0が有意に高い(p=0.0025)。578Aアレルは578Tアレルに比べ、ISI0値が有意に高い(p=0.0135)。以上の検討から、Ser235AsnとA578Thr多型はHOMA(R) が有意に低く、インスリン抵抗性との関連性が示唆された。さらに、健康人を対象とした甘み感受性検査で、Ser235AsnとA578Thr多型は甘み感受性と関連性を認めなかった。
- ・糖負荷時の初期インスリン分泌応答に、味覚細胞が糖を感知して、中枢からインスリン分泌を刺激するCephalic phaseの関与がよく知られている。Cephalic phaseを阻害するとGTT時のインスリン分泌応答が初期分泌低下、過剰遅延反応型へ変化する。TAS1R2 遺伝子950C(317Ala)多型では、甘み感受性が低く、Cephalic phaseが低下して、インスリン初期分泌低下、過剰遅延反応の表現型を示す可能性が想定された。
- ・TRPM5 遺伝子多型、Ser235Asn多型およびAla578Thr多型とインスリン抵抗性の関連性が示唆された。
- ・甘味受容体遺伝子多型と2型糖尿病発症の関連性が示唆される。

5) WRN 遺伝子多型と2型糖尿病発症

ウェルナー症候群は早期老化症候群の代表的疾患である。原因遺伝子が第8染色体短腕のRecQ型DNAヘリカーゼ(WRN 遺伝子)であることが判明し、本遺伝子と糖

尿病など加齢に伴う疾患との関連が注目されている。今回、2型糖尿病患者におけるWRN遺伝子変異および多型の頻度を健常者と比較検討した。

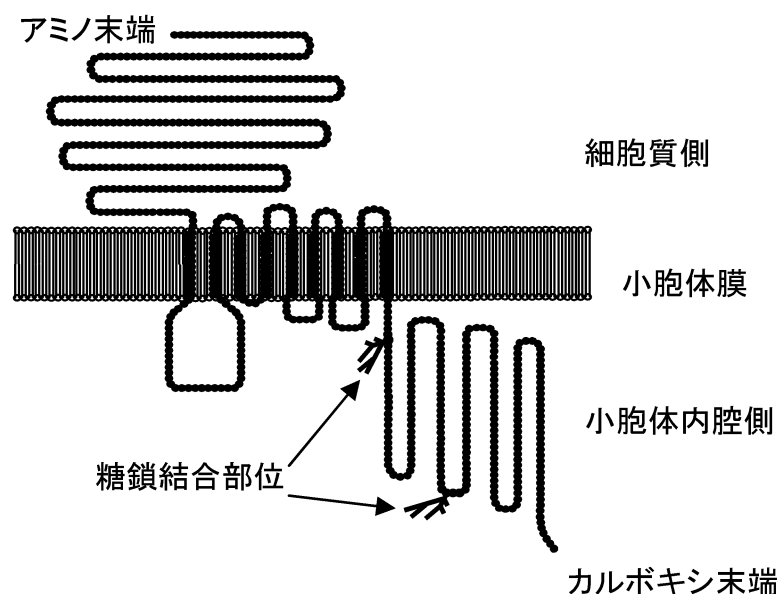
・2型糖尿病症例および対照者では、遺伝子変異は認められなかったが、多型としてCys1367Arg多型を同定した。Cys1367Arg多型は糖尿病患者、正常者間で頻度に差を認めなかった。しかし、1367Argアレルを有するものが、60歳未満の糖尿病患者(6.4%)で耐糖能正常者(15.2%)に比して有意に少ないこと(P<0.05)、また糖尿病発見時年齢45歳未満の糖尿病患者で発見時45歳以上のものと比して有意に少ないことが明らかとなった(P<0.05)。このことより、1367Argアレルが加齢に伴う2型糖尿病発症に対して防御的に関与している可能性が示唆された。なお、これらの結果は論文業績29に発表した。

(2) 膵β細胞維持再生機構からみた候補遺伝子ウオルフラム症候群原因遺伝子WFS1の機能解析

WFS1蛋白は、890個のアミノ酸からなる小胞体の膜蛋白であり、アミノ酸配列から、9-10個の膜貫通領域を持つことが推定されていた。我々は、HAエピトープをアミノ末端あるいはカルボキシル末端に付加したWFS1蛋白のトリプシン消化に対する感受性の違いからWFS1蛋白は9回の膜貫通領域を持ち、アミノ末端が細胞質側に、カルボキシル末端が小胞体内腔に伸びていることを明らかにした。さらに、部位特異的変異導入により、マウスのWFS1蛋白では663番目と748番目のアスパラギン酸残基が糖鎖修飾を受ける部位であることを見出した(論文業績28)。以上の解析により、WFS1蛋白は、図1に示すような構造をとり、細胞質側に約330個、小胞体内腔に約230個のペプチドが伸びていることが予想され、これらの領域が他の蛋白との結合等を介して機能を発揮している可能性が示唆されている。

現在我々は、インスリノーマMIN6細胞においてWFS1蛋白に結合する蛋白の検索を行い、これまでに数種類の蛋白の結合を確認した。現在その細胞機能上の意義に関して検討中である。

図1:WFS1 蛋白の構造



WFS1蛋白が、小胞体に存在することが明らかになって以来、WFS1蛋白と小胞体ストレス応答との関連に興味を持たれてきた。そこで、我々はマウス膵島を小胞体ストレス誘導物質であるタブシガルギンおよびヂチオスレートールで処理した際のWFS1蛋白の発現を検討し、WFS1蛋白の発現が、小胞体ストレスにより増強することを明らかにした。このことは、WFS1が、小胞体ストレス応答のコンポーネントの1つであり、小胞体ストレスから細胞を守る働きを担う可能性を示唆している。

さらにウオルフラム症候群における糖尿病の成因を明らかにするために、WFS1欠損マウスを作製した。129系統のWFS1欠損マウスを、5世代にわたってB6マウスに交配し、129/B6混合系統のWFS1欠損マウスと共に随時血糖測定とブドウ糖負荷試験を行ったところ、129/B6混合系統のKOマウスでは、60%以上のマウスで明確な高血糖を認めた。B6系統のWFS1欠損マウスでは、糖負荷試験で有意な血糖値の上昇と、インスリン分泌反応の低下を認めた。膵島所見としては、いずれのマウスの系統においても、膵(細胞数の進行性の減少が認められ、これがインスリン分泌低下の原因と考えられた。

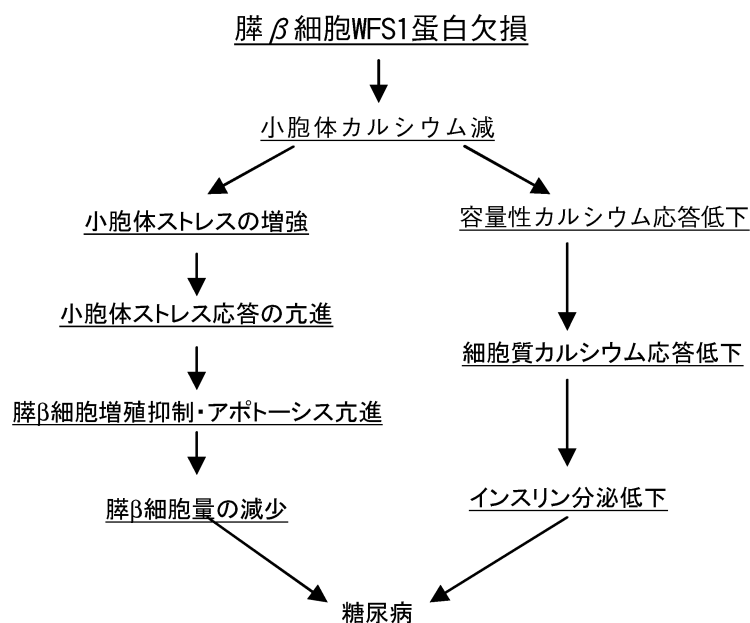
ついで、WFS1が、小胞体ストレス応答のコンポーネントの1つであり、小胞体ストレスから細胞を守る働きを担う可能性が示唆されていたので、B6系統のWFS1欠損単離膵島を用い小胞体ストレスによるアポトーシスの誘導を解析したところ、小胞体ストレス惹起物質であるタブシガルギンおよびツニカマイシンに対し、WFS1欠損マウスの膵島ではアポトーシスによるDNA断片化が亢進していた。しかし、小胞体ストレス経路とは異なる経路でアポトーシスを誘導するTNF α とIFN γ によるDNA断片化については、野生型マウス膵島と差を認めなかった。すなわち、WFS1欠損膵島では小胞体ストレスに対する応答が脆弱になっていると考えられた。そこで、さらに我々は、WFS1欠損膵島での小胞体ストレス応答の詳細を検討した。小胞体ストレス応答では、PERKのリン酸化を起点とする翻訳抑制、ATF6の活性化やIRE1によるXBP1の活性化に始まるシャペロン蛋白の発現誘導が惹起される。WFS1欠損膵島では、PERKリン酸化の亢進、XBP1mRNAのスプライシング増強によるXBP1蛋白発現

の亢進、ATF6の誘導によるシャペロン蛋白の発現増加が認められ、小胞体ストレス応答が亢進していることが観察された。また、小胞体ストレス応答の亢進に伴ってCHOPの発現およびcaspase-3の切断の亢進も認められ、アポトーシスシグナルが活性化されていることも明らかにした。さらに、興味深いことに、WFS1欠損膵島ではBrdUの取り込みが減少しており、(細胞の増殖障害が認められることが明らかとなった。その分子機構に関与するものとして、p21cip1の発現亢進を見出し、また、単離膵島およびMIN6細胞を用いた検討から、小胞体ストレスがp21cip1の発現を転写レベルで増強することを明らかにした。

さらに、WFS1欠損マウス膵島およびアデノウイルスベクターによりWFS1蛋白を過剰発現させた膵島の細胞内カルシウム動態、インスリン分泌を検討した。小胞体からのカルシウム放出を介してインスリン分泌を惹起するカルバコールおよびグルコースでWFS1欠損膵島を刺激すると、インスリン分泌は約30%低下していた。また細胞質のカルシウム濃度変化を β 細胞で測定すると、どちらの刺激に対してもWFS1欠損(細胞において30-40%の低下を認めた。一方、WFS1蛋白を過剰発現させた膵島では、インスリン分泌が両刺激に対し35-50%増加した。そこで、細胞内カルシウム動態制御におけるWFS1蛋白の役割を解析するため、ドキシサイクリン誘導性にWFS1蛋白を過剰発現あるいはノックダウンするHEK293細胞を作製し解析した。その結果、過剰発現細胞では小胞体カルシウム濃度が増加し、さらに小胞体カルシウム枯渇により惹起される容量性カルシウム流入の増加が認められた。対照的に、WFS1蛋白をノックダウンするHEK293細胞では、小胞体カルシウム濃度および容量性カルシウム流入の減少が認められた。

以上のことからWFS1蛋白は、小胞体カルシウムの恒常性の維持に重要な役割を果たしていると考えられる。ウオルフラム症候群では、WFS1蛋白の欠損が小胞体の機能異常を来しインスリン分泌低下をもたらすとともに、小胞体ストレスによる(細胞の増殖抑制・アポトーシスの亢進によって(細胞量の低下に至る結果、糖尿病を発症すると考えられる(図2)。

図2: ウオルフラム症候群における糖尿病発症機構の仮説



2) 国内外での研究の位置づけ

2型糖尿病発症関連遺伝子を見出すというプロジェクトは糖尿病患者の急増という背景もあり、海外でも精力的に行われた。しかし、21世紀に入るところから、数百例の糖尿病患者とそれに対応する正常者を用いたcase-control studyだけでは、false-positiveが多いことが指摘され、case-control studyだけでは評価の高い学術誌には採用されなくなってきた。

そのような中、たとえば、Urotensin 2 (UTS2) 遺伝子多型についての論文が、Diabetologiaという欧州糖尿病学会誌に掲載されたのは、我々がcase-control studyに加えて、耐糖能正常でインスリン分泌不全とインスリン抵抗性が評価できるサンプルでも解析したことが寄与したと思われる。すなわち、この正常者群での遺伝子解析で、case-control studyの結果を補強することができたからである。

本研究において、新生児低血糖症で見出したglutamate dehydrogenase (GLUD1)遺伝子変異Y266Cは、GLUD1の常時活性化によってインスリンが過剰に分泌され低血糖を引き起こすことが示されたが、単に疾患を起こす遺伝子異常にとどまらない。細胞内glutamateがグルコースによるインスリン分泌のメッセンジャーであるとの論文がスイスのグループからNature誌に報告されているが、GLUD1遺伝子変異Y266Cを発現させると、glutamateは減少するにもかかわらず、インスリン分泌は増強されており、この変異体はglutamateメッセンジャー説論争に重要な示唆を与えている。

ウオルフラム症候群原因遺伝子WFS1のノックアウトマウスの作成とその解析は世界で最初におこなったものであり(論文業績26)、1998年の原因遺伝子のクローニング、WFS1の小胞体局在(論文業績5)、ノックアウトマウスの作成と解析(論文業績26)、糖鎖付着部位ならびに小胞体でのオリエンテーション(論文業績28)と、世界をリードしている。小胞体ストレスの糖尿病発症へのかかわりが注目されており、その点でも注目されている。

3) 達成できなかったこと、予想外の困難、及びその理由
case-control studyで有意な遺伝子変異(多型)が見出されても、数百例の解析で得たデータではfalse-positiveが多いことが指摘され、評価の高い学術誌に掲載されなくなった。しかし、解析症例数をたとえば10倍、すなわち数千にすることは、症例の収集、研究費、研究時間などの点で、1研究室で行える範囲を超えている。このように、糖尿病のようなcommon diseaseの遺伝子解析については、単なるcase-control studyの時代は21世紀になると共に消えたといつてよいだろう。

糖尿病発症と関わると思われる遺伝子変異(多型)を見出しても、糖尿病発症に関わる機構を明らかにすることはきわめて困難であった。ひとつには、遺伝子変異(多型)による作用変化がわずかであるために、in vitroの実験で有意差をもって検出することがほとんど不可能に近いからであろう。アミノ酸変異を生じない遺伝子多型の糖尿病発症への関わりとなると、さらに困難となる。

WFS1 associated proteinの同定には多大の時間を要しており、未だに論文発表となっていない。Yeast two hybrid法、免疫沈降物の質量分析などで候補は挙げられてくるが、真にWFS1にassociateしているか否かを検証するのに多大の労力と時間を要している。

小胞体ストレス反応は大きく分けて3つの経路があるが、WFS1がどのような経路で小胞体ストレス反応と関わるかは不明のままである。このようにWFS1の小胞体ストレス反応における位置は不明のままであり、WFS1

関連遺伝子を糖尿病候補遺伝子として解析するところまでは研究は進展しなかった。

<今後の課題>

- 1) 数百人の「ありきたりの」2型糖尿病患者と対照者(正常者)でおこなうcase-control studyは終わった。しかし、もっと特色のある糖尿病患者だけを取り出せば、数百人の患者で行うcase-control studyはまだ十分意味がある。臨床データが十分に整備されデータベース化されている試料を有するか否かが今後の成否を分けるであろう。
- 2) WFS1の小胞体ストレス反応における位置を明らかにすることは重要な課題である。WFS1の機能解明は、小胞体ストレス反応の全く新しい領域を切り開く可能性がある。この中から新たな糖尿病候補遺伝子が出てくるであろう。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

1. Tanizawa Y, Matsuda K, Matsuo M, Ohta Y, Ochi N, Adachi M, Koga M, Mizuno S, Kakjita M, Tanaka Y, Tachibana K, Inoue H, Furukawa S, Amachi T, Ueda K and Oka Y. Genetic analysis of Japanese patients with persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. Nucleotide-binding fold-2 mutation impairs cooperative binding of adenine nucleotides to sulfonylurea receptor 1. Diabetes 49: 114-120, 2000
2. Matsuo M, Trapp S, Tanizawa Y, Kioka N, Amachi T, Oka Y, Ashcroft FM, Ueda K. Functional analysis of a mutant sulfonylurea receptor, SUR1-R1420C, that is responsible for persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. J Biol Chem 275: 41184-91, 2000
3. Mori H, Ikegami H, Seino S, Takeda J, Seino Y, Hanafusa T, Awata T, Kadowaki T, Yamada N, Iwasaki N, Sanke T, Nanjo K, Oka Y, Maeda E and Kasuga M. The Met416→Val Variant in the Glycogen Synthase Gene. Diabetes Care 23: 1709-1710, 2000
4. Yamada T, Katagiri H, Asano T, Inukai K, Tsuru M, Kodama T, Kikuchi M, Oka Y. 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1, an Akt1 kinase, is involved in dephosphorylation of Thr308 of Akt1 in Chinese hamster ovary cells. J Biol Chem 276: 5339-5345, 2001
5. Takeda K, Inoue H, Tanizawa Y, Matsuzaki Y, Oba J, Watanabe Y, Shinoda K, Oka Y. WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: Predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. Hum Mol Genet 10: 477-484, 2001
6. Emoto M, Anno T, Sato Y, Tanabe K, Okuya S, Tanizawa Y, Matsutani A, Oka Y. Troglitazone treatment increases plasma vascular endothelial growth factor in diabetic patients and its mRNA in 3T3-L1 adipocytes. Diabetes 50: 1166-70, 2001
7. 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: 891-4, 2001
8. Okuya S, Tanabe K, Tanizawa Y, Oka Y. Leptin increases the viability of isolated rat pancreatic islets by suppressing apoptosis. *Endocrinology* 142: 4827-4830, 2001
 9. Suzuki Y, Tsukuda K, Taniyama M, Atsumi Y, Matsuoka K, Oka Y. Lipoma and sensory neuropathy in mitochondrial diabetes associated with tRNA mutation at position 3271. *Diabetes Care* 25: 407-408, 2002
 10. Tanizawa Y, Nakai K, Sasaki T, Anno T, Ohta Y, Inoue H, Matuo K, Koga M, Furukawa S, Oka Y. Unregulated elevation of glutamate dehydrogenase activity induces glutamine-stimulated insulin secretion: Identification and characterization of a *GLUD1* gene mutation, and insulin secretion studies with MIN6 cells overexpressing the mutant *GDH*. *Diabetes* 51: 712-717, 2002
 11. Katagiri H, Asano T, Yamada T, Aoyama Y, Fukushima Y, Kikuchi M, Kodama T, Oka Y. Acyl-coenzyme A dehydrogenases are localized on GLUT4-containing vesicles via association with insulin-regulated aminopeptidase in a manner dependent on its dileucine motif. *Mol Endocrinol* 16: 1049-1059, 2002
 12. Yamada T, Katagiri H, Asano T, Tsuru M, Inukai K, Ono H, Kodama T, Kikuchi M, Oka Y. Role of *PDK1* in insulin signaling pathway for glucose metabolism in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol* 282: E1385-94, 2002
 13. Tsuru M, Katagiri H, Asano T, Yamada T, Ohno S, Ogiwara T, and Oka Y. Role of protein kinase C isoforms in glucose transport in 3T3-L1 adipocytes-insignificance of atypical *PKC*. *Am J Physiol* 283: E338-E345, 2002
 14. Nakazaki M, Kakei M, Ishihara H, Koriyama N, Hashiguchi H, Aso K, Fukudome M, Oka Y, Yada T. Association of upregulated activity of *KATP* channels with impaired insulin secretion in *UCP1*-expressing insulinoma cells. *J Physiology* 540.3: 781-789, 2002
 15. Yamasoba T, Goto Yu-ichi, Oka Y, Nishino I, Tsukuda K, Nonaka I. Atypical muscle pathology and a survey of cis-mutations in deaf patients harboring a 1555 A-to G point mutation in the mitochondrial ribosomal RNA gene. *Neuromuscular Disorders* 12: 506-512, 2002
 16. Yujiri T, Nawata R, Takahashi T, Sato Y, Tanizawa Y, Kitamura T, Oka Y. *MEK* kinase 1 interacts with focal adhesion kinase and regulates insulin receptor substrate-1 expression. *J Biol Chem* 278: 3846-3851, 2003
 17. 0403301235
Suzuki Y, Suzuki S, Taniyama M, Muramatsu T, Ohta S, Oka Y, Atsumi Y, Matsuoka K. Multiple cranial mononeuropathies with acetylcholine receptor antibody in mitochondrial diabetes. *Diabetes Care* 26: 1318, 2003
 18. Suzuki Y, Suzuki S, Taniyama M, Muramatsu T, Ohta S, Oka Y, Atsumi Y, Matsuoka K. Multiple tumors in mitochondrial diabetes associated with tRNA^{Leu}(UUR) mutation at position 3264. *Diabetes Care* 26: 1942-1943, 2003
 19. 0403301206
Cryns K, Thys S, Van Laer L, Oka Y, Pfister M, Van Nassauw L, Smith RJ, Timmermans J-P, Van Camp G. The *WFS1* gene, responsible for low frequency sensorineural hearing loss and Wolfram syndrome, is expressed in a variety of inner ear cells. *Histochem Cell Biol* 119: 247-256, 2003
 20. 0403301124
Wenyi Z, Suzuki S, Hirai M, Hinokio Y, Tanizawa Y, Matsutani M, Satoh J, Oka Y. Role of urotensin II gene in the genetic susceptibility to type 2 diabetes mellitus in Japanese. *Diabetologia* 46: 972-976, 2003
 21. 0403301152
Suzuki S, Oka Y, Kadowaki T, Kanatsuka A, Kuzuya T, Kobayashi M, Sanke T, Seino Y, Nanjo K. Clinical features of diabetes mellitus with the mitochondrial DNA 3243 (A-G) mutation in Japanese: Maternal inheritance and mitochondria-related complications. *Diabetes Res Clin Pract* 59: 207-17, 2003
 22. Honda M, Fukumoto S, Fujita T, Oka Y, Asano T. Association of *HLA-CW3* with type 1 diabetes mellitus and idiopathic hypoparathyroidism in the Japanese. *Endocr J* 49: 653-4, 2003
 23. Inukai K, Shewan AM, Pascoe WS, Katayama S, James DE, Oka Y. Carboxy terminus of glucose transporter *GLUT3* contains an apical membrane targeting domain. *Mol Endocrinol* 18:339-349, 2004
 24. Anno T, Uehara S, Katagiri H, Ohta Y, Ueda K, Mizuguchi H, Moriyama Y, Oka Y, Tanizawa Y. Overexpression of constitutively activated glutamate dehydrogenase induces insulin secretion through enhanced glutamate oxidation. *Am J Physiol* 286: E280-E285, 2004
 25. Takahashi K, Satoh J, Kojima Y, Negoro K, Hirai M, Hinokio Y, Kinouchi Y, Suzuki S, Matsuura N, Shimosegawa T, Oka Y. Promoter polymorphism of *SLC11A1* (formerly *NRAMP1*) confers susceptibility to autoimmune type 1 diabetes mellitus in Japanese. *Tissue Antigens* 63: 231-236, 2004
 26. Ishihara H, Takeda S, Tamura A, Takahashi R, Yamaguchi S, Takei D, Yamada T, Inoue H, Soga H, Katagiri H, Tanizawa Y, Oka Y. Disruption of the *WFS1* gene in mice causes progressive beta-cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. *Hum Mol Genet* 13:1159-1170, 2004
 27. Suzuki S, Zong Wenyi, Hirai M, Hinokio Y, Suzuki C, Yamada T, Yoshizumi S, Suzuki M, Tanizawa Y, Matsunami A, Oka Y. Genetic variations at urotensin II and urotensin II receptor genes and risk of type 2 diabetes mellitus in Japanese. *Peptides* 25: 1803-1808, 2004
 28. Yamaguchi S, Ishihara H, Tamura A, Yamada T, Takahashi R, Takei D, Katagiri H, and Oka Y. Endoplasmic reticulum stress and N-glycosylation modulate expression of *WFS1* protein. *Biochem Biophys Res Commun* 325: 250-256, 2004
 29. Hirai M, Suzuki S, Hinokio Y, Yamada T, Yoshizumi S, Suzuki C, Satoh J, Oka Y. *WRN* gene 1367 Arg allele protects against development of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 69: 287-92, 2005

2) データベース/ソフトウェア

<http://www.med.tohoku.ac.jp/room/146/japanese.html>

3) 特許など

出願番号 特願2001-103391

発明者 岡 芳知

発明の名称 糖尿病網膜症を憎悪させる可能性がなく、
浮腫惹起作用を有しないインスリン抵抗性改善薬の検索
システム。

出願人 岡 芳知

出願日 2001年3月30日