

肥満2型糖尿病の成因・病態に関する遺伝要因の解明

●南條 輝志男¹⁾ ◆森川 吉博¹⁾ ◆西 理宏¹⁾ ◆古田 浩人¹⁾

1) 和歌山県立医科大学医学部内科学第一 2) 和歌山県立医科大学医学部解剖学第二

〈研究の目的と進め方〉

2型糖尿病はインスリン分泌およびインスリン感受性の異常が主要な病態である。インスリン感受性の異常すなわちインスリン抵抗性に最も影響する因子として肥満が挙げられる。肥満により2型糖尿病のみならず高血圧、高脂血症など生活習慣病が引き起こされ、我が国を含めた先進国において深刻な問題となっている。2型糖尿病患者の治療で肥満の是正は極めて重要であることは言うまでもない。しかし、食事・運動療法遵守の困難さやインスリン、経口血糖降下剤などによりむしろ肥満を助長してしまうなど実際上肥満の是正はかなり困難である。肥満2型糖尿病患者における肥満のメカニズム解明はこのような減量困難例に対する新たな治療法の開発につながるものであり、臨床で極めて有意義と考えられる。1994年Friedmanらにより、肥満遺伝子産物レプチンがクローニングされ、以後肥満の分子生物学的研究が進み、肥満は個人の生活習慣の問題のみならず、遺伝的素因が重要であることが改めて認識されている。著明なヒト肥満症で、レプチン異常2家系、レプチンレセプター異常1家系が報告されているが、一般のヒト肥満症の多くでは血中レプチン濃度は上昇しており、BMIおよび体脂肪率と相関している。このことは一般のヒト肥満症ではレプチンに対する抵抗性が肥満の主な原因であると考えられる。しかし、抵抗性の本態はなお不明であり、高コレステロール血症の関与やレプチンシグナリングのnegative regulator (SOCS3など)の関与が示唆されている。"adipoinsular axis"すなわち、脂肪組織(レプチン)と膵β細胞(インスリン)の相互作用による体脂肪量と代謝の調節機構といった概念も最近提唱されている。脂肪組織より分泌されたレプチンは脳に働いて摂食を抑制し、エネルギー消費を増加させる。更に交感神経系を介して膵β細胞からのインスリンの分泌を低下させる。また、直接膵β細胞に働いてインスリンの産生分泌を抑える。一方、脂肪同化作用があるインスリンの分泌低下は体脂肪の増加(肥満)に歯止めをかける。adipoinsular axisの異常、破綻は糖尿病や肥満を引き起こすと考えられ、その詳細な分子メカニズムの解明は極めて重要である。

今回、我々は肥満2型糖尿病の成因・病態に関する遺伝要因を解明するため、肥満2型糖尿病患者に認められるレプチン抵抗性に着目し、レプチンシグナルの下流での遺伝子発現について、PCR-Select cDNA subtraction法により検索を試みた。その結果、マウス視床下部および臍ラ島においてレプチンにより誘導される新規転写因子の部分クローンを同定した。本研究の大きな目的としては肥満2型糖尿病の成因や病態に関与する遺伝子群を同定し、肥満2型糖尿病における肥満是正の新たな治療法開発に貢献することである。研究の進め方としては、今回同定した転写因子遺伝子に関する研究などレプチンやグレリンといった摂食調節因子により誘導される未知の遺伝子群を同定し、それらの機能を解析する(Basic Approach)。あるいは既知の遺伝子で肥満、糖尿病への関与が疑われるもの、レプチンなどの摂食調節ホルモンシグナル伝達

関連の遺伝子について遺伝子多型の検索、疾患(肥満、糖尿病)との関連につき検討する(Clinical Approach)(図1)。

より詳細な個々の研究目的を以下に記載すると、

- (1) 新たに同定した転写因子遺伝子に関する研究同遺伝子の完全長cDNAクローニングおよびその局在の同定(in situ hybridization、免疫組織染色)、機能解析(細胞への導入実験など)、本転写因子の標的遺伝子の同定など
- (2) レプチンに拮抗する摂食調節ペプチドであるグレリンにより誘導される遺伝子の同定、およびその機能解析
- (3) 既知の肥満や糖尿病に関連が予想される遺伝子あるいは摂食ホルモンシグナル伝達系遺伝子の多型の検索、疾患との関連性の検討(レプチン、レプチン受容体、POMC、メラノコルチン受容体、AGRP、CART、UCP、グレリン、グレリン受容体など)
- (4) 摂食調節に重要な脳(特に視床下部)におけるレプチン、インスリンシグナル系の検討

などにつき検討を行なう。レプチンシグナル系はこれまで主に肥満との関連で捉えられてきたが、膵β細胞においても重要な役割を果たしており、肥満と糖尿病の2つの観点で見る必要がある。脳でのインスリン受容体を欠失させたマウスでは摂食が亢進し肥満となることが報告されており、摂食調節機構とインスリン(膵β細胞)の密接な関連性も近年注目されている。実際我々は既に本転写因子が脳では摂食に関連すると考えられている弓状核でレプチンによる発現亢進を示し(図2)、膵ではインスリン産生細胞に局在することを認めている。これらのことは本転写因子が摂食調節とインスリン分泌の両者を連結している可能性を示唆するものであり、興味深い。

図1

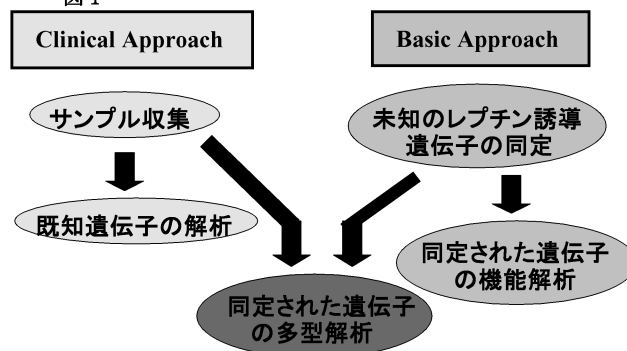
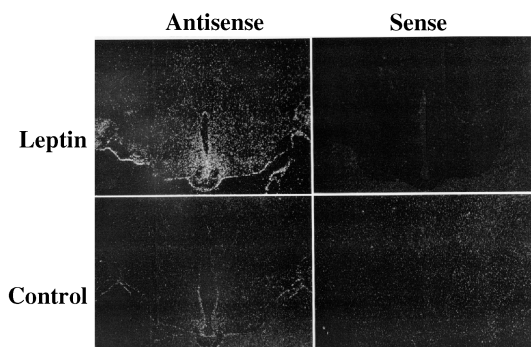


図2 新規転写因子遺伝子のレプチンによる誘導
(視床下部、in situ hybridization)



〈研究開始時の研究計画〉

- (1) 新たに同定した転写因子遺伝子に関する研究

同遺伝子の完全長cDNAクローニングについては5'RACE法を用い、行なう。転写開始部位の同定によりプロモータ領域を特定し、機能解析を行なう。

同遺伝子あるいは蛋白の発現部位の同定にはin situ hybridization、特異抗体による免疫組織化学により行なう。特に脳内での発現状況を解析する。

同遺伝子のエクソン、イントロン構造を決定し、PCR用プライマーを設定する。本転写因子の変異および多型の有無につきPCR-SSCP法などを用い検索し、収集したサンプルを用いて肥満および肥満2型糖尿病、肥満および非肥満非糖尿病の各群において変異および多型との関連につき検討する。

本転写因子遺伝子の機能解析については膵β細胞由来細胞株やNeuroblastoma細胞株などへの遺伝子導入実験を行い、インスリンやNPYなど摂食調節神経ペプチドの発現との関連を検討する。

本遺伝子の標的遺伝子の同定を行なう。
- (2) レプチンに拮抗する摂食調節ペプチドであるグレリンにより誘導される遺伝子の同定、およびその機能解析

予備実験としてマウスにグレリンを投与し摂食量の変化を確認、グレリンの指摘投与量を決定する。生理食塩水をコントロールとし、グレリン投与にて誘導される遺伝子群をPCR-Select cDNA subtraction法にて同定する。また、同定された遺伝子につき、それらの機能解析を行なう。
- (3) 既知の肥満や糖尿病に関連が予想される遺伝子あるいは摂食ホルモンシグナル伝達系遺伝子の多型の検索、疾患との関連性の検討 (レプチン、レプチン受容体、POMC、メラノコルチン受容体、AGRP、CART、UCP、グレリン、グレリン受容体など)

ヒト遺伝子解析のためのコントロールおよび肥満、糖尿病患者の遺伝子サンプル収集を行なう。ミレニアム・ゲノムプロジェクトの一環として和歌山県立医科大学遺伝子解析研究倫理委員会の審査・承認を得る。遺伝子サンプル提供者には全て承認を得た書面でインフォームドコンセントを行い、得られた試料は個人識別情報管理者の下、連結可能もしくは連結不可能匿名化を行い厳重に管理を行なう。

これらの遺伝子サンプルを用い、種々の候補遺伝子の多型と疾患、病態との関連性を検討する。
- (4) 摂食調節に重要な脳 (特に視床下部) におけるレプチン、インスリンシグナル系の検討

インスリン感受性グルコース輸送担体 (GLUT4) の細胞膜へのトランスロケーションはインスリンの代謝作用の重要な指標である。骨格筋や脂肪細胞といった末梢組

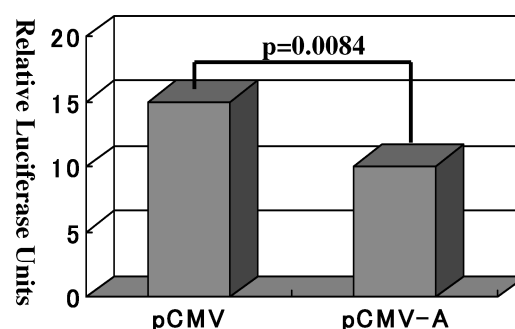
織以外に摂食中枢である視床下部にもGLUT4は発現しているが、その役割は不明である。Ob/Obマウスの視床下部における、GLUT4遺伝子発現およびその局在について免疫組織化学、ウエスタンブロット、免疫電顕にて検討する。

〈研究期間の成果〉

- (1) 新たに同定した転写因子遺伝子に関する研究

同遺伝子の完全長cDNAクローニングを行い、7種類のalternative splicing産物を同定した。抗体作成を試みたが、良質の抗体を得ることができなかった。そのため、局在の同定はin situ hybridizationにて行い、図2に示すような視床下部弓状核や膵臓ではβ細胞での発現、また、レプチンによる遺伝子誘導を確認した。同遺伝子をインスリンノーマ細胞株 (β TC3) 細胞に遺伝子導入し、インスリン遺伝子プロモータ活性への影響を検討したところ、インスリン遺伝子プロモータを負に制御することが判明した (図3)。Neuroblastoma細胞での検討ではNPY発現には手技的な問題もあり、一定の傾向は認められなかった。本転写因子の標的遺伝子の同定は現在進行中である。

図3. 転写因子遺伝子導入によるインスリンプロモータ活性の低下



また、本転写因子遺伝子の多型を同定し、肥満との関連を認めた。しかし、インスリン分泌やインスリン抵抗性とは関連を認めなかった。

- (2) レプチンに拮抗する摂食調節ペプチドであるグレリンにより誘導される遺伝子の同定、およびその機能解析

PCR-Select cDNA subtraction法によりグレリンにより脳で誘導される遺伝子群を複数同定した。しかし、膵臓では全膵を用いたためか、膵外分泌由来の遺伝子のみ得られ、目的とした膵内分泌由来のものが得られなかった。脳でグレリンにより誘導される遺伝子の中に1型糖尿病の自己抗原であるIA-2βが含まれており、本遺伝子に関してさらに検討を行なった。マウス膵臓や膵β細胞由来の細胞株においてグレリンによりIA-2β発現が誘導された (図4)。しかしながらIA-2βの類縁遺伝子であるIA-2はグレリンによる変化は認められなかった。

グレリンはインスリン分泌を抑制することが知られており、我々の検討でもグルコースによるインスリン分泌抑制作用が認められた (図5)。IA-2βの過剰発現もグルコースによるインスリン分泌を抑制した。また、siRNAによりIA-2β発現を低下させたところ、グレリンによるインスリン分泌抑制効果は減弱、消失した。以上より、グレリンによるインスリン分泌抑制にはIA-2βが関与していることが想定された。今後、その機序の解明が必要である。(文献7)、

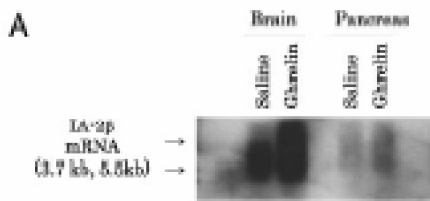


図5. グレリンはインスリン分泌を抑制する

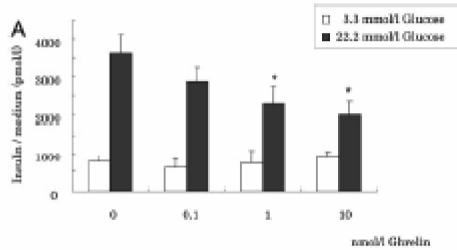
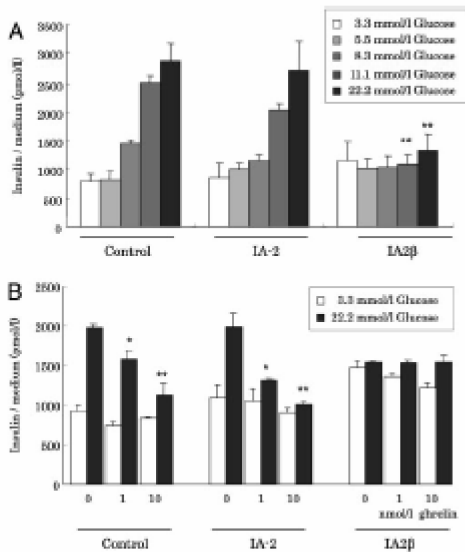


図6. IA-2 β 過剰発現のインスリン分泌への影響



(3) 既知の肥満や糖尿病に関連が予想される遺伝子あるいは摂食ホルモンシグナル伝達系遺伝子の多型の検索、疾患との関連性の検討 (レプチン、レプチン受容体、POMC、メラノコルチン受容体、AGRP、CART、UCP、グレリン、グレリン受容体など)

レプチン遺伝子における多型の検討では肥満とリンクする多型を同定した(文献1)。MC4Rについてはいくつかの多型は見いだしたが、有意な関連は認められていない。また、インスリン抵抗性との関連が報告されているPC-1(Plasma cell differentiation antigen)遺伝子のK121Q多型についても検討したが、インスリン抵抗性との関連は否定的でむしろインスリン分泌低下との関連が示唆された。G蛋白 β サブユニットの多型の検討でも、肥満糖尿病との関連は認められなかった(文献2)。Pro-opiomelanocortin(POMC)遺伝子の検討では肥満および糖尿病と有意な関連は認めなかった(文献4)。グレリン遺伝

子の多型と肥満との有意な関連性を認めた。また、Uncoupling protein(UCP)-2遺伝子のプロモーター領域の多型は肥満とは関連を認めず、インスリン治療や糖尿病発症年齢と関連性を認めた。インスリン治療率との関連は多変量解析やKaplan-Meyer法にても有意であった。また、静脈内糖負荷試験時のインスリン分泌反応とも関連を認めた。本多型のUCP-2遺伝子発現に及ぼす影響を検討するため、膵 β 細胞株を用いたルシフェラーゼアッセイを行い、本多型が遺伝子発現に関与していることを証明した。以上より本多型はUCP-2の膵 β 細胞での発現に影響し、その結果 β 細胞内でのATP濃度を介してインスリン分泌に影響すると考えられる(図7、8)(文献5)。

図7 UCP-2 遺伝子プロモーター領域の多型はインスリン導入までの期間に影響する

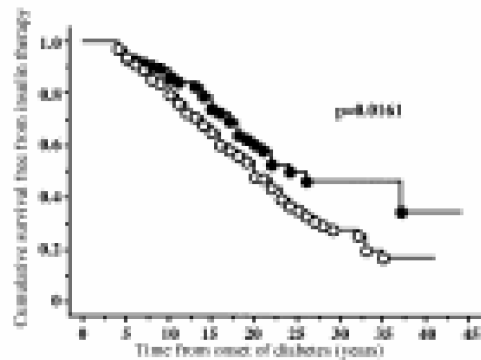
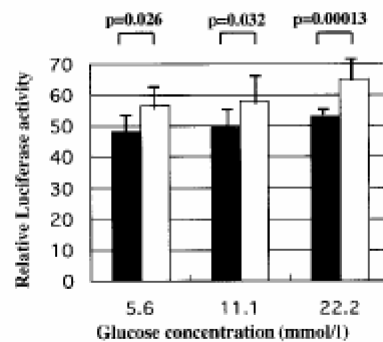


図8 UCP-2 遺伝子プロモーター多型は膵 β 細胞でのプロモーター活性に影響する



ベーターセルリンはEGFファミリーに属する増殖因子で膵 β 細胞の新生、増殖、抗アポトーシスに関係する。同遺伝子のプロモーター領域に存在する遺伝子多型をスクリーニングした結果、-226A>G多型が2型糖尿病患者において有意に多いことを見出した(A/A vs. G/GのORは1.90)。さらに、-226A>G多型を有する糖尿病患者ではインスリン分泌障害がより強く、また、in vitroの機能解析においても-226Gを有するプロモーターはその機能が50%低下していた。以上の結果から、Betacellulin遺伝子が新たな2型糖尿病の疾患感受性遺伝子であることが明らかとなった(文献9)。

酸化ストレスは肥満や糖尿病で増加し、インスリン分泌、インスリン抵抗性、糖尿病血管合併症などに関与すると考えられている。抗酸化酵素(SOD,GPx-1など)は酸化ストレスの除去にきわめて重要である。そこで、抗酸化酵素遺伝子の多型の検討を行なった。グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)-1遺伝子にプロモーター領域および

蛋白翻訳領域に複数の多型を同定し、これらが遺伝子発現や酵素活性に影響していること、およびこれらの多型が糖尿病患者における動脈硬化症（大血管症）に関連していることを証明した（文献6）。また、SOD遺伝子の多型は糖尿病発症年齢、高血圧、インスリン抵抗性に関連していた（文献8）。

(4) 摂食調節に重要な脳（特に視床下部）におけるレプチン、インスリンシグナル系の検討

インスリン感受性グルコース輸送体であるglucose transporter (GLUT) 4は、骨格筋や脂肪細胞といった末梢組織においてインスリン反応性に細胞膜上へ移行し、血中のグルコースを細胞内に取り込む働きをしている。末梢組織のみならず、摂食中枢である視床下部にもGLUT4の発現が認められているが、その機能については未だ不明である。そこで今回、我々は、視床下部におけるGLUT4の機能を明らかにする目的で、過食による肥満のモデルマウスの1つであるob/obマウスの視床下部におけるGLUT4の発現とその細胞内局在について検討した。免疫染色法とウエスタンブロット解析を用いてGLUT4の発現を視床下部にて検討したところ、野生型と比較してob/obマウスの視床下部弓状核の神経細胞においてGLUT4の発現の有意な増加が認められた。免疫電子顕微鏡法を用いてその細胞内局在を検討したところ、弓状核神経細胞におけるGLUT4の発現の増加は細胞膜上に認められた。次に、GLUT4の細胞膜への移行を促すインスリン受容体より下流のシグナル伝達系（インスリン受容体、IRS-1、Akt）の活性化について検討したところ、インスリン受容体とIRS-1のチロシンリン酸化は野生型とob/obマウスの間で有意な差は認められなかった。そこで、末梢組織においてインスリン抵抗性の原因として考えられているIRS-1のセリンリン酸化を検討したところ、ob/obマウスの視床下部で有意に亢進していた。さらに、IRS-1の下流にあるAktのリン酸化を検討したところ、ob/obマウスの視床下部で有意に亢進していた。Aktのリン酸化が亢進していた原因として、視床下部で摂食抑制因子として作用し、Aktのリン酸化を促すことが言われている神経栄養因子の1つであるbrain-derived neurotrophic factor (BDNF)の可能性を考え、ob/obマウスの視床下部におけるBDNFの発現をin situ hybridization法により検討した。野生型と比較してob/obマウスの視床下部腹内側核においてBDNFの発現が有意に増加していた。これらのことより、ob/obマウスの視床下部では、IRS-1のセリンリン酸化によりインスリン受容体とIRS-1の活性化が阻害されており、GLUT4の細胞膜上への移行はインスリンからのシグナルではなくBDNFによってAktが活性化されることによっておこっている可能性が示唆された（文献10）。

さらにレプチンシグナルにおけるBDNFの役割について検討した。C57BL/6Jマウスの尾静脈より10 μ g/gのレプチンを投与し、レプチンのシグナルの指標であるSTAT3のリン酸化を視床下部にて検討したところ、レプチン投与後30分より有意に増加し、60分で最高値に達し、90分を過ぎても高値を保っていた。このことより、投与したレプチンは視床下部に直接働いていると考えられた。ノーザンブロット解析とin situ hybridization法を用いてレプチン投与後60分でのBDNFのmRNAの発現変化を検討したところ、コントロール群と比較して、レプチン投与群においてBDNFのmRNAの発現は視床下部腹内側核で有意に上昇していた。また、STAT3のリン酸化がレプチン投与群の腹内側核で増加しており、BDNFのmRNA陽性神経細胞のほとんどがリン酸化STAT3陽性であった

ことから、レプチンは視床下部腹内側核の神経細胞に直接的に働きかけ、BDNFの発現を誘導していることが示唆された。次に、ウエスタンブロット解析と免疫染色法を用いてBDNFの蛋白発現の変化を検討したところ、レプチン投与群においてBDNFの蛋白発現は視床下部腹内側核で有意に上昇していた。さらに、BDNF陽性の神経線維の増加がレプチン投与群の腹内側核と背内側核に認められ、それらはBDNFの受容体であるTrkB陽性神経細胞と近接していた。また、神経終末のマーカーであるシナプトフィジンとBDNF陽性の神経線維との共存が認められた。これらのことより、レプチンにより視床下部腹内側核で誘導されたBDNFは、腹内側核と背内側核のTrkB陽性神経細胞に作用している可能性が示唆された（文献11）。

<国内外での成果の位置づけ>

これまでレプチン、レプチン受容体、POMC、Prohormone convertase1/3、Melanocortin type 4 receptor等のレプチンシグナル関連遺伝子の異常による肥満症が同定されてきた。また、一般のヒト肥満症ではレプチン抵抗性が認められ、ヒト肥満におけるレプチンシグナルの重要性はいうまでもない。しかし、一般のヒト肥満におけるレプチン抵抗性の本体は未だ明らかでなく、本研究のようなレプチンシグナル下流の新規転写因子同定とその調節遺伝子群の解析は極めてユニークなものである。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

本転写因子遺伝子の機能解析が十分行なえなかった。特に神経細胞における摂食ペプチド発現制御への関与について十分な検討が行なえなかった。また、本転写因子により誘導される標的遺伝子群の同定も十分行なえなかった。多くのalternative splicing産物が存在し、それらの同定に非常に多くの時間を要したことが一因である。

<今後の課題>

本転写因子遺伝子の機能解析(膵 β 細胞、神経細胞、また各種アイソフォームの機能差)

本転写因子遺伝子により調節される遺伝子群の同定
IA-2 β のインスリン分泌抑制機序

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文

- 303301714
Ohshiro Y., Ueda K., Nishi M., Ishigame M., Wakasaki H., Kawashima H., Furuta H., Sasaki H., Sanke T., Takasu N., Nanjo K., A polymorphic marker in the leptin gene associated with Japanese morbid obesity, *J. Mol. Med.*, 78, 516-520 (2000).
- 303301728
Ohshiro Y., Ueda K., Wakasaki H., Takasu N., Nanjo K., Analysis of 825C/T polymorphism of G protein β 3 subunit in obese/diabetic Japanese, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 286, 678-680 (2001)
- 303301747
Furuta H., Furuta M., Sanke T., Ekawa K., Hanabusa T., Nishi M., Sasaki H., Nanjo K., Nonsense and missense mutations in the human hepatocyte nuclear factor-1 β gene (TCF2) and their relation to type 2 diabetes in Japanese, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87, 3859-3863 (2002)
- 303301757

- Ohshiro Y., Ueda K., Wakasaki H., Kosaka M., Nishi M., Sasaki H., Takasu N., Nanjo K., Sequence analysis of the pro-opiomelanocortin (POMC) gene in obese/diabetic Japanese, *Int. J. Obest.*, 26, 730-731 (2002).
5. 401290927
Sasahara M., Nishi M., Kawashima H., Ueda K., Sakagashira S., Furuta H., Matsumoto E., Hanabusa T., Sasaki H., Nanjo K. Uncoupling protein 2 promoter polymorphism -866G/A affects its expression in beta cells and modulates clinical profiles of Japanese type 2 diabetic patients, *Diabetes* 53,482-485 (2004)
6. 409241810
Hamanishi T, Furuta H, Kato H, Doi A, Tamai M, Shimomura H, Sakagashira S, Nishi M, Sasaki H, Sanke T, Nanjo K.
Functional Variants in the Glutathione Peroxidase-1 (GPx-1) Gene Are Associated With Increased Intima-Media Thickness of Carotid Arteries and Risk of Macrovascular Diseases in Japanese Type 2 Diabetic Patients
Diabetes 53,2455-2460 (2004)
7. 602231053
Doi A, Shono T, Nishi M, Furuta H, Sasaki H, Nanjo K. IA-2 β but not IA-2 is induced by ghrelin and inhibits glucose-stimulated insulin secretion. *Proc Nat Acad Sci USA* 103,885-890 (2006)
8. 60223202
Tamai M, Furuta H, Kawashima H, Doi A, Hamanishi T, Shimomura H, Sakagashira S, Nishi M, Sasaki H, Sanke T, Nanjo K. Extracellular superoxide dismutase gene polymorphism is associated with insulin resistance and the susceptibility to type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 71, 140-145 (2006)
9. 602232018
A functional variant in the human betacellulin gene promoter is associated with type 2 diabetes.
Nakano Y, Furuta H, Doi A, Matsuno S, Nakagawa T, Shimomura H, Sakagashira S, Horikawa Y, Nishi M, Sasaki H, Sanke T, Nanjo K. *Diabetes* 54(12),3560-3566 (2005)
10. 602232037
Komori T, Morikawa Y, Tamura S, Doi A, Nanjo K, Senba E.
Subcellular localization of glucose transporter 4 in the hypothalamic arcuate nucleus of ob/ob mice under basal conditions. *Brain Res.* 1049(1),34-42 (2005).
11.
Komori T, Morikawa Y, Nanjo K, Senba E. Induction of brain-derived neurotrophic factor by leptin in the ventromedial hypothalamus. *Neuroscience* (in press)