

## 糖尿病性血管合併症の発症に関わる細胞外分泌タンパク遺伝子の同定

●山田信博 ◆島野仁 ◆豊島秀男

筑波大学臨床医学系内科

### 〈研究の目的と進め方〉

糖尿病患者のQOLを決定する因子は血管合併症であり、その制圧は日本人のQOLを是正する為に重要な課題となっている。しかし、そのtarget tissueである糖尿病の血管壁の分子病態は十分に理解されていない。糖尿病血管合併症の分子病態を解明するためには、糖脂質代謝調節のみならず、糖尿病の合併症を発症させる素因としての候補遺伝子の探索を行わなければならない。本研究では、糖尿病血管合併症に特異的な遺伝子マーカーを分離する為に、in vitro 研究のみならず糖尿病動物を用いて、合併症のtarget tissueである腎、網膜あるいは動脈の遺伝子発現をDNA チップなどにより網羅的に探索し、血管合併症の分子病態を明らかにする。

さらに、血管合併症の分子病態を明らかにするために、血管壁構成細胞を用いて、高糖やインスリンにより発現の変化する遺伝子を同定することにより、その血管病態への影響についても検討する。特に血管壁構成細胞であるマクロファージ、内皮細胞、平滑筋細胞を用いて、糖尿病における血管壁の分子病態を明確にする。

### 〈研究開始時の研究計画〉

本研究では、糖脂質代謝調節のみならず、糖尿病血管合併症の発症に関わり、特異的なマーカーとなり得る遺伝子の分離を試みるが、特に、細胞外に発現されるタンパク、すなわち、サイトカインや受容体、細胞接着因子等を主な目標とする為に、in vitro研究のみならず糖尿病動物を用いて、合併症のtarget tissueである腎、網膜あるいは動脈より独自の遺伝子ライブラリーを制作し、シグナルシーケンストラップ法により網羅的に探索し、血管合併症の分子病態を明らかにする。シグナルシーケンストラップ法は分泌タンパク遺伝子のクローニング法として広く行われているが、我々は最近この方法に独自の改良を加え、少量、或いは、不完全な試料を出発材料に高効率にスクリーニングを行う技術を確認したのでこれを利用する。本研究は糖尿病血管合併症に関わる新たなサイトカインや受容体、細胞接着因子などの疾患関連遺伝子の解明につながることから、その新しい治療法開発の端緒となることが期待される。

### 〈研究期間の成果〉

1. 糖脂質代謝の転写調節に関する研究では、SREの遺伝子上流にコレステロール、オキシステロールにより誘導される転写因子LXRの結合配列を見い出した。転写因子LXRがSREBP-1cの発現を介し、脂肪酸合成に影響を与えることを示している。
2. インスリン抵抗性のモデル動物であるob/obマウスとLDL受容体欠損マウスのdouble mutantを用いた研究より、血管病変発症において危険因子の重積状態が重要であることを明らかにした。
3. DNAチップを用いて、マクロファージにおけるインスリン応答遺伝子を検索し、インスリンによりTNF $\alpha$ やアポトーシス関連遺伝子の発現が亢進することを見い出した。

した。

4. シグナルシーケンストラップ法に改良を加え、少量、或いは、不完全な試料を出発材料に高効率にスクリーニングを行う技術を確認した。腎臓、動脈を試料として現在候補遺伝子のスクリーニングをおこなっている。

5. インスリン抵抗性、肥満、脂肪肝のモデル動物であるob/obマウスとSREBP-1欠損マウスのdouble mutantを用いた研究より、SREBP-1欠損により、脂肪肝は消失する一方、肥満には変化をみとめなかった。SREBP-1は肝におけるインスリン抵抗性や脂肪合成に重要な役割を果たすことが示唆された。

6. アポE欠損マウスにインスリン抵抗性改善剤を投与したところ、動脈硬化症の進展が有意に抑制されたことから、動脈硬化症の発症におけるインスリン抵抗性の関与と、その治療的意義が明らかにされた。

### 〈国内外での成果の位置づけ〉

糖尿病合併症のvascular biologyの研究は、合併症の重大さから考えても、今後その進歩が待たれる領域である。特に糖尿病の血管壁の遺伝子発現の特徴あるいは遺伝的素因に関する研究は極めて少なく、血管合併症の遺伝子マーカーの探索は殆ど行われていない。本研究は血管合併症の病態解明へのアプローチとして、国内外においてもユニークな研究であり、病態モデル動物を用いて病変の遺伝子発現に関する包括的、網羅的データを作成し遺伝子情報を解析しようとした。糖尿病における血管合併症の分子遺伝学は緒についたばかりであり、糖尿病における血管病態を分子遺伝学的にアプローチすることにより、その病態を解明して、血糖コントロール以外の合併症への治療的アプローチを開発することを目的とした。本研究は糖尿病血管合併症に関わる新たなサイトカインや受容体、細胞接着因子の解明につながることから、直接的に新たな臨床検査法の確立、あるいは新しい治療法の開発など、臨床的な応用の可能性が期待された。

### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

モデル動物の標的臓器の遺伝子発現に関して検討するとともに、新しい疾患関連遺伝子の単離、機能解析をすすめた。時間的な制約もあり、網羅的遺伝子マップの作成には至らなかった。

### 〈今後の課題〉

血管合併症の分子病態を明らかにするために、標的臓器を用いて、新しい疾患関連遺伝子の単離、機能解析をすすめる。高血糖は血管壁構成細胞における遺伝子発現を転写調節レベルで変化させることを報告しているが、新たな血管合併症の発症に関わる分泌タンパク遺伝子を同定して、糖尿病における血管合併症の分子病態を明らかにする。

### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Obunike JC, Pillarisetti S, Paka L, Kako Y, Butteri MJ,

- Ho YY, Wagner WD, Yamada N, Mazzone T, Deckelbaum RJ, Goldberg IJ: The Heparin-Binding Proteins Apolipoprotein E and Lipoprotein Lipase Enhance Cellular Proteoglycan Production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:111-118, 2000
2. Osuga J-I, Ishibashi S, Oka T, Yagyu H, Tozawa R, Fujimoto A, Shionoiri F, Yahagi N, Kraemer FB, Tsutsumi O, Yamada N: Targeted disruption of hormone sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:787-92, 2000
3. Abe H, Yamada N, Ishibashi S, Makuuchi M: Chronic inhibitory effect of insulin on plasma lipid concentrations in rats with transplanted pancreas. *Transplantation* 2000 69:2038-2042, 2000
4. Yagyu H, Kitamine T, Osuga Ji, Tozawa Ri, Chen Z, Kaji Yi, Oka T, Perrey S, Tamura Y, Ohashi K, Okazaki H, Yahagi N, Shionoiri F, Iizuka Y, Harada K, Shimano H, Yamashita T, Gotoda T, Yamada N, Ishibashi S: Absence of ACAT-1 attenuates atherosclerosis but causes dry eye and cutaneous xanthomatosis in mice with congenital hyperlipidemia. *J Biol Chem* 275:21324-21330, 2000
5. Amemiya-Kudo M, Shimano H, Yoshikawa T, Yahagi N, Hasty AH, Okazaki H, Tamura Y, Shionoiri F, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga Ji, Harada K, Gotoda T, Sato R, Kimura S, Ishibashi S, Yamada N: Promoter Analysis of the Mouse Sterol Regulatory Element-binding Protein-1c Gene. *J Biol Chem* 275:31078-31085, 2000
6. Hasty AH, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Perrey S, Yoshikawa T, Osuga Ji, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Shionoiri F, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S, Yamada N: Sterol Regulatory Element-binding Protein-1 Is Regulated by Glucose at the Transcriptional Level. *J Biol Chem* 275:31069-31077, 2000  
*Br J Pharmacol* 130:1457-1467, 2000
7. Yoshikawa T, Shimano H, Amemiya-Kudo M, Yahagi N, Hasty AH, Matsuzaka T, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga Ji, Harada K, Gotoda T, Kimura S, Ishibashi S, Yamada N: Identification of Liver X Receptor-Retinoid X Receptor as an Activator of the Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c Gene Promoter. *Mol Cell Biol* 21:2991-3000, 2001
8. Tozawa Ri R, Ishibashi S, Osuga Ji J, Yamamoto K, Yagyu H, Ohashi K, Tamura Y, Yahagi N, Iizuka Y, Okazaki H, Harada K, Gotoda T, Shimano H, Kimura S, Nagai R, Yamada N: Asialoglycoprotein Receptor Deficiency in Mice Lacking the Major Receptor Subunit: Its obligate requirement for the stable expression of oligomeric receptor. *J Biol Chem* 276:12624-12628, 2001
9. Chen Z, Ishibashi S, Perrey S, Osuga Ji, Gotoda T, Kitamine T, Tamura Y, Okazaki H, Yahagi N, Iizuka Y, Shionoiri F, Ohashi K, Harada K, Shimano H, Nagai R, Yamada N: Troglitazone inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice: pleiotropic effects on CD36 expression and HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:372-377, 2001
10. 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
11. Hasty AH, Shimano H, Osuga Ji J, Namatame I, Takahashi A, Yahagi N, Perrey S, Iizuka Y, Tamura Y, Amemiya-Kudo M, Yoshikawa T, Okazaki H, Ohashi K, Harada K, Matsuzaka T, Sone H, Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S, Yamada N: Severe hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia and atherosclerosis in mice lacking both leptin and the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 276:37402-37408, 2001
12. Iida KT, Shimano H, Kawakami Y, Sone H, Toyoshima H, Suzuki S, Asano T, Okuda Y, Yamada N: Insulin upregulates tumor necrosis factor- $\alpha$  production in macrophages through an extracellular-regulated kinases-dependent pathway. *J Biol Chem* 276:32531-32537, 2001
13. Fan J, Unoki H, Kojima N, Sun H, Shimoyamada H, Deng H, Okazaki M, Shikama H, Yamada N, Watanabe T: Overexpression of lipoprotein lipase in transgenic rabbits inhibits diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis. *J Biol Chem* 276:4071-4079, 2001
14. Iizuka Y, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N: CD36 deficiency and insulin resistance. *Lancet* 358:243, 2001
15. Yoshikawa T, Shimano H, Yahagi N, Ide T, Amemiya-Kudo M, Matsuzaka T, Nakakuki M, Tomita S, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Takahashi A, Sone H, Osuga Ji J, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N: Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein-1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. *J Biol Chem* 277:1705-1711, 2002
16. Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Yoshikawa T, Hasty AH, Tamura Y, Osuga J, Okazaki H, Iizuka Y, Takahashi A, Sone H, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N: Dual regulation of mouse Delta (5) - and Delta (6) -desaturase gene expression by SREBP-1 and PPAR $\alpha$ . *J Lipid Res* 43:107-114, 2002
17. Iida KT, Suzuki H, Sone H, Shimano H, Toyoshima H, Yatoh S, Asano T, Okuda Y, Yamada N: Insulin inhibits apoptosis of macrophage cell line, THP-1 cells, via phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:380-386, 2002
18. Yahagi N, Shimano H, Hasty AH, Matsuzaka T, Ide T, Yoshikawa T, Amemiya-Kudo M, Tomita S, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga Ji J, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S, Yamada N: Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers, but not obesity or insulin resistance in Lepob/Lepob mice. *J Biol Chem* 277:19353-19357, 2002
19. Okazaki H, Osuga Ji, Tsukamoto K, Isoo N, Kitamine T, Tamura Y, Tomita S, Sekiya M, Yahagi N, Iizuka Y, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Shimano H, Kimura S, Nagai R, Yamada N, Ishibashi S: Elimination of cholesterol ester from macrophage foam cells by adenovirus-mediated gene transfer of hormone-sensitive lipase. *J Biol Chem* 277:31893-31899, 2002
20. Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Yoshikawa T, Amemiya-Kudo M, Hasty AH, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Takahashi A, Yato S, Sone H,

Ishibashi S, Yamada N: Cloning and characterization of a mammalian fatty acyl-CoA elongase as a lipogenic enzyme regulated by SREBPs.

*J Lipid Res.* 43:911-920,2002

21. Amemiya-Kudo M, Shimano H, Hasty AH, Yahagi N, Yoshikawa T, Matsuzaka T, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga JI, Harada K, Gotoda T, Sato R, Kimura S, Ishibashi S, Yamada N: Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes. *J Lipid Res* 43:1220-1235,2002

22. Kwok JB, Kapoor R, Gotoda T, Iwamoto Y, Iizuka Y, Yamada N, Isaacs KE, Kushwaha VV, Church WB, Schofield PR, Kapoor V: A Missense mutation in kynurenine aminotransferase-1 in spontaneously hypertensive rats. *J Biol Chem* 277:31893-31899,2002

23. Okazaki H, Osuga JI, Tamura Y, Yahagi N, Tomita S, Shionoiri F, Iizuka Y, Ohashi K, Harada K, Kimura S, Gotoda T, Shimano H, Yamada N, Ishibashi S: Lipolysis in the Absence of Hormone-Sensitive Lipase: Evidence for a Common Mechanism Regulating Distinct Lipases. *Diabetes* 51:3368-3375,2002

24. Song H, Shojima N, Sakoda H, Ogihara T, Fujishiro M, Katagiri H, Anai M, Onishi Y, Ono H, Inukai K, Fukushima Y, Kikuchi M, Shimano H, Yamada N, Oka Y, Asano T: Resistin is regulated by C/EBPs, PPARs, and signal-transducing molecules. *Biochem Biophys Res Commun* 299:291-298,2002

25. Tamura Y, Ishibashi S, Gotoda T, Yasufuku-Takano J, Takano K, Ueki K, Yamashita S, Iizuka Y, Yahagi N, Shionoiri F, Okazaki H, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Shimano H, Fujita T, Yamada N, Kimura S: A kindred of familial acromegaly without evidence for linkage to MEN-1 locus. *Endocr J* 49:425-431,2002

26. Sone H, Ito H, Saito Y, Yamashita H, Ishibashi S, Katayama S, Abe R, Ohashi Y, Akanuma Y, Yamada N: The long-term effects of self-management education for patients with type 2 diabetes on glycemic control. *Diabetes Care* 25:2115-2116,2002