

ヘキソサミン経路を介し糖尿病合併症の発症に関わる遺伝子群の同定とその調節機構の解明

●横手孝太郎

千葉大学医学部附属病院

研究の目的と進め方

これまで我々は、オステオポンチン(以下 OPN)という動脈硬化促進性分子が糖尿病状態の動脈壁中膜で平滑筋細胞に強く発現し、培養平滑筋細胞においても高グルコース条件下でヘキソサミン経路の活性化を介してその転写が亢進することを明らかにしてきた。そして、OPNのプロモーターに見られる高グルコース・グルコサミン反応性が糖尿病合併症の発症に重要な役割を担うと考え、その転写調節機構の解明に取り組んでいる。さらに血管平滑筋細胞で高グルコース・グルコサミン反応性を示す OPN 以外の遺伝子群の網羅的な同定を試み、糖尿病合併症を発症しやすい患者におけるその発現パターンの特徴を明らかにしたいと考えている。

2001 年度の研究の当初計画

- 1) 高グルコース条件下で転写活性が上昇する OPN 遺伝子の 5' flanking region (以下 OPN プロモーター領域)の中に、高グルコースおよびグルコサミンに反応するエレメント (glucose / glucosamine responsive element: 以下 GGRE) を絞り込み、その構造を決定する。
- 2) GGRE に対する親和性に基づき、培養血管平滑筋細胞核抽出物より転写調節因子を同定する。
- 3) GGRE との相同性または DNA チップによる解析から、グルコサミンにより平滑筋細胞での発現が変化する遺伝子群を網羅的に同定する。

2001 年度の成果

- 1) OPN プロモーター領域の deletion constructs を順次培養平滑筋細胞へ導入してルシフェラーゼレポーターアッセイを行なった結果、-112 から -62bp の領域に GGRE の存在が示唆された。その構造はラットのほかマウス・ヒトの OPN プロモーターにも保存され、複数の既知のコンセンサスモチーフを含有していた。そのうち、E-box あるいは GC-rich モチーフに変異を導入すると、高グルコースおよびグルコサミンによる転写活性の上昇が著しく損なわれた。この GGRE モチーフを有する標識オリゴヌクレオチドを複製しゲルシフトアッセイを行なったところ、既知の転写因子である USF-1/2 や、他の未同定蛋白が結合することがわかった。
- 2) HMG-CoA 還元酵素阻害剤(以下スタチン)を培養平滑筋細胞に添加すると、その濃度依存的に、高グルコースによる OPN 発現が蛋白レベル・mRNA レベルで著しく低下した。スタチンによる OPN 発現抑制効果は、メバロン酸あるいはゲラニルゲラニルピロリン酸(以下 GGP)の添加によ

り、ほぼ完全にレスキューされた。したがって、内因性コレステロール合成経路において GGP が産生され、その結果何らかの細胞内蛋白がゲラニルゲラニル化されることを介して OPN 発現がポジティブに制御されていると推察された。細胞内蛋白のゲラニルゲラニル化から最終的に OPN 発現に至るシグナル伝達経路については、現在解析中である。ストレプトゾトシン惹起糖尿病ラットでは大動脈および腎において OPNmRNA が過剰発現するが、*in vivo* でも、スタチンを経口投与すると、これを対照のレベルまで低下させることができた。

3) アフィメトリクス社のオリゴヌクレオチドチップを用い、低濃度グルコサミン負荷により平滑筋細胞内で発現変化の見られる複数の遺伝子を同定した。現在クラスター解析を行なっている。

国内外での成果の位置づけ

糖尿病合併症の発症への関与が想定される細胞内代謝経路のうちヘキソサミン経路については最も未知の部分が多い。特に血管平滑筋細胞の遺伝子発現変化に着目した本研究成果は国内外におい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

平滑筋細胞核抽出物の不足により、GGRE に結合する転写因子の同定が完遂されなかった。

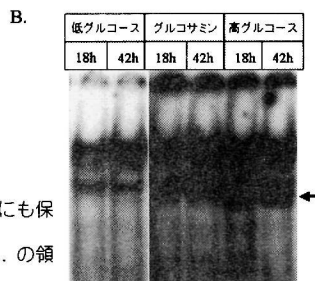
今後の課題

本年度の当初計画を完遂する。糖尿病合併症が進みやすい患者と進みにくい患者のゲノム DNA を収集し、ヘキソサミン経路の律速段階酵素である GFAT の遺伝子多型を比較する。

成果公表リスト

1. Takemoto M, Kitahara M, Yokote K, Take A, Asaumi S, Saito Y and Mori S. NK-104, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, reduces osteopontin expression by rat aortic smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 133 : 83-88, 2001.
2. Asaumi S, Takemoto M, Yokote K, Ridall AL, Butler WT, Fujimoto M, Kobayashi K, Kawamura H, Take A, Saito Y and Mori S. Identification and characterization of high glucose and glucosamine responsive element in rat osteopontin promoter. *Eur J Clin Invest*, in press.

E-box GC-rich
 Rat OPN: -110 GTGTAGGAGCAGGTGGCGGGCCGTGGCA-AAAACCTGA-73
 Mouse OPN: GTGTAGGAGCAGGTGGCGGGCTAGTGGCA-AAAACCTGA
 Human OPN: GTGTAGGAGCAGGTGGCTGGCGAGTGGCAGAAAACCTGA



OPN プロモーターの解析から推定されるグルコース・グルコサミン反応領域

- A. 高グルコース・グルコサミンに反応する rat の DNA 領域は、マウス、ヒト OPN 遺伝子にも保存されている
- B. 高グルコース(30mM)やグルコサミン(5mM)存在下で培養した平滑筋の細胞核には A. の領域を模したオリゴヌクレオチドと特異的に結合する蛋白(矢印)が確認された