

膵島特異的遺伝子の発現調節軸に焦点を絞った糖尿病遺伝子の探索

●武田 純¹⁾ ◇堀川 幸男²⁾

1) 岐阜大学大学院医学系研究科 2) 岐阜大学医学部附属病院

<研究の目的と進め方>

我々は日本人のメジャー糖尿病遺伝子の同定を目指している。日本人2型糖尿病は膵β細胞のインスリン分泌不全を特徴とするので、日本人の病態に類似した単因子異常のモデル疾患 MODY を解析する戦略を取った。すなわち、インスリン分泌に関する遺伝子異常が重度の場合は単一で糖尿病発症の「決定因子」となり、軽度の場合は他の遺伝子と協調する「リスク因子」になるという考え方に基づく。MODYは、非肥満、インスリン分泌不全、インスリン抵抗性がない若年糖尿病を特徴とする。同定された全てのMODY遺伝子はインスリン合成と分泌に関連するので、日本人2型糖尿病も類似した経路が障害されていると考え、膵島トランスクリプトームを活用した戦略を進めている。日本人の体質であるインスリン分泌不全にインスリン抵抗性素因が付加されると病態は加速される。抵抗性の相当部分にはグルココルチコイド経路が関与する。一方、ステロイド糖尿病や食欲亢進にも感受性体質が関与するので、上記の膵島インスリン分泌の規定因子に加えて、発症リスクを増大させる観点から膵島-視床下部グルココルチコイド調節軸を考えることはユニークな戦略である。

本研究では、視床下部にはグルココルチコイドの上流調節機構と摂食調節機構が存在し、膵島とも直接リンクする糖尿病が存在するという仮説を立てている。内分泌機能の共通性が組織を超えて存在する可能性が考えられる。そこで、膵島機能に関する特異的遺伝子群の濃縮セット化に加えて、グルココルチコイドの調節機構と摂食制御という視床下部トランスクリプトーム由来の調節軸を考慮した液性因子に特化した2極研究を行なっている。

一方、膵島内での直接の調節軸の下流標的の網羅も効果的である。そこで、本研究では糖尿病状態で変化する遺伝子の内で他臓器との調節軸を形成するものに特化して機能解析を進めた。

<2008年度の研究の当初計画>

(視床下部)

ラット視床下部の発現遺伝子を網羅的し、gene ontology(GO)に基づいて機能分類を行った。そして約2万種類の遺伝子を取録したマイクロアレイとcDNAライブラリを併用して、GCに反応する遺伝子を検索した。既存のアレイならびに上記カスタムアレイを用いて、8週齢の雄ラットにリン酸デキサメサゾン2mg/kgを腹腔内投与し、2時間後の視床下部mRNAの発現変化を解析した。変化遺伝子の内で膵島と共通のものを求めて解析を進めた。

(膵島)

ラットの膵島発現遺伝子の完全長cDNAをデータベースより構築する。この時マウスの完全長のデータベースを参照しながら、適宜GOサーチ、SignalPなどのソフトウェアを用いて合計84個の分泌タンパク候補分子を獲得した。糖尿病モデルGKラットの糖尿病発症前後の膵島でこれら分泌タンパクの発現レベルの

変化を検討したところ、*islet X*の発現レベルが有意に変化していることが明らかとなり(8w/3w=3.72 ± 0.34)、糖尿病候補分泌タンパクである可能性が高いと判断して先ず解析に供した。

<2008年度の成果>

(視床下部の応答遺伝子)

検出した視床下部発現既知遺伝子は10,801個だった。その内DEX投与によって2倍以上発現が変化した遺伝子は22個だった。15個は増加し、7個は減少した。一方でラット視床下部cDNAライブラリから11,092個の部分塩基配列を含むクローンを獲得し、GenBankデータベースとの相同性解析とクラスタリングによって2,777個の既知遺伝子を同定した。その内2,498個はマイクロアレイでも検出された。mRNA長が1.5-2.5kbの遺伝子について、ライブラリのクローン重複数とマイクロアレイのシグナル強度は有意に相関し($r=0.569$ ($p<0.001$))、検出した遺伝子のGOに基づく機能分布も両手法の間で類似していた。カスタムアレイによって残り279個のGC反応性を検証したところ、GC反応性遺伝子は含まれていなかった。GCによって増加した15個の遺伝子のうち、転写因子結合領域予測プログラム(rVISTA)と文献検索によってGREが予測された遺伝子は6個にすぎなかった。その中で、GC反応性が最も大きかった*sgk*、*bcl6*、*pdk4*について発現の詳細を検討し、これら3遺伝子の発現がDEX容量依存性に増加することを確認した。*In situ hybridization*法によって、CRH産生細胞の存在する室傍核を含む視床下部前方の切片でも3遺伝子の発現が検出された。*In silico*の手法によって予測されたGREが実際に機能しているかを検討するため、Hela細胞を用いてレポーターアッセイを行った結果、*sgk*のプロモーター領域だけがGC反応性を示し、*bcl6*、*pdk4*のプロモーターは反応しなかった。

(膵島の応答遺伝子と脂肪肝)

肝臓に*islet X*を強発現させ表現型を観察したところ、Ad-*islet X*過剰発現マウスでは中性脂肪含量増加(10.3 ± 1.9 vs 33.0 ± 9.9 mg/g liver, $p < 0.05$) によると思われる肝臓重量の増加が認められた。Ad-*islet X*過剰発現マウスの肝臓ではグルコキナーゼ(GK)、PAI-1の発現増加がみられたため(GK 2.25 ± 0.09 fold, PAI-1 12.9 ± 1.85 fold; 血清PAI-1濃度 1.57 ± 1.03 vs 10.18 ± 4.03, $p < 0.05$)、単離肝細胞や肝細胞株にAd-*islet X*を感染させ、GKの発現誘導やPAI-1産生能について確かめた。また高脂肪食負荷のみや、ob/obマウスではNASHのような繊維化を伴う脂肪肝は得られないため、これらのマウスにAd-*islet X*を過剰発現させ、NASHのモデルとなるか検討中である。

上記で述べた様に遺伝子多型はNASHの原因のワンヒットとなりうると考え、約100名のNASHサンプルにてタンパク変異の検討を行い、H211Qを含む3個のcSNPと1個のrSNPを獲

得した。今後病態との関連について検討を加える。

<国内外での成果の位置づけ>

ラット脳島トランスクリプトームに関する遺伝子シーズは我々のものが唯一である。視床下部のトランスクリプトームと連結させて代謝異常に特化した調節軸を探るところみは類を見ない。また、転写因子異常を発端とした発現調節軸の流れの検討から液性因子に特化して関連分子を同定したこともユニークである。

得られた候補遺伝子の解析により、糖尿病を中心とした代謝異常の感受性遺伝子を最も多く同定してきた経験を有するので、本研究の分子についても同様の戦略により成果が期待される。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

上記の戦略により、糖尿病の疾患感受性遺伝子に関する多くの候補が同定された。しかし一方で、投入してきた研究費用は想定を下回ったために当初予定の遺伝子数はこなせなかった。限られた予算という縛りの中では十分な成果であると自己評価する。さらに、モデル動物の作成も同様の理由により到達目標を達成できていないことも挙げられる。

<今後の課題>

我々は既に冠動脈の石灰化 (CT 値 130 以上) の定量的評価法を開発した。脂肪肝との関連を検討するために、診断的意義が確立されているレプチン、アディポネクチン、アポ蛋白、高感度 CRP、TNF- α 、IL-6、PAI-1 などの液性因子を測定し、糖尿病関連データとリンクした約 530 名の動脈硬化データベースを作成した。我々の予備解析では *islet X* と BMI に有意な正相関 ($r = 0.284$, $p = 0.043$)、アディポネクチンとは有意な負相関 ($r = -0.361$, $p = 0.0089$) が認められているが、今後さらにサンプル数を増やして病態リンクに関する統計学的検討を加えていく。「臓器連関における発現調節軸」に関連した病態という概念の確立を目指す本研究は、糖尿病のみならず、関連する代謝異常の病態解明に新機軸を提示するであろう。

<成果公表リスト>

0901152027

H. Sato, Y. Horikawa, K. Iizuka, N. Sakurai, T. Tanaka, N. Shihara, A. Oshima, J. Takeda, and M. Mikuni.

Large-scale analysis of glucocorticoid target genes in rat hypothalamus.

J Neurochem. 106: 805-814, 2008.

0801111028

K. Miyake, Y. Horikawa, K. Hara, K. Yasuda, H. Osawa, H. Furuta, Y. Hirota, K. Yamagata, Y. Hinokio, Y. Oka, N. Iwasaki, Y. Iwamoto, Y. Yamada, Y. Seino, H. Maegawa, A. Kashiwagi, K. Yamamoto, K. Tokunaga, J. Takeda, H. Makino, K. Nanjo, T. Kadowaki, and M. Kasuga.

Association of TCF7L2 polymorphisms with susceptibility to type 2 diabetes in 4,087 Japanese subjects.

J Hum Genet. 53: 174-180, 2008.

0811171544

K. Yasuda, K. Miyake, Y. Horikawa, K. Hara, H. Osawa, H.

Furuta, Y. Hirota, H. Mori, A. Jonsson, Y. Sato, K. Yamagata, Y. Hinokio, H-Y. Wang, T. Tanahashi, N. Nakamura, Y. Oka, N. Iwasaki, Y. Iwamoto, Y. Yamada, Y. Seino, H. Maegawa, A. Kashiwagi, J. Takeda, E. Maeda, H-D. Shin, Y-M. Cho, K-S. Park, H-K. Lee, M. Ng, R. Ma, W-Y. So, J. Chan, V. Lyssenko, T. Tuomi, P. Nilsson, L. Groop, N. Kamatani, A. Sekine, Y. Nakamura, K. Yamamoto, T. Yoshida, K. Tokunaga, M. Itakura, H. Makino, K. Nanjo, T. Kadowaki, and M. Kasuga.

Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus.

Nat Genet. 40: 1092-1097, 2008.

0901160819

M. Zenibayashi, K. Miyake, Y. Horikawa, Y. Hirota, T. Teranishi, K. Kouyama, K. Sakaguchi, J. Takeda and M. Kasuga.

Lack of association of LRP5 and LRP6 polymorphisms with type 2 diabetes mellitus in the Japanese population

Endocr. J. 55: 699-707, 2008.