

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

岐阜大学大学院医学系研究科

<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。しかし、2型糖尿病は多因子疾患であり、遺伝素因を同定することは困難である。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、直接リンクした遺伝素因を同定することが求められる。そこで、日本人の病態に類似した単因子異常のモデル疾患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因子と協調する「リスク因子」となるという考え方に基づく。我々は、日本人の2型糖尿病の遺伝素因を解明し罹患体質診断に応用するために、日本人タイプの糖尿病と類似した常染色体優性遺伝の若年発症糖尿病 (MODY; maturity-onset diabetes of the young) をモデル疾患として解析してきた。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ことを特徴とする (純粋な日本人型の表現型)。現在までに同定された6種類のMODY遺伝子にコードされる分子はインスリン合成と分泌に関連するので、日本人タイプの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。

日本人の表現型であるインスリン分泌不全に後天的な肥満、食行動異常、インスリン抵抗性が付加されるとインスリン分泌不全は加速される。インスリン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、ステロイド糖尿病の発症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グルココルチコイド応答性を考えることはユニークな戦略である。

インスリン分泌不全に標的を絞ったと言えど、依然として候補遺伝子の数は膨大であるので、さらに別の関連した表現型を考慮することによって候補を濃縮することが効率的である。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、両者は密接に関連すると共に膵島とも直接リンクする糖尿病の病態が存在するという仮説を立てている。内分泌機能の特性に関する共通性が組織を超えて存在する可能性が考えられる。上述のように、膵島特異的な機能や発現パターンに関する遺伝子を対象として遺伝学的解析を試みている。上記のように、視床下部に関連するサブ表現型を付加的に考慮することによって、特定のサブタイプの検出能の向上を試みてきた。即ち、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リンクを考慮した2極推進研究を行なっている。

<2007年度の研究の当初計画>

1) 膵島in situ hybridizationの成果応用と遺伝学的解析

膵島特異的な発現遺伝子について、主要組織での発現分布を検討することによって、より高次的特異性を有する候補遺伝子を得る。我々が独自開発したESTプールを解析対象とする。特に、ホルモン分泌という特性の共通性も考え、内分泌組織の発現遺伝子も検討対象とする。

本作業と平行し、前年度と同様に、MODY家系について直接シーケンス法によりコード蛋白の異常を探索する。同時にエクソン領域または近傍のSNP集積を行ない、2型糖尿病の発症およびサブ表現型とのリンクを関連解析する

2) インスリン分泌と食欲調節との関連についての解析

既にラット視床下部のESTも平行して11,092個を集積している (重複しない5,442遺伝子)。データベースサーチでどの登録ESTにも合致しない新規遺伝子は上記以外に1,367種類あり、組織特異性の高い未検出遺伝子またはnon-coding RNAと考えられる。

実験動物にグルココルチコイド (DEX-P) 負荷を行ない、発現変化遺伝子をマイクロアレイ (28K) で網羅し、視床下部ESTと重複するものを選別した。

集積した視床下部での高変化遺伝子において、特に神経内分泌に関連する分泌蛋白をコードする構造遺伝子に本年度研究では焦点を当てた。即ち、グルココルチコイド応答配列GREをプロモーターに有する候補遺伝子を検索し、膵島機能との関連を検討した。

<2007年度の成果>

1) 膵島ESTの大規模in situ hybridizationによる候補獲得

インスリン分泌という膵島特異的な機能に関連する遺伝子群を網羅的に集積するために、前年度までに我々はハイスループットなEST in situ hybridizationの系を確立し、独自収集した約2万個のラットESTに由来する約1万種類の重複しない配列を用いて膵島の特異的発現について網羅的解析を実施した。その結果、現在までに膵島に特異性の高い発現遺伝子134個 (既知43個、未知91個) を同定した。これらについて、さらに胎生期の未成熟膵 (rat embryo 15days) を用いた同様のISH解析により、組織特異性の獲得過程の解析を行なっている。

第一段階の遺伝子のうち、機能が明らかな20遺伝子 (194/233エクソン) を直接シーケンスにより変異スクリーニングした。その結果、MODYの成因となる遺伝子変異の同定には至っていないが、181 SNP (新規91個、ミスセンス15個) を同定することができた。現在、これらのSNPと2型糖尿病の発症との関連を解析している。

2) ラット視床下部ESTにおけるグルココルチコイドの標的遺伝子についての解析

ゲノム配列を用いて特異性の高い遺伝子について、10 Kb以内の予測プロモーター配列におけるGREの有無をin silico解析し

た。ESTとアレイ解析で2,498個もホルモン合成分泌関連の遺伝子を選別し、さらにgene ontology解析により587個のグルココルチコイド応答遺伝子を得た。rVISTA 2.0によるGRE解析により、86個の遺伝子を獲得した。しかし、sgkのみがグルココルチコイド応答性を示した。

3) グルココルチコイド応答遺伝子の解析

グルココルチコイド負荷条件により検出した15遺伝子に着目したが、rVISTA解析により3種類の遺伝子がGREを有する有力候補として選別された(sgk, bcl6, pdk4)。プロモーター領域のGC応答配列の転写制御活性はsgkのみに認められたことから(レポーター解析)、プロモーターを介した直接制御以外のグルココルチコイド調節も生理機能において重要であることが示唆された。さらに、以前に実施されたゲノム全域にわたる感受性遺伝子座のスクリーニングにおいて、気分障害の感受性遺伝子座のマッピング領域にsgkが存在したことから、同遺伝子は重要な候補遺伝子であると考えられた。現在、多型スクリーニングとSNPハプロタイプを用いた関連解析を進めているところである。

<国内外での成果の位置づけ>

申請者は、世界で最初のMODYを含め3種類の原因遺伝子を発見して以来、一貫して発症機序の解明研究のフロンティアに位置する。実際、約300の日本人家系からのMODY症例を有しており、現在までに最も多くMODY遺伝子異常を発見している。さらに、

また、膵内分泌の組織特異性と糖尿病の発症機構を解明するために、1993年に世界で最初にヒト膵島ゲノム研究(EST)に着手し、その後、実験動物(マウス、ラット)にも膵島トランスクリプトーム研究を進展させた。大型膵島ESTバンクは、世界で米国EPConDBと我々のソースの2つだけであり、ラットシーズはEPConDBにはなく、我々だけが大規模に有する(DDBJで公開)。視床下部のトランスクリプトームも加えて高次の糖尿病ESTシーズはユニークなツールである。本研究では、ラットESTを用いた大規模in situ hybridization(ISH)により、膵島特異的な新たな遺伝子群を得たので、同新規遺伝子群のプロモーター解析を実施しているが、このアプローチも独創的である。

また、上述のようにストレス応答や食欲制御に関するラット視床下部のEST収集も前年度までに完了しており、本研究の重要な遺伝子情報ソースとなる。糖尿病の関連表現型について、膵島と視床下部という異なる関連組織を病態リンクさせたゲノム発現解析は国内外に類を見ない。

本アプローチは、基本的に大量ラットESTクローンを有する我々のみが遂行可能である、ユニークな糖尿病トランスクリプトーム戦略である。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

ラットのadult膵の大規模in situ hybridizationに関しては、自動処理システムの確立によって順調に作業は進行した。続いて、膵島の内分泌特性の獲得に関する遺伝子群を絞り込むためには、発生と分化の過程による機能関連の解析が重要である。胎生期の未成熟膵(rat embryo 15days)を用いた同様のISH解析により、組織特異性の獲得過程の解析を行なっているが、胎児膵の適正な週齢の決定と大量処理の条件設定に手間どった。その背景として、組織の性状から切片数を十分に得られなかったことがある。この点は、当初予定よりも作業のスピードダウンはせざるを得な

いと考えている。

<今後の課題>

視床下部と膵島の各々において、設定条件に基づいて候補遺伝子は集積されつつある。食行動やストレス由来のインスリン抵抗性と分泌不全という表現型の直接リンクを効率的に行なうことが直近の課題である。さらに、遺伝素因の関連解析の対象は現集団で適切かどうかの検証も必要になる可能性がある。

具体的な本研究目標としての課題は、視床下部に加えてsgkの膵島における意義について解析を深めることであり、患者を用いた多型解析である。

<成果公表リスト>

現在、成果を投稿中である。