

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09377

研究課題名(和文)2型糖尿病疾患感受性遺伝子KCNQ1の生理的・病態生理的役割の解明

研究課題名(英文)Physiological and pathophysiological roles of KCNQ1 as a susceptibility gene for type 2 diabetes mellitus

研究代表者

高本 偉碩 (Takamoto, Iseki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60431871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病感受性遺伝子KCNQ1の生理的・病態生理的役割をin vivoで明らかにすることを目的として、KCNQ1に関する様々な遺伝子改変マウスを同定・作製し、その表現型を解析した。新規に同定した1塩基変異によるKCNQ1の機能低下型遺伝子変異マウスは明らかな耐糖能異常を示さず、また機能亢進型KCNQ1を膵細胞に発現させた遺伝子改変マウスはインスリン分泌低下を伴う耐糖能異常を示した。KCNQ1の発現/機能亢進が耐糖能異常と関連している可能性が示唆された。

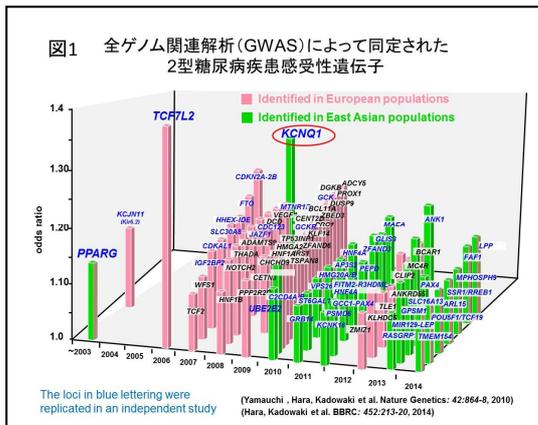
研究成果の概要(英文)：Common genetic variations of KCNQ1 are associated with type 2 diabetes. In this study, we investigated the physiological and pathophysiological roles of KCNQ1 in glucose homeostasis with several genetically engineered mice. We have identified novel genetically engineered mice with loss-of-function KCNQ1 caused by a single-nucleotide mutation, which showed no obvious glucose intolerance. By contrast, mice with gain-of-function KCNQ1 in the pancreatic beta cells were associated with a reduction of insulin secretion, leading to impaired glucose tolerance. Thus, our findings suggest that functional up-regulation and/or over-expression of KCNQ1 in the pancreatic beta cells play a crucial role in glucose metabolism in vivo.

研究分野：糖尿病

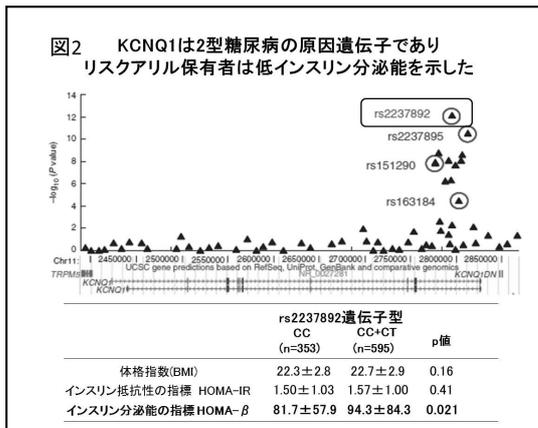
キーワード：2型糖尿病 疾患感受性遺伝子 KCNQ1

1. 研究開始当初の背景

近年、全ゲノム関連解析(GWAS)によって2型糖尿病疾患感受性遺伝子が続々と同定され、その数は70を超えている【図1】。



2008年に我々を含む2つのグループは、電位依存性カリウムチャンネルKCNQ1が2型糖尿病疾患感受性遺伝子であることを見出し報告した。このことはその後の多くの検討でも追試され、KCNQ1はヒトにおいて普遍的かつインパクトの大きい2型糖尿病疾患感受性遺伝子であることがコンセンサスとなっている。臨床的にはインスリン分泌への関与が示されているが、詳細な分子機構は不明である【図2】¹⁻²⁾。



2. 研究の目的

そこで本研究では、KCNQ1に関する様々な遺伝子改変マウスの作製・解析を通じて、膵細胞機においてKCNQ1が担う生理的・病態生理的役割をin vivoで解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 機能低下型遺伝子改変マウスについて 自然発生KCNQ1遺伝子変異マウス(C3H/HeJCrI-Kcnq1vtg-2J/J)では、KCNQ1遺伝子の5'側の変異により、KCNQ1の機能が低

下していることが知られている。本マウスとの相補性解析(complementation analysis)などにより、KCNQ1に機能低下型変異が導入されていることが判明したKCNQ1の機能低下型遺伝子操作マウス(C57BL/6J-Kcnq1vtg-3J/J(vtg3マウス)<<https://www.jax.org/strain/005748>>)を用いて、その表現型を解析した。

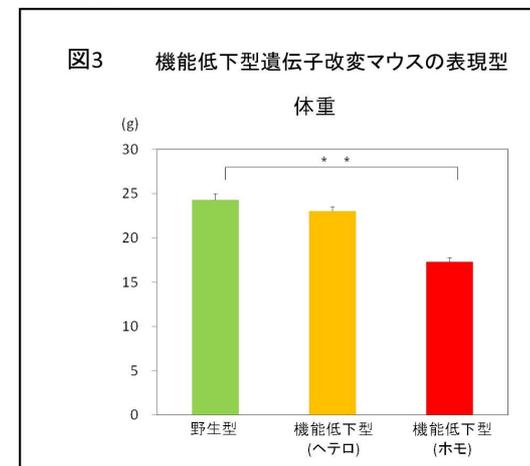
(2) 機能亢進型遺伝子改変マウスについて

KCNQ1の機能亢進型変異体をRIPプロモーター(Rat Insulin Promoter)の下流につなぐコンストラクトを構築し、膵細胞に機能亢進型KCNQ1を発現させたトランスジェニックマウスを作製し、表現型を解析した。

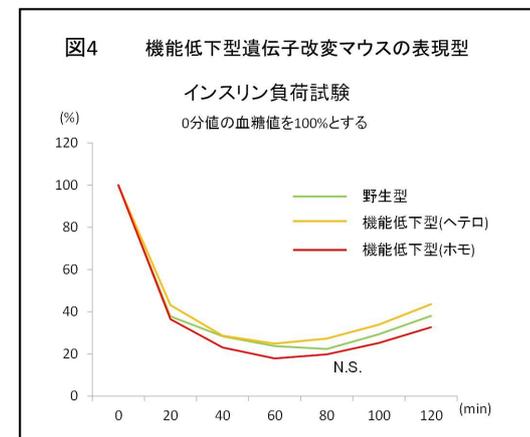
4. 研究成果

(1) 機能低下型遺伝子改変マウスについて

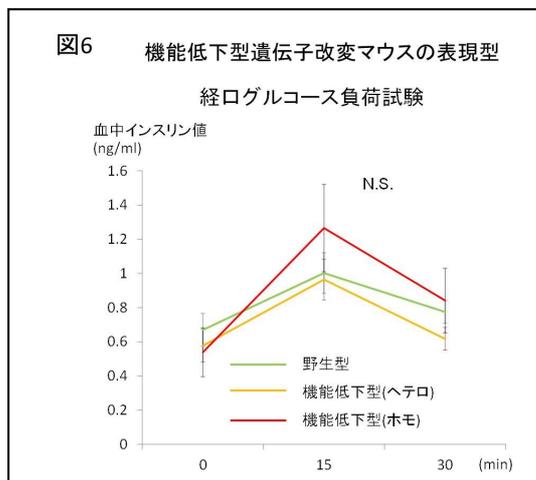
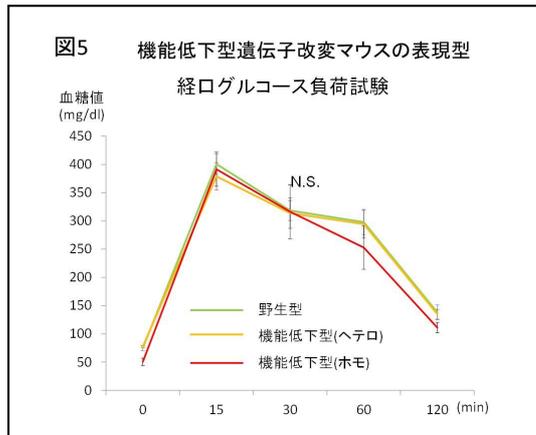
普通食飼育下の成体において、野生型マウスと比較して、機能低下型マウス(ヘテロ)の体重と同等であったが、機能低下型マウス(ホモ)の体格は小さく、体重は有意に少なかった【図3】。



また、インスリン負荷試験を行うと、野生型マウス、機能低下型マウス(ヘテロ)、機能低下型マウス(ホモ)は同等の血糖降下度を示したことから、インスリン抵抗性に大きな差はないと考えられた【図4】。



次に、経口糖負荷試験を行うと、野生型マウス、機能低下型マウス(ヘテロ)、機能低下型マウス(ホモ)は同等のインスリン分泌と血糖推移を示した【図5,6】。



従って、in vivo で KCNQ1 の機能低下は耐糖能異常をきたさないことが示唆された。この結果は、つい最近報告された、exon2 を人工的に欠失させた KCNQ1 欠損マウスの耐糖能に関する表現型に類似している³⁾。また、以前、Yamagata Kらは、膵細胞株 MING で KCNQ1 を過剰発現させた場合にインスリン分泌が低下することを報告している⁴⁾。そこで、KCNQ1 の発現/機能亢進と耐糖能の関連を in vivo で明らかにすることが重要であると考えられた。

(2) 機能亢進型遺伝子改変マウスについて

膵細胞において機能亢進型 KCNQ1 を発現しているマウスは、野生型マウスと比較して離乳時期より随時血糖値は高値を示した。また成体において、耐糖能異常はさらに顕著となり、野生型マウスと比較して機能亢進型マウスでは、随時血糖値は高値を示し、インスリン値は低値であった【図7】。

経口糖負荷試験を行うと、機能亢進型マウスは野生型マウスと比較してインスリン分泌低下を伴う耐糖能異常を呈した【図8】。

また、機能亢進型マウスは膵組織像での膵細胞面積の減少を呈した【図9】。

図7 機能亢進型遺伝子改変マウスの表現型

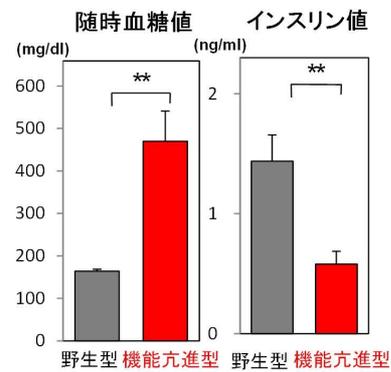


図8 機能亢進型遺伝子改変マウスの表現型

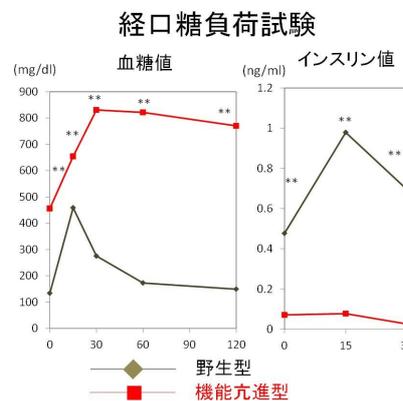
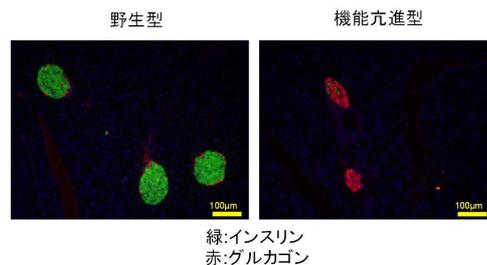


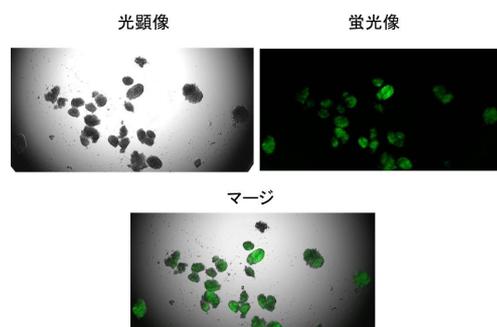
図9 機能亢進型遺伝子改変マウスの表現型

膵組織像



さらに、機能亢進型マウスと、膵細胞特異的な蛍光レポーターマウス(MIP-GFP-Tg)とを交配して得られたダブルトランスジェニックマウスを作製した。単離膵島を採取し、明瞭な蛍光を確認できた【図10】。

図10 ダブルトランスジェニックマウス由来の単離膵島



単離膵島を single cell 化し, 蛍光を指標として膵細胞を同定した上で電気生理学的解析を行ったところ, 機能亢進型 KCNQ1 を発現しているマウス由来の膵細胞ではコントロールマウス由来の膵細胞と比較して, 高グルコース時の活動電位数が減少していることを見出した.

以上から, 膵細胞において, KCNQ1 は機能を亢進させた場合に, インスリン分泌低下を伴う耐糖能異常をきたすことが示された.

(3) 考察

2008年に KCNQ1 は 2 型糖尿病感受性遺伝子の 1 つとして同定され, 日本人にとって重要な遺伝子であると考えられるが, 2 型糖尿病の発症機序は未だ不明である. KCNQ1 は電位依存性カリウムチャネルであり, 心筋のほかに, 膵島においても発現している.

本研究により, 膵細胞において, KCNQ1 は機能を低下させた場合ではなく, 亢進させた場合に, 膵細胞の脱分極抑制ないしは再分極促進を介することで, インスリン分泌低下をもたらす可能性が示唆された. 膵細胞特異的な KCNQ1 チャネル阻害薬が, 新たな糖尿病治療薬の開発のターゲットとなることが期待される.

<参考文献>

- 1) Nat Genet.40:1092, 2008
- 2) Nat Genet.40:1098, 2008
- 3) Proc Natl Acad Sci U S A.112:8332, 2015
- 4) Biochem Biophys Res Commun. 407:620, 2011

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計4件)

高本 偉碩, 窪田 直人, 中屋 恵三, 桜井 賛孝, 植木 浩二郎, 門脇 孝. 「モデル動物を用いた KCNQ1 遺伝子変異と耐糖能に関する検討」. 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2017 年 5 月

高本 偉碩. 「膵細胞不全の分子機構 2 型糖尿病感受性遺伝子の機能解析 ((Molecular mechanisms of pancreatic cell failure Functional analysis of type 2 diabetes susceptibility gene))」. 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2016 年 5 月

高本 偉碩, 窪田 直人, 中屋 恵三, 桜井 賛孝, 植木 浩二郎, 門脇 孝. 「KCNQ1 遺伝子変異と耐糖能 モデル動物を用いた検討」. 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2016 年 5 月

高本 偉碩, 窪田 直人, 中屋 恵三, 桜井 賛孝, 植木 浩二郎, 門脇 孝. 「KCNQ1 の機能低下型変異の同定と耐糖能との関連」. 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2015 年 5 月

[図書](計2件)

寺内 康夫, 高本 偉碩, 藤本 新平, 水上 浩哉:膵細胞不全の分子メカニズム. Islet Equality .6:5-14,2018

高本 偉碩:2 型糖尿病感受性遺伝子が膵細胞で担う役割の解明. 日本応用酵素協会誌.51:120-121,2017

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高本 偉碩 (TAKAMOTO, Iseki)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 60431871

(2) 研究協力者

窪田 直人 (KUBOTA, Naoto)
中屋 恵三 (NAKAYA, Keizo)
熊谷 勝義 (KUMAGAI, Katsuyoshi)
窪田 哲也 (KUBOTA, Tetsuya)
井上 真理子 (INOUE, Mariko)
桜井 賛孝 (SAKURAI, Yoshitaka)
岩本 真彦 (IWAMOTO, Masahiko)
吉田 昌史 (YOSHIDA, Masashi)
原 一雄 (HARA, Kazuo)
植木 浩二郎 (UEKI, Kohjiro)
門脇 孝 (KADOWAKI, Takashi)