

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08466

研究課題名(和文) 疾患モデル動物を活用した2型糖尿病疾患感受性遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of type 2 diabetes susceptibility genes using animal disease models

研究代表者

高本 偉碩 (TAKAMOTO, ISEKI)

国際医療福祉大学・医学部・准教授

研究者番号：60431871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病感受性遺伝子であるKCNQ1とUBE2E2に着目し、疾患モデル動物を作製してin vivoで機能解析を行った。KCNQ1のチャネルclose型遺伝子変異マウスは通常食飼育下ならびに高脂肪食負荷下にて、明らかな耐糖能異常を示さなかった。また、チャネルopen型KCNQ1を膵細胞に発現させた遺伝子改変マウスは離乳後早期からインスリン分泌低下を伴う耐糖能異常を呈した。また、膵細胞でUBE2E2を過剰発現させた遺伝子改変マウスは成体においてインスリン分泌低下を伴う耐糖能異常を呈した。KCNQ1とUBE2E2の発現/機能の亢進が耐糖能異常と関連している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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100を超えている。ユビキチン結合酵素であるUBE2E2は欧米人では2型糖尿病との相関が認められず、日本人・アジア人に特有の疾患感受性遺伝子であると推察され、そのPopulation Attributable Riskは電位依存性カリウムチャネルKCNQ1と並んで日本人2型糖尿病疾患感受性遺伝子の中でも重要である。本研究ではインスリンを分泌する膵細胞においてKCNQ1とUBE2E2が担う生理的・病態生理的役割の一端を個体レベルで明らかにすることができた。

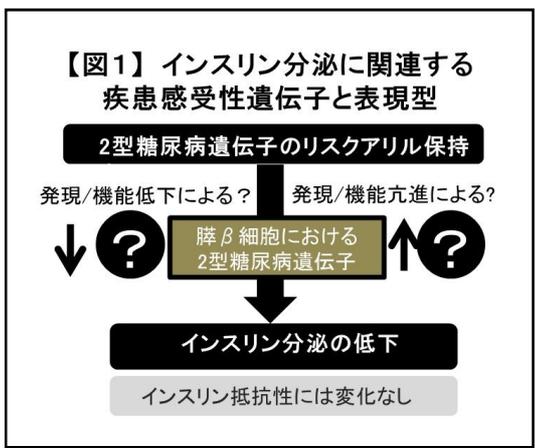
研究成果の概要(英文)：Common genetic variations of KCNQ1 and UBE2E2 are associated with type 2 diabetes. In this study, we investigated the physiological and pathophysiological roles of KCNQ1 and UBE2E2 in glucose homeostasis with several genetically engineered mice. We have identified novel genetically engineered mice with loss-of-function KCNQ1 caused by a single-nucleotide mutation, which showed no obvious glucose intolerance under a normal chow diet and a high-fat diet. By contrast, postweaning mice with gain-of-function KCNQ1 in the pancreatic beta cells had a characteristic of reduced insulin secretion, leading to impaired glucose tolerance. Moreover, adult mice with over-expression of UBE2E2 in the pancreatic beta cells showed impaired glucose tolerance with reduction of insulin secretion. Thus, our findings suggest that functional up-regulation and/or over-expression of KCNQ1 and UBE2E2 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 疾患モデル動物 KCNQ1 UBE2E2

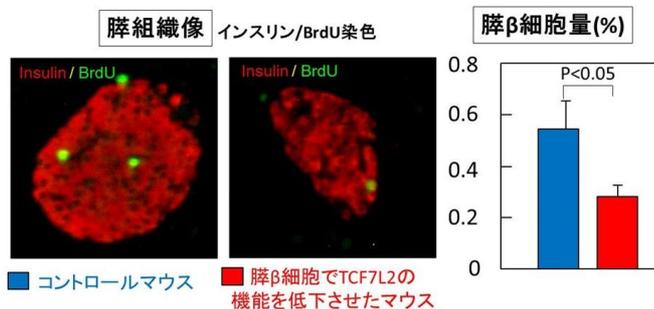
1. 研究開始当初の背景

2006年に疾患感受性領域に関する位置情報をもとに患者対照相関解析により欧米人における2型糖尿病疾患感受性遺伝子として TCF7L2 が同定された(Nat Genet.38:320, 2006).翌年,我々も日本人において同様の結果を報告した(Diabetologia.50:747,2007).この TCF7L2 の発見を皮切りに,様々な人種・地域においてゲノムワイド関連解析(GWAS)が実施されるようになったが,同定された疾患感受性遺伝子に関して,臨床的にインスリン分泌との関連が認められても,その発現や機能の低下・亢進のいずれが糖尿病発症の原因となるのか,多くは不明のままであり,疾患モデル動物による検討が模索された【図1】.



我々は以前,Wnt シグナルの一翼を担う転写因子である TCF7L2 に着目し,TCF7L2 の機能低下型遺伝子改変マウスの作製・解析に着手した.その結果,TCF7L2 は膵β細胞量の制御を通じてインスリン分泌に重要な役割を果たしていることを明らかにした(Diabetologia.57:542,2014)

【図2】膵β細胞でTCF7L2の機能を低下させたマウスは膵β細胞量の減少を呈した



【図2】.その後,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100を優に超えている.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ネルKCNQ1が2型糖尿病の疾患感受性遺伝子であることを見出し報告した(Nat Genet.40:1092,2008 ; Nat Genet.40:1098, 2008).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型糖尿病の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.

【図3】UBE2E2は日本人における2型糖尿病疾患感受性遺伝子である

SNP	遺伝子	ステージ1			ステージ2			合わせたP値	オッズ比(95%CI)	PAR
		2型DM	コントロール	P値	2型DM	コントロール	P値			
rs2237892	KCNQ1	0.660	0.614	1.07 × 10 <sup>-9</sup>	0.669	0.611	7.41 × 10 <sup>-9</sup>	6.66 × 10 <sup>-18</sup>	1.25 (1.19-1.31)	13.1
rs2206734	CDKAL1	0.513	0.478	3.11 × 10 <sup>-5</sup>	0.519	0.465	8.91 × 10 <sup>-9</sup>	1.93 × 10 <sup>-12</sup>	1.19 (1.13-1.25)	8.2
rs2383208	CDKN2B	0.615	0.584	1.92 × 10 <sup>-4</sup>	0.624	0.57	3.15 × 10 <sup>-9</sup>	1.45 × 10 <sup>-11</sup>	1.19 (1.13-1.24)	9.6
rs7901695	TCF7L2	0.056	0.04	4.49 × 10 <sup>-6</sup>	0.056	0.042	2.29 × 10 <sup>-1</sup>	4.53 × 10 <sup>-9</sup>	1.41 (1.26-1.58)	1.6
rs6780569	UBE2E2	0.850	0.825	4.97 × 10 <sup>-5</sup>	0.860	0.835	1.76 × 10 <sup>-3</sup>	3.19 × 10 <sup>-5</sup>	1.21 (1.19-1.29)	14.7
rs7172432	C2CD4A/B	0.598	0.559	3.35 × 10 <sup>-6</sup>	0.591	0.564	3.79 × 10 <sup>-3</sup>	7.48 × 10 <sup>-3</sup>	1.14 (1.09-1.20)	7.4

PAR: Population Attributable Risk

さらに我々は,2010年に新たな2型糖尿病疾患感受性遺伝子としてユビキチン結合酵素UBE2E2を同定した

(Nat Genet.42:864,2010).UBE2E2は,欧米人では2型糖尿病との相関が認められず,日本人・アジア人に特有の疾患感受性遺伝子であると推察された.UBE2E2のリスクアリルはインスリン分泌に関連しており,そのPopulation Attributable Riskが14.7とKCNQ1(13.1)に匹敵し,日本人2型糖尿病疾患感受性遺伝子の中でも重要であると考えられた【図3】.その後もアジア人を対象とした解析で,KCNQ1とUBE2E2のSNPがインスリン分泌低下を伴う耐糖能異常と関連していることが報告されている(Medicine (Baltimore). 95: e3604,2016).

2. 研究の目的

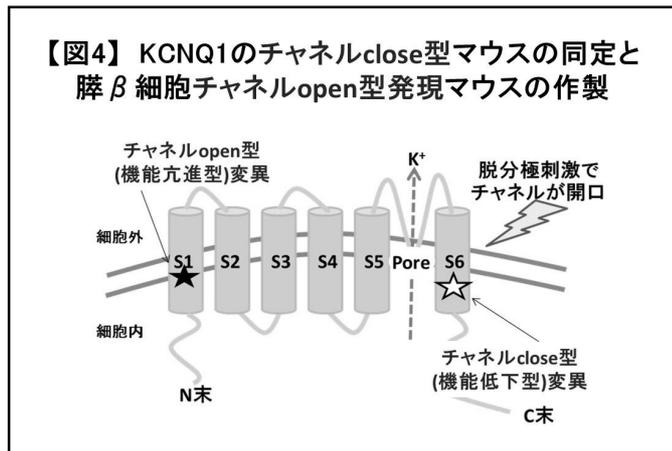
インスリンを分泌する膵β細胞で電位依存性カリウムチャネルとしてのKCNQ1やユビキチン結合酵素としてのUBE2E2が担う生理的・病態生理的役割を解明することは,2型糖尿病の発症機構の理解と早期の診断法・最適な治療法の開発において新たな発展をもたらすことが期待

されるが,そもそもヒトにおける「インスリン分泌低下」という表現型が,KCNQ1・UBE2E2の発現や機能の亢進あるいは低下によるものか,未だ明確な結論が得られていない。

そこで我々は本研究で,疾患モデル動物として KCNQ1・UBE2E2 に関する遺伝子改変マウスを作製・解析することを通じて,KCNQ1・UBE2E2 が膵β細胞で担う役割を in vivo で明らかにすることを旨とした。

### 3. 研究の方法

KCNQ1 に関する遺伝子改変マウスとして,我々は 1 塩基変異による KCNQ1 の機能低下型(チャンネル close 型)遺伝子変異マウスの同定に成功した.また,in vitro の電気生理学的解析により機能亢進型(チャンネル open 型)であると確認できた変異 KCNQ1(mtKCNQ1)を膵β細胞に発現させた遺伝子改変マウス (RIP-mtKCNQ1-Tg)も作製した【図4】.また,UBE2E2 に関する遺伝子改変マウスとして,膵β細胞で UBE2E2 を過剰発現させた遺伝子改変マウス (RIP-UBE2E2-Tg)を作製した. これら疾患モデル動物に関して,耐糖能を中心に表現型を解析した.さらに膵β細胞にチャンネル open 型 KCNQ1 を発現させたマウス (RIP-mtKCNQ1-Tg)と膵β細胞特異的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 Tg マウスから単離膵島を採取し,顕微鏡下で膵β細胞を同定した上で電気生理学的解析を行った。

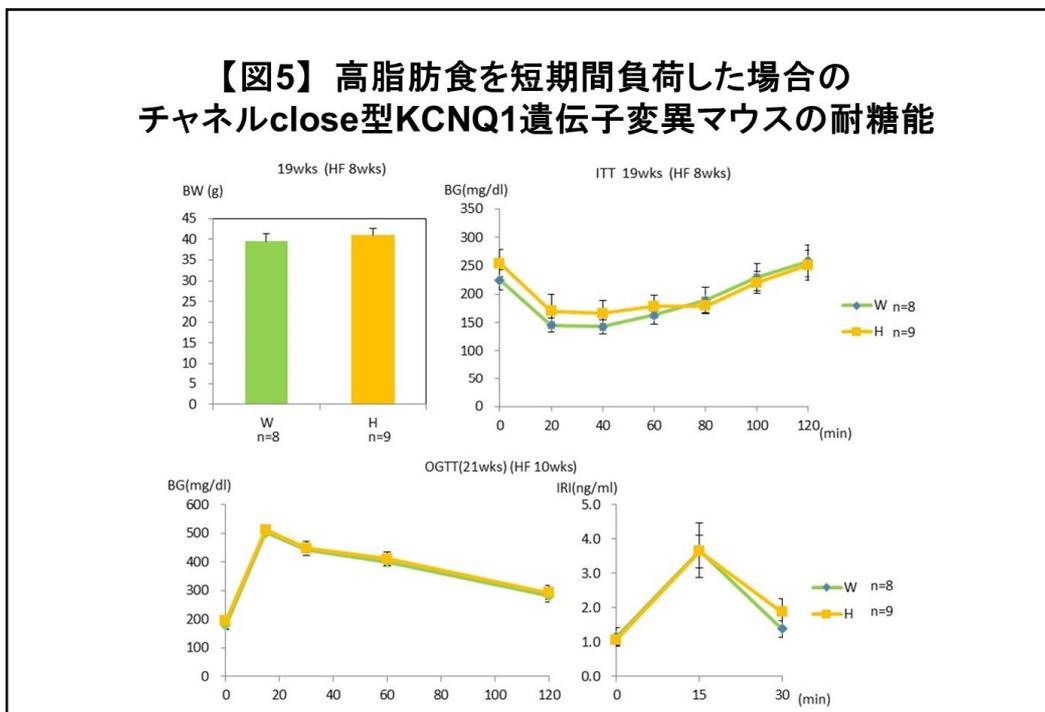


### 4. 研究成果

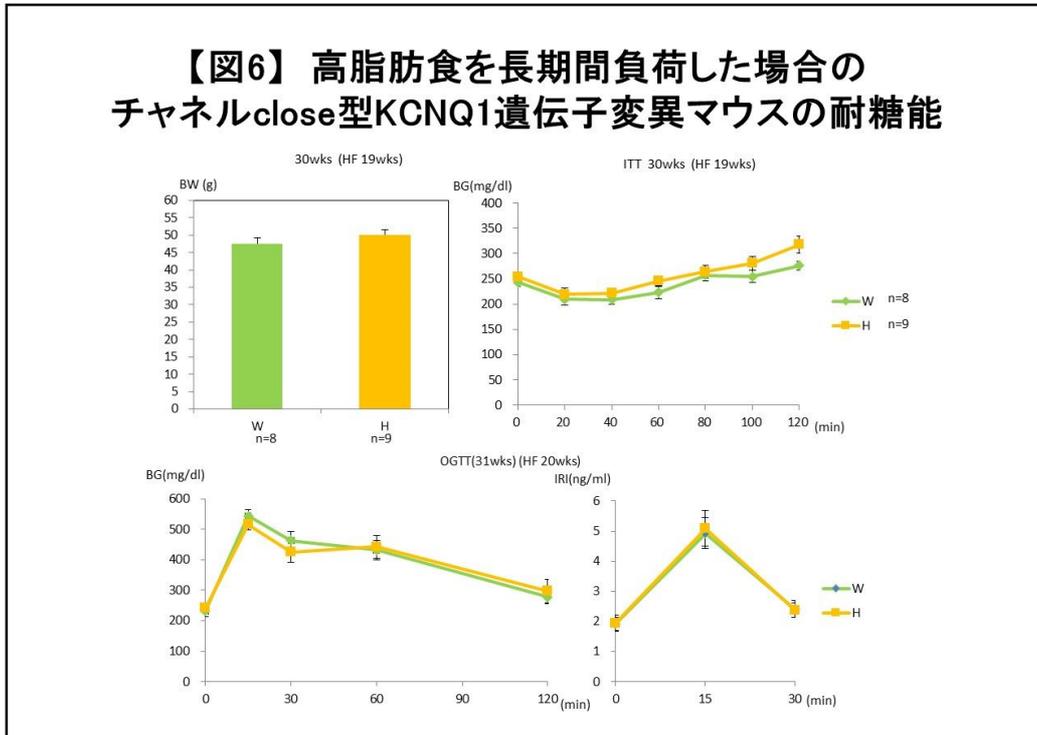
#### (1) チャンネル close 型 KCNQ1 遺伝子変異マウスについて

普通食飼育下の成体において,野生型マウスと比較して,チャンネル close 型マウス(ヘテロ)の体重と同等であったが,チャンネル close 型マウス(ホモ)の体格は小さく,体重は有意に少なかった.また,インスリン負荷試験(ITT)を行うと,野生型マウス,チャンネル close 型マウス(ヘテロ),チャンネル close 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.次に,経口糖負荷試験(OGTT)を行うと,野生型マウス,チャンネル close 型(ヘテロ),チャンネル close 型(ホモ)は同等のインスリン分泌と血糖推移を示した。

そこで,野生型マウス(W),チャンネル close 型マウス(ヘテロ;H)に短期間高脂肪食を負荷して耐糖能を評価した.高脂肪食を負荷し8週間経過した時点では両者に体重差はなく,インスリン負荷試験(高脂肪食負荷期間:8週間)ならびに経口糖負荷試験(高脂肪食負荷期間:10週間)にも有意な差を認めなかった【図5】.



さらに、高脂肪食負荷期間を延長して評価した。高脂肪食を負荷し 19 週間経過した時点でも両者に体重差はなく、インスリン負荷試験（高脂肪食負荷期間:19 週間）ならびに経口糖負荷試験（高脂肪食負荷期間:20 週間）にも有意な差を認めなかった【図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、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 (Proc Natl Acad Sci U S A.112:8332, 2015)。また、以前、Yamagata K らは、膵β細胞株 MIN6 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 (Biochem Biophys Res Commun. 407:620, 2011)。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た。

### (2) 膵β細胞チャンネル open 型 KCNQ1 発現マウスについて

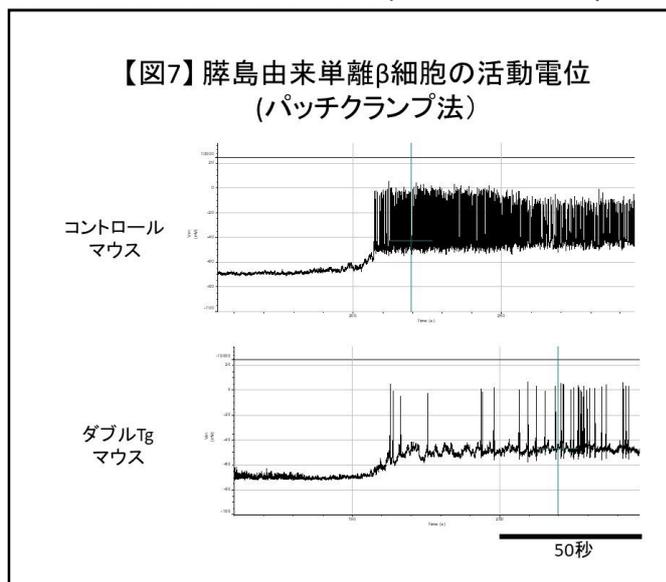
膵β細胞においてチャンネル open 型 KCNQ1 を発現しているマウス (RIP-mtKCNQ1-Tg) は、野生型マウスと比較して離乳時期より血糖値は有意に上昇していた。また成体において、耐糖能異常はさらに顕著となり、野生型マウスと比較して膵β細胞チャンネル open 型マウスでは、随時血糖値は高く、随時インスリン値は低かった。実際、経口糖負荷試験を行うと、膵β細胞チャンネル open 型マウスは野生型マウスと比較してインスリン分泌低下を伴う耐糖能異常を呈した。また、膵β細胞チャンネル open 型マウスは膵組織像で膵β細胞面積の減少を認めた。

さらに膵β細胞チャンネル open 型マウスと MIP-GFP-Tg とを交配してダブル Tg マウスを作製した。単離膵島を single cell 化し、顕微鏡下で蛍光を指標として膵β細胞を同定した上で電気生理学的解析を行った【図7】。膵β細胞チャンネル open 型マウス (ダブル Tg) 由来の膵β細胞ではコントロールマウス (MIP-GFP-Tg) 由来の膵β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β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唆された。

### (3) 膵β細胞 UBE2E2 過剰発現マウスについて

UBE2E2 の機能解析については、膵β細胞で UBE2E2 を過剰発現させた遺伝子改変マウス (RIP-UBE2E2-Tg) を独立した 2 ラインで作製することに成功した。2 ラインとも、成体においてインスリン分泌低下を伴う耐糖能異常を呈することを見出した。従って、膵β細胞で UBE2E2 の発現が亢進すると糖尿病のリスクが高まる可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高本偉碩, 窪田直人, 中屋恵三, 桜井賛孝, 植木浩二郎, 門脇孝
2. 発表標題 2型糖尿病感受性遺伝子KCNQ1の機能解析
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 桜井賛孝, 高本偉碩, 和田亘弘, 塩田清二, 窪田直人, 門脇孝
2. 発表標題 新規糖尿病関連遺伝子UBE2E2の膵 細胞における役割
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 桜井賛孝, 窪田直人, 高本偉碩, 和田亘弘, 門脇孝, 山内敏正
2. 発表標題 新規糖尿病関連遺伝子UBE2E2の膵 細胞における役割
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桜井賛孝, 窪田直人, 高本偉碩, 和田亘弘, 林高則, 窪田哲也, 笹子敬洋, 門脇孝, 山内敏正
2. 発表標題 糖尿病関連遺伝子UBE2E2の膵 細胞における役割
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桜井賛孝, 窪田直人, 高本偉碩, 和田亘弘, 林高則, 窪田哲也, 笹子敬洋, 門脇孝, 山内敏正
2. 発表標題 糖尿病関連遺伝子UBE2E2の膵 細胞における役割
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桜井賛孝, 窪田直人, 高本偉碩, 和田亘弘, 林高則, 相原允一, 窪田哲也, 笹子敬洋, 門脇孝, 山内敏正
2. 発表標題 糖尿病関連遺伝子UBE2E2の膵 細胞における役割
3. 学会等名 第41回日本肥満学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	桜井 賛孝  (SAKURAI YOSHITAKA)  (70748376)	東京大学・医学部附属病院・助教   (12601)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	窪田 直人  (KUBOTA NAOTO)		
研究 協力者	中屋 恵三  (NAKAYA KEIZO)		

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	熊谷 勝義  (KUMAGAI KATSUYOSHI)		
研究協力者	窪田 哲也  (KUBOTA TETSUYA)		
研究協力者	岩本 真彦  (IWAMOTO MASAHIKO)		
研究協力者	和田 亘弘  (WADA NOBUHIKO)		
研究協力者	林 高則  (HAYASHI TAKANORI)		
研究協力者	相原 允一  (AIHARA MASAKAZU)		
研究協力者	笹子 敬洋  (SASAKO TAKAYOSHI)		
研究協力者	吉田 昌史  (YOSHIDA MASASHI)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	原 一雄  (HARA KAZUO)		
研究協力者	中條 浩一  (NAKAJO KOICHI)		
研究協力者	久保 義弘  (KUBO YOSHIHIRO)		
研究協力者	山内 敏正  (YAMAUCHI TOSHIMASA)		
研究協力者	植木 浩二郎  (UEKI KOHJIRO)		
研究協力者	門脇 孝  (KADOWAKI TAKASHI)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------