

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 20 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成 22 年度～平成 23 年度

課題番号：22790876

研究課題名（和文）2 型糖尿病遺伝因子 *KCNQ1* の膵  $\beta$  細胞における機能解析研究課題名（英文）Functional analysis of a diabetes-susceptibility gene *KCNQ1* in pancreatic beta cells

研究代表者

宇田川 陽秀（UDAGAWA HARUHIDE）独立行政法人国立国際医療研究センター

研究者番号：50533882

研究成果の概要（和文）：本研究は、日本人で最も関連性の高い 2 型糖尿病遺伝因子 *KCNQ1* の膵  $\beta$  細胞における機能意義を明らかにする為におこなった。まず、ラット膵  $\beta$  細胞株 INS-1 やマウス単離膵島で糖尿病遺伝因子 *Kcnq1* が発現していることが認められた。また、INS-1 細胞に発現する *Kcnq1* は、インスリン分泌の制御に関与していることが示唆された。一方、*KCNQ1* の責任 SNP の機能を解析する為、*KCNQ1* 責任 SNP (rs2237892) を含むイントロン 15 領域を詳細に解析した結果、種間で保存性の高い新規転写産物を同定した。遺伝因子と環境因子の影響を検討する為、INS-1 細胞のインスリン分泌に及ぼすパルミチン酸暴露と *Kcnq1* 遺伝子発現抑制との関連性を検討したが、明らかな関連性は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：This research was performed in order to elucidate the functional significance in pancreatic beta cells of *KCNQ1*, which was recently established by genome-wide association studies (GWAS) as one of the most important genetic factors of type 2 diabetes mellitus in most ethnic groups including Japanese. First, the expression of *Kcnq1* was confirmed both in rat pancreatic beta cell-line INS-1 and mouse islets, and the changes in expression or activity of *Kcnq1* resulted in dysregulation of insulin secretion in INS-1 cells. Second, multiple novel transcripts were demonstrated from the genomic region of intron 15 of *Kcnq1* encompassing disease-related SNPs. Finally, *Kcnq1*-suppressed INS-1 cells was exposed to palmitate as a model of gene-environment interaction, and no significant interaction was observed in our system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
23 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：エネルギー・糖質代謝異常

## 1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病罹患者は、予備群も含めて2210万人（国民健康調査、平成19年）と、10年前の1370万人から1.6倍も増加しており、さらに失明・人工透析・下肢切断や動脈硬化性疾患などの合併症により、平均寿命ばかりでなく健康寿命やQOL、医療費の面で大きな問題になっている。2型糖尿病の発症には、遺伝因子が強く影響することが知られていたが、近年までその本体は不明であった。また、2型糖尿病患者が急増する背景として肥満やライフスタイルの変化など、環境因子の影響が強いことも示唆されていたが、その分子メカニズムは遺伝因子が特定されていなかったため推測の域を出なかった。

最近、当研究所の安田・春日らを中心としたゲノムワイド関連解析（GWAS: genome-wide association study）により、日本人の2型糖尿病遺伝因子 *KCNQ1* が同定された。この *KCNQ1* は、韓国や中国などの東アジア人で最も重要な遺伝因子であるだけでなく、白人も含め人種を越えて糖尿病と関連する（Yasuda K et. al, *Nat Genet* 2008）。日本人では、*KCNQ1* 以外にも、欧米人で重要な2型糖尿病遺伝因子 *TCF7L2* や、*SLC30A8*, *CDKAL1*, *CDKN2A/B*, *IGF2BP2*, *KCNJ11*, *HHEX*, *HNF1B*, *HNF4A*, *WFS1* などが、膵β細胞障害を介して糖尿病と関連すると報告されている。しかし、これら2型糖尿病遺伝因子の多くはタンパク質をコードしないイントロンや遺伝子間に存在することから、SNPの機能的意義は不明であり、遺伝因子が2型糖尿病を引き起こす機序は未だわかっていない。これは、GWASにより同定された遺伝因子に共通する特徴であり、多因子疾患の解析で最も大きなチャレンジングな課題である。

また、疾患遺伝因子同定の利点の1つは、モデル系を用いて環境因子の効果との相互作用を分子レベルで検証できることである。2型糖尿病の遺伝因子の多くは、β細胞障害を介して糖尿病を生じるが、2型糖尿病の発症機序の視点からは、環境因子は直接に、あるいはインスリン抵抗性などの負荷を介して間接的に、β細胞障害を増悪させると考えられる。ヒト2型糖尿病遺伝因子と環境因子との相互作用が解明されれば、より合理的な生活習慣介入法の開発や、新たな創薬への道を開くと考えられるが、こうした相互作用を分子レベルで詳細に検討した報告はこれまでみられない。

## 2. 研究の目的

(1) 2型糖尿病遺伝因子 *KCNQ1* 責任 SNP 領域の膵β細胞における機能的意義

2型糖尿病の遺伝因子 *KCNQ1* は、インスリンを分泌するβ細胞の障害を介して糖尿病

を生じ易くすると考えられる。責任 SNP は *KCNQ1* 遺伝子のイントロン15に存在するが、人種を越えて普遍的に糖尿病やインスリン分泌障害と関連することから、この領域が何らかの機能を有すると考えられ、そのメカニズムには様々な可能性が考えられる。

第一に、イントロンに存在するSNPであるので、*KCNQ1* の発現に関与する可能性が考えられる。従って、本研究において膵β細胞における *KCNQ1* の発現および機能的意義について検討した。

第二に、*KCNQ1* の発現変化以外のメカニズムを介する可能性も想定される。学会レベルでは、*Kcnq1* 遺伝子のヘテロノックアウトマウスにおいて、出生時における膵β細胞量の減少がみられ、これが細胞増殖に関与する近傍遺伝子 *CDKN1C* (p57) の発現亢進による可能性が報告されている（渋谷ら、2009年日本糖尿病学会）が、疾患感受性SNPの存在するヒトゲノム領域の機能との関連は全く不明である。そこで、本研究では *KCNQ1* の責任SNPを含むイントロン領域から、未知の機能的RNAが生成されている可能性を検討した。

(2) 2型糖尿病遺伝因子 *KCNQ1* と環境因子の相互作用による *in vitro* 解析

2型糖尿病の発症には、高脂肪食や運動不足、肥満などの環境因子の関与が強く示唆されている。特に日本人は、元来欧米人に比べてインスリンの分泌量が少なく、比較的軽度の環境因子負荷により、β細胞障害をきたす可能性が指摘されている。しかしながら、環境因子が直接β細胞を障害するのか、インスリン抵抗性の負荷を介してβ細胞障害を助長するのかは、遺伝因子によっても異なる可能性があり、明らかでない。本研究では、日本人2型糖尿病の遺伝因子、環境因子の代表として、それぞれ *KCNQ1* と、高脂肪食を取り上げ、責任SNPが *KCNQ1* の発現調節に関わるという仮説のもとに、β細胞におけるその相互作用を検討した。すなわち、*Kcnq1* の発現を変化させることで環境因子負荷によるβ細胞障害に影響が出るか、環境因子により *Kcnq1* の発現が変化するか、などを検討した。

以上の検討より、多因子遺伝病の遺伝因子を手がかりとした日本人糖尿病の病態に重要な新規メカニズムや新規分子の同定を目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 膵β細胞における *KCNQ1* 遺伝子の機能解析

ラット膵β細胞株 INS-1 およびマウスから単離した膵島の *Kcnq1* 遺伝子発現レベルの確認には、定量PCR法を用いた。*Kcnq1* タンパク質発現はウエスタンブロット法および蛍

光免疫染色法にて確認した。

ラット *Kcnq1* 遺伝子の siRNA を、リポフェクタミン 2000 を用いて細胞に導入し、ノックダウン効率を定量 PCR 法と蛍光免疫染色法にて確認した。*Kcnq1* 遺伝子をノックダウンした INS-1 細胞で、バッチインキュベーション法にて低濃度グルコース (3mM)、高濃度グルコース (25mM)、高濃度カリウム (30mM) 刺激によるグルコース応答性インスリン分泌試験 (GSIS) をおこなった。インスリン分泌量および細胞内インスリン含量は、インスリン ELISA キットを用いて測定した。

### (2) *KCNQ1* の責任 SNP 領域の機能的意義

*KCNQ1* イントロン 15 領域のゲノム配列をデータベースより取得し、ヒト・マウス・ラットのゲノム配列で保存性の高い領域を 51 箇所検出した。51 箇所プライマーを作成し、ラット膵β細胞株 INS-1 から調製した cDNA を用いて RT-PCR 法および電気泳動法にて転写されている候補領域のスクリーニングをおこなった。同定された候補領域において、TaqMan プローブを作成し、定量 PCR 法にて発現レベルを測定した。

### (3) *Kcnq1* 遺伝子 knockdown と脂肪酸負荷が膵β細胞の GSIS に及ぼす影響

膵β細胞株 INS-1 を用いて、*Kcnq1* の knockdown 系において、環境因子の代表として高脂肪食を模した脂肪酸 (パルミチン酸) で 24 時間暴露し、GSIS をおこなった。

## 4. 研究成果

### (1) 膵β細胞における *KCNQ1* 遺伝子の機能解析

*Kcnq1* 遺伝子の発現は、INS-1 細胞およびマウス単離膵島共に認められた。さらにウエスタンブロッティングの結果より INS-1 細胞において *Kcnq1* はタンパク質レベルでも発現している事が認められた。また蛍光免疫染色の結果より、細胞膜のマーカータンパク質である E-カドヘリンと共染されたことから、*Kcnq1* は細胞膜と部分的に細胞質に局在していることが示唆された (図 1)。

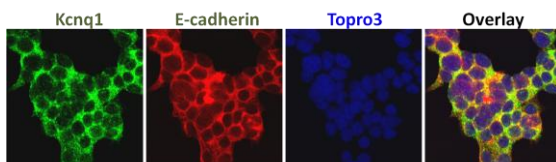


図1. INS-1細胞における*Kcnq1*の細胞内局在

*Kcnq1* 遺伝子をノックダウンし、GSIS に及ぼす影響を検討した結果、高濃度グルコース (25mM) 刺激下においてインスリンの分泌を有意に低下させる事が認められた (図 2)。KCNQ1 は遅延整流性外向き電流を発生させるカリウムチャンネルのαサブユニットであり、特異的チャンネル阻害剤によりその機能

を抑制する事が可能なことから、KCNQ1 チャンネル阻害剤リノビルジンをを用いて INS-1 細胞の KCNQ1 チャンネルを阻害した。その結果、コントロール細胞では阻害剤処理によりインスリン分泌の有意な増加が認められたのに対し、*Kcnq1* をノックダウンした細胞では、阻害剤によるインスリン分泌の増強作用は減弱することが認められた (図 2)。さらに、ヒト *KCNQ1* ベクターを INS-1 細胞に導入し、GSIS 試験を行った結果、インスリン分泌の有意な低下が認められた。以上の事から、ノックダウンと過剰発現によるインスリン分泌に及ぼす効果の相関は得られなかったが、*Kcnq1* は膵β細胞に発現し、インスリン分泌の調節にやや複雑に関与している事が示唆された。

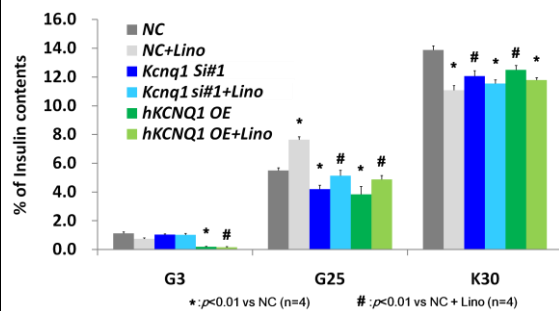


図2 *Kcnq1*ノックダウン、Human *KCNQ1* 過剰発現(OE)とKCNQ1 チャンネル阻害剤 Linopirdine (Lino)のインスリン分泌に及ぼす影響

*Kcnq1* のノックダウンと過剰発現においてインスリン分泌に与える効果の相関が得られなかった事から、*KCNQ1* を含む広い領域はインプリンティングを受けており、KCNQ1 の発現を変化させると近傍遺伝子の発現調節が変化する可能性も考えた。そこで、*Kcnq1* 遺伝子の近傍に位置する *Slc22a18*, *Trpm5*, *Cdkn1c* 遺伝子の発現を確認した結果、*Cdkn1c* の発現は認められなかったが、INS-1 細胞で *Slc22a18*, *Trpm5* 遺伝子の発現が認められた (図 3)。

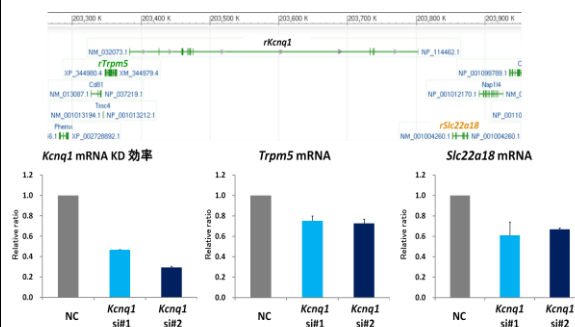


図3 *Kcnq1* Knockdownによる近傍遺伝子 *Slc22a18* と *Trpm5* mRNA の発現変動

さらに INS-1 細胞において、*Kcnq1* 遺伝子をノックダウンすることで、*Slc22a18* と *Trpm5* 遺伝子発現が低下する事が認められた。これら低下した遺伝子を siRNA でノックダウンし GSIS 試験をおこなった結果、有意なインスリン分泌の低下が認められた (図 4)。以上のこ

とから、*Kcnq1* 遺伝子の発現を変化させると、メカニズムは不明だが、近傍遺伝子の発現が変化する可能性が認められ、間接的にインスリン分泌の調節に関与している事が示唆された。

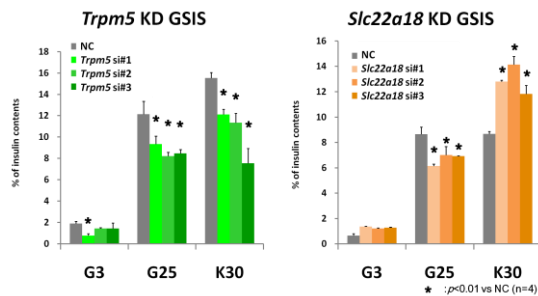


図4 近傍遺伝子ノックダウンがインスリン分泌に及ぼす影響

## (2) *KCNQ1* の責任 SNP 領域の機能的意義

まず、データベースから取得したヒト・マウス・ラットのゲノム配列においてアライメント検索を行い、*KCNQ1* イントロン 15 配列の中から、保存性の高い領域 51 箇所が検出された。それぞれにプライマーを設計し、INS-1 細胞から調製した cDNA を用いて発現の有無を RT-PCR で確認した。その結果、PCR 後の電気泳動より、合計 24 箇所が発現を示すバンドが認められた。さらに、24 箇所の内、発現が顕著であった 10 箇所を TaqMan プローブを作成し、発現レベルを検証した結果、10 箇所全てにおいて発現が認められ、新規転写産物と同定した。

以上より、*KCNQ1* のイントロン 15 領域からは機能未知の新規転写産物が生成されていることが示唆された。これらの新規転写産物の機能は未だ不明なため、siRNA を作成し、RNA 発現を抑制した場合の表現型の解析を現在進めている。

## (3) *Kcnq1* 遺伝子 knockdown と脂肪酸負荷が膵β細胞のGSISに及ぼす影響

糖尿病の発症には遺伝因子だけでなく、環境因子の負荷が大きく関与している事が報告されている事から、*Kcnq1* のノックダウン条件下で、環境因子の負荷として高脂肪食を模倣したパルミチン酸を INS-1 培養液中に添加し、24H 暴露後の GSIS への影響を検討した。その結果、コントロールの細胞ではパルミチン酸処理によりインスリンの分泌が有意に低下し、*Kcnq1* をノックダウンした細胞でも同様にインスリン分泌の低下が認められた。これら試験区間に顕著な差は認められなかった。この結果は、*Kcnq1* 遺伝子のノックダウンでもパルミチン酸刺激でも共にインスリンの分泌が低下してしまうことから、顕著な差を検出する事が出来なかった。

## (4) まとめ

本研究では、疾患感受性遺伝子の機能的意義について、標的遺伝子や近傍遺伝子の発現変化を介する可能性や、SNP を含む領域あるいは近傍の領域から、未知の転写産物が存在する可能性などを検討した。イントロンの SNP が機能的意義をもつ機序としては、エンハンサーなどの転写活性の変化や、DNA 結合タンパクの関与など、ほかにもさまざまな可能性が考えられ、複数の機序が関与していることも考えられる、*KCNQ1* の機能的意義が明らかになれば、糖尿病の病態の解明に資するだけでなく、多因子疾患の疾患感受性 SNP の研究一般にも貢献すると期待される。

## 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)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

宇田川陽秀、平本正樹、上番増喬、川口美穂、南茂隆生、西村渉、安田和基、膵β細胞株 INS-1 における糖尿病遺伝因子 *KCNQ1* の機能解析、第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇田川陽秀 (UDAGAWA HARUHIDE)

国立国際医療研究センター研究所・糖尿病研究センター・代謝疾患研究部・研究員

研究者番号：50533882