

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25504007

研究課題名(和文) 糖尿病リスク遺伝子の発現を制御するmicroRNAの同定

研究課題名(英文) Analyses of the microRNAs regulating the expression of type 2 diabetes mellitus-susceptibility genes

研究代表者

小林 公子 (Kobayashi, Kimiko)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：90215319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムワイド関連解析(GWAS: genome wide association study)により検出された糖尿病リスク遺伝子の発現を制御するmicroRNAを同定することを目的として研究をおこなった。その結果、2型糖尿病の発症と強い関連がみられたHNF1B遺伝子の3' UTRには、2種類のmiRNAが結合すること、さらにその結合は、SNP (rs2229295)の遺伝子型の影響を受けることがわかった。すなわち、糖尿病リスク遺伝子であるHNF1Bの発現調節にはmiRNAが関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found the 3' UTR SNP (rs2229295) in the HNF1B gene was associated with the susceptibility of T2DM. In addition, luciferase reporter assays indicate that the substitution of C>A due to SNP (rs2229295) induces the binding of hsa-miR-214-5p/hsa-miR-550a-5p to the 3' UTR of the HNF1B gene. There is a possibility that the binding of such miRNAs regulates the expression of the HNF1B gene and susceptibility of T2DM.

研究分野：統合栄養科学

キーワード：生活習慣病 糖尿病 microRNA

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の発症には食生活、運動といった生活習慣(ライフスタイル)とともに遺伝要因も重要である。ヒトの全ゲノム上の個体差(SNP: single nucleotide polymorphism)を網羅的に分析するゲノムワイド関連解析(GWAS: genome wide association study)により、糖尿病に対する感受性と関連する50個以上の遺伝子が糖尿病リスク遺伝子として検出された。しかしながら、GWASにより検出された型糖尿病リスク遺伝子のうちで遺伝子の機能と病態との関係が明らかになっているものはごくわずかである。また、糖尿病感受性の個体差に関わることが報告されたSNPの多くは、イントロン領域や3'側非翻訳領域(3'UTR)に存在しており、タンパク質の構造や機能に直接変化を与える可能性のあるコーディング領域の変異は極めて少ない。

一方、無駄な遺伝子領域と考えられてきたイントロンや3'UTR、および遺伝子間領域などの非翻訳領域に存在する塩基配列の多くがmicroRNA(miRNA)としてRNAに転写され、タンパク質をコードする遺伝子の発現を制御していることがわかってきた。従って、GWASにより同定された糖尿病リスク遺伝子の中にも、miRNAによる制御を受けている遺伝子が存在する可能性がある。さらに、糖尿病リスク遺伝子の3'UTRにあるSNPの塩基配列の違いによってmiRNAの結合に個体差が生じることで、糖尿病に対する感受性(なりやすさ)の個体差を説明できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は、糖尿病リスク遺伝子の発現を制御するmiRNAを同定することを目的とした。

糖尿病リスク遺伝子の発現を制御するmiRNAを同定することができれば、糖尿病に対する感受性の個体差を説明するだけにとどまらず、Complex diseaseと言われる糖尿病の病態に関する新たな理解に役立つことが期待できる。

3. 研究の方法

データベースを用いた*in silico*解析により、3'UTRにmiRNAが結合する可能性のある7種類の糖尿病リスク遺伝子(*SLC30A8*, *HNF1B*, *CDC123*, *PPARGC1A*, *UBE2E2*, *IRS2*, *CAMK1D*)をピックアップした。健康診断を受診した65歳以下の男性6094名の中から、医師により糖尿病と診断された323名と対照448名(空腹時血糖 ≤ 100 mg/dlかつHbA1c $\leq 6.2\%$)を、本研究への協力に対する同意を得た上で被験者として選定した。上記7種類の遺伝子のSNPの遺伝子型を調べ糖尿病発症との関連を分析した。糖尿病発症との間に強い関連が見られた*HNF1B*3'UTRのSNP(rs2229295)については、このSNPに対応する塩基配列を含むルシフェラーゼ発現ベクター(レポータープラスミド)を作成し、このSNP領域に結合するmiRNAを探索した。

さらに、これまでに糖尿病の発症や進展への関与が報告されている84種類のmiRNAに着目し、ヒト肝臓由来株化細胞(HepG2細胞)を高グルコース環境下においた時に、発現量が変化するmiRNAが存在するかどうかを調べた。

4. 研究成果

(1)糖尿病リスク遺伝子の3'UTRにあるSNPと糖尿病発症との関連

データベースを用いた*in silico*解析により、7種類の糖尿病リスク遺伝子(*SLC30A8*, *HNF1B*, *CDC123*, *PPARGC1A*, *UBE2E2*, *IRS2*,

CAMK1D) の 3'UTR には miRNA の結合領域に SNP が存在することがわかった。そこで、これらの SNP と糖尿病発症との関連を調べたところ、*HNF1B* 遺伝子の 3'UTR にある SNP (rs2229295) と糖尿病発症との間に強い関連があることがわかった (P=0.004) (表 1)。

Gene	SNP	OR (95%CI)	P-value
<i>SLC30A8</i>	rs11558471	0.60(0.39-0.93)	0.022
	rs3802178	1.46 (0.93-2.30)	0.10
<i>HNF1B</i>	rs2229295	0.44 (0.25-0.77)	0.004
	rs1800929	0.62 (0.37-1.04)	0.071
<i>CDC123</i>	rs10951	1.86 (1.07-3.22)	0.027
<i>PPARGC1A</i>	rs6821591	0.69 (0.42-1.12)	0.13
<i>UBE2E2</i>	rs7631705	0.57 (0.35-0.91)	0.018
<i>IRS2</i>	rs2289047	1.29(0.85-1.96)	0.22
<i>CAMK1D</i>	rs1644394	0.93 (0.59-1.48)	0.77

Odd 比と P 値は年齢・BMIにて調整

(2) *HNF1B* 遺伝子 3'UTR 領域への miRNA の結合

糖尿病発症との間に強い関連がみられた *HNF1B* 3'UTR にある SNP (rs2229295、C>A) のすぐとなりには、もう一つ別の SNP (rs1800929 SNP、A>G) が存在する。in silico 解析により、この SNP (rs1800929) による塩基置換も miRNA の結合に影響を与える可能性が推測された。そこで、これら 2 つの SNP による塩基置換に対応する 4 種類 (CA、CG、AA、AG) の配列を持つ *HNF1B* 3'UTR 配列をルシフェラーゼ遺伝子の下流に挿入したレポータープラスミドを作成した(図 1A)。次に、この領域への結合が予想される 2 種類の miRNA (has-miR214-5p, has-miR550a-5p) と作成した 4 種類のレポータープラスミドを HEK293 細胞に導入して、ルシフェラーゼ活性を比較した。その結果、SNP (rs2229295、C>A) の A アリルを含むベクター (AA、AG)

では、C アリルを含むベクター (CA、CG) に較べて、ルシフェラーゼ活性が低下することがわかった (図 1B)。すなわち、SNP (rs2229295) の A アリルを持つ *HNF1B* 遺伝子は、miRNA の結合による発現制御を受けている可能性がある。

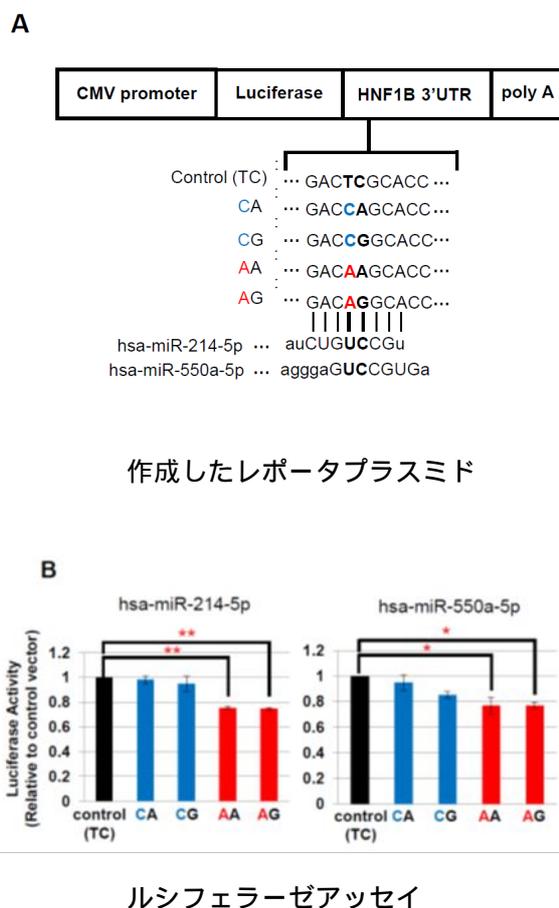


図 1 *HNF1B* 3'UTR への miRNA の結合

HNF1B は肝臓および膵 β 細胞で高発現している核内転写因子であり、*HNF1B* 遺伝子の異常により若年発症型糖尿病の一つである MODY5 が発症することが知られている。また、*HNF1B* はグルコース運搬タンパク (*GLUT2*)、ピルビン酸キナーゼ (*PK*)、インスリン (*INS*)、グルコキナーゼ (*GCK*) など、インスリンの分泌や糖代謝に重要な多くの遺伝子の転写制御に重要な役割を果たしていることが知られている。本研究の結果よ

り、*HNF1B* (rs2229295、C>A) の C 型は、miRNA との結合が弱く、適切な発現制御を受けることができないために、肝臓や膵臓における転写制御ネットワークをうまくコントロールできないことが、糖尿病の発症と関係している可能性が考えられる。今後、miRNA (has-miR214-5p, has-miR550a-5p) が、どのような条件において、肝臓や膵β細胞において *HNF1B* 遺伝子の 3'UTR に結合するのかといった点や SNP (rs2229295) の遺伝子型の影響を受けて *HNF1B* の発現量は変化するのかといった点について *in vivo* および *in vitro* の系において分析する必要がある。

(3) 高グルコース環境下における miRNA 発現量の変動

これまでに糖尿病の発症や進展への関与が報告されている 84 種類の miRNA に着目し、ヒト肝臓由来株化細胞 (HepG2 細胞) を高グルコース環境下においた時に、発現が変動する miRNA が存在するかどうかを調べた。HepG2 細胞を高グルコース環境下 (16.5mM) で 48 時間培養したところ、低グルコース環境下 (5.5mM) での培養時と比較して 3 種類の miRNA の発現が上昇し、7 種類の miRNA の発現が低下することがわかった。発現低下がみられた miRNA のうち hsa-miR-24-3p は、*in silico* 解析により、糖尿病リスク遺伝子のひとつである *HNF1B* 遺伝子の 3'UTR と結合することが推測された。また、*HNF1B* 遺伝子の 3'UTR 配列を持つルシフェラーゼ発現プラスミドを用いたレポーターアッセイにおいても、hsa-miR-24-3p の *HNF1B* 遺伝子 3'UTR への結合が確認できた。さらに、高グルコース環境下では、*HNF1B* の mRNA の発現量が増加していることが観察された。従って、高

グルコース環境下での *HNF1B* の発現上昇には、hsa-miR-24-3p の発現低下が関与している可能性が考えられる。

本研究により、糖尿病リスク遺伝子である *HNF1B* は 3'UTR の塩基配列の個体差 (SNP) の違いによって結合能が変化する miRNA、および血中のグルコース濃度の違いによって発現量が調節される miRNA など複数の miRNA による発現調節を受けることで、糖尿病の発症に関与していることが示唆された。

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 1 件)

1. Goda N., Murase H., Kasezawa N., Goda T., Yamakawa-Kobayashi K.: Polymorphism in microRNA-binding site in *HNF1B* influences the susceptibility of type 2 diabetes mellitus: a population based case-control study. *BMC Med Genet.* 16:75 (2015)

[学会発表](計 3 件)

1. 合田直樹、加瀬沢信彦、合田敏尚、小林公子: Identification of the SNPS altering microRNA binding affinity in the type 2 diabetes susceptibility genes. 第 19 回 静岡健康・長寿学術フォーラム 2014 年 11 月 (沼津)

2. 合田直樹、小林公子: microRNA 結合を調節する 2 型糖尿病リスク遺伝子多型の探索 日本人類遺伝学会 第 59 回大会 2014 年 11 月 (東京)

3. 小林公子: 教育講演 12 「遺伝子と生活習慣病」 第 37 回日本臨床栄養学会総会 2015 年 10 月 (東京)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小林公子 (KOBAYASHI KIMIKO)
静岡県立大学・食品栄養科学部・教授
研究者番号：90215319

(2)研究分担者

合田敏尚 (TOSHINAO GODA)
静岡県立大学・食品栄養科学部・教授
研究者番号：70195923