

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461352

研究課題名(和文) 環境因子の膵島遺伝子発現に対する影響の網羅的解析を基盤とした糖尿病発症機序の解明

研究課題名(英文) New insights into diabetes onset in response to environmental factors through global transcriptome analysis of pancreatic islets isolated from a mouse model of type 2 diabetes

研究代表者

南茂 隆生 (NAMMO, Takao)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・代謝疾患研究部・室長

研究者番号：50594115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病において環境因子は重要であるが、病態に関与する分子機序は不明である。本研究では、自然発症2型糖尿病モデルマウス膵島を用い、RNA-Seqとcis調節活性を反映するH3K27ac CHIP-Seqデータを、環境因子の有無により比較した。糖尿病の発症と進展は多くの遺伝子の発現低下を伴っており、環境因子によって活性の低下するH3K27acと関連していた。これらcisエレメントには重要転写因子モチーフのエンリッチメントが認められ、膵細胞機能異常との関連が窺われた。本研究により、環境因子による糖尿病発症機構にエピゲノム・遺伝子転写発現調節機構の破綻(不全)が寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although accumulating evidence supports a role for environmental factors in the development of diabetes, much remains unknown about the molecular mechanisms that are involved in the pathogenesis. Here, we report an analysis of transcriptome of mouse pancreatic islets isolated from a spontaneous mouse model of type 2 diabetes (T2D) exposed to a diabetogenic environment. We also generated genome-wide H3K27ac profiles to detect changes in cis-regulatory activity underlying differential gene expression. Compared to the control condition, we found that the environmental exposure resulted in lots of sites with decreased H3K27ac signals, which were associated to lower expression of corresponding genes. Interestingly, within such regions, there was enrichment of binding motifs for crucial transcription factors, suggesting that epigenetic dysregulation driven by environmental factors can cause downregulation of islet gene expression, beta-cell dysfunction, and the onset and progression of T2D.

研究分野：医歯薬学

キーワード：エネルギー・糖代謝異常 2型糖尿病 膵島 環境因子 エピゲノム 代償メカニズム インスリン分泌
動物実験

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病は、慢性の高血糖を臨床像とする疾患群である。発症および進展には遺伝素因と環境因子の関与が重要であると考えられているが、その分子機構については依然として不明な点が多い。ゲノムワイド関連解析の登場によって、KCNQ1 (Nat Genet. 40:1092-1097, 2008)をはじめ多数の common disease と関連する一塩基多型 (SNP) が同定された。申請者はヒト臍島のクロマチン状態をゲノム網羅的に検討し (Gaulton, K.J., Nammo, T. et al. Nat. Genet. 42: 255-259, 2010)、2 型糖尿病と最も強く関連する TCF7L2 遺伝子イントロンの SNP がエンハンサーに存在し、遺伝子発現の cis 調節を変化させることを明らかにした。このように、common disease の遺伝素因は遺伝子発現の個人差に関して基本的な意義を持つと考えられる。しかしながら、単一遺伝子疾患でさえも浸透率は必ずしも 100%ではなく、2 型糖尿病 SNP のオッズ比は高くても 1.4 前後であることはよく知られており (Nature 461:747-753, 2009)、病態の多様性は治療法選択の観点からも問題となると考えられた。

(2) このような多様性は、遺伝子発現自体が確率的に決定される (Cell 135: 216-226, 2008) ことに起因する可能性がある。環境因子は DNA メチル化やヒストン修飾といったエピゲノム変化を介して遺伝子発現に影響を与えることが示されつつあるが、同一の遺伝情報を持ち、同一環境下に飼育した純系動物間であっても、ゲノム上にはエピゲノム状態が個体間において多様な変化を示す領域の存在が知られている (PNAS 107 Suppl 1:1757-1764, 2010)。ヒトの場合には環境要因の個人差が大きく、細胞毎のエピゲノム状態決定にはさらに確率的要因が関与する結果、臓器の発揮する機能は遺伝素因から期待されるものからはある程度変容している可能性が高いと考えられた。

(3) 申請者は、肥満・運動不足といった環境因子が糖尿病の発症過程におけるモデルマウス臍島のエピゲノムと遺伝子発現に与える影響について、次世代シーケンサーを用いた ChIP-Seq および RNA-Seq によって網羅的な検討を行ってきた。KK マウス (Diabetes Res Clin Pract. 24 Suppl:S313-316, 1994) は近交系化された自然発症 2 型糖尿病モデルである。糖尿病リスクとなる環境下に飼育したマウス (実験群) は対照群と比較して、11 週齢では両者の随時血糖に有意差はないが、16 週齢では実験群において随時血糖の有意な上昇が認められた。ヒト 2 型糖尿病では、環境因子によって生じたインスリン抵抗性に対し、臍島の代償性インスリン分泌亢進の不可逆的障害が起ると糖尿病を発症すると考えられている (J Clin Invest. 116:1802-1812, 2006)。KK マウスでも経過中に臍島において種々の転写調節機構の破綻が起こっていると推察されたが、この間の血糖値には個体差

が大きく、遺伝素因以外の要因によって病態が容易に左右されるといった点も含めて、現実的なヒト 2 型糖尿病の発症機序を考察する上で興味深いモデルと考えられた。

(4) 当初は、解析に必要とされた total RNA 量の問題から、複数の動物由来のサンプルを混合して解析を行っていた。RNA-Seq によって、種々のモデルマウスを含めた臍島の発現変動遺伝子を同定し、遺伝子間クラスタリングによって、発現変動パターンの類似した遺伝子群に分類を行うことができた。遺伝子機能データベースである DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, Nat Protoc. 4:44-57, 2009) を用いた検討を行ったところ、各遺伝子群には種々の細胞機能 (ER ストレス、細胞周期など) によって特徴付けられる遺伝子グループが複数種類存在することが判明した。興味深いことに、KK マウスでは多くの遺伝子群において代償期 (11 週齢) には発現増加遺伝子数が増加していたが、代償の破綻 (16 週齢までに認められた血糖値の上昇) とともに発現増加遺伝子数の減少が認められ、糖尿病発症と病態の進行が遺伝子群を単位とする機能低下として捉えられた。すなわち、発現変動遺伝子を分類することによって、臍島をシステムとして系統的に理解するための枠組みを構築できた可能性がある。

(5) ところで、これらマウスの随時血糖高値が顕性化する間、各遺伝子群における個々の発現増加遺伝子を検討したところ、同一週齢の生物学的レプリケート間でも、一致率の高い遺伝子群とあまり一致しないものが認められた。すなわち、環境因子負荷に続いて誘導される遺伝子発現変動には個体差があり、遺伝子群の機能低下は均一ではなく、経過の多様性に関与する可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

2 型糖尿病の発症時に責任臓器で起こっている分子生物学的変化についての詳細はほとんど明らかにされていない。申請者は、環境因子負荷によって糖尿病を発症するモデルマウス臍島のエピゲノムおよび遺伝子発現について、網羅的かつダイナミックレンジの広い次世代シーケンサーを用いた検討を行い、病態の背景となる変化を観察する。多くの個体は数週間間に多様な経過で血糖値の上昇を示したが、この前後の解析では既に初期段階の変化を識別することは、当初ほとんど不可能と考えられた。そこで、本計画開始時には、経過中の狭い範囲の時期により多数のマウスについて検討を行い、経過の個体差も視野に入れた発症要因に迫る観察によって、新たな 2 型糖尿病治療標の同定に役立てることを主たる目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス実験:

9週齢まで群飼育された雄性KKマウスを、糖尿病リスクとなる環境因子の負荷群（実験群）と対照群の2群に分けて飼育した。実験群はより早期に血糖値が上昇し始めたが、耐糖能異常の進行には個体差も認められた。臍島採取は11週齢（随時血糖の上昇直前）、16週齢（糖尿病の発症後）に行った。

(2) RNA-Seq 解析：

RNA-Seq を用いて転写産物の網羅的同定および遺伝子発現解析を行った。

(3) ChIP-seq 解析および RNA-Seq との統合：

活性のあるプロモーター・エンハンサーのマーカースとして知られるヒストン修飾 H3K27ac (Nature. 470:279-283,2011) の ChIP-seq によって、臍島の cis 調節領域をゲノム網羅的に明らかにした。環境因子の負荷によって増加・不変・減少した H3K27ac 領域をリストアップし、それぞれにエンリッチする転写因子 DNA 結合モチーフについて調べた。また、個々の H3K27ac 領域に、標的と想定された遺伝子を割り当て、エピゲノム変化と遺伝子発現変化につき網羅的な比較を行った。

(4) 特定遺伝子に着目した検討：

臍島の代償機能を担う遺伝子、糖尿病発症抑制に重要な役割を果たす遺伝子候補を吟味し、機能解析実験に供することとした。ラット臍β細胞株 INS-1 を用い、siRNA によるノックダウン実験を行った。

4. 研究成果

本研究では、2型糖尿病発症メカニズムを考察するために、近交系化された自然発症モデルのKKマウスを用いた。このマウスを糖尿病発症リスクとなる環境下に飼育するとより早期に血糖値が上昇し始めたが、耐糖能異常の進行には個体差も認められた。臍島を単離し、cis調節エレメント（プロモーターおよびエンハンサー）に着目したヒストン修飾 H3K27ac の ChIP-Seq 解析、および RNA-Seq 解析によって、エピゲノム変化と遺伝子発現変化につき、通常飼育環境下の対照サンプルとの網羅的な比較を行った。

糖尿病の進行前に採取したサンプルの ChIP-Seq においては、シグナルに差のある領域が多数（16,989箇所増加領域と5,541箇所減少領域）見出されたが、特に環境因子負荷によって転写不活性化の方向性を示したエピゲノム変化には、トランスクリプトーム変化との間に有意な関連性が認められた。エピゲノムと発現のいずれにおいても低下を示した遺伝子には、β細胞の機能上重要とされるものが多く認められ、病態の進行に関与する所見である可能性がある。このような「活性低下型」cis調節エレメント領域には複数種類の重要転写因子モチーフのエンリッチメントが観察され、網羅的なトランスクリプトーム変化の原因的意義を示すものと考えられた。ラット臍β細胞株 INS-1 を用い、結合が想定される転写因子の機能喪失実験

によって転写因子モチーフの機能的意義の検証を試みたところ、標的遺伝子の発現変化とともにインスリン分泌能の変化を起こすものも認められた。

臍β細胞において、機能的に重要な転写因子はプロモーター・エンハンサーなどの結合領域にてヒストン修飾変化を介して標的遺伝子転写を活性化するが、本モデルにおいては、環境因子による糖尿病発症機構にこのようなエピゲノム・遺伝子転写発現調節機構の破綻（不全）が寄与している可能性が示唆された。

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 7件)

Nakaoku T, Tsuta K, Ichikawa H, Shiraishi K, Sakamoto H, Enari M, Furuta K, Shimada Y, Ogiwara H, Watanabe S, Nokihara H, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, Ishigame T, Schetter AJ, Okayama H, Harris CC, Kim YH, Mishima M, Yokota J, Yoshida T, Kohno T, Druggable oncogene fusions in invasive mucinous lung adenocarcinoma. Clin Cancer Res. 20: 3087-3093, 2014. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0107.

Gotoh M, Ichikawa H, Arai E, Chiku S, Sakamoto H, Fujimoto H, Hiramoto M, Nammo T, Yasuda K, Yoshida T, Kanai Y, Comprehensive exploration of novel chimeric transcripts in clear cell renal cell carcinomas using whole transcriptome analysis. Genes Chromosomes Cancer. 53: 1018-1032, 2014. doi: 10.1002/gcc.22211.

Hiramoto M, Udagawa H, Watanabe A, Miyazawa K, Ishibashi N, Kawaguchi M, Uebanso T, Nishimura W, Nammo T, Yasuda K, Comparative analysis of type 2 diabetes-associated SNP alleles identifies allele-specific DNA-binding proteins for the KCNQ1 locus. Int J Mol Med. 36: 222-230, 2015. doi: 10.3892/ijmm.2015.2203.

Saito K, Uebanso T, Maekawa K, Ishikawa M, Taguchi R, Nammo T, Nishimaki-Mogami T, Udagawa H, Fujii M, Shibasaki Y, Yoneyama H, Yasuda K, Saito Y, Characterization of hepatic lipid profiles in a mouse model with nonalcoholic steatohepatitis and subsequent fibrosis. Sci Rep. 5: 12466, 2015. doi: 10.1038/srep12466.

Kuramoto J, Arai E, Tian Y, Funahashi N, Hiramoto M, Nammo T, Nozaki Y, Takahashi Y, Ito N, Shibuya A, Ojima H, Sukeda A, Seki Y, Kasama K, Yasuda K, Kanai Y, Genome-wide

DNA methylation analysis during non-alcoholic steatohepatitis-related multistage hepatocarcinogenesis: comparison with hepatitis virus-related carcinogenesis.

Carcinogenesis 38: 261-270, 2017.

doi: 10.1093/carcin/bgx005.

南茂 隆生、安田 和基、特集 2 型糖尿病における膵 細胞機能不全のメカニズム 膵 細胞分化過程におけるエピゲノム変化、綿田裕孝(編) 内分泌・糖尿病・代謝内科、査読なし、Vol.38、No.4、2014、pp.376-383 <http://www.kahyo.com/item/B201404-384>

南茂 隆生、安田 和基、特集 ラ氏島細胞研究 Update ラ氏島細胞分化過程におけるエピゲノム変化、北村 忠弘(編) ホルモンと臨床、査読なし、Vol.62、No.1、2014、pp.37-46

<http://www.igakunosekaisha.com/horumon/h6201.html>

[学会発表](計19件)

南茂 隆生、宇田川陽秀、川口 美穂、舟橋 伸昭、上番増 喬、平本 正樹、西村 渉、安田 和基、膵島のゲノム網羅的解析による糖尿病発症機序の考察、第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、平成 26 年 5 月 24 日

西村 渉、川口 美穂、宇田川陽秀、衛藤 弘城、舟橋 伸昭、南茂 隆生、平本 正樹、安田 和基、転写因子 MafA による膵 細胞の分化可塑性制御、第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、平成 26 年 5 月 23 日

宇田川陽秀、平本 正樹、舟橋 伸昭、川口 美穂、南茂 隆生、西村 渉、安田 和基、脂肪細胞由来液性因子による新規インスリン分泌調節因子の発現誘導と膵 細胞機能変化、第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、平成 26 年 5 月 24 日

宇田川陽秀、平本 正樹、舟橋 伸昭、川口 美穂、西村 渉、南茂 隆生、安田 和基、前駆・成熟脂肪細胞由来液性因子による膵 細胞機能変化、第 35 回日本肥満学会、平成 26 年 10 月 25 日

南茂 隆生、宇田川陽秀、川口 美穂、舟橋 伸昭、上番増 喬、平本 正樹、西村 渉、安田 和基、膵島のゲノム網羅的解析による膵島代償機序/糖尿病発症機序関連因子の同定、第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会、平成 27 年 5 月 21 日

安田 和基、南茂 隆生、平本 正樹、西村 渉、宇田川陽秀、上番増 喬、舟橋 伸昭、金井 弥栄、松本 健治、斎藤 嘉朗、関 洋介、笠間 和典、高度肥満患者由来の脂肪組織の多層的オミックス解析、第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会、平成 27 年 5 月 21 日

宇田川陽秀、舟橋 伸昭、平本 正樹、川口 美穂、西村 渉、南茂 隆生、安田 和基、脂肪細胞由来ステロイドホルモンによる GIR を介した膵 細胞機能変化、第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会、平成 27 年 5 月 21

日

舟橋 伸昭、宇田川陽秀、南茂 隆生、西村 渉、川口 美穂、矢野 哲、中西美紗緒、箕浦 茂樹、福岡 秀興、安田 和基、妊婦低栄養と DNA メチル化状態との関連性の検討へ向けて、第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会、平成 27 年 5 月 23 日

安田 和基、南茂 隆生、平本 正樹、西村 渉、宇田川陽秀、上番増 喬、舟橋 伸昭、金井 弥栄、松本 健治、斎藤 嘉朗、関 洋介、笠間 和典、日本人肥満患者由来 NASH 肝の多層的オミックス解析パネルの構築、第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会、平成 27 年 5 月 23 日

南茂 隆生、宇田川陽秀、舟橋 伸昭、安田 和基、網羅的 cis 調節領域の検討による、高脂肪食に続発する膵島代償機序の解明、NGS 現場の会 第四回研究会、平成 27 年 7 月 2-3 日

宇田川陽秀、舟橋 伸昭、平本 正樹、川口 美穂、西村 渉、南茂 隆生、安田 和基、脂肪細胞培養上清による膵 細胞機能変化、第 36 回日本肥満学会、平成 27 年 10 月 2 日

安田 和基、宇田川陽秀、南茂 隆生、平本 正樹、西村 渉、上番増 喬、舟橋 伸昭、金井 弥栄、松本 健治、斎藤 嘉朗、関 洋介、笠間 和典、高度肥満患者由来の脂肪組織の多層的オミックス解析、第 36 回日本肥満学会、平成 27 年 10 月 3 日

南茂 隆生、宇田川陽秀、舟橋 伸昭、川口 美穂、上番増 喬、平本 正樹、西村 渉、安田 和基、遺伝子 cis 調節領域の網羅的解析による膵島代償機序の検討、第 53 回日本臨床分子医学会、平成 28 年 4 月 15-16 日

南茂 隆生、宇田川陽秀、舟橋 伸昭、川口 美穂、上番増 喬、平本 正樹、西村 渉、安田 和基、ゲノム網羅的解析結果を用いた膵島代償機序の検討、第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会、平成 28 年 5 月 19 日

舟橋 伸昭、宇田川陽秀、南茂 隆生、中西美紗緒、矢野 哲、箕浦 茂樹、福岡 秀興、安田 和基、妊婦栄養状態と DNA メチル化状態との関連性の検討、第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会、平成 28 年 5 月 20 日

宇田川陽秀、舟橋 伸昭、西村 渉、平本 正樹、川口 美穂、南茂 隆生、安田 和基、脂肪細胞培養上清によるグルココルチコイド受容体を介した膵 細胞機能変化、第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会、平成 28 年 5 月 19 日

安田 和基、宇田川陽秀、南茂 隆生、舟橋 伸昭、平本 正樹、西村 渉、松本 健治、関 洋介、笠間 和典、高度肥満患者由来内臓脂肪・皮下脂肪の組織の遺伝子発現の比較解析、第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会、平成 28 年 5 月 21 日

舟橋 伸昭、宇田川陽秀、南茂 隆生、上番増 喬、西村 渉、平本 正樹、松本 健治、関 洋介、笠間 和典、安田 和基、日

本人高度肥満症由来 NASH 肝のトランスクリプトーム解析、第3回肝臓と糖尿病・代謝研究会、平成28年7月16日

宇田川陽秀、南茂 隆生、舟橋 伸昭、平本 正樹、西村 渉、松本 健治、関 洋介、笠間 和典、安田 和基、高度肥満患者およびマウス由来内臓脂肪・皮下脂肪発現遺伝子の比較解析、第37回日本肥満学会、平成28年10月8日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rincgm.jp/department/dia/02/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南茂 隆生 (NAMMO, Takao)

国立国際医療研究センター研究所

代謝疾患研究部・室長

研究者番号：50594115

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

安田 和基 (YASUDA, Kazuki)

国立国際医療研究センター研究所

代謝疾患研究部・部長

研究者番号：80311611

(4) 研究協力者