

平成 22 年 5 月 11 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19591047
 研究課題名：KATP チャネル遺伝子異常による糖尿病発症機序解明と薬剤反応性変化についての検討
 研究課題名（英文）Mutations in genes encoding the K_{ATP} channel and their influence on efficacy of insulinotropic agents.
 研究代表者
 長嶋 一昭（NAGASHIMA KAZUAKI）
 京都大学・大学院医学研究科・助教
 研究者番号：40324628

研究成果の概要（和文）：

ATP 感受性 K^+ (K_{ATP}) チャネルは、Kir6.2 および SUR1 の 2 つのサブユニットから構成され、膵 β 細胞からのインスリン分泌に重要である。上記遺伝子異常に関して、自験例および解析委託された変異に関して電気生理学的検討を含む機能解析を行い、変異部位の違いにより ATP 感受性、インスリン分泌促進薬反応性および K_{ATP} チャネル蛋白の膜面への発現に違いが生じることを明らかにした。変異 K_{ATP} チャネルの発現系を用いた *in vitro* での処方前薬効評価により、同遺伝子変異を有する患者における薬効予測が可能であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Kir6.2, together with SUR1, forms an ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channel that plays a key role in insulin secretion from pancreatic β -cells. In this study, we carried out functional analyses including electrophysiological analysis, and found significant differences in ATP-sensitivity, sulfonylurea-sensitivity, and membrane surface expression among the mutants. Furthermore, it is possible to evaluate the potential efficacy of these insulinotropic agents in patients with the mutation by using *in vitro* analyses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：糖尿病学

1. 研究開始当初の背景

1995 年に膵 β 細胞インスリン分泌調節に重要な役割を担っている K_{ATP} チャネルに関する分子的基盤が解明されて以降 (Science

1995)、インスリン分泌調節における重要性から同チャネルを構成する Kir6.2 あるいは SUR1 サブユニットの遺伝子異常は、低血糖症や糖尿病の原因遺伝子となり得ることが

想定されてきた。既報では、低血糖症、即ち持続性高インスリン性低血糖症 (PHHI) の報告が主であり、糖尿病発症との直接的関連性を示唆する報告はほとんどなかった。

新生児糖尿病の発症機序は不明であり、通常、高血糖あるいはケトアシドーシスの発症を契機に発見され、生涯インスリン治療が必要であるとされてきた。新生児期での急激な発症、その病状の重篤さ、および治療法がインスリン療法に限定され、それを強いられる本人・家族の多大な負担ゆえ、本疾患は早期発見のための発症原因の解明および新たな治療選択肢の開拓が切望されてきた。近年、永続型糖尿病の発症原因として、 K_{ATP} チャンネルの構成サブユニットである Kir6.2 の遺伝子点変異が報告された (N Engl J Med,2004)。

本申請者は、これまで糖尿病研究、特にインスリン分泌メカニズムに関して、*in vivo* および *in vitro* の両面から一貫して研究してきた。本研究室稲垣らが確立した K_{ATP} チャンネルに関する分子的基盤の研究を引き継ぎ、世界で初めて K_{ATP} チャンネル欠損マウスを用いて同チャンネルが生体内でグルコースおよび経口血糖降下薬刺激による膵β細胞インスリン分泌調節に必須であることを直接的に証明し (Proc Natl Acad Sci USA,1998)、同チャンネルの様々な活性調節調節に関して詳細に検討し (EMBO J,1999)、経口血糖降下薬の作用機序・各薬剤間での作用特性の違いに関して検討を行ってきた (Diabetes Res Clin Pract,2004)。

これら一連の研究過程で、申請者等は本邦で初めて Kir6.2 遺伝子異常新生児糖尿病症例を同定し、さらに世界で初めて Kir6.2 遺伝子異常による成人発症糖尿病症例を報告し、その遺伝子変異によるチャンネル特性変化を電気生理学的手法を用いて直接的に検討した (J Clin Endocrinol Metab,2005)。

2. 研究の目的

上記の研究経過を踏まえて、本申請研究では、主に、新生児糖尿病および糖尿病の濃厚な家族歴を有する成人発症糖尿病での新たな K_{ATP} チャンネル (Kir6.2 および SUR1) 遺伝子上の変異部位の同定、同定された Kir6.2 遺伝子または SUR1 遺伝子上の変異によって生じるチャンネル特性の変化、ATP 感受性の変化、膵β細胞膜面における K_{ATP} チャンネルの機能的発現量の変化、および糖尿病治療薬スルホニル尿素 (SU) 薬に対する反応性の変化を検討した。これらは各々、膵β細胞インスリン分泌の基礎値および反応性分泌量、ならびに治療薬反応性の残存を規定する要因となることから、当該遺伝子変異が糖尿病発症原因となり得るか否かに関する検証にもつながるものである。これら論拠の集積は、Kir6.2 遺伝子異常あるいは SUR1 遺伝子異

常の変異部位に応じた、糖尿病治療薬 (SU 薬など) の処方前薬効評価、さらには遺伝子変異部位に応じたテーラード医療への展開への可能性を開くものと考えられる。

3. 研究の方法

(1) 変異遺伝子スクリーニング:

京都大学医学部附属病院および関連施設にて、遺伝子解析に関するインフォームドコンセントを得られた新生児糖尿病症例および糖尿病の家族歴濃厚な糖尿病患者に関して、末梢血より抽出したゲノム DNA を用いて Kir6.2 および SUR1 遺伝子に関してスクリーニングを行う。

(2) *in vitro* での変異チャンネル特性評価:

スクリーニングにて発見された変異および既報の K_{ATP} チャンネル変異に関して、overlap extension PCR 法を用いてヒト Kir6.2 または SUR1 遺伝子に点変異を導入。発現ベクターに組み込み、哺乳動物細胞 (COS1 細胞) を用いた再構成系で、パッチクランプ法を用いて、ATP 感受性、インスリン分泌促進薬 (主に SU 薬) に対する感受性変化 (濃度-反応曲線作製)、チャンネル開口率 (P_o) および変異 K_{ATP} チャンネル特性の変化を各遺伝子変異ごとに評価する。さらに電気生理学的手法 (パッチクランプ法) による細胞膜へのチャンネル蛋白の機能的発現、および共焦点レーザー顕微鏡を用いたチャンネル蛋白の細胞内局在の検討を行い、当該変異による K_{ATP} チャンネル蛋白の細胞膜面への発現量およびクラスタリングの過多などの発現状態への影響を検討する。

(3) K_{ATP} チャンネル遺伝子上の変異部位に応じた *in vitro* での事前薬効評価と治療薬選択論拠の集積。

上記 *in vivo* 実験から得られたデータを集積するとともに、*in vitro* での薬効残存程度の推測程度と、患者服用時の薬効程度とを比較することで、遺伝子変異部位に応じた、治療薬処前 *in vitro* 薬効評価の可能性を検討する。

本研究は、京都大学大学院医学研究科・医学部医の倫理委員会の倫理規定に則って行われ、検体は匿名化 (記号化) により個人情報保守の厳守を徹底している。動物実験に関しては、京都大学動物実験委員会・動物実験指針に則り遂行する。

4. 研究成果

京都大学医学部附属病院、協力医療機関および国内外の医療・研究機関からの解析委託を受け、Kir6.2 または SUR1 遺伝子異常を有する 14 症例に関して検討を行った。 K_{ATP} チャンネルを構成する Kir6.2 および SUR1 サブユニット上の未報告部位を含む遺伝子変異に関して、ATP 感受性、経口血糖降下薬 SU 薬に対

する感受性および細胞膜面へのチャネル蛋白発現量を評価した。なかでも協力医療機関から解析委託を受けた症例に関して、in vitro で発現させた変異 K_{ATP} チャネルに対する現在臨床使用可能な複数の SU 薬の薬剤感受性を電気生理学的手法を用いて並列評価した結果、薬剤間で薬効変化に差異を認め、同遺伝子変異に関して、ある特定の SU 薬はほとんど薬効低下が起こらず、野生型 K_{ATP} チャネルと同程度の薬効が見込めることを見いだした。実際に解析依頼元の医療機関において SU 薬を用いた治療が行われており、in vitro 評価で薬効が保たれていた特定の SU 薬により著明な血糖改善を認めた。本症例は、本薬剤著効により、これまでの強化インスリン療法から離脱でき、経口薬での血糖管理が可能となった。これまでの新生児糖尿病は、生涯、インスリン治療が必須とされてきたが、これらの結果は、同遺伝子異常を有する患者に対する経口薬での治療の可能性を提供するのみならず、経口治療薬薬剤反応性変化を事前の in vitro 機能解析で評価することが実際に可能であることを示すものであり、本申請研究の大きな目標である、薬剤処方前 in vitro 評価に基づいた治療薬選択論拠の提示が可能であることを示唆するものである。本成果は臨床的にも大きな可能性を開く成果であると考えられる。

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 4 件)

- ① Fujita Y, Hosokawa M, Fujimoto S, Mukai E, Abudukadier A, Obara A, Ogura M, Nakamura Y, Toyoda K, Nagashima K, Seino Y, Inagaki N. Metformin suppresses hepatic gluconeogenesis and lowers fasting blood glucose levels through reactive nitrogen species. *Diabetologia*. 査読有, 2010 Mar 29.(in press)
- ② Shimodahira M, Fujimoto S, Mukai E, Nakamura Y, Nishi Y, Sasaki M, Sato Y, Sato H, Hosokawa M, Nagashima K, Seino Y, Inagaki N. Rapamycin impairs metabolism-secretion coupling in rat pancreatic islets by suppressing carbohydrate metabolism. 査読有, *J Endocrinol*. 204(1):37-46, 2010
- ③ Mahalakshmi RN, Nagashima K, Ng MY, Inagaki N, Hunziker W, Béguin P. Nuclear transport of Kir/Gem requires specific signals, importin $\alpha 5$ and is regulated by calmodulin and predicted serine phosphorylations. *Traffic*, 査読有, 8(9):1150-63, 2007

④ Takahashi A, Nagashima K, Hamasaki A, Kuwamura N, Kawasaki Y, Ikeda H, Yamada Y, Inagaki N, Seino Y. Sulfonylurea and glinide reduce insulin content, functional expression of K_{ATP} channels, and accelerate apoptotic β -cell death in the chronic phase. *Diabetes Res Clin Pract*. 査読有, 77(3):343-50, 2007

[学会発表] (計 10 件)

- ① 細川雅也、浜崎暁洋、藤本新平、長嶋一昭、原島伸一、藤田義人、豊田健太郎、山田千積、原田範雄、幣 憲一郎、稲垣暢也。当院外来通院中の「脂質異常症を合併した 2 型糖尿病患者」における脂質管理目標達成率に関する調査。第 13 回日本病態栄養学会年次学術集会 (2010 年 1 月 9 日-10 日, 京都)
- ② Takagi T, Furuta H, Miyawaki M, Nagashima K, Nishi M, Sasaki H, Inagaki N, Yoshikawa N, Nanjo K. A P1198L mutation in ABCC8 gene decreases ATP sensitivity of the K_{ATP} channel and causes permanent neonatal diabetes. The 11th Symposium on Molecular Diabetology in Asia (2009 年 12 月 19 日, Taipei, Taiwan)
- ③ 山野 言、長嶋一昭、藤本新平、稲垣暢也。組織リン脂質組成変化の糖代謝に及ぼす影響—リン脂質メタボローム解析を用いた検討—。“代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術”研究領域 第 2 回公開シンポジウム (2009 年 10 月 16 日, 東京)
- ④ 渋谷由紀、木戸良明、浅原俊一郎、松田友和、竹田章彦、井上 妙、小柳真希、長嶋一昭、清野 進、春日雅人。2 型糖尿病候補遺伝子 KCNQ1 の膵 β 細胞に及ぼす役割の検討。第 52 回日本糖尿病学会総年次学術集会 (2009 年 5 月 21 日-24 日, 大阪)
- ⑤ 長嶋一昭, Pascal Beguin, Walter Hunziker, 稲垣暢也。新規電位依存性 Ca^{2+} チャネル調節因子の同定および膵 β 細胞インスリン分泌調節への影響に関する検討。第 52 回日本糖尿病学会総年次学術集会 (ポスター発表, 2009 年 5 月 21 日-24 日, 大阪)
- ⑥ 長嶋一昭、佐々木真弓、中村靖彦、桑村尚充、河崎祐貴子、稲垣暢也。Kir6.2 遺伝子異常糖尿病の遺伝子変異部位による薬剤反応性変化に関する検討。第 3 回トランスポーター研究会年会 (2008 年 6 月 8 日, 京都)
- ⑦ 長嶋一昭、佐々木真弓、中村靖彦、桑村尚充、河崎祐貴子、稲垣暢也。Kir6.2 遺伝子異常糖尿病での遺伝子変異部位の違いによる薬剤反応性変化についての比較検討。第 51

回日本糖尿病学会（2008年5月22日-24日，東京）

⑧長嶋一昭. インスリン分泌と栄養シグナルに関する検討. シンポジウム糖尿病（2008年4月19日，東京）

⑨ Nagashima K. Diversity of the pharmacological profile in oral insulinotropic agents. 14th Japan-Korea Symposium on Diabetes Mellitus (2007年10月6日，Kyoto)

⑩長嶋一昭、桑村尚充、常 宝成、高橋 輝、河崎祐貴子、山田祐一郎、清野 裕、稲垣暢也. HMG-CoA 還元酵素阻害薬（スタチン）による潜在的膵β細胞インスリン分泌抑制作用に関する検討. 第50回日本糖尿病学会年次学術集会（2007年5月24日～26日，仙台）

〔図書〕（計10件）

①長嶋一昭、稲垣暢也. 経口糖尿病薬—作用機序とエビデンス 1. —；スルホニル尿素薬. 治療学，ライフサイエンス出版，査読無，44(1)，26-29，2010

②田中大祐、長嶋一昭、稲垣暢也. 「特集：糖尿病治療薬 Up to Date. 2. インスリン分泌促進薬の作用機序とトピックス（インスリン分泌調節機構、新生児糖尿病を含めて）」月刊糖尿病，医学出版，査読無，1(2)：25-32，2009

③長嶋一昭、稲垣暢也. インスリン分泌促進薬. 日本内科学会雑誌，日本内科学会，査読無，98(4)，737-741，2009

④長嶋一昭、稲垣暢也. 新生児糖尿病の成因と治療，Diabetes Journal，協和企画，査読無，36(3)，132-134，2008

⑤長嶋一昭、稲垣暢也. K_{ATP} チャンネルを介するインスリン分泌機構，日本臨床 増刊新時代の糖尿病学（1）—病因・診断・治療研究の進歩—第2版，日本臨床社，査読無，151-157，2008

⑥長嶋一昭、稲垣暢也. 種々のSU薬の相違点 内分泌・糖尿病科，科学評論社，査読無，26(1)，66-71，2008

⑦長嶋一昭、稲垣暢也. ABCタンパク質の異常と疾患，血糖調節にかかわるSUR-低血糖症と糖尿病—，最新医学，最新医学社，査読無，62(11)，76-82，2007

⑧長嶋一昭、稲垣暢也. 臨床薬剤の糖代謝への影響；抗不整脈薬. Diabetes Frontier,

メディカルレビュー社，査読無，4(18)，371-375，2007

⑨長嶋一昭、稲垣暢也. インスリン分泌における K_{ATP} チャンネルの役割，カラー版 糖尿病学 基礎と臨床，西村書店，査読無，74-77，2007

⑩長嶋一昭、稲垣暢也. 新生児糖尿病治療の新展開—スルホニル尿素薬の有効性—，最新医学，最新医学社，査読無，62(4)，101-107，2007

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長嶋 一昭 (NAGASHIMA KAZUAKI)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：40324628

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし