

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890129

研究課題名（和文）

糖尿病遺伝子座・分子の解析

研究課題名（英文）

The study of susceptibility genes loci to diabetes mellitus.

研究代表者

上田 裕紀 (UEDA HIRONORI)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任准教授（常勤）

研究者番号：90543463

研究成果の概要（和文）：糖尿病になりやすいという体質（疾患感受性）が遺伝することは古くから知られているが、その疾患感受性の分子メカニズムは必ずしも明らかではない。本研究において、CD4 陽性ヘルパーTリンパ球内で機能する1型（自己免疫性）糖尿病疾患感受性遺伝子を同定した。これらの、遺伝子群は1型糖尿病のみならず、自己免疫性甲状腺疾患（バセドウ病・橋本病）などの疾患感受性とも共通しており、本研究の成果は、自己免疫性内分泌疾患の予知・予防法・根治療法の開発に貢献できると考えられる。これらの研究成果は、雑誌論文、国際学会、日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、神戸生活習慣病研究会、未来医療セミナーなどにて報告した。

研究成果の概要（英文）：Type 1 Diabetes (T1D) of man and animal models results from immune-mediated specific beta cell destruction. Putative transforming growth factor- $\beta$ 1 regulated T1D susceptibility genes were identified by using T lymphoma cell-lines in this study. A question how these genes can determine T1D susceptibility by regulating T lymphocytes and T lymphocyte recognition in immunological synapse still remains unsolved and will be addressed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：内科、内分泌学、免疫学、糖尿病の成因

科研費の分科・細目：内科、内分泌学、免疫学

キーワード：糖尿病の遺伝素因、発症原因遺伝子、Tリンパ球、TGF- $\beta$ 1、Zac1、NSYマウス

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病は、多くの遺伝子が相加的に働き、また、環境要因の影響も加わって発症する多因子遺伝疾患である。古くから遺伝学者の悪夢と呼ばれてきたが、ヒト・ラット・マウスゲノムプロジェクト

が完了し、これらのゲノム遺伝情報を基盤とし、多くの糖尿病疾患感受性遺伝子座・遺伝子がヒト・モデル動物で、同定されてきている。

(1) 1型糖尿病の遺伝素因

1型（自己免疫性）糖尿病は米国だけ

で年間約 13,000 人もの幼児・小児・若年成人に新規発症し、喘息に次いで二番目に若年患者数が多い慢性疾患である。発症頻度が低いとされる我が国でも全糖尿病患者の約 5%、30 万人以上の患者が存在し、コントロールが困難なことから QOL・寿命の両面において予後不良な疾患である。移植医療では終生にわたる免疫抑制が不可欠であり、再生医療に関しても自己免疫の再発による再生膵β細胞の破壊を免れないことから、自己免疫機序の解明ならびにそのコントロールなくして再生医療の臨床応用は不可能と考えられる。

免疫の中核的な役割を果たす T リンパ球は、異物である細菌やウイルスを検出・攻撃し我々の体から排除する一方で、自己の細胞や抗原は攻撃しない（自己免疫寛容）が成立している。この自己免疫寛容は、複雑かつ精巧に制御されている生体システムで、1 型糖尿病は、この自己免疫寛容が破綻し、インスリンを唯一体内で産生し分泌する自己膵β細胞を T リンパ球が攻撃し破壊してしまうことにより発症する。

最近の研究で、免疫システムにおいて中核的役割を担う、T リンパ球の制御が、1 型糖尿病の発症に重要であることが明らかになってきた (Ueda H et al. Nature 2003)。

その後、私が 3 年間所属していた英国ケンブリッジ大学の John A. Todd 研究室が中心となり、1 型糖尿病の DNA チップを使用した「網羅的全ゲノム関連解析 (Genome-wide association studies; (GWAS))」を完了し、多くの 1 型糖尿病疾患感受性遺伝子座・遺伝子が同定され、現在、約 50 の遺伝子座・遺伝子が知られている。しかしながら、機能的にこれらの遺伝子がどのように疾患感受性を決定するかは、未解決の問題である。

一方で、CD4 陽性制御性 T リンパ球 (Treg) は、免疫自己寛容と免疫恒常性の維持に必須であり、1 型糖尿病患者で Treg が不安定であるという機能異常が指摘されている。Treg の重要な分化誘導因子でもある免疫細胞が産生する Transforming Growth Factor beta1 (TGF-β1) は、抗炎症サイトカインで、免疫自己寛容と免疫恒常性の維持に必須であることが知られている (Li & Flavell Cell 2008)。

## (2) 2 型糖尿病の遺伝素因

2 型糖尿病の病態はインスリン分泌不全と、その作用が減弱したインスリン抵抗性の存在が主体である。また、近年で

は脂肪肝と 2 型糖尿病の関係が指摘されており、肝臓での糖代謝の重要性が指摘されている。自然発症 2 型糖尿病モデル NSY マウスは、加齢とともに肥満・脂肪肝を示し、インスリン抵抗性・インスリン分泌不全をともなって糖尿病を発症する (Ueda H et al. Diabetologia 1995, Metabolism 2000, Diabetologia 2000)。NSY マウスのインスリン分泌不全・インスリン抵抗性の原因遺伝子座を第 11・14 番染色体上に、脂肪蓄積に関与する原因遺伝子座を第 6 番染色体上に同定した (Ueda H et al. Diabetes 1999, Diabetes Res Clin Pract 2001)。

## 2. 研究の目的

網羅的全ゲノム関連解析や自然発症 1 型糖尿病モデル動物で同定されている多くの 1 型糖尿病疾患感受性遺伝子座・遺伝子が、機能的にどのように疾患感受性を決定するかという分子メカニズムを解明し、予知・予防法・根治療法の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究は、実験系として、マウス胸腺 T リンパ種由来の CD4 陽性 EL4 培養細胞株と、ヒト T リンパ種由来である CD4 陽性 JurkatE6.1 培養細胞株を用いた。特に、胸腺 T リンパ種由来の EL4 培養細胞株は、唯一 Treg に特徴的な分子 Forkhead box P3 (Foxp3) を誘導することができる培養細胞株で、広く、特に T リンパ球の Foxp3 を中心とした転写因子の研究に用いられている。

まず、ヒト・ラット・マウスで、同定されおり重要と考えられる 18 個の 1 型糖尿病疾患感受性候補遺伝子を、EL4 において TGF-β 存在下で培養し、ウエスタンブロット法や Taqman real-time PCR を用いて発現量の変化を解析した。18 個の 1 型糖尿病疾患感受性候補遺伝子は、Ubash3, Ctla4, Ptpn22, Ptpn2, Il2, Lnk (Sh2b3), Cblb, Ikzf1, Vav3, Erbb3, Prkcq, Rnls (C10orf59), Clec16A (Kiaa0350), Il2ra (CD25), Bach2, Dlk1, Pparg と Glis である (<http://www.tldbse.org>)。ヒトの 1 型糖尿病疾患感受性遺伝子は、GWAS で同定され、メタ解析で確認されかつゲノムワイド閾値 ( $p = 10^{-8}$ ) を見たしかつ連鎖不平衡領域内に 1 遺伝子を選び出した。また、Treg に特徴的な分子の一つとして同定されている Zinc finger protein which regulates apoptosis and cell cycle arrest (Zac1) 遺伝子も解析した。Zac1 遺伝子は、生直後 1 ヶ月に現

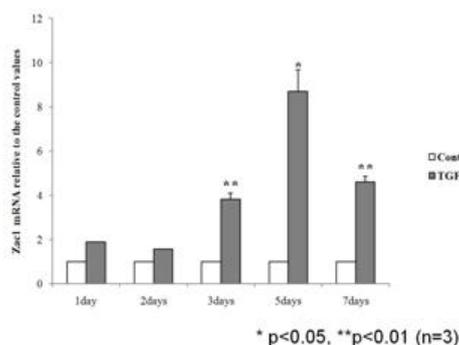
れるインスリン治療を必要とする高血糖症である奇形症候群の一種、新生児一過性糖尿病 (Transient neonatal diabetes mellitus) の原因遺伝子としても知られている。

#### 4. 研究成果

(1) 平成 21 年度においては、本研究で、Bioinformatic データベースを用いた検討で、Zac1 遺伝子が、T リンパ球の細胞周期コントロールに重要な役割を担い、多くの自己免疫疾患の原因遺伝子として知られる cytotoxic lymphocyte-associated antigen-4 と類似した発現パターンを取ることを見出した。また、CD3/CD28 expander beads, TGF- $\beta$  1, Interleukin-2 (IL-2), IL-6, Retinoic acid, Octreotide, cyclosporin A, rapamycin, trichostatin A, troglitazone, PI3K inhibitor: LY294002, nocodazole, vinblastine, aryl hydrocarbons (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, 6-formylindolo[3,2-b]carbazole), Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), ionomycin, Akt1/2 inhibitor, ERK inhibitor: PD98059, FK506 などの各種薬剤・阻害剤・刺激剤で培養 T リンパ球における Zac1 遺伝子の発現誘導を、ウエスタンブロット法や real-time PCR 法を用いて検討したところ、細胞周期を抑制するソマトスタチン誘導体の octreotide や troglitazone や TGF- $\beta$  1 等で、Zac1 の発現が誘導されることを見出した。EL4 において TGF- $\beta$  1 存在下と非存在下で培養し、Taqman real-time PCR を用いて発現量の変化を経時的に解析し比較したところ、培養後第 5 日をピークとして、Zac1 発現の有意な上昇 ( $p < 0.01$ ) が認められた (図 1)。

図 1.

#### Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) による Zac1 mRNA の発現誘導



(2) 平成 22 年度においては、前年度の研究成果を基盤とし、さらに TGF- $\beta$  1 に着目した研究を施行した。EL4 において TGF- $\beta$  1 存在下と非存在下で培養し、Taqman real-time PCR を用いて 1 型糖尿病疾患感受性候補遺伝子の発現量の変化を解析した。

Ubash3a mRNA と Zac1 mRNA は、有意に TGF- $\beta$  1 によって発現が誘導された。Ctla4 mRNA, Ptpn22 mRNA, Ptpn2 mRNA, I12 mRNA, Lnk (Sh2b3) mRNA, Cblb mRNA, Ikzf1 mRNA, Vav3 mRNA, Erbb3 mRNA, Prkcq mRNA は、有意に TGF- $\beta$  1 によって発現が低下した。Erbb3 mRNA の、有意な TGF- $\beta$  1 による発現低下を図 2 に示す。ERBB3 は、欧米白人 1 型糖尿病患者のみならず、日本人 1 型糖尿病患者においては、特に、バセドウ氏病や橋本病などの自己免疫性甲状腺疾患を合併する 1 型糖尿病患者において有意な関連が認められている (Awata T et al. J Clin Endocrinol Metab. 2009)。

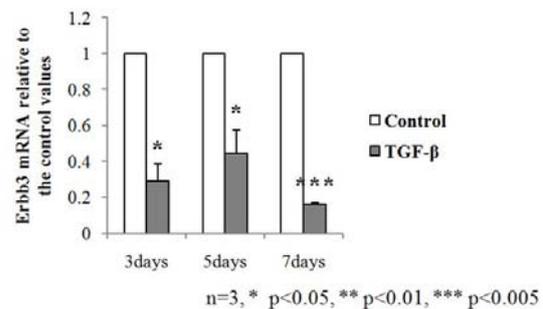


図 2. Erbb3 mRNA の TGF- $\beta$  1 による発現低下

Rnl1 (C10orf59) mRNA, Clec16A (Kiaa0350) mRNA, I12ra (CD25) mRNA には、有意な TGF- $\beta$  1 による発現量の変化は認められなかった。また、Bach2 mRNA, Dlk1 mRNA, Pparg mRNA, Glis mRNA の発現は、TGF- $\beta$  存在下と TGF- $\beta$  1 非存在下の両者において Taqman real-time PCR 法で検知できなかった。抗体による Ctla4 刺激では I12 以外に、上記、EL4 において発現が認められた遺伝子において発現量の変化はみとめられなかった。以上の解析により、TGF- $\beta$  1 によって発現量に変化が認められた遺伝子を TGF- $\beta$  1 依存性 1 型糖尿病疾患感受性遺伝子と暫定的に命名した。TGF- $\beta$  1 による発現量の変化を表 1 にまとめる。

さらに、前年度の研究成果を基盤とし、Zac1 に着目した研究を施行した。Zac1 には多くのスプライシングバリエントが存在することが知られているが、5 種類の Taqman を用いて、どのスプライシングバリエントが発現誘導されているか検討したところ、7 zinc fingers でステロイドホルモンや甲状腺ホルモンなどの核内レセプターと C 末端で共有結合できるタイプであることが明らかとなった。また、Zac1 を T リンパ球培養細胞株にプラスミドを用いて導入し標的分子を検索し

たところ、Delta-like 1 homolog 1 (DLK1) を、標的分子の一つとしている可能性が見出された。尚、最近、DLK1 は網羅的全ゲノム関連解析とメタ解析の結果、1 型糖尿病患者の原因遺伝子として報告されている (Wallace C et al. Nat Genet. 2010)。

現在、EL4 に Zac1b 遺伝子を導入し、Foxp3 や Zac1b と TGF- $\beta$  1、さらに今回の解析により新たに発見した TGF- $\beta$  依存性 1 型糖尿病疾患感受性遺伝子との遺伝子制御ネットワークに関する解析を精力的に進めている。

表 1.

TGF- $\beta$ による発現調節			
	3 days	5 days	7days
Zac1	↑	↑	↑
Ubash3a	↑	↑	↑
Dlk1	↑	↑	↑
ErbB3	↓	↓	↓
Ctla4	↓	↓	↓
Ptpn22	→	↓	↓
Ptpn2	→	↓	↓
Prkceq	↓	↓	↓
Lnk	↓	↓	↓
Cblb	↓	↓	↓
Irf1(Ikaros)	↓	↓	↓
Vav3	↓	↓	↓
Il2	↓	↓	↓
IL2RA (CD25)	→	→	→
Rnls (C10orf59)	→	→	→
Clec16a	→	→	→
Pparg	→	→	→

T リンパ球は、抗原特異的な T 細胞受容体を介して、抗原提示細胞 (APC) 上の、主要組織適合抗原と抗原ペプチドからなる複合体を検知し、反応を開始する。この時、T リンパ球と APC の間に、免疫シナプスと呼ばれる構造が形成され、免疫応答制御のシステム標的として注目されている。そこで、T リンパ球研究の世界的権威である米国スタンフォード大学 Mark M. Davis 教授を訪問し、T リンパ球の制御に重要な役割を担う免疫シナプスと 1 型糖尿病発症原因遺伝子との関係における共同研究の日程を確定した。CD4 陽性 T リンパ球の免疫シナプスと今回の解析により新たに発見した TGF- $\beta$  依存性 1 型糖尿病疾患感受性遺伝子との遺伝子制御ネットワークとの関係を図 3 に示す。

1 型糖尿病、自己免疫性甲状腺疾患 (バセドウ病・橋本病)、慢性関節リウマチ、慢性腸炎症性疾患などの異なる自己免疫疾患は同一家系に集積する傾向があること、つまり共通した遺伝素因があることが知られている。CD4 陽性ヘルパー T 細胞は免疫システムの指揮官としての役割を担っている。現在のところ、ヘルパー T 細胞には 4 種類のサブセットがあることが知られている。免疫シナプスは、これらの CD4 陽性ヘルパー T 細胞の分化誘導の役割も担っている。TGF- $\beta$  1 依存性 1 型糖尿病疾患感受性遺伝子は、バセドウ病

や橋本病などの甲状腺自己免疫疾患や慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患との共通遺伝素因としても関連することが知られている。そしてその多くは、免疫シナプスの形成・制御に関与している。そこで、免疫シナプスと TGF- $\beta$  1 依存性 1 型糖尿病疾患感受性遺伝子との関係を解析する。これらの研究から、免疫シナプスを制御する方法を見出す。そして、免疫シナプスの制御を低分子化合物で可能にし、経口剤で自己免疫疾患を予防・加療する斬新な方法を設計へと展開していきたいと考えている。



図 3. CD4 陽性 T リンパ球の免疫シナプスと TGF- $\beta$  1 依存性 1 型糖尿病疾患感受性遺伝子遺伝子制御ネットワークのモデル図。

(3) 2 型糖尿病の研究に関しては、平成 22 年 9 月から自然発症 2 型糖尿病モデル NSY マウスの系統育種をスタートさせ、コロニーを維持し、環境因子が遺伝因子に与える解析を目的としシヨ糖負荷を施行した。そして肝臓における遺伝子発現を網羅的に解析した結果、NSY マウスとコントロール C3H マウス間で、シヨ糖負荷に対して異なった反応を示す遺伝子群を同定した。これまでの研究で同定している NSY マウスのインスリン分泌不全・インスリン抵抗性の原因遺伝子座と、コンソミック・コンジェニック (Babaya N et al. Diabetologia 2010) の研究成果を進展させ、さらに、国内外のヒト 2 型糖尿病の網羅的全ゲノム関連解析とメタ解析研究成果を継承し、環境因子が遺伝素因に与える影響の分子メカニズムを解明していく。これらの研究成果は、2 型糖尿病の発症予知・予防・新規治療法の開発のブレークスルーに斬新な視点を与えることに貢献できると考えられる。

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2件)

- ① 上田 裕紀、1型糖尿病の発症機構—最新の知見—、内分泌・糖尿病・代謝内科、2011 (印刷中)、査読無
- ② 上田 裕紀、T細胞の制御からみた1型糖尿病の発症機構、分子糖尿病学の進歩—基礎から臨床まで—、pp66-73、2009、査読無

[学会発表] (計6件)

- ① 上田 裕紀、免疫シナプスの3Dイメージング～Tリンパ球の内側から見たI型糖尿病～、第4回神戸生活習慣病研究会、神戸、2011年2月5日
- ② 上田 裕紀、免疫シナプスの細胞内微細構造とその動態の解析～Tリンパ球の内側から見たI型糖尿病～、第56回未来医療セミナー、大阪、2010年9月28日
- ③ 上田 裕紀ほか、自然発症2型糖尿病モデルNSYマウスを用いた多因子疾患の機能分割、第24回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、大阪、2010年1月22-23日
- ④ Hironori Ueda、Induction of a Cell Cycle Regulator: Zacl in T lymphocyte Cell-Lines. The 49th annual meeting for the American Society for Cell Biology, December 5-9, San Diego, USA 2009
- ⑤ 上田 裕紀、炎症制御システム～免疫シナプス～の構造と動態、第4回生活習慣病と動脈硬化のUp to date、大阪、2009年11月5日
- ⑥ 上田 裕紀、免疫シナプス不全へのアプローチ、第10回KK21抗老化・高血圧研究会、大阪、2009年4月16日

[その他]

ホームページ等

<http://apprentice.jpn.org/hp/research-ueda.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

上田 裕紀 (UEDA HIRONORI)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任准教授  
(常勤)

研究者番号：90543463

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者  
なし