

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25年 5月31日現在

機関番号：82401
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591021
 研究課題名（和文） ケーシーエヌキュー1によるインスリン分泌調節とその分子機構の解明
 研究課題名（英文） Investigation of molecular mechanisms for the regulation of insulin secretion by KCNQ1
 研究代表者
 前田 士郎 (MAEDA SHIRO)
 独立行政法人理化学研究所・内分泌・代謝疾患研究チーム・チームリーダー
 研究者番号：50314159

研究成果の概要（和文）：ラット単離β細胞を用いた検討により、KCNQ1阻害薬が高グルコース下のインスリン分泌を有意に増加させること、GLP-1分泌細胞(NCI-H716)を用いた検討によりKCNQ1阻害剤がbethanecol刺激時のGLP-1分泌を増加させること明らかにした。さらに、正常対照者においてKCNQ1の危険対立遺伝子はインスリン分泌の指標(HOMA-β)と負の相関を示し、2型糖尿病患者においてKCNQ1を含む2型糖尿病感受性遺伝子座の危険対立遺伝子の総和が高値であるとインスリン治療が必要となる頻度が有意に高くなっていることを明らかにした。

研究成果の0概要（英文）：

We identified that inhibition of KCNQ1 enhanced glucose-induced insulin secretion in rat isolated pancreatic beta cells, and bethanecol-induced glucagon like peptide-1 secretion in NCI-H716 cells. In addition, we have found that *KCNQ1* risk variants for type 2 diabetes were negatively correlated with beta cell function (HOMA-beta) in non-diabetic individuals, and an accumulation of type 2 diabetes risk variants, including *KCNQ1* variants, was associated with requirement of insulin injection in patients with type 2 diabetes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	0	0	0
2009年度	0	0	0
2010年度	2200000	660000	2860000
2011年度	800000	240000	1040000
2012年度	500000	150000	650000
総計	3500000	1050000	4550000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：2型糖尿病、膵β細胞、インスリン分泌、GLP-1分泌、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

我が国における糖尿病患者数は増加の一途をたどっている。糖尿病患者の90%以上を占める2型糖尿病患者の成因には、骨格筋、

脂肪など末梢でのインスリン抵抗性と膵β細胞からのインスリン分泌不全が関与するがその正確な分子メカニズムに関しては未だ明らかではない。

我々は、ゲノムワイドな遺伝学的アプローチにより、KCNQ1 遺伝子を新たな 2 型糖尿病疾患感受性遺伝子として同定した (Maeda S et al. SNPs in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes in East Asian and European populations. Nat Genet 40: 1097-1102, 2008)。

KCNQ1 は電位依存性カリウムチャネルの α サブユニットをコードしており主に心筋で作用し心筋細胞膜の再分極に関与している事が知られている。KCNQ1 と 2 型糖尿病との関連については過去に知られていなかったが我々は KCNQ1 遺伝子発現が膵 β 細胞あるいはインスリン分泌細胞にも認められる事を明らかにした。その後 KCNQ1 遺伝子内の遺伝子多型はインスリン分泌能あるいは腸管からの GLP-1 分泌能との関連が認められるとの報告が散見されることより、KCNQ1 のインスリン分泌に及ぼす作用およびその分子機構の解明は新たな 2 型糖尿病の成因解明につながるのみならず、これらの分子そのものあるいはその上流下流分子を標的とした新たな治療法開発にも結びつく事が期待できる。

2. 研究の目的

本研究は当研究室で同定した新規 2 型糖尿病感受性遺伝子 *KCNQ1* の 2 型糖尿病発症に関わる分子機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

1. インスリン分泌の検討

ラットから単離した膵ラ氏島あるいは膵 β 細胞を用いてアデノウィルスベクターによる KCNQ1 遺伝子過剰発現、KCNQ1 阻害剤 (Yang IC et al. J Pharmacol Exp Ther 294:955-, 2000) などがインスリン分泌に及ぼす効果を検討した。また、インスリン分泌への関与について、その機序を詳細に知るためにグルコースあるいは KCl 刺激時の細胞内カルシウム濃度の変化を検討した。

2. GLP-1 分泌の検討

GLP-1 分泌細胞 (NCI-H716; Reimer RA et al. Endocrinology 142:4522-, 2001) を用いてアデノウィルスベクターによる KCNQ1 遺伝子過剰発現、KCNQ1 阻害剤などが GLP-1 の基礎分泌および栄養物刺激 (Meat hydrolysate)、副交感神経刺激 (Bethanecol)、細胞内カルシウム刺激 (Ionomycin) による分泌に及ぼす効果を検討した。

4. 研究成果

【インスリン分泌に関する検討】

ラット膵ラ氏島における KCNQ1 および β サブユニットの発現を reverse transcription PCR とウェスタンブロット法で解析した。単離膵ラ氏島では KCNQ1 の発現は mRNA、タンパクともに認められた。また β サブユニットは KCNE2 の発現が確認できた。次に KCNQ1 阻害剤 (chromanol 293B) がインスリン分泌に及ぼす効果を検討した。ラット単離 β 細胞を chromanol 293B 100 μ M で 1 時間前処理し高グルコース (16.7mM)、Tolbutamide (300 μ M)、高 KCl (30 mM) 存在下でのインスリン分泌を vehicle 処理の細胞 (コントロール) と比較検討した。Chromanol 293B 処理細胞では低グルコース条件下 (2.8mM) ではコントロールとインスリン分泌に差を認めなかったが、高グルコースおよび tolbutamide 存在下のインスリン分泌はコントロールに比し増加を認めた (高グルコース 386.0 \pm 74.5 vs. 608.8 \pm 100.9, $p < 0.05$, tolbutamide 465.3 \pm 65.5 vs. 627.6 \pm 85.9 $p < 0.1$)。KCl によるインスリン分泌には差は認めなかった。

【GLP-1 分泌に関する検討】

次に KCNQ1 が GLP-1 分泌に及ぼす効果を検討するために GLP-1 分泌細胞 (NCI-H716 細胞を用いて検討した。NCI-H716 細胞では KCNQ1 および KCNE1-5 の発現が確認できた。Chromanol 293B (100 μ M) 処理細胞では meat hydrolysate および bethanecol 刺激時の GLP-1 分泌がコントロール細胞に比し増加が認められた。Ionomycin による GLP-1 分泌には差は認められなかった。以上より KCNQ1 はインスリンおよび GLP-1 分泌調節に関与する事が示唆された。

KCNQ1 過剰発現細胞ではインスリンあるいは GLP-1 分泌への効果は明らかでなかった。

【細胞内カルシウムの検討】

KCNQ1 がインスリン分泌や GLP-1 分泌に及ぼす分子機構を知る目的で KCNQ1 阻害剤 (chromanol 293B) の細胞内カルシウム濃度に及ぼす影響を検討した。Chromanol 293B (100 μ M) 処理ラット単離膵 β 細胞では無処理の細胞に比し、tolbutamide 添加時の細胞内カルシウム濃度上昇が有意に増加した。GLP-1 分泌細胞 (NCI-H716) においても Chromanol 293B (100 μ M) 処理により bethanecol 添加時の細胞内カルシウム濃度上昇は、無処理の細胞に比し有意に高くなっていた。また KCNQ1 阻害剤 (chromanol 293B) は細胞内 cAMP 濃度の変化には影響を及ぼさなかった。以上より KCNQ1 はインスリンおよび GLP-1 分泌を細胞内カルシウム濃度上昇を介して調節する事が示唆された。

【遺伝子型とインスリン分泌に関する検討】さらに2型糖尿病患者あるいは対照者における遺伝子型とインスリン分泌能との関連を検討した。正常対照者において *KCNQ1* の危険対立遺伝子はインスリン分泌の指標 (HOMA- β) と負の相関を示した。また、2型糖尿病患者において *KCNQ1* を含む11の2型糖尿病感受性遺伝子座の危険対立遺伝子の総和が高値であるとインスリン治療が必要となる頻度が有意に高くなっていた。

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16件)

1. Fukuda H, Imamura M, Tanaka Y, Iwata M, Hirose H, Kaku K, Maegawa H, Watada H, Tobe K, Kashiwagi A, Kawamori R, Maeda S. Replication study for the association of a single nucleotide polymorphism, rs3746876, within *KCNJ15*, with susceptibility to type 2 diabetes in a Japanese population. *J Hum Genet* 2013, in press (査読有り)
2. Ma RCW, Hu C, Tam CH, Zhang R, Kwan P, Leung TF, Thomas GN, Go MJ, Hara K, Sim X, Ho JSK, Wang C, Li H, Lu L, Wang Y, Li JW, Wang Y, Lam VKL, Wang J, Yu W, Kim Y, Ng DP, Fujita H, Panoutsopoulou K, Day-Williams A, Lee HM, Ng ACW, Fang Y, Kong APS, Jiang F, Ma X, Hou X, Tang S, Lu J, Yamauchi T, Tsui SKW, Woo JLF, Leung PC, Zhang X, Tang NLS, Sy HY, Liu J, Wong TY, Lee JY, Maeda S, Xu G, Cherny SS, Chan TF, Ng MCY, Xiang K, Morris AP, DIAGRAM Consortium, Keildson S, MuTHER Consortium, Hu R, Ji L, Lin X, Cho YS, Kadowaki T, Tai ES, Zeggini E, McCarthy MI, Hon KL, Baum L, Tomlinson B, So WY, Bao Y, Chan JCN, Jia W. Genome-wide association study in a Chinese population identifies a susceptibility locus for type 2 diabetes at 7q32 near *PAX4*. *Diabetologia* 2013, in press (査読有り)
3. Saxena R, Saleheen D, Been LF, Garavito ML, Bjornes A, Young R, Ho WK, Rasheed A, Frossard P, Sim X, Hassanali N, Radha V, Chidambaram M, Liju S, Rees SD, Ng DPK, Wong T-Y, Yamauchi T, Hara K, Tanaka Y, Hirose H, McCarthy MI, Morris AP, DIAGRAM, MuTHER, AGEN, Basit A, Barnett AH, Katulanda P, Matthews D, Mohan V, Wander GS, Singh JR, Mehra NK, Ralhan S, Kamboh MI, Mulvihill JJ, Maegawa H, Tobe K, Maeda S, Cho YS, Tai ES, Kelly MA, Chambers JC, Kooner JS, Kadowaki T, Deloukas P, Danesh J, Sanghera DK. Genome-wide association study identifies a novel locus contributing to type 2 diabetes susceptibility in Sikhs of Punjabi origin from India. *Diabetes* published ahead of print January 8, 2013 (査読有り)
4. Imamura M, Iwata M, Maegawa H, Watada H, Hirose H, Tanaka Y, Tobe K, Kaku K, Kashiwagi A, Kadowaki T, Kawamori R, Maeda S. A replication study for the association of rs391300 in *SRR* and rs17584499 in *PTPRD* with susceptibility to type 2 diabetes in the Japanese. *J Diabetes Invest*, 2013 in press (査読有り)
5. Fukuda H, Imamura M, Tanaka Y, Iwata M, Hirose H, Kaku K, Maegawa H, Watada H, Tobe K, Kashiwagi A, Kawamori R, Maeda S. A single nucleotide polymorphism within *DUSP9* is associated with susceptibility to type 2 diabetes in a Japanese population. *PLoS One* 7: e46263, 2012 (査読有り)
6. Lim XL, Nurbaya S, Tai ES, Maeda S, Nakamura Y, Ng DPK. *KCNQ1* SNPs and susceptibility to diabetic nephropathy in East Asians with type 2 diabetes. *Diabetologia* 55: 2402-2406 2012 (査読有り)
7. Iwata M, Maeda S, Kamura Y, Takano A, Kato H, Murakami S, Higuchi K, Takahashi A, Fujita H, Hara K, Kadowaki T, Tobe K. Genetic risk score constructed using 14 susceptibility alleles for type 2 diabetes is associated with the early onset of diabetes and may predict the future requirement of insulin injections among Japanese individuals. *Diabetes Care* 35: 1763-1770, 2012 (査読有り)
8. Imamura M, Maeda S, Yamauchi T, Hara K, Yasuda K, Morizono T, Takahashi A, Horikosi M, Nakamura M, Fujita H, Tsunoda T, Kubo M, Watada H, Maegawa H, Okada-Iwabu M, Iwabu M, Shojima N, Ohshige T, Omori S, Iwata M, Hirose H, Kaku K, Ito C, Tanaka Y, Tobe K, Kashiwagi A, Kawamori R, Kasuga M, Kamatani N, DIAGRAM consortium, Nakamura Y, Kadowaki T. A single

- nucleotide polymorphism in ANK1 is associated with susceptibility to type 2 diabetes in Japanese populations. *Hum Mol Genet* 21: 3042-3049, 2012 (査読有り)
9. Kodama M, Horikoshi M, Toda K, Yamada S, Hara K, Irie J, Sirota M, Morgan AA, Chen R, Ohtsu H, Maeda S, Kadowaki T, Butte AJ. Expression-based genome-wide association study links CD44 in adipose tissue with type 2 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109: 7049-7054, 2012 (査読有り)
 10. Cho YS, Chen C-H, Hu C, Long J, Ong RTH, Sim X, Takeuchi F, Wu Y, Go MJ, Yamauchi T, Chang Y-C, Kwak SH, Ma RCW, Yamamoto K, Adair LS, Aung T, Cai Q, Chang L-C, Chen Y-T, Gao Y, Hu FB, Kim H-L, Kim S, Kim YJ, Lee JJ-M, Lee NR, Li Y, Liu JJ, Lu W, Nakamura J, Nakashima E, Ng DPK, Tay WT, Tsai F-J, Wong TY, Yokota M, Zheng W, Zhang R, Wang C, So WY, Ohnaka K, Ikegami H, Hara K, Cho YM, Cho NH, Chang TJ, Bao Y, Hedman ÅK, Morris AP, McCarthy MI, DIAGRAM consortium, MuTHER consortium, Takayanagi R, Park KS, Jia W, Chuang L-M, Chan JCN, Maeda S, Kadowaki T, Lee J-Y, Wu J-Y, Teo YY, Tai ES, Shu XO, Mohlke KL, Kato N, Han B-G, Seielstad M. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies 8 new loci for type 2 diabetes in East Asians. *Nature Genetics* 44: 67-72, 2012 (査読有り)
 11. Ohshige T, Iwata M, Omori S, Tanaka Y, Hirose H, Kaku K, Maegawa H, Watada H, Kashiwagi A, Kawamori R, Tobe T, Kadowaki T, Nakamura Y, Maeda S. Association of New Loci Identified in European Genome-wide Association Studies with Susceptibility to Type 2 Diabetes in the Japanese. *PLoS One* 6: e26911, 2011 (査読有り)
 12. Imamura M, Iwata M, Maegawa H, Watada H, Hirose H, Tanaka Y, Tobe K, Kaku K, Kashiwagi A, Kawamori R, Nakamura Y, Maeda S. Genetic variants at CDC123/CAMK1D and SPRY2 are associated with susceptibility to type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetologia* 54: 3071-3077, 2011 (査読有り)
 13. Imamura M, Maeda S. Genetics of type 2 diabetes; GWAS era and the future perspectives. *Endocrine J* 58: 723-739, 2011 (査読有り)
 14. Grarup N, Overvad M, Sparsø T, Witte DR, Pisinger C, Jørgensen T, Yamauchi T, Hara K, Maeda S, Kadowaki T, Hansen T, Pedersen O. The diabetogenic VPS13C/C2CD4A/C2CD4B rs7172432 variant impairs glucose-stimulated insulin response in 5,722 non-diabetic Danish individuals. *Diabetologia* 54:789-794, 2011 (査読有り)
 15. Yamauchi T, Hara K, Maeda S, Yasuda K, Takahashi A, Horikoshi M, Nakamura M, Fujita H, Grarup N, Cauchi S, Ng DPK, Ma RCW, Tsunoda T, Kubo M, Watada H, Maegawa H, Okada-Iwabu M, Iwabu M, Shojima N, Shin HD, Andersen G, Witte DR, Jørgensen T, Lauritzen T, Sandbæk A, Hansen T, Ohshige T, Omori S, Saito I, Kaku K, Hirose H, So WY, Beury D, Chan JCN, Park KS, Tai ES, Ito C, Tanaka Y, Kashiwagi A, Kawamori R, Kasuga M, Frogue P, Pedersen O, Kamatani N, Nakamura Y & Kadowaki T. A genome-wide association study in the Japanese population identifies susceptibility loci for type 2 diabetes at UBE2E2 and C2CD4A/B. *Nat Genet* 42: 864-868, 2010 (査読有り)
 16. Ohshige T, Tanaka Y, Araki S, Babazono T, Toyoda M, Umezono T, Watada H, Suzuki D, Iwamoto Y, Kawamori R, Nakamura Y, Maeda S. A single nucleotide polymorphism in KCNQ1 is associated with susceptibility to diabetic nephropathy in Japanese subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 33: 842-846, 2010 (査読有り)
- [学会発表] (計 10 件)
1. Imamura M, Fukuda H, Iwata M, Maegawa H, Watada H, Hirose H, Tanaka Y, Tobe K, Kaku K, Kashiwagi A, Kawamori R, Maeda S. Genetic variations in DUSP9 locus and CMIP locus are associated with type 2 diabetes in a Japanese population. 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes 2012/10/3 Berlin, Germany
 2. Imamura M, Iwata M, Maegawa H, Watada H, Hirose H, Tanaka Y, Tobe K, Kaku K, Kashiwagi A, Kawamori R, Nakamura Y, Maeda S. Rs10906115 in CDC123/CAMK1D locus and rs1359790 near SPRY2 are

- associated with susceptibility to type 2 diabetes in a Japanese population. 46th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes 2011/9/15 Lisbon, Portugal
3. Maeda S, Tsukada S Effects of KCNQ1 on glucose-induced insulin secretion in rat pancreatic beta cells or on glucagon-like peptide-1 secretion in cultured NCI-H716 cells 46th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes 2010/9/22 Stockholm, Sweden
 4. Oshige T, Omori S, Tanaka Y, Kashiwagi A, Kaku K, Hirose H, Kawamori R, Nakamura Y, Maeda S Replication Study for the Association of 23 Susceptibility Loci for Type 2 Diabetes in the Japanese American Diabetes Association 70th Scientific Sessions 2010/6/26 Orland U. S. A.
 5. Maeda S., Oshige T., Araki S., Tomoya U., Toyoda M., Kawai K., Imanishi M., Uzu T., Babazono T., Watada H., Suzuki D., Tanaka Y., Kashiwagi A., Iwamoto Y., Kawamori R., and Nakamura Y. single nucleotide polymorphism in KCNQ1 is associated with diabetic nephropathy in Japanese subjects with type 2 diabetes”, International Society of Nephrology (ISN-nexus), (International Society of Nephrology), 2010/4/16 Kyoto
 6. 今村美菜子, 前田士郎, 山内敏正, 原一雄, 安田一基, 綿田裕孝, 前川聡, 岩田実, 広瀬寛, 加来浩平, 伊藤千賀子, 田中逸, 戸辺一之, 柏木厚典, 河盛隆造, 春日雅人, 中村祐輔, 門脇孝 Imputation に基づくゲノムワイド関連解析による 2 型糖尿病疾患感受性遺伝子領域の同定 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 2012/5/18 横浜
 7. 前田 士郎, 2 型糖尿病患者のゲノム解析 第 53 回日本糖尿病学会 2010/5/29 岡山
 8. 今村美菜子、田中逸、前川 聡、綿田 裕孝、柏木厚典、加来浩平、広瀬寛、河盛隆造、中村祐輔、前田士郎 2 型糖尿病感受性候補領域 33 領域の日本人集団における検証 第 54 回日本糖尿病学会 2011/5/21 札幌
 9. 原 一雄、藤田 逸人、庄嶋 伸浩、掘越 桃子、岡崎 由希子、前田 士郎、山内 敏正、植木 浩二郎、門脇 孝 全ゲノム解析と発現解析による 2 型糖尿病関連遺伝子同定の試み 第 54 回日

- 本糖尿病学会 2011/5/21 札幌
10. 大重 聡彦, 大森 慎太郎, 田中 逸, 柏木 厚典, 加来 浩平, 広瀬 寛, 河盛隆造, 中村 祐輔, 前田 士郎, 2 型糖尿病感受性候補領域 23 領域の日本人集団における検証 第 53 回日本糖尿病学会 2010/5/27 岡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 士郎 (MAEDA SHIRO)

独立行政法人理化学研究所・内分泌・代謝疾患研究チーム・チームリーダー

研究者番号：50314159