

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01966

研究課題名(和文)高脂肪食と2型糖尿病感受性遺伝子の相乗効果に関する検討

研究課題名(英文) Analysis of synergy effect between high fat feeding and harboring T2DM susceptibility gene

研究代表者

木戸 良明 (Kido, Yoshiaki)

神戸大学・保健学研究科・教授

研究者番号：10335440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,300,000円

研究成果の概要(和文)：最近代表者が明らかにした、日本人2型糖尿病感受性遺伝子として最も重要と言われるKCNQ1遺伝子の糖尿病発症メカニズムにおいて高脂肪食負荷が相乗的に関与している可能性を考え、Kcnq1変異マウスに高脂肪食を与え解析を行った。その結果、膵細胞に蓄積する転写因子C/EBPが細胞周期調節因子Cdkn1cの発現を誘導することによって、相乗的に膵細胞量が減少することが明らかとなった。これはKcnq1変異によってもたらされたDNA脱メチル化と高脂肪食誘導性C/EBP発現によるGene-environmental interactionによる相乗的效果によるものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

わが国においては、不規則な食生活や運動不足の日々を送りながら糖尿病を発症しない人もいれば、規則正しい生活を心がけていながら糖尿病を発症する人もいる。現在の糖尿病医療においては、その違いを明確にすることはできていない。代表者は、遺伝・環境因子の相互作用が重要と考えており、家族歴、さらにKCNQ1遺伝子の変異を確認することにより、栄養指導の重要性が患者に伝わりやすくなるものと考えている。すなわち、特に栄養指導に重点をおくべき患者とそうでない患者に分けることができれば、医療者・患者両者のモチベーションも上がり、薬物に依存しない治療法であることから、医療経済への負担も軽減することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We found that when there is a risk allele in Kcnq1 gene, a T2DM susceptibility gene, the expression of non-coding RNA Kcnq1ot1 was decreased. In addition, Kcnq1ot1 expression reduction was found to result in epigenetic alterations induced an increase in the expression of Cdkn1c and a decrease in the pancreatic  $\beta$ -cell mass. We have already reported that the transcription factor C/EBP accumulates in the pancreatic  $\beta$ -cells of high fat-fed mice. In vivo studies have shown that compared to control mice, Kcnq1ot1-truncated C/EBP overexpressing mice show significantly higher blood glucose levels, smaller pancreatic  $\beta$ -cell mass, and enhanced expression of Cdkn1c in the pancreatic islets. The findings suggest that the introduction of epigenetic modifications in pancreatic  $\beta$ -cells may lead to enhanced binding of C/EBP to the Cdkn1c promoter, then an increase in the expression levels of Cdkn1c, and a decrease in pancreatic  $\beta$ -cell mass.

研究分野：糖尿病学

キーワード：膵細胞 高脂肪食 2型糖尿病感受性遺伝子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2008年に日本人特異的な2型糖尿病感受性遺伝子としてKcnq1遺伝子が同定された。Kcnq1は母方でのみ発現するインプリンティング遺伝子として知られている。Kcnq1遺伝子領域では父方アリルにおいて、non coding RNA Kcnq1ot1がKcnq1遺伝子内より発現し、近傍遺伝群のプロモーター領域に結合しDNAメチル化やヒストン修飾を行う。その結果、近傍遺伝子の発現は抑制される。一方母方アリルではKcnq1ot1のプロモーター領域がDNAメチル化されているため、Kcnq1ot1は発現しない。よって近傍遺伝子群のプロモーター領域はエピジェネティクス修飾変化を受けず、発現が保たれる(図1)。このようなKcnq1遺伝子領域のインプリンティング制御の異常が2型糖尿病発症に寄与している可能性が考えられた。

代表者は、Kcnq1ot1が直接膵細胞量を調節しているかどうかを検討するため、Kcnq1ot1の下流にpolyAを挿入し、Kcnq1ot1の発現を抑制したKcnq1ot1 truncation マウスについて解析を行った。polyAを父親より受け継いだマウス(Truncated Paternal; TP) 母親より受け継いだマウス(Truncated Maternal; TM) 野生型(Wild-type; WT)の3群に分けて、Kcnq1ot1の発現量を検討したところTPマウスについて有意に低下していた。

さらに出生時及び24週齢の膵細胞量を定量したところ、いずれの週齢においてもTPマウスで有意に減少していた。Kcnq1ot1 truncation マウスにおける膵細胞量減少の機序として、細胞周期調節因子Cdkn1cの関与が考えられたため、Cdkn1cの発現を定量したところTPマウスの膵島で有意に増加していた。

### 2. 研究の目的

戦後の日本は食生活が激変し、その結果糖尿病をはじめとした生活習慣病が急増したと考えられている。特にカロリー摂取量と比較して、脂質摂取量が年々増加していることが厚生労働省の栄養調査によって明らかにされている。脂質、特に飽和脂肪酸が2型糖尿病発症において危険因子であるという報告は数多く見られるものの、その発症メカニズムについて十分に検討されたものは少ない。特に、欧米人と比較して明らかにBMIが低い日本人においては、インスリン分泌臓器である膵β細胞の脆弱性が以前から指摘されているが、脂質摂取と膵β細胞の脆弱性の関連について検討した報告は多くはない。また日本人の脂質摂取量が増加しているとはいえ、欧米人のそれとは比較にならないことは明白である。代表者は、日本人の膵β細胞は特に脂質負荷において脆弱性を有するのではないか、という仮説を構築した。最近代表者が明らかにした、日本人2型糖尿病感受性遺伝子として最も重要と言われるKCNQ1遺伝子の糖尿病発症メカニズムにおいても高脂肪食負荷が関与している可能性を考え、現在の日本人2型糖尿病モデルとして高脂肪食負荷Kcnq1変異マウスを作製・解析することとした。

### 3. 研究の方法

Kcnq1ot1発現が減少したKcnq1ot1 truncation マウスとC/EBP過剰発現マウスを交配しKcnq1ot1 truncated C/EBP過剰発現マウス(KT)を作成した。KTマウスの代謝データ、膵細胞量の測定を行い、野生型マウス(WT)、Kcnq1ot1 truncation マウス(TP)、C/EBP過剰発現マウス(TG)らと比較検討を行った。

### 4. 研究成果

**オープンクロマチンの状態ではC/EBP がCdkn1cの発現を増加させる**

2010年に代表者らは、糖尿病モデルマウスにおいて C/EBP $\beta$  が膵島で発現が亢進することを報告した。C/EBP $\beta$  は C/EBP ファミリーの一つであり、遺伝子のプロモーター領域に存在する CCAATモチーフに結合することでその遺伝子の転写を制御することが知られている。軟骨細胞においては、C/EBP $\beta$  が Cdkn1c のプロモーター領域に結合することで Cdkn1c の発現を増加させるとの報告がある。同様の機序が膵細胞でも起こっている可能性が考えられた。そこで野生型のマウスに高脂肪食を負荷し C/EBP $\beta$  の発現量について検討したところ、高脂肪食負荷マウスにおいて発現が増加していた (Figure 1)。

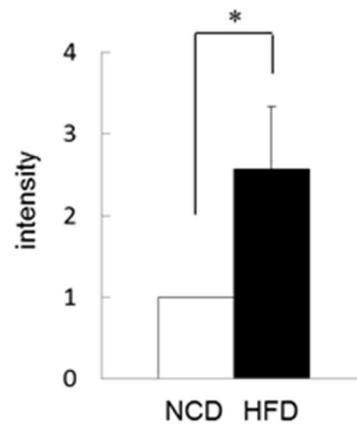


Figure1. 高脂肪食負荷野生型マウスの膵島における C/EBP の発現量

C/EBP $\beta$  が Cdkn1c の発現にどのような影響を及ぼすかを検討するために、マウス膵細胞株である MIN6 細胞で実験を行った。ルシフェラーゼアッセイをしたところ、C/EBP $\beta$  過剰発現時において Cdkn1c の転写活性が有意に亢進していることが明らかになった。しかしながら、定量リアルタイム PCR では、C/EBP $\beta$  の過剰発現で Cdkn1c の mRNA レベルにおける発現量は

変化しなかった。MIN6 細胞にヒストンメチル化酵素阻害薬である DZNep、脱アセチル化酵素阻害薬の TSA、DNA メチル化酵素阻害薬である 5-aza-dC を負荷したところ、Cdkn1c の発現が Control に比べ増加した。更に C/EBP $\beta$  を過剰発現させたところ、Cdkn1c の発現量がより増加した。次に ChIP assay にて C/EBP $\beta$  と Cdkn1c プロモーター領域との結合を検討したところ、エピジェネティクス修飾阻害剤と C/EBP $\beta$  を負荷した細胞において強い結合が確認できた。

これらの結果から、エピジェネティクス修飾阻害剤により Cdkn1c のプロモーター領域がオープンクロマチンの状態になると、Cdkn1c の発現が通常状態より亢進すると考えられた。更に C/EBP $\beta$  が蓄積すると、C/EBP $\beta$  が Cdkn1c のプロモーター領域に結合することでより Cdkn1c 発現が増加することが示された。

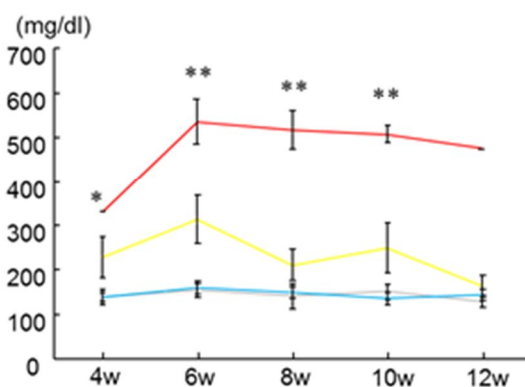


Figure2A. KT マウス、TP マウス、TG マウス、WT マウスにおける随時血糖値の推移

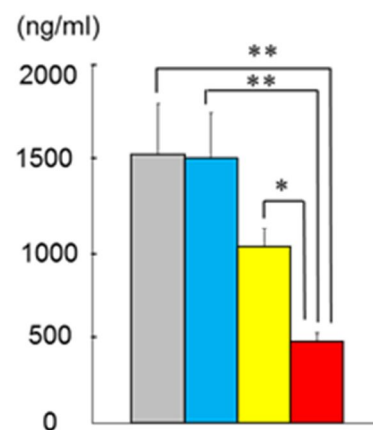


Figure2B. 各群マウスにおける血清インスリン値の推移

#### C/EBP $\beta$ 過剰発現 Kcnq1ot1 truncation マウスの検討

これらの結果を in vivo でも検証するために、Kcnq1ot1 truncation マウスに膵細胞特異的 C/EBP $\beta$  過剰発現マウスを交配した。Kcnq1ot1 の変異が父親より受け継がれるように交配を

行い、Kcnq1ot1 truncated C/EBP transgenic マウス (KT マウス)、Truncated Paternal マウス (TP マウス) と、C/EBP 過剰発現マウス (TG マウス)、そして野生型 (WT マウス) との 4 群に分け、検討を行った。随時血糖値と 8 週齢におけるインスリン値を測定したところ、KT マウスでは対照群と比べ血糖値の有意な上昇と血清インスリン値の有意な低下が認められた (Figure 2A, B)。同じく 8 週齢における膵細胞量について検討したところ、KT マウスで有意に減少していた (Figure 2C)。さらにこの時点での Cdkn1c の発現量は KT マウスで対照群に比べ mRNA、タンパクとも増加していた。

次に、KT マウスの膵島においても C/EBP が Cdkn1c プロモーターに結合することを確認するため、代表者は膵細胞特異的 HA タグ付 C/EBP トランスジェニックマウスを作製した。これは、ChIP アッセイをするのに適当な C/EBP 抗体が無いためである。我々は Kcnq1ot1 truncation マウスと HA タグ付 C/EBP トランスジェニックマウスを交配し、HA-KT マウスを作製した。ChIP アッセイにより、HA-KT マウスの膵島において、HA-C/EBP が Cdkn1c プロモーターにより多く結合することが明らかになった。

これらの結果より、vitro と同様、vivo でも Kcnq1ot1 の発現減少による Cdkn1c プロモーター領域のクロマチンが open になっている状態で C/EBP が蓄積すると、Cdkn1c の発現が増加することが明らかとなった。

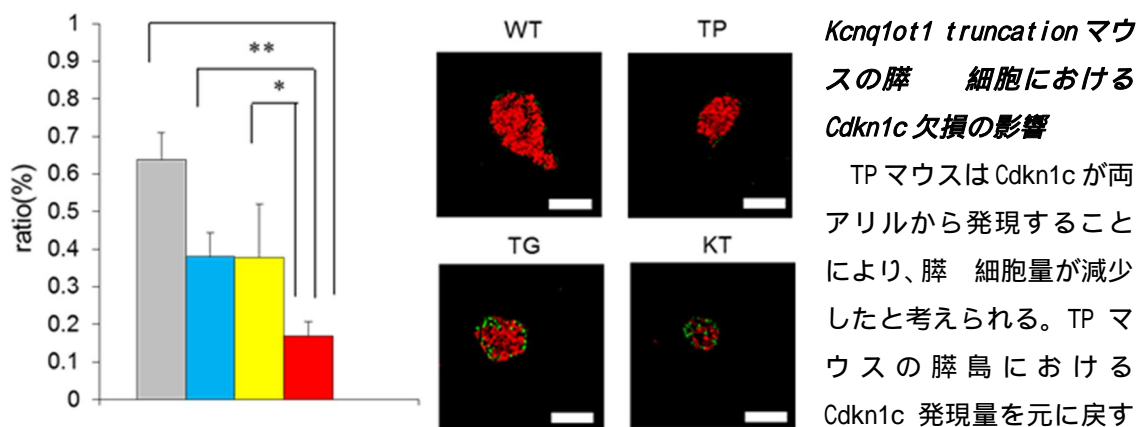


Fig2C. KT マウス, TP マウス, TG マウス, WT マウスにおける膵細胞量

**Kcnq1ot1 truncation マウスの膵細胞における Cdkn1c 欠損の影響**

TP マウスは Cdkn1c が両アリルから発現することにより、膵細胞量が減少したと考えられる。TP マウスの膵島における Cdkn1c 発現量を元に戻すことによって膵細胞量も回復するかを検討するため、TP マウスの膵

細胞において Cdkn1c がヘテロノックアウトされたマウス (TP × Cdkn1c) を作製した。このマウスは、片方のアリル (父方アリル) からのみ Cdkn1c が発現しており、Cdkn1c の発現量は TP マウスの半分となる。このマウスを用いて、TP マウスの膵細胞における Cdkn1c の発現の影響を解析した。出生時、12 週齢において TP マウスでは膵細胞量が減少する。しかし Cdkn1c の発現が半減している TP × Cdkn1c では膵細胞量は回復した。以上の結果より、TP マウスにおける膵細胞量の減少は Cdkn1c 発現が関与していることが考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Suzuki E, Matsuda T, Kawamoto T, Takahashi H, Mieda Y, Matsuura Y, Takai T, Kanno A, Koyanagi-Kimura M, Asahara SI, Inoue H, Ogawa W, Kido Y	4. 巻 64
2. 論文標題 Docosahexaenoic Acid Reduces Palmitic Acid-Induced Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Kobe J Med Sci.	6. 最初と最後の頁 E43-E55.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kanno A, Asahara SI, Kawamura M, Furubayashi A, Tsuchiya S, Suzuki E, Takai T, Koyanagi-Kimura M, Matsuda T, Okada Y, Ogawa W, Kido Y.	4. 巻 3
2. 論文標題 Early administration of dapagliflozin preserves pancreatic $\beta$ -cell mass through a legacy effect in a mouse model of type 2 diabetes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig	6. 最初と最後の頁 577-590
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/jdi.12945.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yano H, Sakai M, Matsukawa T, Yagi T, Naganuma T, Mitsushima M, Iida S, Inaba Y, Inoue H, Unoki-Kubota H, Kaburagi Y, Asahara SI, Kido Y, Minami S, Kasuga M, Matsumoto M.	4. 巻 8
2. 論文標題 PHD3 regulates glucose metabolism by suppressing stress-induced signalling and optimising gluconeogenesis and insulin signalling in hepatocytes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 14290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41598-018-32575-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ardestani A, Lupse B, Kido Y, Leibowitz G, Maedler K.	4. 巻 27
2. 論文標題 mTORC1 Signaling: A Double-Edged Sword in Diabetic $\beta$ Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Metab.	6. 最初と最後の頁 314-331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cmet.2017.11.004.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Takai T, Matsuda T, Matsuura Y, Inoue K, Suzuki E, Kanno A, Kimura-Koyanagi M, Asahara SI,	4. 巻 497
2. 論文標題 Casein kinase 2 phosphorylates and stabilizes C/EBP in pancreatic cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 451-456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.02.108.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawada Y, Asahara SI, Sugiura Y, Sato A, Furubayashi A, Kawamura M, Bartolome A, Terashi-	4. 巻 12
2. 論文標題 Histone deacetylase regulates insulin signaling via two pathways in pancreatic cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0184435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0184435. eCollection 2017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Bartolome A, Garcia-Aguilar A, Asahara SI, Kido Y, Guillen C, Pajvani UB, Benito M.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 MTORC1 Regulates both General Autophagy and Mitophagy Induction after Oxidative Phosphorylation Uncoupling.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00441-17.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kanno A, Asahara SI, Furubayashi A, Masuda K, Yoshitomi R, Suzuki E, Takai T, Kimura-Koyanagi M, Matsuda T, Bartolome A, Hirota Y, Yokoi N, Inaba Y, Inoue H, Matsumoto M, Inoue K, Abe T, Wei FY, Tomizawa K, Ogawa W, Seino S, Kasuga M, Kido Y.	4. 巻 5
2. 論文標題 GCN2 regulates pancreatic $\beta$ -cell mass by sensing intracellular amino acid levels.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JCI Insight.	6. 最初と最後の頁 e128820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.128820.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Katsuyama A, Kusuhara S, Asahara SI, Nakai SI, Mori S, Matsumiya W, Miki A, Kurimoto T, Imai H, Kido Y, Ogawa W, Nakamura M.	4. 巻 8
2. 論文標題 En face slab optical coherence tomography imaging successfully monitors progressive degenerative changes in the innermost layer of the diabetic retina.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMJ Open Diabetes Research & Care.	6. 最初と最後の頁 e001120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmjdr-2019-001120.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inoue H, Saito M, Kouchi K, Asahara SI, Nakamura F, Kido Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Association between mean platelet volume in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus and diabetic macrovascular complications in Japanese patients.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Diab. Invest.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13198.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Kido Y
2. 発表標題 Beta Cell mass
3. 学会等名 IDF2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Asahara S, Ohashi Y, Kido Y
2. 発表標題 Effect of removal of glucotoxicity by SGLT2 inhibitor dapagliflozin on the gene expression in pancreatic beta cells
3. 学会等名 IDF2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shimono N, Asahara S, Kido Y
2. 発表標題 Analysis of Pathogenic Mechanism by Susceptibility Genes of T2DM Using Human iPS Cells
3. 学会等名 77th Scientific Sessions of American Diabetes Association (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kido Y.
2. 発表標題 Regulation of pancreatic beta cell mass from the interaction of geneenvironment factors
3. 学会等名 9th AASD Scientific Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高井智子、松田友和、井上佳歩、松浦有希、鈴木江美、神野歩、木村真希、淺原俊一郎、小川渉、木戸良明
2. 発表標題 膵 細胞の小胞体ストレス誘導性アポトーシスにおけるCK2 の役割
3. 学会等名 第60回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木江美、松田友和、川本剛士、松浦有希、高井智子、神野歩、木村真希、淺原俊一郎、小川渉、木戸良明
2. 発表標題 脂肪酸が膵 細胞の小胞体に及ぼす影響
3. 学会等名 第60回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 下野名奈子、浅原俊一郎、原瑞季、田中孝一、松田友和、木村真希、神野歩、高井智子、鈴木江美、青井貴之、木戸良明
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を用いた2型糖尿病発症機序の解明
3. 学会等名 第60回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井上佳歩、高井智子、松田友和、鈴木江美、神野歩、木村真希、浅原俊一郎、木戸良明
2. 発表標題 膵細胞の小胞体ストレス誘導性アポトーシスにおけるCK2 の役割
3. 学会等名 第40回分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古林鮎子、神野歩、増田勝久、吉富理紗、木村真希、松田友和、浅原俊一郎、木戸良明
2. 発表標題 高脂肪食負荷GCN2欠損マウスの膵島におけるmTORC1シグナル調節機構の解明
3. 学会等名 第40回分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山田瑞姫、浅原俊一郎、下野名奈子、田中孝一、松田友和、木村真希、神野歩、高井智子、鈴木江美、青井貴之、木戸良明
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を用いた膵内分泌細胞への分化誘導法の確立
3. 学会等名 第40回分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kido Y
2. 発表標題 Regulation of pancreatic cell mass from the interaction of gene-environmental factors
3. 学会等名 International Congress of Diabetes and Metabolism (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asahara S, Kido Y.
2. 発表標題 Early administration of dapagliflozin preserves pancreatic beta cell mass through an epigenetic modification in a mouse model of type2 diabetes
3. 学会等名 International Congress of Diabetes and Metabolism (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kudo M, Kanno A, Asahara S, Kido Y
2. 発表標題 Identification of the regulatory mechanism of mTORC1 signaling activity in pancreatic $\beta$ -cells in GCN2 knockout mice
3. 学会等名 79th American Diabetes Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----