

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007 年 2008 年
 課題番号：19591064
 研究課題名（和文）TCF7L2 遺伝子による糖尿病の病態解明
 研究課題名（英文）Mechanism of increased risk of type 2 diabetes by TCF7L2 gene polymorphisms

研究代表者
 古田 浩人(FURUTA HIROTO)
 和歌山県立医科大学・医学部・講師
 研究者番号：90238684

研究成果の概要：

臨床研究では、TCF7L2 遺伝子多型が日本人の 2 型糖尿病の発症に関係すること、さらに、グルカゴン刺激に対するインスリン分泌反応の低下がその特徴のひとつであることが明らかとなった。基礎研究では、膵細胞においてグルカゴン刺激は GLP-1 受容体を介すること、TCF7L2 の過剰発現は GLP-1 受容体の発現を低下させることなどが明らかとなり、TCF7L2 遺伝子による糖尿病の病態にはインクレチンホルモンのひとつである GLP-1 に対する反応性の低下によるインスリン分泌障害が関係していると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	700,000	210,000	910,000
平成 20 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,600,000	480,000	2,080,000

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、インクレチン、TCF7L2 遺伝子、遺伝子多型

1. 研究開始当初の背景

糖尿病、特に 2 型糖尿病は、インスリン分泌不全に末梢組織におけるインスリン抵抗性が重なることで持続的な高血糖をきたす疾患で、その病因には過食や運動不足といった環境要因に加え遺伝素因が深く関係する。

糖尿病の遺伝素因の解明は、新たな治療法の開発にも繋がることから、世界中で精力的に研究が行われており、我々もこれまでアミン、Pax4、UCP2、ベータセルリンといった遺伝子の多型が「ありふれた」2 型糖尿病の病態に関係することを報告しているが、その

全体像は依然明らかではない。

2006 年、アイスランドから転写因子に属する *transcription factor 7-like 2 (TCF7L2)* 遺伝子の多型 (rs7903146 および rs12255372) が「ありふれた」2 型糖尿病の発症に関連することが報告された。その後、同遺伝子多型と 2 型糖尿病との関連はイギリス、フランス、アメリカなどにおいても確認されたが、日本人を含むアジア人においては報告がなくアジア人における意義は不明であった。また、rs7903146 および rs12255372 はどちらもイントロンに位置しており TCF7L2 遺伝子がどの

ような機序で糖尿病の発症に関係しているのかについても不明であった。このような背景の下、*TCF7L2* 遺伝子多型が日本人の2型糖尿病の病態にどのように関与しているかを明らかにすることを目的に本研究を計画した。

2. 研究の目的

TCF7L2 遺伝子多型が日本人の2型糖尿病の病態にどのように関与しているかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 日本人2型糖尿病患者を対象としたケース・コントロール研究

インフォームドコンセントが得られた糖尿病患者および非糖尿病コントロール(50歳以上でHbA1c5.6%以下を満たす者)を対象にTaqMan allelic discrimination法にてrs7903146およびrs12255372のタイピングを行い2群間でリスクアレル頻度を比較した。

(2) *TCF7L2* 遺伝子多型とインスリン分泌障害との関連の検討

グルカゴンがインスリン分泌刺激作用を有することは広く知られており、経静脈的なグルカゴン刺激によるインスリン分泌能の評価は日常臨床において汎用されている検査のひとつである。2型糖尿病患者を対象に早朝空腹時に経静脈的に1mg/bodyのグルカゴンを投与し、インスリン分泌能の指標として負荷前および負荷後5分後の血清Cペプチド濃度を測定し*TCF7L2* 遺伝子多型との関連を検討した。

(3) *TCF7L2* の過剰発現が膵細胞機能におよぼす影響の検討

マウス *TCF7L2* cDNA を pcDNA3.1 プラスミドに組み込み過剰発現ベクターを作製、マウス膵インスリノーマ細胞株(MIN6細胞)に、トランスフェクション試薬としてFuGENE6を用い一過性に過剰発現させ、10mM、22mMグルコースおよび10nMグルカゴン(10mMグルコース存在下)で刺激を行い、*TCF7L2* の過剰発現がこれらの刺激によるインスリン分泌におよぼす影響を検討した。

(4) グルカゴン受容体および glucagon like peptide-1(GLP-1)受容体の発現抑制がグルカゴン刺激による膵細胞からのインスリン分泌に与える影響の検討

グルカゴンとGLP-1のアミノ酸配列の比較から、グルカゴン刺激を感知する膵細胞の受容体としてグルカゴン受容体およびGLP-1受容体の二つが考えられた。グルカゴン受容

体およびGLP-1受容体に対するsiRNAをRNAiFect試薬を用いてMIN6細胞にトランスフェクションし各々の受容体の発現を抑制、その後、10mMグルコース存在下に10nMグルカゴンで刺激を行い、各々の受容体の発現抑制がグルカゴン刺激によるインスリン分泌におよぼす影響を検討した。

(5) *TCF7L2* の過剰発現が膵細胞内の種々の遺伝子の発現におよぼす影響の検討

TCF7L2 の過剰発現後、細胞よりmRNAを抽出、real time PCR法にてグルカゴン受容体、GLP-1受容体、insulin receptor substrate(IRS)-2、Kir6.2のmRNA発現量を測定、actin related peptide(ARP)mRNAの発現量で補正の後、比較検討した。

4. 研究成果

(1) 日本人2型糖尿病患者を対象としたケース・コントロール研究

日本人2型糖尿病患者(384名)および非糖尿病コントロール(378名)を対象に2つのSNP頻度の比較を行った。

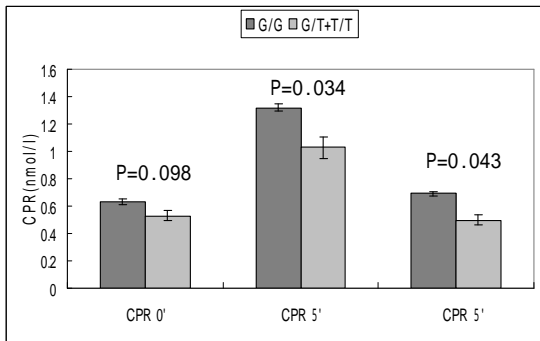
rs7903146のリスクアレル(Tアレル)は糖尿病患者で有意に高頻度(odds ratio 1.97, 95%CI 1.14-3.41, P=0.014)であり、rs12255372(リスクアレルはTアレル)に関しても同様の傾向(P=0.055)を認めた。一方、実際のリスクアレル頻度は、各々、5.1%および4.3%であり、欧米人での報告の6分の1程度と低頻度であった。

これらの結果から、*TCF7L2* 遺伝子多型は日本人においても2型糖尿病の発症に関連するもその寄与度は欧米人に比し低いと考えられた。

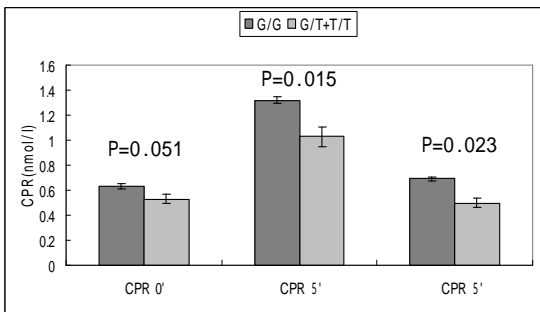
(2) *TCF7L2* 遺伝子多型とインスリン分泌障害との関連の検討

rs7903146では、リスクアレルを有する糖尿病患者では有さない者に比しグルカゴン刺激5分後の血清Cペプチド濃度および負荷前からの差(CPR5分値)が有意に低下していた(図1A)。rs12255372に関しても同様の関連を認めた(図1B)。なお、糖尿病の罹病期間、BMI、HbA1cなどインスリン分泌能と関連する他の因子に関しては2群間で差は認められなかった。

この結果から、リスクアレルを有する者ではグルカゴン刺激に対するインスリン分泌経路に何らかの障害が存在するものと考えられた。



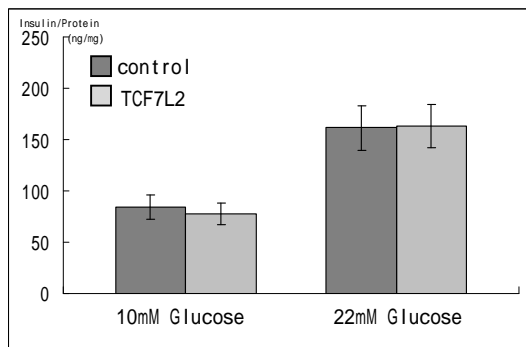
【図1A】rs7903146遺伝子型と経静脈的グルカゴン刺激による血清Cペプチド上昇反応との関係



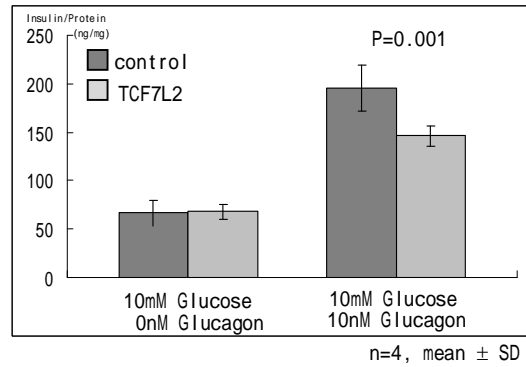
【図1B】rs12255372遺伝子型と経静脈的グルカゴン刺激による血清Cペプチド上昇反応との関係

(3) TCF7L2の過剰発現が膵細胞機能におよぼす影響の検討

MIN6細胞にTCF7L2を過剰発現させた場合、10mM、22mMグルコース刺激によるインスリン分泌には変化は認められなかった(図2A)。一方、10nMグルカゴン(10mMグルコース存在下)刺激によるインスリン分泌はTCF7L2を過剰発現させた細胞において低下していた(図2B)。



【図2A】TCF7L2の過剰発現がグルコースによるMIN6細胞からのインスリン分泌に与える影響



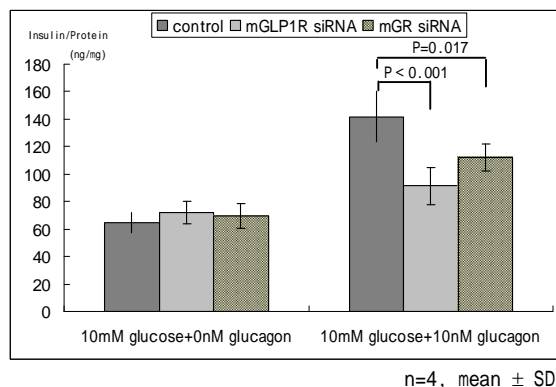
【図2B】TCF7L2の過剰発現がグルカゴンによるMIN6細胞からのインスリン分泌に与える影響

(4) グルカゴン受容体およびglucagon like peptide-1(GLP-1)受容体の発現抑制がグルカゴン刺激による膵細胞からのインスリン分泌に与える影響の検討

まず、各々のsiRNAをトランスフェクション後、細胞よりmRNAを抽出、real time PCR法にてグルカゴン受容体およびGLP-1受容体発現量を測定し、両受容体ともその発現量が20%程度まで抑制されることを確認した。

次に、10mMグルコースおよび10nMグルカゴン(10mMグルコース存在下)刺激によるインスリン分泌に対する影響を検討したところ、グルカゴン受容体の発現を抑制した場合でもGLP-1受容体の発現を抑制した場合でもいずれもグルカゴン刺激によるインスリン分泌の低下が観察された(図3)。

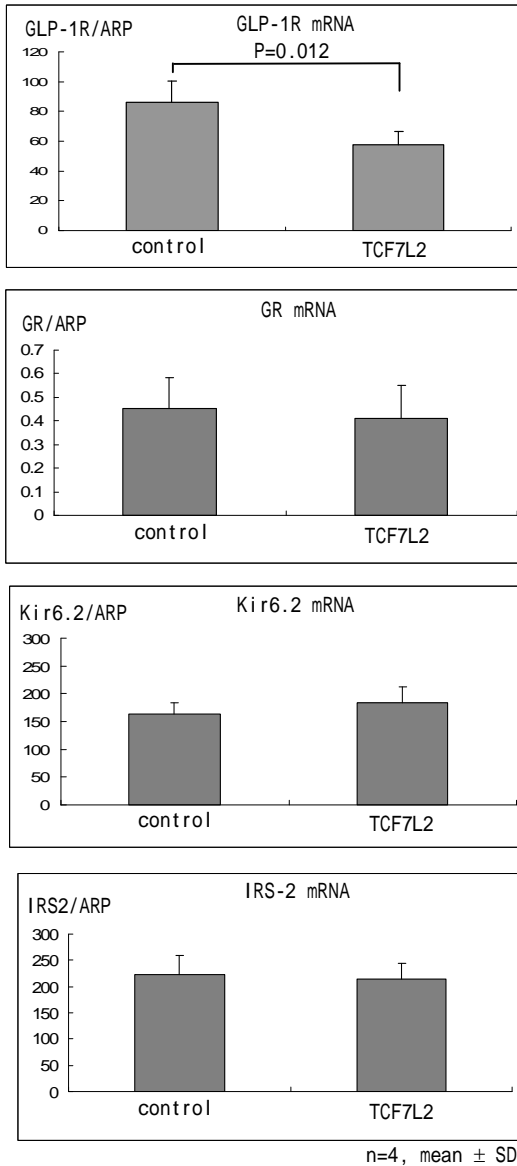
この結果から、膵細胞においてグルカゴン刺激はGLP-1受容体およびグルカゴン受容体の両方を介してインスリン分泌を刺激していると考えられた。



【図3】siRNAを用いたGLP-1受容体(GLP-1R)およびグルカゴン受容体(GR)の発現抑制がグルコースおよびグルカゴン刺激によるインスリン分泌に与える影響

(5) TCF7L2の過剰発現が膵 細胞内の種々の遺伝子の発現におよぼす影響の検討

TCF7L2をMIN6細胞に過剰発現させインスリン分泌と関連する種々の遺伝子の発現量に及ぼす影響について検討を行った。その結果、Kir6.2、IRS-2、グルカゴン受容体などの発現量には差は認められなかったが、GLP-1受容体の発現量は低下していた(図4)。



【図4】 TCF7L2の過剰発現がMIN6細胞でのGLP-1受容体(GLP-1R)、グルカゴン受容体(GR)、Kir6.2、IRS-2の発現量におよぼす影響

以上の成果から、TCF7L2は膵 細胞におけるGLP-1受容体の発現に関与しており、その多型による2型糖尿病発症リスクの増加には、食事に伴うインスリン分泌にとって重要なインクレチンホルモンであるGLP-1に対する反応性の低下が関与していると考えられた。

GLP-1製剤ならびにGLP-1分解酵素であるDPP の阻害剤は、海外ではすでに糖尿病の治療薬として一般臨床で用いられており国内でも近々使用が可能になるが、本研究の知見から、TCF7L2遺伝子多型を有する者ではこれらの薬剤に対する反応性が低下している可能性が高く、今後、さらに検討を行っていく予定である。

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)

[学会発表](計2件)

古田 浩人、シンポジウム「2型糖尿病関連遺伝子はどこまで解明されたか」、TCF7L2 遺伝子多型による2型糖尿病発症リスク増加機序の検討、第52回日本糖尿病学会年次学術集会、2009年5月22日、大阪

古田 浩人、TCF7L2 遺伝子多型による2型糖尿病発症リスク増加機序の検討、第20回分子糖尿病学シンポジウム、2008年12月13日、東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

古田 浩人 (FURUTA HIROTO)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：90238684

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし