

機関番号 : 12601

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20790640

研究課題名 (和文) 日本人特有の第 11 番染色体上にある糖尿病原因遺伝子の同定と機能解析

研究課題名 (英文) Identification and functional analysis of the gene related to diabetes mellitus in chromosome 11

研究代表者

庄嶋 伸浩 (SHOJIMA NOBUHIRO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 447393

研究成果の概要 (和文) : 2 型糖尿病は、インスリン分泌不全とインスリン抵抗性が重なって発症する。インスリン分泌不全をきたす原因遺伝子の中でも、Pdx (pancreatic duodenal homeobox) は欠損するとヒトでは MODY (maturity onset diabetes of the young) の原因遺伝子となり、Pdx 欠損マウスは膵臓を欠損する。Hipk (homeodomain interacting protein kinase) は、Pdx の転写活性を調整する因子である。今回、Hipk は、脂肪食負荷によりマウス膵島での発現が増加していた。Hipk3 欠損マウスでは、単離膵島における検討でも、グルコース応答性の刺インスリン分泌に低下を認め、膵島面積の低下を認め、膵島の PCNA 染色陽性で増殖中の細胞が低下していた。これらの結果から、本遺伝子は、膵β細胞の機能および量を調節して、インスリン分泌に関与すると考えられた。さらに、インスリン分泌を低下させる分子メカニズムを検討した。Hipk3 欠損マウスでは、GSK3β のリン酸化が抑制され、Pdx の発現が低下していた。単離膵島において siRNA で本遺伝子を抑制すると、インスリン分泌能が低下した。これらの結果から、本遺伝子は、Wnt シグナルや Pdx を介して、膵β細胞の機能および量を調節して、インスリン分泌への作用を介して糖尿病発症に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文) : Insufficient insulin secretion and reduced pancreatic  $\beta$ -cell mass are hallmarks of type 2 diabetes. HIPK (homeodomain interacting protein kinase) is reported to modulate pancreatic duodenal homeobox (PDX)-1, which plays a crucial role in both pancreas development and maintenance, transcriptional activity. However, the role of HIPK in glucose homeostasis is not clear. We characterized the role of HIPKs in regulating insulin secretion and insulin transcription activity by performing RNA interference. Moreover, we found HIPK expression in the pancreas of high-fat diet fed mice is increased. We focused on HIPK3, and analyzed *Hipk3* deficient mice which exhibited impaired glucose tolerance due to deficiency of insulin secretion under high-fat diet. The expression level of pancreatic PDX-1 was significantly decreased and GSK3 $\beta$  phosphorylation was significantly decreased in *Hipk3* deficient islets. These results suggest that decreased HIPK3 has a substantial role in the pathogenesis of 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	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：遺伝子欠損マウス 遺伝子多型

### 1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病において、原因遺伝子の網羅的な探索が進んでいるが、まだ遺伝因子の多くの部分が解明されていない。2002年に当研究室において罹患同胞対法を用いたゲノム解析により、染色体 11 番に全染色体中に最大の相関を示した領域を特定した。この結果は、独立して行われた九州大学の名和田らによる全ゲノム解析の結果と、ほぼ完全に一致をしており、この領域に、日本人の 2 型糖尿病の最も重要な原因遺伝子が存在すると考えられた。11 番染色体にある 2 型糖尿病原因遺伝子を同定し、機能解析を行うことで、糖尿病の診断と治療の飛躍的な進歩が期待できる。

### 2. 研究の目的

Hipk (homeodomain interacting protein kinase) の 2 型糖尿病発症への関与およびそのメカニズムを解明するために、遺伝子欠損マウスの表現系解析や、ヒトのハプロタイプ標識 SNP の解析、ヒト脂肪細胞を用いた発現解析などを行いたい。

### 3. 研究の方法

#### (1) 遺伝子欠損マウスを用いて機能解析を個体レベルで行う

候補遺伝子の遺伝子欠損マウスは、8 週間の脂肪をカロリー比で 32%含む餌を摂取することにより、インスリン分泌不善を伴った耐糖能の異常を示す。膵島面積、膵島のインスリン含量、膵臓の脂肪含量について検討する。また単離膵島における、グルコース応答性などの刺激によるインスリン分泌について経時的に検討する。また、遺伝子欠損マウスは、脂肪重量が約 50%と有意な減少があり、脂肪細胞のサイズやアディポサイトカインの血中濃度や脂肪組織での発現について解析する。

#### (2) 遺伝子欠損マウスの各臓器別に DNA チップによる発現プロファイリングを行う

膵島の全 mRNA の遺伝子変化を Affymetrix 社の Gene Chip 解析を行うことにより、インスリン分泌を低下させる分子メカニズムを解明する (J Clin Invest 117:246, 2007)。さらに膵島での特異抗体を用いた免疫染色や、in vitro における siRNA を用いた遺伝子発現抑制法を用いることで、遺伝子発現の変化について解析する。

#### (3) 11 番染色体のハプロタイプ標識 SNP 解

#### 析および表現型 (臨床情報) との相関解析

11 番染色体に含まれるハプロタイプ標識 SNP について、当施設のサンプルを理化学研究所に持ち込み、SNP タイピングを行う。SNP と身長、体重、BMI、血糖値、血糖コントロール (HbA1c)、脂質、アディポカインとの相関を解析する。

(4) 当病院におけるヒト脂肪細胞バンクを活用し、発現量と SNP との関連を調べる  
東京大学医学部附属病院の糖尿病・代謝内科では、形成外科と共同で、手術の際の約 50 人分の脂肪組織の DNA と mRNA が抽出されている。mRNA 発現量と SNP の関連について解析を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 遺伝子欠損マウスを用いた個体レベルでの機能解析

Hipk3 の遺伝子欠損マウスは、脂肪をカロリー比で 32%含む餌を 8 週間摂取することにより、インスリン分泌不全を伴った耐糖能の異常を認めた。また単離膵島における検討でも、グルコース応答性の刺インスリン分泌に低下を認めた。さらに、膵島面積の 24%の低下を認め、膵島の PCNA 染色陽性で増殖中の細胞は 36%低下していた。これらの結果から、本遺伝子は、膵β細胞の機能および量を調節して、インスリン分泌を促進すると考えられた。また、本遺伝子欠損マウスでは、脂肪重量が減少し脂肪細胞が小型化しており、TNFα の発現が低下しており、インスリン感受性に関与している可能性が示唆された。

#### (2) 遺伝子欠損マウスの膵島の DNA チップによる遺伝子の検討

膵島の mRNA の発現変化を Affymetrix 社の Gene Chip での網羅的解析により、インスリン分泌を低下させる分子メカニズムを検討した。パスウェイ解析で、Wnt シグナルの減弱が認められた。蛋白量でも、GSK3β のリン酸化が 25%抑制され、Pdx の発現が低下していた。単離膵島において siRNA で本遺伝子を抑制すると、増殖能が低下した。これらの結果から、本遺伝子は、Wnt シグナルを活性化することで、膵β細胞の機能および量を調節すると考えられた。

#### (3) ヒト脂肪組織における発現量と SNP との関連の検討

形成外科手術の際の皮下脂肪組織 72 人において、本遺伝子の mRNA 発現を検討した。本遺伝子のエクソン 1 にある一塩基多型 SNP 19 の CC アレルを持つと、AA アレルに比較して、

糖尿病になりやすく、本遺伝子の発現が有意に低下していた。ヒトにおける本遺伝子遺伝子多型に伴う発現量の低下が、糖尿病の発症に関与していると考えられた。マウス臍島における機能解析の結果と一致して、ヒトにおいてもインスリン分泌低下を介して糖尿病発症に関与する可能性が示唆された。

この酵素の機能解析やヒト臍臓での発現をみることで、分泌不全型中心の日本人の病態が解明できるという結果が予想される。この原因遺伝子を糖尿病の発症予測に用い、この遺伝子を標的とした治療の開発を進めて、特に日本人の健康を、大きく増進するという意義がある。

#### 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)

[雑誌論文] (計7件)

1. Yamauchi T, Hara K, Maeda S, Yasuda K, Takahashi A, Horikoshi M, Nakamura M, Fujita H, Grarup N, Cauchi S, Ng DP, Ma RC, 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 JC, Park KS, Tai ES, Ito C, Tanaka Y, Kashiwagi A, Kawamori R, Kasuga M, Froguel 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-C2CD4B. *Nat Genet.* 42:864-869, 2010 (査読あり)
2. 庄嶋伸浩 原一雄 門脇孝 「MetSの遺伝子診断」*Heart View* Vol 14 No 3 : 300-304, 2010 (査読なし)
3. 庄嶋伸浩 堀越桃子 原一雄 門脇孝 「スルホニル尿素の二次無効」*医薬ジャーナル* Vol 46 No 10: 186-189, 2010 (査読なし)
4. 庄嶋伸浩 原一雄 門脇孝 「メタボリック症候群-最近の話題」*皮膚病診療* Vol 32 No 10 : 1052-1057, 2010 (査読なし)

5. 門脇孝、大杉満、原一雄、窪田直人、大須賀淳一、植木浩二郎、塚本和久、羽田裕亮、藤城緑、迫田秀之、堀越桃子、山内敏正、庄嶋伸浩、大橋健：糖尿病学。*日本医事新報* 4434号 43-55, 2009. 04 (査読なし)

6. 庄嶋伸浩, 原一雄, 門脇孝: 虚血性心疾患・治療と管理/虚血性心疾患の再発防止と長期予後の改善をめざした最新の実地診療と管理のすすめかた- 糖尿病の管理の実際。 *Medical Practice* 26 巻 2 号 : 239-245, 2009. 02 (査読なし)

7. Horikoshi M, Hara K, Ito C, Shojima N, Nagai R, Ueki K, Froguel P, Kadowaki T: Variations in the HHEX gene are associated with increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetologia* 50: 2461-2466, 2007 (査読あり)

[学会発表] (計13件)

#### 第54回日本糖尿病学会年次学術集会 (2011年5月 札幌)

1. 原一雄、藤田速人、庄嶋伸浩、堀越桃子、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型糖尿病感受性遺伝子同定の試み」

#### 第84回日本内分泌学会学術総会 (2011年4月 神戸)

2. 庄嶋伸浩、原一雄、堀越桃子、高橋倫子、岡畑純江、藤田逸人、大杉満、野田光彦、窪田直人、油谷浩幸、山内敏正、植木浩二郎、門脇孝：「HIPK3 (homeodomain interacting kinase 3) のインスリン分泌への影響」

#### FASEB Summer Research Conferences (Kyoto, 2010. 10)

3. Kazuo Hara, Momoko Horikoshi, Nobuhiro Shojima, Sumie Okahata, Hayato Fujita and Takashi Kadowaki : A Polymorphism in the AMPK2 Subunit Gene Is Associated With Insulin Resistance and Type 2 Diabetes in the Japanese Population.

#### International Congress of Endocrinology (Kobe, 2010. 03)

4. Okahata S, Hara K, Horikoshi M, Shojima N, Yamauchi T, Ueki K, Kadowaki T  
Effect of Candesartan on high molecular weight adiponectin (HMW-Ad) and resistin in Japanese diabetic patients with hypertension (randomized controlled trial) 14th

**第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2009 年 5 月 大阪)**

5. 堀越桃子、原一雄、庄嶋伸造、伊藤千賀子、前田士郎、門脇孝：「2 型糖尿病感受性領域 15q13-q21 における 2 型糖尿病感受性遺伝子の探索

**第 9 回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会 (2009 年 2 月 東京)**

6. 高本偉碩、羽田裕亮、金子和真、中村正裕、堀越桃子、庄嶋伸造、大橋健、大須賀淳一、塚本和久、植木浩二郎、門脇孝：「肥満歴を有し GAD 抗体が陽性の緩徐進行型 1 型糖尿病 (SPT1DM) の 2 症例 -GAD 抗体価に応じた治療法の選択に関する考察-

**第 46 回日本糖尿病学会関東甲信越地方会 (2009 年 1 月 横浜)**

7. 勝山修行、塚本和久、羽田裕亮、堀越桃子、庄嶋伸造、藤城緑、大杉満、原一雄、大橋健、植木浩二郎、門脇孝：「Baker's cyst 破裂により蜂窩織炎様症状を呈した 2 型糖尿病の 1 例」

**第 554 回日本内科学会関東地方会例会 (2008 年 6 月 東京)**

8. 脇裕典、根本充、藤城緑、藏野信、大橋健、庄嶋伸造、大須賀淳一、塚本和久、植木浩二郎、門脇孝：「インスリンによるアナフィラキシーとボグリボース (ベイスン®) による好中球減少症を合併した 2 型糖尿病の 1 例」

**Genomic Disorders 2008 (London, UK. 2008 .03)**

9. Momoko Horikoshi, Kazuo Hara, Chikako Ito, Nobuhiro Shojima, Kohjiro Ueki, Ryoza Nagai, Philippe Froguel, and Takashi Kadowaki: The influence of polymorphisms in Japanese type 2 diabetes genes on insulin secretion. Wellcome Trust Conference Centre, Cambridge (Poster-presentation)

**第 8 回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会 (2008 年 2 月 茨城)**

10. 三松貴子、原一雄、勝山修行、西真貴子、藏野信、根本充、堀越桃子、大杉満、藤城緑、原真純、迫田秀之、庄嶋伸造、大橋健、大須賀淳一、塚本和久、植木浩二郎、門脇孝：「左臀部ガス壊疽でドレナージ術後に意識障害が発症し、原因としてヨード中毒が疑われた一例」

**68th Scientific Sessions of the American Diabetes Association (San Francisco, USA. 2008. 01)**

11. Momoko Horikoshi, Kazuo Hara, Nobuhiro Shojima, Chikako Ito, and Takashi Kadowaki: Variations in the TCF7L2 and HHEX genes independently confer Type 2 Diabetes Susceptibility on Japanese Population. (Poster-presentation)

**First Meeting of EASD Study Group of Genetics of Diabetes (EASD-SGGD) (Malaga, Spain. 2007. 10)**

12. Momoko Horikoshi, Kazuo Hara, Chikako Ito, Nobuhiro Shojima, Kohjiro Ueki, Ryoza Nagai, Philippe Froguel, Takashi Kadowaki: Variations in the HHEX gene are associated with increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. (Poster-presentation)

**第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2007 年 5 月 仙台)**

13. 原一雄、堀越桃子、庄嶋伸造、岡畑純江、永井良三、門脇孝：「TCF7L2 遺伝子は日本人において 2 型糖尿病感受性遺伝子である」

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

庄嶋 伸浩 (SHOJIMA NOBUHIRO)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：447393

### (2) 研究分担者

( なし )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：