

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24年3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591141

研究課題名（和文） レジスチン遺伝子を標的としたインスリン抵抗性エピジェネティクスモデルの体系的確立

研究課題名（英文） Epigenetic models of insulin resistance targeting the human resistin gene

研究代表者

大澤 春彦 (OSAWA HARUHIKO)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90294800

研究成果の概要（和文）：

レジスチンは、2型糖尿病の成因であるインスリン抵抗性を引き起こす。本研究では、レジスチンの遺伝子発現に影響する遺伝子・環境因子を解析した。一般住民約2000名において、血中レジスチンは、一塩基多型(SNP)-420がGであっても、SNP-358がGの場合には低く、SNP-358がAの場合にのみ高かった。また、プロモーター活性の解析では、SNP-420のGとSNP-358のAの組み合わせで最も高かった。以上より、SNP-420のGが血中レジスチンを高めるためには、SNP-358のAが必要であった。

研究成果の概要（英文）：

Resistin causes insulin resistance, a feature of type 2 diabetes. We analyzed genetic and environmental factors affecting resistin gene expression. In ~2000 subjects in the Japanese general population, plasma resistin was low with G at single nucleotide polymorphism (SNP)-420 and G at SNP-358, but highest with G at SNP-420 and A at SNP-358. This combination of these SNPs also showed the highest promoter activity. Therefore, A at SNP-358 is required for G at SNP-420 to confer the highest plasma resistin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：レジスチン、インスリン抵抗性、SNP、エピジェネティクス、遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病は、インスリン抵抗性やインスリン分泌不全に関わる遺伝子に、肥満、運動不足といった環境因子が作用して発症すると考えられている。従って、その発症予防やオ

ーダーメイド医療の確立には、原因遺伝子の同定に加え、遺伝子・環境因子相互作用の解明が鍵である。

マウスにおいて、レジスチンは、主として脂肪細胞から分泌され、インスリン作用に拮

抗するサイトカインである (*Nature* 409: 307, 2001)。実際、レジスチンの過剰発現はインスリン抵抗性を引き起こす。また、ノックアウトは空腹時血糖を低下させる (*Science* 303:1195, 2004)。一方、ヒトでは、レジスチンの主たる発現部位は単球・マクロファージである。さらに、炎症を惹起する細菌のエンドトキシンは、レジスチンの発現を増強する。また、欧米化した食事などの環境因子は腸内細菌叢を変化させる。すなわち、ヒトにおいて、レジスチンは、環境因子、炎症、インスリン抵抗性をリンクする鍵分子である。

申請者らは、世界に先駆けて、レジスチン遺伝子の転写調節領域の一塩基多型 (SNP) が、ヒト 2 型糖尿病の原因遺伝子であることを見出した (*Am J Hum Genet* 75: 678, 2004)。すなわち、SNP-420 の遺伝子型が G/G の場合、2 型糖尿病発症リスクが約 2 倍に高まった。その機序として、SNP-420 が G の場合にのみ転写因子 Sp1/3 が特異的に DNA エlement に結合し、転写活性及び血中濃度を高めることを見出した。さらに、レジスチンの単球 mRNA 量と血中濃度は正に関連し、いずれも SNP-420 の G が多い型ほど高く、C/C<C/G<G/G の順であることを示した (*BBRC* 335: 596, 2005)。

一般住民 2078 名の解析でも、血中レジスチンは C/C<C/G<G/G 型の順に高かった (*Diabetes Care* 30: 1501, 2007)。統計解析の結果、血中レジスチンの全変動の 26% は SNP-420 の遺伝子型により説明され、血中レジスチンは、同 SNP により強く規定されていた。一方、G/G 型の人々の血中レジスチンは C/C 型に比べて広範囲に分布した。すなわち、血中レジスチンは SNP-420 以外の遺伝子・環境因子によっても制御されていると考えられた。さらに、血中レジスチンは、インスリン抵抗性指数 (HOMA-IR) と正に関連した。

エピジェネティクスとは、DNA の塩基配列の変化を伴わずに、細胞分裂の際に記憶として子孫や娘細胞に伝達される遺伝子機能の変化をさす。そのメカニズムは、メチル化などの DNA の修飾にある。最近、環境因子が DNA を修飾することが明らかになってきている。実際、同一の遺伝子を有する雌の蜂は、ロイヤルゼリーを摂取すると女王蜂になり、摂取しないと働き蜂になる。DNA のメチル化を抑制すると、ロイヤルゼリーと同様に女王蜂となる (*Science* 319: 1827, 2008)。すな

わち、環境因子は、DNA のメチル化を介して遺伝子発現に影響し、表現型を変化させる。また、メチル化は DNA の CG 配列の C に起こるので、一塩基多型 (SNP) によっても変化する。

2. 研究の目的

レジスチンは、環境因子、炎症、インスリン抵抗性をリンクする鍵分子である。環境因子によるレジスチン遺伝子発現と DNA 修飾のメカニズムを明らかにすれば、インスリン抵抗性を改善し、2 型糖尿病、メタボリックシンドローム、動脈硬化を統合的に予防できるはずである。

そこで本研究では、レジスチン遺伝子発現と DNA 修飾を制御する遺伝子・環境因子を体系的に同定する。ヒトの単球培養細胞を用いた *in vitro* 解析、SNP-420 と単離単球を用いたヒトの *in vivo* 解析、一般住民多数例の遺伝疫学的解析により、レジスチン遺伝子発現と DNA 修飾に影響する遺伝子・環境因子を体系的に同定し、エピジェネティクスを含めたインスリン抵抗性の統合的発症予防戦略を見出す。

3. 研究の方法

本研究では、レジスチンを標的として、その遺伝子発現と DNA 修飾に影響する因子 (遺伝子・環境因子) を体系的に同定する。第一に、ヒト単球培養細胞を用いて、*in vitro* においてレジスチンのプロモーター活性、mRNA、DNA 修飾 (DNA メチル化とヒストン修飾) に影響する因子を同定する。第二に、ヒト *in vivo* において、レジスチンの単球 mRNA 及び血中濃度と DNA 修飾との関連について、SNP を含めて解析する。第三に、一般住民多数例の遺伝疫学的解析により、レジスチン遺伝子発現・DNA 修飾に影響する環境因子及び SNP と血中レジスチン濃度との関連を解析する。こうして、レジスチン遺伝子発現と DNA 修飾に影響する遺伝子・環境因子を体系的に同定する。

4. 研究成果

一般住民 2019 名を対象に、レジスチン遺伝子周囲の SNP と血中濃度の関係を検討した。血中レジスチンは、我々が従来より報告して

いる SNP-420 に加え、SNP-638、SNP-537、SNP-358、SNP+299、SNP+1263 のそれぞれと関連した。このうち、血中レジスチンと SNP との関連は、SNP-420、SNP-358、及び SNP-638 が最も強かった。さらに、これらの 3 つの SNP は、同一の連鎖不平衡(LD)ブロックに存在し、遺伝的に互いに強く関連していた。特に、SNP-638 と SNP-358 は、ほぼ完全な連鎖不平衡にあり、ほぼ一致した組み合わせで遺伝すると考えられた。一方、Asano らは、日本人において、血中レジスチンと最も関連するのは、SNP-638 であることを報告した。

SNP-358 と SNP-638 の機能を、ゲルシフトアッセイにより *in vitro* で解析した結果、SNP-358 においてのみ、転写因子がアレル特異的に結合した。そこで、SNP-420 と SNP-358 について遺伝疫学的に解析した結果、SNP-420 の G が血中レジスチンを高めるためには、SNP-358 の A が必要であった。さらに、SNP-420 と SNP-358 の組み合わせによるレジスチンプロモーター活性の違いをルシフェラーゼアッセイにより解析した。その結果、SNP-420 の G と SNP-358 の A の組み合わせにおいて最もプロモーター活性が高く、遺伝疫学のデータと一致した。

一方、環境因子の影響により変化する可能性のある DNA メチル化をパイロシーケンス法により解析した。レジスチン遺伝子転写調節領域の複数の CpG 配列のシトシンメチル化率は、部位間、個人間でその程度に差を認めた。

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 6 件)

全て査読あり

1. 大沼 裕, 大澤春彦 ヒトにおけるレジスチンの意義. *実験医学* 29: 715-721, 2011.

2. 大澤春彦. 生活習慣病における遺伝因子-2型糖尿病を中心に- 日本体質医学会雑誌 73: 41-46, 2011.

3. Osawa, H., Tabara, Y., Ohashi, J., Kawamura, R., Onuma, H., and Makino, H. Is rs34861192 or rs1862513 a more promising variant for determining plasma resistin in an aged Japanese population? *Diabetologia* 53:795-797, 2010.

4. Onuma, H., Tabara, Y., Kawamura, R., Tanaka, T., Ohashi, J., Nishida, W., Takata, Y., Ochi, M., Yamada, K., Kawamoto, R., Kohara, K., Miki, T., Makino, H., and Osawa, H. A at single nucleotide polymorphism-358 is required for G at -420 to confer the highest plasma resistin in the general Japanese population.

PLoS ONE 5: e9718, 2010.

5. 大沼 裕, 大澤春彦. レジスチンの臨床的意義. *Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌*: 138-144, 2010.

6. 大沼 裕, 大澤春彦. レジスチン. *日本臨床* 68 (増刊号 2) 肥満症: 100-104, 2010.

[学会発表] (計 3 件)

1. 大沼 裕, 田原康玄, 西田 互, 高田康徳, 大澤春彦 他. 血中レジスチンはレジスチン遺伝子の SNP-420、SNP-358 により強く規定される一方、2 型糖尿病感受性遺伝子のトランス作用によっても影響される. 第 61 回日本体質医学会総会 2011 年 10 月 8-9 日、東京.

2. 大澤春彦. 生活習慣病における遺伝因子-2型糖尿病を中心に- 第 60 回日本体質医学会総会 2010 年 10 月 16-17 日、熊本.

3. Hiroshi Onuma, Haruhiko Osawa et al. Relevance of resistin in human insulin resistance. The 2nd Insulin resistance in metabolic disease forum October 31, 2009, Tokyo, Japan.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/clab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大澤 春彦 (OSAWA HARUHIKO)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90294800

(2) 研究分担者

大沼 裕 (ONUMA HIROSHI)
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00294794

西田 亙 (NISHIDA WATARU)
愛媛大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：80271089

高田 康德 (TAKATA YASUNORI)
愛媛大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20432792

田原 康玄 (TABARA YASUHARU)
愛媛大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：00268749

(3) 連携研究者 なし