

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390146

研究課題名(和文) 糖尿病の一塩基多型の解析と新たなインスリン分泌調節機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of single nucleotide polymorphism in diabetes and novel mechanism for insulin secretion

研究代表者

村上 正巳 (Murakami, Masami)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30241871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,900,000円、(間接経費) 3,570,000円

研究成果の概要(和文)：我々の研究により、細胞内局所で甲状腺ホルモンのT4をT3に変換して活性化する2型甲状腺ホルモン脱ヨード酵素(D2)の遺伝子(DI02)のThr92AlaのSNPがインスリン分泌能の低下に関与し、DI02のSNPを有すると運動による耐糖能改善効果が得られにくくなるという成績が得られた。膵細胞における甲状腺ホルモン代謝を解析する目的でMIN-6細胞を用いて検討したところ、D2に加えてT4をrT3に、T3をT2に不活化する3型甲状腺ホルモン脱ヨード酵素(D3)が発現し、GLP-1によりインスリン分泌とともにその発現が増加することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Single nucleotide polymorphism (SNP) in type 2 iodothyronine deiodinase (D2) was found to be related to the impairment of insulin secretion and exercise induced improvement of glucose tolerance. We have identified type 2 and type 3 iodothyronine deiodinase (D2, D3) in a mouse insulinoma cell line (MIN-6). D2 activates thyroid hormone by catalyzing conversion of T4 to T3, and D3 inactivates thyroid hormone by catalyzing conversion of T4 to rT3, and T3 to T2. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) stimulates D3 and D2 in MIN-6 cells. These results suggest GLP-1 regulated thyroid hormone metabolism is involved in the regulation of insulin secretion in pancreatic beta cells, which may be related to the pathophysiology of diabetes mellitus.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：糖尿病 遺伝子 一塩基多型 インスリン 甲状腺ホルモン

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の治療においてインクレチン関連薬が注目を集めている。インクレチンは消化管から分泌され、膵β細胞膜に存在する受容体にはたらき細胞内 cAMP の増加を介してインスリン分泌を血糖依存性に増幅するものであり、GLP-1 と GIP が知られている。インクレチン関連薬には GLP-1 受容体作動薬と DPP-4 阻害薬があり、血糖依存性にインスリン分泌を増幅する薬剤であり、低血糖の副作用がなく安全に使用できることから現在広く使用されている。日本人においては、欧米人と異なり糖尿病の病態にインスリン分泌能の低下が深く関与していることが明らかとなっており、今後の我が国の糖尿病治療において主要な選択肢として位置づけられるものと思われる。さらに、インクレチンには膵細胞数の増加や膵細胞の機能の維持や保護にもつなげる可能性が指摘されているが、その機序の詳細は不明な点が多い。

我々は、これまで群馬大学教育学部保健体育学教室と共同で群馬大学の地域貢献事業として地域住民の健診を行い、400 例以上の対象者に 75 g 経口糖負荷試験を実施してきた。この検査結果からインスリン分泌能ならびにインスリン抵抗性を解析し、エネルギー代謝に関わる遺伝子の一塩基多型 (SNP) との関連について理化学研究所で開発された新規迅速遺伝子解析法である SmartAmp 法を用いて検討を行ってきた。その過程において、細胞内局所で甲状腺ホルモンの T4 を T3 に変換して活性化する 2 型甲状腺ホルモン脱ヨード酵素 (D2) の遺伝子 (*D102*) の Thr92Ala の SNP がインスリン分泌能の低下に強く関連していることが明らかとなった。我々は D2 が骨格筋や褐色脂肪組織に発現していることを見出したが、近年は脂肪酸による TGR5 を解するエネルギー代謝に D2 が重要な役割を果たしていることが報告され、これまでは専らインスリン抵抗性と D2 の関連について研究が進められてきた。それに対し、今回の我々の解析結果はインスリン分泌調節における D2 の役割の可能性を示唆するという全く新たな視点を提供するものである。

我々は、これらの解析結果から、膵ラ氏島のβ細胞に D2 が発現している全く新たな可能性を推測した。膵β細胞における D2 の発現の可能性について培養マウス膵β細胞を用いて検討したところ、驚くべきことに T4 から T3 に変換する D2 の酵素活性と D2 mRNA の強い発現を認めた。今後、D2 による T3 の産生の

インスリン分泌調節における新たな役割の解明が期待される。

2. 研究の目的

我々は、地域住民を対象とした健診でエネルギー代謝に関連する遺伝子の一塩基多型 (SNP) を新規迅速遺伝子解析技術により解析する中で、甲状腺ホルモン活性化酵素の SNP がインスリン分泌能低下に関連することを見出した。我々は、本酵素が骨格筋や褐色脂肪組織に発現していることを明らかにしてきたが、その SNP がインスリン分泌能低下に関連していたことから膵β細胞への発現について検討したところ、本酵素が培養膵β細胞に発現していることが明らかとなった。本研究においては、培養細胞および実験動物を用いてインスリン分泌調節における甲状腺ホルモン代謝酵素の役割を検討し、甲状腺ホルモンに応答する遺伝子を探索する。糖尿病症例についてインスリン分泌能に関連する新たな遺伝子の SNP を解析し、糖尿病の個別化医療の実現を目指す。

3. 研究の方法

(1) SmartAmp 法による *D102* の SNP の解析

SmartAmp 法は、理化学研究所ゲノム科学総合研究センターで開発され、目標とする遺伝子多型を、核酸抽出の手順を踏むことなく、血液などの臨床サンプルから直接に 30 分という短時間で検出することができる個別化医療実現の一助となる画期的な方法である。血液と試薬を混合するのみの簡便な操作しか必要とせず、感度と特異度が高く、迅速、簡便、低コストで正確に SNP を診断できる検査法である。これまでの *D102* の Thr92Ala の SNP の SmartAmp 法による検討では、野生型のホモが 40%、ヘテロが 45%、変異型のホモが 15%という割合であり、正確で安定した結果が得られている。*D102* の SNP の SmartAmp 法のキットを用いて、さらに多数例の地域住民の健診受診者と糖尿病症例について検討し、臨床経過、病態、インスリン分泌能について解析し、*D102* の SNP との関連について検討する。さらに、健診受診者に運動処方を行い、運動の耐糖能に及ぼす効果と *D102* の SNP との関連について検討する。

(2) 培養膵細胞における甲状腺ホルモン代謝酵素の発現とその調節機構ならびに役割の解明

我々の保有する培養マウス膵β細胞 (MIN-6) を用いて、高速液体クロマトグラフィー

(HPLC)により甲状腺ホルモンの代謝を解析する。D2をはじめとする甲状腺ホルモン脱ヨード酵素活性と mRNA の発現を検討し、その発現調節機構を細胞レベルで解析する。本研究において、膵β細胞に作用することが知られている GLP-1をはじめとする糖尿病治療薬による甲状腺ホルモン脱ヨード酵素活性ならびに mRNA の変化の有無を検討し、膵β細胞における発現調節機構を明らかにする。また、D2 のインヒビターである iopanoic acid ならびに siRNA を用いて D2 の酵素活性を阻害し、GLP-1 をはじめとする糖尿病治療薬によるインスリン分泌をはじめとする膵β細胞機能の調節における D2 の活性阻害による影響を検討し、膵β細胞機能調節における D2 の役割を解明する。

(3) ノックアウトマウスを用いた膵細胞機能の調節における D2 の役割の解明

膵細胞における D2 の生理的役割を個体レベルで解析することを目的として、D2 ノックアウトマウスを用いて野生型マウスと比較検討する。各発生段階における野生型マウスと D2 ノックアウトマウスの膵ラ氏島の形態の差異について検討する。野生型マウスと D2 ノックアウトマウスのそれぞれに対して糖負荷ならびに GLP-1 受容体作動薬をはじめとする薬物の投与を行い、血糖ならびにインスリン分泌に及ぼす影響を検討し、D2 のインスリン分泌をはじめとする膵β細胞機能における役割を解明する。さらに、野生型マウスとノックアウトマウスから膵ラ氏島を単離し、我々が行っている膵ラ氏島灌流システムにより糖負荷に対するインスリン分泌能のパターンを比較解析し、インスリン分泌能における D2 の役割を詳細に検討する。

4. 研究成果

(1) 膵β細胞における D2 の発現の制御

膵ラ氏島の細胞に D2 が発現している可能性を推測し、培養マウス膵細胞を用いて検討したところ、D2 の酵素活性と D2 mRNA の発現を認めた。さらに、インクレチンである GLP-1 を添加したところ、培養膵細胞からのインスリン分泌の増加とともに、D2 の酵素活性と D2 mRNA が増加することが示され、この刺激には細胞内の cAMP が関与することが明らかとなった。これらの成績は、膵細胞内において D2 によって T4 から T3 への変換という甲状腺ホルモンの活性化が GLP-1 受容体-cAMP 系を介して制御されている可能性を示唆しているものと考えられる。

(2) 運動による耐糖能改善効果における D2 の SNP の意義

対象者に運動処方を行い、長期間の習慣的な運動の前後で耐糖能を比較し、D102 の SNP の有無と運動による耐糖能改善効果の関連について検討した結果、D102 の SNP を有すると運動による耐糖能改善効果が得られにくくなるという成績が得られ、D102 の SNP が耐糖能の変化に関与する可能性が示唆された。

(3) 膵β細胞における甲状腺ホルモン代謝の解析

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による膵細胞における T4 の代謝に関する解析を行ったところ、T4 を不活性型の rT3 に、活性型の T3 を不活性型の T2 に変換する甲状腺ホルモン脱ヨード酵素が発現していることが明らかとなり、解析の結果甲状腺ホルモンを不活化する 3 型甲状腺ホルモン脱ヨード酵素 (D3) であることが明らかとなった。

(4) 膵細胞における 3 型甲状腺ホルモン脱ヨード酵素の発現調節機構

培養膵細胞に 3 型甲状腺ホルモン脱ヨード酵素 (D3) 活性とその mRNA の発現が認められた。D3 の発現は、GLP-1 ならびに GLP-1 受容体作動薬によって刺激されることが明らかとなり、GLP-1 受容体-cAMP 系によって D3 の発現が調節され、甲状腺ホルモンの不活化が制御されている可能性が示唆された。

(5) D2 ノックアウトマウスを用いた解析

D2 ノックアウトマウスを用いて、各臓器における甲状腺ホルモン代謝の解析を行うと同時に、野生型マウスとの遺伝子発現の差異について検討を行った。

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 33 件)

Tsunekawa K, Yanagawa Y, Aoki T, Morimura T, Araki O, Kimura T, Ogiwara T, Kotajima N, Yanagawa M, Murakami M. Frequency and clinical implication of the R450H mutation in the thyrotropin receptor gene in the Japanese population detected by Smart Amplification Process 2. Biomed Res Int 査読有 2014;2014:964635.

DOI:10.1155/2014/964635.Epub 2014 May 5.

Cacciagiú L, González Al, Elbert A, De' mawrziani G, Machida T, Murakami M, López Gl, Wikinski R, Nakajima K, Schreier L. Do insulin resistance conditions further impair the lipid and inflammatory profile in end-stage renal disease patients on hemodialysis? *Metab Syndr Relat Disord* 査読有 2014 Mar 6.

DOI:10.1089/met.2013.0124

Miida T, Nishimura K, Okamura T, Hirayama S, Ohmura H, Yoshida H, Miyashita Y, Ai M, Tanaka A, Sumino H, Murakami M, Inoue I, Kayamori Y, Nakamura M, Nobori T, Miyazawa Y, Teramoto T, Yokoyama S. Validation of homogeneous assays for HDL-cholesterol using fresh samples from healthy and diseased subjects. *Atherosclerosis* 査読有 233:252-259, 2014

DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2013.12.033

Syamsunarno MR, Iso T, Hanaoka H, Yamaguchi A, Obokata M, Koitabashi N, Goto K, Hishiki T, Nagahata Y, Matsui H, Sano M, Kobayashi M, Kikuchi O, Sasaki T, Maeda K, Murakami M, Kitamura T, Suematsu M, Tsushima Y, Endo K, Hotamisligil GS, Kurabayashi M. A critical role of fatty acid binding protein 4 and 5 (FABP4/5) in the systemic response to fasting. *PLoS One* 査読有 14;8:e79386, 2013

DOI:10.1371/journal.pone.0079386.eCollection2013

Miyashita K, Kobayashi J, Imamura S, Kinoshita N, Stanhope KL, Havel PJ, Nakajima K, Machida T, Sumino H, Nara M, Murakami M. A new enzyme-linked immunosorbent assay system for human hepatic triglyceride lipase. *Clin Chim Acta* 査読有 424:201-206, 2013

DOI:10.1016/j.cca.2013.06.016

Ogiwara T, Araki O, Morimura T, Tsunekawa K, Mori M, Murakami M. A novel mechanism for the inhibition of type 2 iodothyronine deiodinase by tumor necrosis factor α : involvement of proteasomal degradation. *Endocr J*

査読有 60:1035-1045, 2013

DOI:10.1507/endocrj.EJ11-0144

Sawano E, Negishi T, Aoki T, Murakami M, Tashiro T. Alterations in local thyroid hormone signaling in the hippocampus of the SAMP8 mouse at younger ages: association with delayed myelination and behavioral abnormalities. *J Neurosci Res* 査読有 91:382-392, 2013

DOI:10.1002/jnr.23161

Miida T, Nishimura K, Okamura T, Hirayama S, Ohmura H, Yoshida H, Miyashita Y, Ai M, Tanaka A, Sumino H, Murakami M, Inoue I, Kayamori Y, Nakamura M, Nobori T, Miyazawa Y, Teramoto T, Yokoyama S. A multicenter study on the precision and accuracy of homogeneous assays for LDL-cholesterol: comparison with a beta-quantification method using fresh serum obtained from non-diseased and diseased subjects. *Atherosclerosis* 査読有 225:208-215, 2012

DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2012.08.022

Nakajima K, Nakano T, Tokita Y, Nagamine T, Yatsuzuka SI, Shimomura Y, Tanaka A, Sumino H, Nara M, Machida T, Murakami M. The characteristics of remnant lipoproteins in the fasting and postprandial plasma. *Clin Chim Acta* 査読有 413:1077-1086, 2012

DOI:10.1016/j.cca.2012.02.026

Takahashi K, Murakami M, Kikuchi H, Oshima Y, Kubohara Y. Derivatives of *Dictyostelium*

differentiation-inducing factors promote mitogen-activated IL-2 production via AP-1 in Jurkat cells. *Life Sci* 査読有 88:480-485, 2011.

DOI:10.1016/j.lfs.2011.01.004

Tsunekawa K, Yanagawa Y, Aoki T, Morimura T, Araki O, Ogiwara T, Kawai Y, Mitani Y, Lezhava A, Yanagawa M, Hayashizaki Y, Murakami M. Association between accumulation of visceral fat and the combination of α 3 adrenergic receptor Trp64Arg, α 2 adrenergic receptor Arg16Gly and uncoupling protein 1 -3826A>G polymorphisms

detected by Smart Amplification
Process 2. Endocr J 査読有
58:1079-1086, 2011.
DOI:10.1507/endocrj.EJ11-0148

[学会発表](計 153 件)

村上正巳、内分泌代謝疾患の検査結果のみかた、第23回臨床内分泌代謝 Update、2014年1月23日~25日、名古屋

Araki O, Nakahara R, Ujiie K, Tsunekawa K, Aoki T, Morimura T, Kimura T, Nara M, Sumino H, Ogiwara T, Murakami M. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors improve glycaemic control in latent autoimmune diabetes in adults (LADA) patients insufficiently controlled despite insulin therapy. 第49回欧州糖尿病学会、2013年9月23日~27日、バルセロナ

秋山滋男、荻原貴之、青木智之、荒木修、村上正巳、膵細胞における3型甲状腺ホルモン脱ヨード酵素の発現とその調節機構、第56回日本甲状腺学会学術集会、2013年11月14日~16日、和歌山

青木智之、常川勝彦、森村匡志、荒木修、奈良誠人、荻原貴之、木村孝穂、角野博之、町田哲男、村上正巳、若年者における75g経口糖負荷試験における血糖およびインスリン分泌に対する検討、第60回日本臨床検査医学会学術集会、2013年10月31日~11月3日、神戸

荒木修、氏家紘平、高山真祐子、中原理恵子、常川勝彦、青木智之、森村匡志、木村孝穂、奈良誠人、角野博之、荻原貴之、村上正巳、インスリン療法中の糖尿病患者に対するシタグリプチン併用の有効性に関するCGMと1,5-AGによる検討、第56回日本糖尿病学会、2013年5月16日~18日、熊本

村上正巳、パセドウ病の診断と治療、第13回日本内分泌学会関東甲信越支部博術集会、2012年12月14日~15日、宇都宮

常川勝彦、青木智之、森村匡志、荒木修、荻原貴之、川井雄輝、三谷康正、林崎良英、村上正巳、運動による耐糖能の改善効果に2型甲状腺ホルモン脱ヨード酵素遺伝子多型が及ぼす影響、第55回日本甲状腺学会、2012年11月29日~12月1日、福岡

青木智之、常川勝彦、森村匡志、荒木修、奈良誠人、荻原貴之、角野博之、木村孝穂、岡島史和、村上正巳、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)における甲状腺ホルモンのnon-genomic effectの検討、第55回日本甲状腺学会、2012年11月29日~12月1日、福岡

常川勝彦、柳川美磨、青木智之、森村匡志、荒木修、荻原貴之、古田島伸雄、四

方田幸恵、三谷康正、林崎良英、村上正巳、耐糖能の変化における2型甲状腺ホルモン脱ヨード酵素遺伝子多型と最大酸素摂取量の関連性の検討、第58回日本臨床検査医学会、2011年11月17日~20日、岡山

常川勝彦、青木智之、森村匡志、荒木修、荻原貴之、川井雄輝、三谷康正、林崎良英、村上正巳、日本人における2型甲状腺ホルモン脱ヨード酵素遺伝子多型の糖代謝に及ぼす影響、第54回日本甲状腺学会、2011年11月21日~23日、大阪

[図書](計 10 件)

村上正巳、Nonthyroidal illness(NTI)、日本臨床、70巻、2005-2010、2012

村上正巳、低T3症候群 血中T3濃度が低下するメカニズム、日本甲状腺学会雑誌、2巻、38-41、2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 正巳 (MURAKAMI, Masami)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 30241871

(2) 研究分担者

角野 博之 (SUMINO, Hiroyuki)
群馬大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 10375579

常川 勝彦 (TSUNEKAWA, Katsuhiko)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 30436307

荻原 貴之 (OGIWARA, Takayuki)
群馬大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 80361377

荒木 修 (ARAKI, Osamu)
群馬大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 80589482

木村 孝穂 (KIMURA, Takao)
群馬大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 90396656

奈良 誠人 (NARA, Makoto)
群馬大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 80420165

(3) 連携研究者

レジャバ アレキサンダー (Lezhava Alexander)
独立行政法人理化学研究所・研究員
研究者番号: 40443048