

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591361

研究課題名(和文)新規糖尿病関連遺伝子UBE2E2によるインスリン分泌調節とその分子機構の解明

研究課題名(英文) Investigation for the role of UBE2E2 in insulin secretory machinery and its molecular mechanisms

研究代表者

今村 美菜子 (Minako, Imamura)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：00596124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、膵細胞におけるUBE2E2の役割を知るために、培養細胞および遺伝子改変動物を用いてUbe2e2がインスリン分泌や糖代謝に与える影響を検討した。これまでの結果から、加齢や肥満など2型糖尿病のリスクとなる環境要因との相互作用を考慮した解析を行うことでUBE2E2の疾患感受性の機序がより明らかになると期待された。また、疾患感受性を直接規定する遺伝子多型を同定するためにUBE2E2領域内の詳細な多型検索および関連解析を行い、候補となり得る複数の一塩基多型を同定した。

研究成果の概要(英文)：We have evaluated the insulin secretion from pancreatic beta-cell line and phenotype of the genetically-modified mice for Ube2e2 to explore the role of UBE2E2 in pancreatic beta-cells. Our results indicate that it is important to consider the influence of environmental factor(s), such as age and obesity, to reveal the mechanism(s) how UBE2E2 contribute to conferring susceptibility to type 2 diabetes. We have also identified several candidates for causal variants by a fine-mapping within the UBE2E2 locus.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、内分泌学

キーワード：2型糖尿病 遺伝要因

1. 研究開始当初の背景

我が国における糖尿病患者数は増加の一途をたどっている。糖尿病患者の90%以上を占める2型糖尿病患者の成因には、骨格筋、脂肪など末梢でのインスリン抵抗性と膵細胞からのインスリン分泌不全が関与するがその正確な分子メカニズムは未だ明らかではない。

ゲノムワイド関連解析(GWAS)は従来の既知の分子機能に基づいた2型糖尿病研究とは異なり、仮説に基づかない統計学的アプローチ法である事から新規標的の同定に適していると考えられる。

このゲノムワイドな遺伝学的アプローチにより、2010年に研究分担者らは*UBE2E2*を新たな2型糖尿病疾患感受性遺伝子領域として同定した(Yamauchi T, Hara K, Maeda S et al. *Nat Genet* 42: 864-868, 2010)

しかしながら、*UBE2E2* 遺伝子領域がどのような機序で2型糖尿病疾患感受性に関与しているかは明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は新規2型糖尿病関連遺伝子*UBE2E2*の膵細胞における機能を検討し、加えて*UBE2E2*多型による疾患感受性のより詳細な機序を解明することにより、2型糖尿病発症進展機序を明らかにし、新規糖尿病治療法の開発に貢献することである。

*UBE2E2*は遺伝統計学的アプローチによって得られた新規の糖尿病関連遺伝子であり、膵細胞における生理的役割に関する検討はこれまで行われていない。本研究は上記の背景に基づき、*UBE2E2*の膵細胞での生理的役割、特にインスリン分泌に対する作用を明らかにすると共に、その分子機構を解明する事により、新規の糖尿病治療標的としての可能性を検証する事を目的とするものである。

また、本研究では新規2型糖尿病感受性遺伝子として同定された*UBE2E2* 遺伝子領域の機能性多型の検索を行うと共に、その機能性多型によりどのような遺伝子産物機能変化がもたらされるかを明らかにすることで*UBE2E2*多型による2型糖尿病疾患感受性機序を分子レベルで解明することを目的とする。

本研究から得られる知見により従来は明らかになっていない新たな2型糖尿病の発症メカニズムが解明され、新規治療法(治療薬)、予防法の開発につながる事が期待される。

3. 研究の方法

(1)培養細胞系における*UBE2E2*のインスリン分泌に対する作用の解明:

膵細胞における*Ube2e2*の役割を検討するため、マウス由来膵細胞株MIN6細胞を用いて特異的siRNAによる*Ube2e2*ノックダウンあるいはアデノウィルスベクターによる*Ube2e2*過剰発現がインスリン分泌に及ぼす効果を検討した。

インスリン分泌能は、グルコース、KCL、およびスルホニルウレア剤刺激によるイン

スリン分泌能にて評価した。

(2)遺伝子導入動物の作成および表現型解析;

*Ube2e2*の*in vivo*での糖代謝における役割を解明するために膵細胞特異的*Ube2e2*トランスジェニックマウスを作成した。

膵細胞特異的プロモーター(RIP2;ラットインスリン2プロモーター)はラットゲノムよりクローニングした。マウス*Ube2e2*CDS配列(606bp)はマウス組織brain mRNA由来のcDNAをテンプレートとしてPCRで作成した。RIP2-*Ube2e2*-SV40 polyAを持つ発現ベクターを構築し制限酵素処理した後、精製した断片を200個の受精卵にインジェクションした。得られたファウンダーマウス(F0)のジェノタイプングをPCRで行い*Ube2e2*遺伝子導入動物の確認を行った。PCRで*Ube2e2*の導入が確認されたF0マウスは野生型マウスと交配し、得られたF1マウスおよびF0マウスのgenomic DNAをサザンブロットで解析して、導入コピー数の確認を行った。

表現型の解析は定期的な血糖値、体重の計測および経口糖負荷試験、インスリン負荷試験、摂餌量測定を行った。

通常食での飼育に加え、高脂肪高シヨ糖食による飼育を行い、食事性肥満がトランスジェンによる表現型に及ぼす影響を検討した。(3)ヒト*UBE2E2*領域の新規遺伝子多型の検索および機能性多型の同定

ヒト*UBE2E2*全長および周辺領域のリシーケンスを行った。2型糖尿病患者(n=96)の末梢血由来genomic DNAを用いて、*UBE2E2*遺伝子全長(380kbp)、および5'側10kbp、3'側500bpのリシーケンスをサンガー法にて行った。得られたDNA配列からの遺伝子多型の検出はpolyphredにて行った。

同定した遺伝子多型(一塩基多型)に対して2型糖尿病患者群、対照群のゲノムサンプルを用いてマルチプレックスPCRインベダー法による遺伝子型タイプングを行った。

それぞれの一塩基多型と2型糖尿病疾患感受性との関連をロジスティック回帰分析で検討した。

4. 研究成果

(1)培養細胞系における*UBE2E2*のインスリン分泌に対する作用の解明

マウス由来膵細胞株MIN6細胞を用いて特異的siRNAによるノックダウンがインスリン分泌に及ぼす効果を検討した。特異的siRNAs処理MIN6細胞では、コントロール細胞に比し内因性*Ube2e2*mRNAは約90%抑制された。25mMグルコース、50mM KCl、1μM グリベンクラミド存在下でのMIN6細胞のインスリン分泌は5.3~7.5倍に増加し、*Ube2e2*ノックダウンはいずれの条件下でもこのインスリン分泌に影響を及ぼさなかった。

マウス*Ube2e2*発現アデノウィルスベクター(adeno-*Ube2e2*)による*Ube2e2*過剰発現系を構築した。MIN6細胞にadeno-*Ube2e2*を30

m.o.i で感染させると *Ube2e2*mRNA は内因性 *Ube2e2* の約 50 倍に増加した。今後は *Ube2e2* 過剰発現系でインスリン分泌を検討していく予定である。

(2) 遺伝子導入動物の作成および表現型解析
 臍 細胞特異的 *Ube2e2* トランスジェニックマウスの作成

研究の方法で記述した通りに臍 細胞特異的 *Ube2e2* トランスジェニックマウスを作成した。F0 マウスのうち tail 由来 DNA サンプルを用いた PCR にて 3 匹の *Ube2e2* トランスジーン陽性マウスの獲得が確認された。これらのマウスを野生型マウスと交配させて F1 マウスを作成した。3 つのラインのうち 2 つは *Ube2e2* トランスジーン陽性 F1 マウスが得られたが、残りの 1 ラインは陽性 F1 マウスが得られる前に死亡した。

F0 マウスおよび F1 マウス Tail 由来 DNA を用いたサザンブロットを行い、トランスジーンの導入コピー数を検証したところ、3 つのラインのうち F0 マウスが死亡したラインが最もコピー数が高く、導入した遺伝子の過剰発現により致命的となった可能性も考えられた。残りの 2 ラインについては F2 マウスまで獲得できたため導入コピー数の高い方を *-Ube2e2-Tg-high*, 導入コピー数の低い方を *-Ube2e2-Tg-low* とした。

臍 細胞特異的 *Ube2e2* トランスジェニックマウスの表現型解析

-Ube2e2-Tg-high, *-Ube2e2-Tg-low*, 野生型マウスを含めた 3 群で表現型解析を行った。

先ず、これらの 3 群のマウスを通常飼育下において 32 週齢まで観察したが、血糖値、体重ともにトランスジェニックマウスとコントロールマウスとの有意な差は観察されなかった。また、経過を通じて明らかな外観や行動の異常は観察されなかった。

そこで *-Ube2e2-Tg-high* (n=8), *-Ube2e2-Tg-low* (n=9), およびコントロール野生型マウス (n=9) に生後 8 週齢より高脂肪高シヨ糖食を投与開始し、24 週齢まで観察した。野生型マウスにおいて高脂肪、高シヨ糖食投与により 20 週齢時の体重は 39.6 ± 3.3 g と通常食で飼育した littermate 30.7 ± 3.5 g に比して顕著な体重の増加を認め、食事誘発性肥満モデルとして適していると判断された。高脂肪高シヨ糖食開始 4 週間後より、*-Ube2e2-Tg-high* では体重の増加が他の 2 群に比して少ない傾向が観察された。

ここまでの観察では、臍 細胞における *Ube2e2* の過剰発現はマウスモデルにおいては通常飼育下では糖代謝に明らかな影響を及ぼさないことが示された。高脂肪高シヨ糖食投与下の表現型については再現検証の必要があり、現在独立した実験群 (*-Ube2e2-Tg-high* n=8, 野生型マウス n=10) を用いた検討を行っている。

(3) ヒト *UBE2E2* 領域の新規遺伝子多型の検索および機能性多型の同定

2 型糖尿病患者 96 名の genomic DNA を用いて *UBE2E2* およびその周辺領域計 400 kbp をサンガー法にてリシークエンスを行った結果、計 626 個の一塩基多型 (SNV) が同定された。

626 個のうち 505 個は 2011 年 7 月の時点で SNP データベース (dbSNP) に収載されていた。残りの 121 個はデータベースに記載のない、新規 SNV であった。

626 個の SNV のうち、205 個については我々の過去の研究においてすでに 2 型糖尿病との関連は検討済みであり、残りの 421 個の SNV の遺伝子型判定をマルチプレックス PCR インベータ法にて試みた。421 個のうち 339 個が遺伝子型判定のためのプローブ設計が可能であり、これらの 339 SNVs について 2 型糖尿病患者 2994 名、コントロール 3352 名における遺伝子型の判定を行った。現在までに 305 SNVs の遺伝子型判定を終了した。

すでに検討済みの 205 SNVs の情報と新たに解析した 305 SNVs の情報から、以下のような知見が得られた。

) 2 型糖尿病との関連解析において最も強い関連を認めた SNV は *UBE2E2* のイントロン 3 に位置しており、p 値は 1.45×10^{-6} で 1 危険対立遺伝子辺りのオッズ比は 1.29 (95% 信頼区間 1.16-1.42)。対照群における危険対立遺伝子頻度は 12.4% であった。

) 一方、最も強い効果を持つ SNV もイントロン 3 に認められ、対照群における危険対立遺伝子頻度は 0.46% で、1 危険対立遺伝子辺りのオッズ比は 2.30 (95% 信頼区間 1.49-3.56) 関連の p 値は 1.3×10^{-4} であった。

以上のように、これまでの解析の結果から 2 型糖尿病と最も強く関連する SNV は *UBE2E2* のイントロン 3 に位置しており、さらにより効果 (オッズ比) の大きい頻度の低い SNV (rare variant) もイントロン 3 に認められた。最終的な結論は解析の終了していない 34 SNVs の結果を得たのちとなるが、イントロン 3 の SNVs に関しては有力な機能性多型候補と考えられ、今後機能解析を進めていく予定である。

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)

[雑誌論文] (計 7 件)

Imamura M, Shigemizu D, Tsunoda T, Iwata M, Maegawa H, Watada H, Hirose H, Tanaka Y, Tobe K, Kaku K, Kashiwagi A, Kawamori R, Maeda S. Assessing the clinical utility of a genetic risk score constructed using 49 susceptibility alleles for type 2 diabetes in a Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab*. 査読あり
98(10):E1667-73. 2013

doi: 10.1210/jc.2013-1642

Imamura M, Iwata M, Maegawa H, Watada

H, Hirose H, Tanaka Y, Tobe K, Kaku K, Kashiwagi A, Kadowaki T, Kawamori R and Maeda S, Replication study for the association of rs391300 in *SRR* and rs17584499 in *PTPRD* with susceptibility to type 2 diabetes in a Japanese population. *J Diabetes Invest*. 査読あり Volume 4 Issue 2 168-173, 2013 DOI:10.1111/jdi.12017

今村美菜子、久保充明、前田士郎 バイオバンクジャパンの成果と今後；2型糖尿病疾患感受性遺伝子研究の進歩 *Diabetes Frontier* 査読なし vol 24 no4 p377-384 2013

Imamura M, Maeda S, Yamauchi T, Hara K, Nakamura Y & Kadowaki et al. A single nucleotide polymorphism in *ANK1* is associated with susceptibility to type 2 diabetes in Japanese populations. *Hum Mol Genet*. 査読あり 2012 Jul 1;21(13):3042-9 doi: 10.1093/hmg/dd113.

今村美菜子、前田士郎 糖尿病疾患感受性遺伝子の解明 *Modern Physician* 査読なし vol 32 No.8 (1022-1024) 2012

Imamura M, Iwata M, Maegawa H, Watada H, Hirose H, Tanaka Y, Tobe K, Kaku K, Kashiwagi A, Kawamori R, Nakamura Y, Maeda S. Genetic variants at *CDC123/CAMK1D* and *SPRY2* are associated with susceptibility to type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetologia*. 査読あり 2011 Dec;54(12):3071-7. doi:10.1007/s00125-011-2293-3

Imamura M, Maeda S. Genetics of type 2 diabetes: the GWAS era and future perspectives [Review]. *Endocr J*. 査読あり 30;58(9):723-39. 2011 doi.org/10.1507/endocrj.EJ11-0113

〔学会発表〕(計5件)

Minako Imamura, Usefulness of genetic risk score constructed from 49 loci for type 2 diabetes in Japanese individuals, 49th EASD Annual Meeting, Barcelona, 23-27 September 2013.

Minako Imamura, Usefulness of genetic risk score constructed from 47 loci for type 2 diabetes in non-obese, older Japanese individuals, American Diabetes Association's 73rd Scientific Sessions, June 21-25, 2013 in Chicago, Illinois

今村美菜子、2型糖尿病疾患感受性遺伝子領域55領域の日本人集団における検討、第55回日本糖尿病学会年次学術集会 熊本 2013年5月16日 18日

今村美菜子、Imputationに基づくゲノムワイド関連解析による2型糖尿病疾患感受性遺伝子領域の同定、第55回日本糖尿病学会年次学術集会 2012年5月17日(木曜日)~19日(土曜日) 横浜

今村美菜子、2型糖尿病感受性候補領域33領域の日本人集団における検証 第54回日本糖尿病学会年次学術集会 2011年5月19日(木曜日)~21日(土曜日) 札幌

〔その他〕

ホームページ等

独立行政法人理化学研究所

統合生命医科学研究センター

腎代謝内分泌疾患研究チームホームページ

http://www.riken.jp/research/labs/ims/ndocrinol_metab_kidney_dis/

アウトリーチ活動

サイエンスカフェ 講師 今村美菜子

タイトル“糖尿病になりやすい体質ってなんだろう？” 2012年8月26日(日) 神奈川県立川崎図書館2階ホール

http://www.klnet.pref.kanagawa.jp/kawasaki/information/science_cafe031.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 美菜子 (IMAMURA, Minako)

独立行政法人理化学研究所 統合生命医科学研究センター 研究員

研究者番号：00596124

(2) 研究分担者

前田 士郎 (MAEDA, Shiro)

独立行政法人理化学研究所 統合生命医科学研究センター チームリーダー

研究者番号：50314159