

平成 28 年 4 月 21 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293212

研究課題名(和文) 膵細胞転写因子ネットワークの網羅的解析による糖尿病発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of diabetes mellitus based on beta-cell transcription factor network

研究代表者

山縣 和也 (Yamagata, Kazuya)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：70324770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：HNF遺伝子異常によりインスリン分泌不全を伴う糖尿病が発症するが、その詳細な分子機構は不明である。本研究の結果、高感度CRPがHNF1の標的遺伝子であり、診断のバイオマーカーとなりうる可能性が示された。また、HNF1新規標的遺伝子として機能未知の分子であるTmed6を同定した。さらにHNF4の標的遺伝子であるAnks4bは正常なインスリン分泌に必須であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Mutations in the genes encoding hepatocyte nuclear factor (HNF) cause impaired insulin secretion and diabetes mellitus. However, the detailed molecular mechanisms are largely unknown. In the present work, we found that Crp is a direct target gene of HNF1 and high sensitive could be a biomarker for HNF1 diabetes. In addition, we found that Tmed6 is a target gene of HNF1. Furthermore, we identified that Anks4b, a direct target of HNF4, regulates insulin secretion by beta-cells.

研究分野：代謝学

キーワード：糖尿病 インスリン分泌 転写因子 MODY

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、maturity-onset diabetes of the young (MODY)の解析を通じて hepatocyte nuclear factor (HNF)をはじめとする種々の転写因子やグルコキナーゼが正常なインスリン分泌に必須であることを明らかにした (Yamagata K. Nature 1996a, Yamagata K. Nature 1996b)。

その後、我々を含む複数のグループから HNF 遺伝子多型が 2 型糖尿病の疾患感受性に関与していること (PNAS 2002, Diabetologia 2003, Nat. Genet. 2007) や、2 型糖尿病患者膵島において HNF の発現が低下していること (Cell 2005) が報告され、HNF 遺伝子多型や HNF 発現低下が 2 型糖尿病の発症にも関与している可能性が示された。これらの結果は HNF によるインスリン分泌機構の解明は、2 型糖尿病におけるインスリン分泌不全を理解する上で重要であることを示唆している。

HNF の役割を解明する上で、その標的遺伝子を同定することは極めて重要である。我々は HNF1 $\alpha$ の標的遺伝子として GLUT2 (Diabetes 2002)、コレクトリン (Cell Metabolism 2005)、Hgfac (BBRC 2012) を同定した。また、HNF4 $\alpha$ の標的遺伝子として Anks4b (JBC 2012) を同定することに成功している。しかしインスリン分泌における Anks4b の役割は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究においては、HNF4 $\alpha$ の新規標的遺伝子である Anks4b の機能解析を行うと共に、HNF 標的遺伝子の網羅的解析を行い、 $\beta$ 細胞機能や量の制御に重要な分子を同定する。また MODY 診断のためのバイオマーカーを同定する。さらに加齢や代謝シグナル・各種ストレスが HNF など MODY 原因遺伝子に及ぼす影響を明らかにする。これら結果を総括することで 2 型糖尿病におけるインスリン分泌不全の成因解明および新規治療法の分子標的獲得を目指す。

## 3. 研究の方法

HNF4 $\alpha$ の新規標的遺伝子 Anks4b の機能解析

Anks4b shRNA 発現レトロウイルスを用いて Anks4b ノックダウン MIN6 細胞細胞を作製し、グルコース応答性インスリン分泌について検討を行った。

Anks4b flox/flox マウスと RIP-Cre マウスを交配させ、膵 $\beta$ 細胞特異的 Anks4b ノックアウトマウスを作製し、耐糖能について検討を行った。

MODY3 バイオマーカーとしての CRP の有用性の検討

HNF1 $\alpha$  遺伝子異常による MODY3 のバイオマーカーとしての高感度 CRP の有用性について検討を行った。MODY3 患者の血中

CRP レベルおよび HNF1 $\alpha$  ノックアウトマウス肝臓における Crp 遺伝子発現について検討を行った。

HNF 標的遺伝子の網羅的解析

HNF1 $\alpha$  ノックダウン MIN6 細胞およびコントロール MIN6 細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。ノックダウン細胞で発現の低下している遺伝子の中から新規標的遺伝子の探索を行った。

低酸素ストレスによる MODY 遺伝子発現制御の検討

低酸素が MODY 遺伝子の発現に及ぼす影響について遺伝子およびタンパクレベルで検討を行った。

肝グルコキナーゼによるインスリン分泌制御の検討

膵 $\beta$ 細胞のグルコキナーゼはインスリン分泌に重要であることは知られているが、肝におけるグルコキナーゼがインスリン分泌に及ぼす影響については明らかではない。肝臓特異的グルコキナーゼノックアウトマウスを作製し、インスリン分泌について検討を行った。

## 4. 研究成果

HNF4 $\alpha$ の新規標的遺伝子 Anks4b の機能解析

Anks4b ノックダウン MIN6 細胞のグルコース応答性インスリン分泌について検討を行った結果、低グルコースにおけるインスリン分泌亢進と高グルコース刺激に対する分泌低下が認められた。細胞内カルシウム濃度について検討を行ったところ、低グルコース下における細胞内カルシウム濃度の上昇が確認された。細胞内カルシウム濃度がノックダウン細胞において上昇するメカニズムについて現在、検討中である。

次に、Anks4b flox/flox マウスと RIP-Cre マウスを交配させることにより膵 $\beta$ 細胞特異的 Anks4b ノックアウトマウスを作製した。随時血糖値および体重については Cre マウスと膵 $\beta$ 細胞特異的 Anks4b ノックアウトマウスの間で差を認めなかったが、腹腔内糖負荷試験を行ったところ、膵 $\beta$ 細胞特異的 Anks4b ノックアウトマウスにおいて有意な耐糖能の悪化を認めた。ノックアウトマウスにおける検討結果から、Anks4b は in vivo における耐糖能制御に重要な役割を担っているものと考えられた。

MODY3 バイオマーカーとしての CRP の有用性の検討

HNF1 $\alpha$ ( $-/-$ ) マウス肝における遺伝子発現について検討を行ったところ、Crp 遺伝子の発現が有意に低下していた (図 1)。

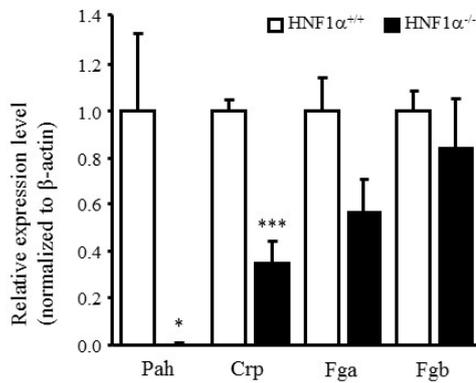


図1. HNF1α(-/-)ノックアウトマウス肝におけるCrp遺伝子発現の低下 (Ohki T. JDI 2014引用)。

そこで転写活性化ドメインを欠損する機能喪失型変異である R229X 変異を有する MODY3 患者における血中高感度 CRP 値について測定を行ったところ、通常の2型糖尿病患者に比して著しい低値を示していることが判明した (図2)。

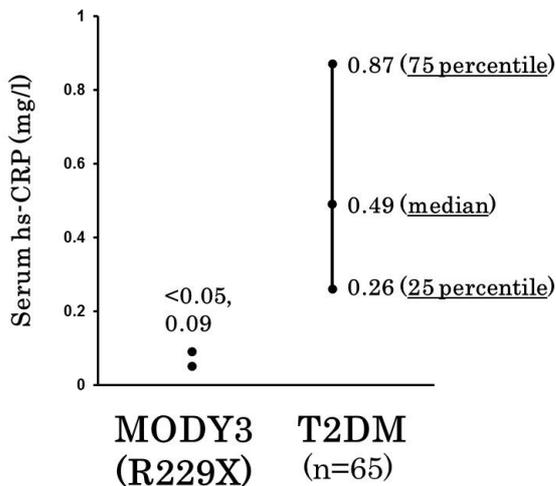


図2. 日本人MODY3患者 (R229X変異) における血中高感度CRPレベル。日本人2型糖尿病患者との比較 (Ohki T. JDI 2014引用)。

高感度 CRP は日本人 MODY3 患者を一般の2型糖尿病患者から識別するための血中バイオマーカーとなりうる可能性が示された。

#### HNF 標的遺伝子の網羅的解析

HNF1α(-/-)マウス膵島より抽出した RNA を用いてマイクロアレイ解析を実施したところ、機能未知遺伝子である Tmed6 の発現がノックアウトマウス膵島で低下していることが判明した。プロモーター解析の結果、Tmed6 遺伝子の発現はHNF1αにより制御されていることが確認された。現在、インスリン分泌における Tmed6 の働きについて検討を行っている。

#### 低酸素ストレスによる MODY 遺伝子発現

#### 制御の検討

我々は糖尿病モデルマウス膵島が低酸素に陥っていることを報告している (Sato Y. JBC 2011)。低酸素が MODY 遺伝子発現に及ぼす影響について検討を行ったところ、低酸素は MODY4 原因遺伝子である Pdx1 の遺伝子発現を低下させることが明らかになった (Sato Y. PLOS ONE 2014)。

HNF4αに及ぼす影響について検討を行ったところ、低酸素は AMPK の活性化を介して HNF4αのタンパク安定性を制御することで、発現を低下させることが判明した (図3)。

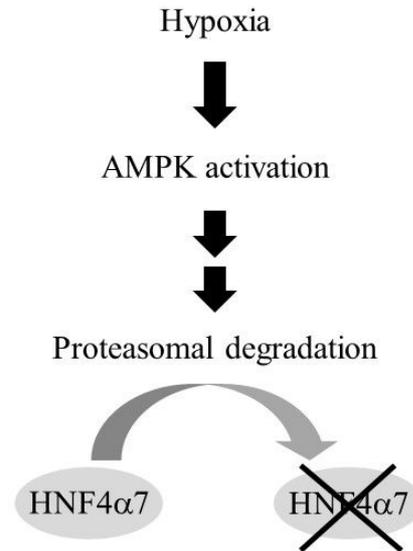


図3. 低酸素によるHNF4αの発現低下作用。

低酸素は MODY 遺伝子の発現を低下させることでインスリン分泌不全を増悪させる可能性が示された。

#### 肝グルコキナーゼによるインスリン分泌制御の検討

グルコキナーゼ (MODY2) は肝および膵β細胞に発現しており、肝のグルコキナーゼは肝における糖取り込みやグリコーゲンの蓄積、膵β細胞におけるグルコキナーゼはインスリン分泌に重要な役割を担っていることが知られている。一方、肝におけるグルコキナーゼがインスリン分泌を制御しているという報告があるため、肝臓特異的グルコキナーゼノックアウトマウスを作製し、同マウスにおけるインスリン分泌について検討を行った。その結果、肝のグルコキナーゼ自身はインスリン分泌に影響を及ぼさないことが明らかになった (Hayashi H. BBRC 2014)。

#### 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 10 件)

1. Karim MF, Yoshizawa T, Sato Y, Sawa T, Tomizawa K, Akaike T, Yamagata K: Inhibition of H3K18 deacetylation of Sirt7 by Myb-binding protein 1a (Mybbp1a). **Biochem Biophys Res Commun.** 441: 157-163, 2013
  2. Ohki T, Utsu Y, Morita S, Karim M.F., Sato Y, Yoshizawa T, Yamamura KI, Yamada K, Kasayama S, Yamagata K: Low serum level of high-sensitivity C-reactive protein in a Japanese subject with MODY3. **J Diabetes Invest** 5: 513-516, 2014
  3. Yamagata K: Roles of HNF1 $\alpha$  and HNF4 $\alpha$  in pancreatic  $\beta$ -cells: lessons from a monogenic form of diabetes (MODY). **Vitam Horm.** 95: 407-423, 2014
  4. Yoshizawa T, Karim MF, Sato Y, Senokuchi T, Miyata K, Fukuda T, Go C, Tasaki M, Uchimura K, Kadomatsu T, Tian Z, Smolka C, Sawa T, Takeya M, Tomizawa K, Ando Y, Araki E, Akaike T, Braun T, Oike Y, Bober E, Yamagata K: SIRT7 controls hepatic lipid metabolism by regulating the ubiquitin-proteasome pathway. **Cell Metab.** 19: 712-721, 2014
  5. Sato Y, Inoue M, Yoshizawa T, Yamagata K: Moderate hypoxia induces  $\beta$ -cell dysfunction with HIF-1-independent gene expression changes. **PLOS ONE** 9: e114868, 2014
  6. Hayashi H, Sato Y, Li Z, Yamamura KI, Yoshizawa T, Yamagata K: Roles of hepatic glucokinase in intertissue metabolic communication: examination of novel liver-specific glucokinase knockout mice. **Biochem Biophys Res Commun.** 460: 727-732, 2015
  7. Kurokawa H, Ito H, Inoue M, Tabata K, Sato Y, Yamagata K, Kizaka-Kondoh S, Kadonosono T, Yano S, Inoue M, Kamachi T: High resolution imaging of intracellular oxygen concentration by phosphorescence lifetime. **Sci Rep** 5: 10657, 2015
  8. Yoshikawa Y, Yoshizawa T, Domae E, Hieda Y, Takeyama A, Hirota S, Kawamoto A, Goda S, Tamura I, Kamada A, Komasa Y, Morita S, Yamagata K, Ikeo T: RNA interference-mediated knockdown of Smad1 inhibits receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand expression induced by BMP-2 in primary osteoblasts. **Arch Oral Biol.** 60: 1319-1326, 2015
  9. Yamagata K, Karim MF, Sato Y, Yoshizawa T: Role of SIRT7 in hepatic lipid metabolism. **Diabetol Int** 6: 193-196, 2015
  10. Araki S, Izumiya Y, Rokutanda T, Ianni A, Hanatani S, Kimura Y, Onoue Y, Senokuchi T, Yoshizawa T, Yasuda O, Koitabashi N, Kurabayashi M, Braun T, Bober E, Yamagata K, Ogawa H: Sirt7 contributes to myocardial tissue repair by maintaining TGF- $\beta$  signaling pathway. **Circulation** 132: 1081-1093, 2015
- 〔学会発表〕(計 10 件)
1. 第 5 6 回日本糖尿病学会年次学術集会 荒木栄一(熊本) 2013.5.16-18  
Hypoxic stress and pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction  
Yamagata K, Sato Y.
  2. 第 3 6 回日本分子生物学会年会 近藤滋(神戸) 2013.12.3-12.6  
軽度低酸素による膵 細胞障害機構の検討  
佐藤叔史、井上正宏、山縣和也
  3. 第 5 7 回日本糖尿病学会年次学術集会 花房俊昭(大阪) 2014.5.22-24  
膵 細胞における HNF4 $\alpha$  標的遺伝子 Anks4b の機能解析  
作永真由美、佐藤叔史、吉澤達也、山縣和也
  4. 第 5 7 回日本糖尿病学会年次学術集会 花房俊昭(大阪) 2014.5.22-24  
Hypoxic stress and pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction  
Kazuya Yamagata
  5. 第 3 7 回日本分子生物学会年会 小安重夫(横浜) 2014.11.25-27  
HIF-1 非依存的発現調節を介した軽度低酸素による 細胞障害メカニズムの検討  
佐藤叔史、井上正宏、吉澤達也、山縣和也
  6. 第 4 9 回糖尿病学の進歩 榎野博史(岡山) 2015.2.20-21  
シンポジウム: ゲノム・エピゲノムと糖尿病 遺伝子異常と糖尿病  
山縣和也、佐藤叔史
  7. 第 5 8 回日本糖尿病学会年次学術集会 谷澤幸生(山口) 2015.5.21-24  
新規 MODY3 モデルマウスの作製: ICR バックグラウンド Hnf1a ノックアウトマウス  
羽根田昌樹、佐藤叔史、吉澤達也、山縣和也

8. 第58回日本糖尿病学会年次学術集会  
谷澤幸生(山口)2015.5.21-24

細胞低酸素による転写因子 HNF4α蛋白  
発現低下機序の検討

佐藤叔史、佐藤ちなみ、吉澤達也、井上正  
宏、山縣和也

9. 第53回日本糖尿病学会九州地方会  
井口登與志(福岡)2015.11.27-28

教育講演6 糖代謝と遺伝学

山縣和也

10. 第38回日本分子生物学会年会・第8  
8回日本生化学大会合同大会 BMB2015

影山龍一郎、遠藤斗志也(神戸)2015.12.1-4

β細胞低酸素による転写因子 HNF-4α蛋白

低下メカニズムの検討

吉澤達也、山縣和也

〔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

[http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/dept/  
biochem2/biochem2.html](http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/dept/biochem2/biochem2.html)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

山縣和也(Kazuya Yamagata)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：70324770

(2)研究分担者

吉澤達也(Tatsuya Yoshizawa)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：40313530

佐藤叔史(Yoshifumi Sato)