

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293246

研究課題名(和文) MODYにおける膵β細胞の代償性インスリン分泌の惹起経路の解明

研究課題名(英文) Characterization of impaired regulatory system of insulin synthesis and secretion in MODY.

研究代表者

武田 純 (Takeda, Jun)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40270855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病は多因子疾患であるので遺伝素因の解明は困難である。筆者らはメンデル遺伝様式の若年糖尿病MODYを日本人の病態モデルとして解析している。MODYは発症年齢や重症度が多様であることから、インスリン分泌不全には何らかの代償機構や修飾因子が存在すると考えた。対象条件を緩めて遺伝子異常の再スクリーニングを行った結果、軽症のMODY2が日本人で高頻度であることが判明し、さらに本邦初の4家系のMODY6の発見にも成功した。膵島トランスクリプトームを活用したHNF転写経路の分子スクリーニングと機能関連のアルゴリズム解析によって、インスリン分泌能を修飾する可能性のある分子群を同定した。

研究成果の概要(英文)：Type 2 diabetes is characterized primarily by insulin deficiency. Their genetic studies have been hampered by its complex mode of inheritance. In this context, we examined a monogenic form of diabetes, maturity-onset diabetes of the young (MODY). Screening of the MODY cohort for mutations resulted in the identification of higher prevalence of MODY2 than estimated and the first cases of MODY6 in Japanese. They might have been overlooked by low penetrance of the phenotypes, suggesting that MODYs are oligogenic rather than monogenic. In order to identify compensatory factors in the state of insulin deficiency, we screened transcriptome databases for pancreatic islet-specific transcripts, resulting in the identification of over 100 expressed genes. Then, using various kinds of algorithm, we could select candidates closely related to the MODY pathways. Further examination of their functions will lead to the better understanding of compensatory mechanism of insulin deficiency in MODY.

研究分野：分子糖尿病学

キーワード：メンデル遺伝 インスリン分泌不全 分子遺伝学 若年糖尿病 膵β細胞

リーニングでは浸透度の高い遺伝子異常が同定されたが、今回は逆に 35 歳以下と年齢基準を緩めることによって代償能が作用していると思われる病態のスクリーニングを試みる。

2) 広領域アレル欠損のスクリーニング

家族歴を考慮しない遺伝子異常のスクリーニングの結果、MODY5 においては染色体上の HNF-1 を含むアレル欠損が成因の約半数を占めることが判明した。MODY3 においてもアレル欠失は見出された。欠失領域に含まれる遺伝子群のコード蛋白の機能欠失は当然の事ながらインスリン分泌や耐糖能に影響を及ぼすと推定される。そこで、欠失領域における関連遺伝子群の検出と未知 MODY における広領域アレル欠失の有無を検討する。

3) ゲノム全域の SNP 連鎖解析

連鎖解析に適した MODY 大家系を得ることは極めて困難である。そこで、小家系群を対象としてゲノム上で出現頻度が高い SNPs を用いて、責任遺伝子と同時に関連する共役遺伝子を連鎖解析でスクリーニングする。

4) 核内受容体 SHP-LRH1 の標的経路の解析

DNA 結合ドメインを欠くオーファン受容体 SHP は HNF 転写経路を抑制して、インスリン過分泌に働く代償性の転写因子である。また、SHP の共役因子である転写因子 LRH1 の欠失動物は軽度肥満、インスリン抵抗性、インスリン過分泌の表現型を示す。従って、SHP の関連分子のスクリーニングは代償能の理解を深める。そこで、SHP や LRH1 の欠失動物の病態を解析すると共に、SHP と直接結合する核内分子をスクリーニングし、機能解析する。

5) 膵島 EST からの特異的遺伝子群の検出

既知 MODY 蛋白が相互に関連する一連の転写因子 (HNF-1 α , -1 β , -4 α , IPF1, Beta2) であることから、代償性分子も下流の転写標的遺伝子にコードされる可能性が高い。

そこで、以前に筆者らが構築した膵島トランスクリプトーム研究のデータベースを活

用して、膵島に比較的特異的な遺伝子を網羅することを本研究でも継続する。EST の出現頻度の比較、大規模 *in situ* hybridization による膵島で高発現する遺伝子のスクリーニングを行う。MODY 蛋白は膵島の発生や分化にも関与するので、耐性期の膵組織切片も検討する。

6) MODY 蛋白との機能関連の解析による共役因子の探索

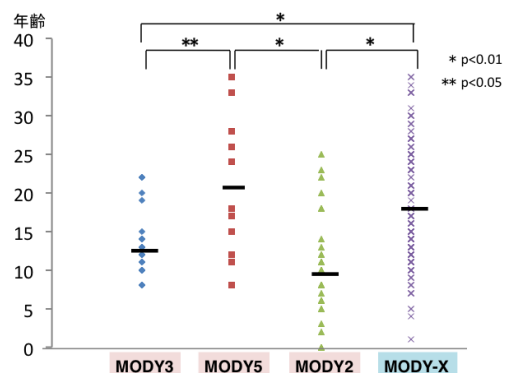
上記のトランスクリプトーム解析や広く行われている 2 型糖尿病のゲノム全域関連解析 (GWAS) の感受性遺伝子群などの相互関連を知ることによって、インスリン分泌を修飾する代償性因子の候補をスクリーニングする。下図のように、種々の推定アルゴリズムや *in silico* 解析を統合した検討を行う。

4. 研究成果

1) MODY コホートの再スクリーニング

再スクリーニングは、代償能のために浸透率が低くなる異常を同定するために、スクリーニング基準となる診断時年齢を 35 歳以下に引き上げ、境界型や妊娠糖尿病など軽度の耐糖能異常も含めた。

その結果、MODY 全体における MODY2 の頻度 (13.0%) は MODY3 (17.5%) に次いで高かった。当該家系で罹患者が多世代に亘らない場合は、遺伝様式を満たさないことから見逃されていると考えられた。一方、MODY5 や未知の MODY-X の診断時年齢は MODY2 や MODY3 に比して有意に年齢が高かった。



このことは、MODY5 では早期発症やインスリ

ン分泌不全の重症例も見られることから、MODY5やMODY-Xの多くでは何らかの代償性の機能が影響している場合が少なくないと推定される。その候補遺伝子の一つとして、アрил欠損に含まれる責任遺伝子の近隣遺伝子群が挙げられる。

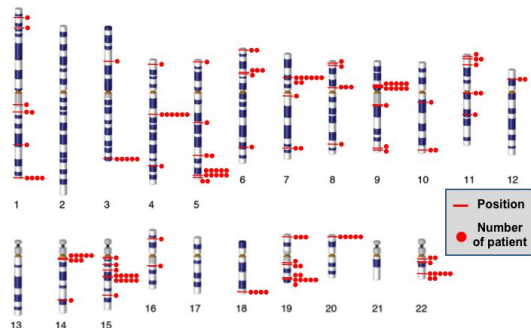
2) 希少 MODY のスクリーニング

家系調査を基本とした MODY スクリーニングでは、HNF-4 α (MODY1)の頻度は極めて低く、MODY4 や MODY6 に至っては本邦では同定されていない。本調査の結果、MODY1 は 2.8%に認められた。本邦初の MODY6 が 4 家系も見出された。未発症例も家系内に含まれたので、何らかの代償能が働いているものと思われる。実際、罹患者は何らかの条件下では、ケトosisを生じやすいことも明らかとなった。

IPF1 遺伝子異常(MODY4)は見出されなかったため、代償性や浸透率は関係なく、日本人では極めて稀な病型と結論された。

3) MODY5 と MODY-X のアрил欠損の解析

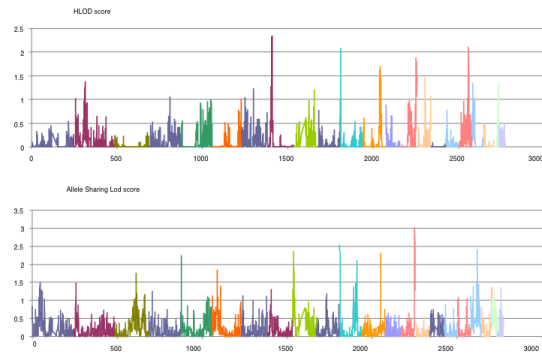
MODY5 における HNF-1 β 遺伝子を含むアрил欠損域に含まれる遺伝子群を特定した。MODY5 の病態の共役因子の候補となる遺伝子は、TRIP3, AATF, ACACA, LHX1, TADA2L, Q8N8D2, Q96TB3, DDXS2, AP1GBP1 であった。さらに、MODY-X の関連遺伝子を含むアрил欠損の可能性を検証した。CGH 解析を行った結果、60 領域において 157 遺伝子を検出した。



4) ゲノム全域の SNP 連鎖解析

MODY 小家系群と SNP HITLink プログラムを用いて、SNP 連鎖解析を実施した。2 つ解析モデルを用いて連鎖を検証した結果、有意の領域は検出されず、示唆レベルのロッドスコ

アのみが検出された。このことは、日本人では浸透率の高い MODY 責任遺伝子は存在せず、浸透度の比較的低い希少 MODY が未知 MODY の大半を占めていて、インスリン分泌不全の病態の発症には何らかの代償性機序または抑制機構が働いているものと推定された。



5) SHP と ChREBP の肝における協調作用

MODY 遺伝子にコードされる HNF 転写因子は、肝の糖脂質代謝において重要な働きをしている。インスリン分泌の代償因子である SHP も肝で胆汁酸と脂質代謝に深く関与する。従って、肝がインスリン分泌代償性を間接的に発揮している可能性がある。

SHP は核内受容体、b-HLH 蛋白、フォークヘッド蛋白に結合する。そこで SHP の結合因子を探索した結果、グルコースで転写レベルが正に制御される転写因子 ChREBP が同定されたので、SHP との相互作用を解析した。

ChREBP と SHP はそれぞれ糖、胆汁酸の刺激を介して肝臓での糖質・脂質代謝を調節する。ChREBP と SHP は多くの共通点を有するにも関わらず、互いの機能連関については不明である。MTTP は主に肝臓や小腸に存在し、肝臓からの VLDL 放出に携わる。MTTP の発現はグルコース活性化転写因子 ChREBP により増加し、胆汁酸誘導転写因子 SHP により減少することが知られている。ChREBP は核内受容体との結合部位が想定されているため、MTTP の発現に着目し、ChREBP と SHP の相互作用を検討した。
<方法> 野生型 (WT)、ChREBP 欠失マウス (ChREBP^{-/-})、SHP 欠失マウス (SHP^{-/-})、ChREBP/SHP ダブル欠失マウス(DKO)に対し、

肝からの VLDL 放出率、肝 *Mttp* mRNA 発現量、MTTP 蛋白量、VLDL 粒子数を検討した。また、ラット初代培養肝細胞に ChREBP、SHP を過剰発現させた際の *Mttp* mRNA 発現量、*Mttp* 遺伝子のプロモーター領域を用いたレポーターアッセイ、哺乳類 two-hybrid システムにて ChREBP と SHP 間の相互作用を評価した。

その結果、肝の VLDL 放出率は ChREBP^{-/-}で減少、SHP^{-/-}で増加、DKO は ChREBP^{-/-}と同程度減少した。上記に一致して、*Mttp* mRNA 発現量、MTTP 蛋白量、血中リポ蛋白の粒子数の結果も同様であった。ラット初代肝細胞における *Mttp* mRNA 発現量は、ChREBP の過剰発現により増加し、SHP の過剰発現によって減少した。レポーターアッセイにて、SHP により *Mttp* 転写活性は低下したが、ChREBP によっては変化しなかった。また、哺乳類ツーハイブリッドシステムでは ChREBP と SHP とは結合したが、ChREBP と FXR との結合と比較し軽度であった。

以上から、ChREBP と SHP は共に *Mttp* を介して VLDL 分泌を調節するが、ChREBP による効果が上回る。ChREBP と SHP は互いに結合しうるが、*Mttp* の調節に関しては両者独立に作用すると考えられた。

6) GCK と SGLT2 遺伝子のダブル変異の同定

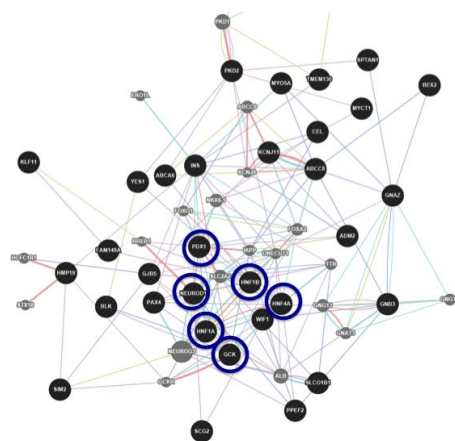
膵β細胞以外の他の組織の修飾因子も考慮すべきである。HNF-1 (MODY3,5) の腎臓での標的遺伝子には SGLT2 遺伝子がある。MODY3 では HNF-1 調節能の減弱に従って SGLT2 の発現低下が生じて早期から尿糖が検出される。もし、SGLT2 異常が MODY 変異に合併すれば MODY 病態は修飾されるので、腎性糖尿で耐糖能異常の症例の変異スクリーニングを行ったところ、SGLT2 遺伝子の G356R 変異と GCK の A387V 変異を両有する症例を見出した。

患児における 75gOGTT の結果、血糖値の 30 分値ピークから遅れて 60 分にインスリン分泌ピークを認めた。持続的な尿糖排泄の結果、インスリン分泌は第一相以降では血糖上昇を認めるにも関わらず、基礎レベルに低下し、

二相性パターンは認められなかった。

7) 機能代償性の候補分子の連関解析

組織発現、機能経路、分子間結合、機能ドメインなどの情報に基づき、上記の候補分子や GWAS で報告された多くの感受性遺伝子群について連関図を作成した。解析プログラムは、GeneMANIA, Pathway Commons, BioGrid, GEO, InterPro を用いた。



6 種類の既知 MODY 遺伝子 (丸印) は互いに密接に関連することが本図で確認される。この相関図に新たな候補分子を次々とプロットすることによって、修飾因子、共役因子、新規 MODU 分子の検出が可能となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Horikawa Y, Enya M, Mabe H, Fukushima M, Takubo N, Ohashi M, Ikeda F, Hashimoto K, Watada H, Takeda J. NEUROD1-deficient diabetes (MODY6): Identifications of the first cases in Japanese and the clinical features. *Pediatr Diabetes*. 査読有り、2017 (In press)

Yasuda H, Ohashi A, Kamiya T, Nishida S, Suwa T, Hara H, Takeda J, Itoh Y, Adachi T. Exendin-4 induces extracellular-superoxide dismutase through histone H3 acetylation in human retina endothelial cells. *J Clin Biochem Nutr*. 査読有り、59: 2016, 174-181.

Wu W, Tsuchida H, Niwa H, Horikawa Y, Takeda J, Iizuka K. Fat and carbohydrate in Western diet differently contributes to hepatic lipid accumulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有り、461: 2015, 681-686.

Horikawa Y, Enya M, Fushimi N, Fushimi Y, Takeda J. Screening of diabetes of youth for hepatocyte nuclear factor 1 mutations: clinical phenotype of HNF-1 β -related maturity-onset diabetes of the young and HNF-1 α -related maturity-onset diabetes of the young in Japanese. *Diabetic Med*. 査読有り、31: 2014, 721-727.

Hattori T, Iizuka K, Horikawa Y, Takeda J. LRH-1 heterozygous knockout mice are prone to mild obesity. *Endocr J*. 査読有り、61: 2014, 471-480.

Enya M, Horikawa Y, Iizuka K, Takeda J. Association of genetic variants of the incretin-related genes with quantitative traits and occurrence of type 2 diabetes in Japanese. *Mol Genet Metab Rep*. 査読有り、1: 2014, 350-361.

〔学会発表〕(計8件)

塩谷真由美、堀川幸男、橋本健一、水野正巳、廣田卓男、諏訪哲也、武田 純. 日本人 MODY1 の特徴についての検討 ; MODY3 との比較から. 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会、京都、2016 年.

Enya M, Horikawa Y, Hashimoto K, Takeda J. Investigation of clinical differences between MODY1 and MODY3 in Japanese. The 13th International Congress of Human Genetics、京都、2016 年.

呉烏徳勒胡、飯塚勝美、丹羽啓之、加藤丈博、土田宏美、堀川幸男、武田 純. SHP 欠失マウスは肥満抵抗性である. 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会、下関、2015 年.

平手祐子、橋本健一、塩谷真由美、堀川幸男、武田 純. HNF1 の標的分子である DPP4 と SGLT2 の阻害が有効であった MODY5 の 1 家系. 第 112 回日本内科学会、京都、2015 年.

塩谷真由美、堀川幸男、横山恵子、川田純子、土田宏美、廣田卓男、諏訪哲也、武田 純. BLM 遺伝子のエクソン 1 欠損と MODY との関係についての検討. 第 57 回日本糖尿病学会、大阪、2014 年.

堀川幸男. 若年発症糖尿病の遺伝素因の解明. 第 59 回日本人類遺伝学会、東京、2014 年.

堀川幸男. 日本人若年糖尿病の新規原因遺伝子同定戦略とその展開. 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会、下関、2015 年.

塩谷真由美、堀川幸男、橋本健一、廣田卓男、諏訪哲也、間部裕代、福嶋 恵、大橋正明、池田富貴、武田 純. 日本人 MODY6 の 4 症例についての検討 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会、下関、2015 年.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕 出願状況 (計0件)

〔その他〕 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 純 (TAKEDA, Jun)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 40270855

(2) 研究分担者

堀川 幸男 (HORIKAWA, Yukio)

岐阜大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号 : 10323370

飯塚 勝美 (IIZUKA, Katsumi)

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 40431712

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし