

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461382

研究課題名(和文) 2型糖尿病関連遺伝子Kcnq1遺伝子領域が膵細胞に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) Effect of type 2 diabetes susceptibility gene Kcnq1 gene region on pancreatic beta cells

研究代表者

浅原 俊一郎 (Asahara, Shun-ichiro)

神戸大学・医学研究科・特命助教

研究者番号：00570342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：日本人2型糖尿病患者を対象としたゲノムワイド関連解析によって、KCNQ1遺伝子の一塩基多型が糖尿病発症の有意な危険因子であることが報告されているが、KCNQ1遺伝子が2型糖尿病を発症させるメカニズムに関してはこれまで明らかにされていなかった。代表者は、KCNQ1遺伝子がインプリンティング遺伝子である点に注目した。マウスを用いた検討により、父親から引き継いだKcnq1遺伝子の変異は、インプリンティング制御に異常を起こすことによって、細胞周期抑制因子p57の発現量を増加させることが明らかとなった。p57は膵細胞特異的に蓄積することによって、膵細胞量を減少させ、2型糖尿病発症に至ると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Numerous susceptibility genes for type 2 diabetes, including KCNQ1, have been identified in humans by genome-wide analyses and other studies. Experiments with genetically modified mice have also implicated various genes in the pathogenesis of diabetes. However, possible parent-of-origin effects for diabetes susceptibility alleles on disease onset have remained unclear. Here, we show that a mutation at the Kcnq1 locus reduces pancreatic cell mass in mice via epigenetic modulation only when it is paternally inherited. The noncoding RNA Kcnq1ot1 is expressed from the Kcnq1 locus and regulates the expression of neighboring genes on the paternal allele. We found that disruption of Kcnq1 results in reduced Kcnq1ot1 expression and increased Cdkn1c expression, an imprinted gene encoding a cell cycle inhibitor, only when the mutation is on the paternal allele. Furthermore, histone modification of the Cdkn1c promoter in pancreatic islets was found to contribute to this phenomenon.

研究分野：糖尿病学

キーワード：膵細胞 2型糖尿病感受性遺伝子 エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

現在、世界中で2型糖尿病患者が急増しており、国際的な問題となっている。特にわが国をはじめとした東アジアにおける2型糖尿病患者数は、世界の成人糖尿病人口の1/3以上を占めると言われており、2030年にはさらに約1.5倍に増加すると見込まれている。こうした問題に対応するため、糖尿病発症の遺伝因子を探るべく、近年ゲノムワイド関連解析(GWAS)が盛んに行われている。GWASによって、これまでに多くの2型糖尿病感受性遺伝子が報告されているが、その中でも特にオッズ比が高い分子の一つがKCNQ1である。KCNQ1は、2008年に我が国の異なる2つのグループから、独立したGWASの結果により同定された新規2型糖尿病感受性遺伝子である。これらの報告以降、東アジアだけでなく、世界中の多くの施設からKCNQ1リスクアレルによる耐糖能異常に関する報告が為されているが、その発症メカニズムに関しては未だ十分にわかっていない。

## 2. 研究の目的

2008年の報告において、11番染色体に存在する*Kcnq1*遺伝子のイントロン15にきわめて強く2型糖尿病発症と相関するSNP(一塩基多型)が同定された。そのオッズ比は1.4前後であり、*Tcf7l2*を除くほとんどの2型糖尿病感受性遺伝子が1.1~1.2であることを考えると、非常に高いオッズ比と言える。また、その後も世界各国の施設から、*Kcnq1*遺伝子のSNPに関する報告が相次ぎ、現在はTCF7L2と並んで最も重要な2型糖尿病感受性遺伝子と考えられている。実際に、*Kcnq1*遺伝子のリスクアレルはインスリン分泌不全を介して耐糖能異常を呈することが、続報によって明らかになっている。

KCNQ1は、6回膜貫通型の電位依存性カリウムチャンネルの一つであり、再分極に関与する分子であることが知られている。心筋細胞では特に有名で、KCNQ1遺伝子上の膜貫通領域等に変異が存在すると、KCNQ1の機能が障害されることにより(Loss of function)、

心筋細胞における再分極が遅延することによってQT延長症候群を呈することが報告されている。また逆に、KCNQ1の機能が亢進するような変異が存在することも明らかになっており(Gain of function)、その場合はQT時間が短縮することによって家族性心房細動を発症すると言われている。またKcnq1は、胃酸や気道粘膜からの分泌に関しても寄与していることが報告されており、全身の臓器において重要な役割を担っていると考えられる。しかしながら、2008年のGWASに関する報告が出るまで、糖尿病発症に関与しているという報告は見られなかった。そこで本研究では、Kcnq1変異マウスを用いて、インスリン分泌および耐糖能に関する検討を開始した。

## 3. 研究の方法

**Kcnq1ノックアウトマウス:** *Kcnq1*遺伝子のExon2をネオマイシン耐性遺伝子と相同組換えを起こすことにより作製。ホモノックアウトマウスでは内耳の異常により平衡機能が障害され、異常運動を起こすことから、代謝データはヘテロノックアウトマウスを用いて解析した。

**Kcnq1ot1 truncation マウス:** *Kcnq1*遺伝子の第10イントロンにpolyA (polyadenylation) cassetteを挿入することによって、*Kcnq1ot1*の発現を抑制したマウス。

## 4. 研究成果

*Kcnq1*は他臓器においては分泌との関連が報告されていることから、膵β細胞においてもインスリン分泌に影響が現れることが予想された。しかしながらヘテロ群と野生型群において随時血糖、体重、随時インスリン値において有意差は認められず、またOGTTにおいても血糖値、インスリン値に有意差は見られなかった。*Kcnq1*ノックアウトマウスからの単離膵島におけるインスリン分泌アッセイを行ってみたが、やはり野生型との差は認められなかった。また*Kcnq1*ノックアウ

ト膝島、*Kcnq1* ノックダウン膵β細胞株における静止膜電位、細胞内 Ca 濃度、活動電位においても変化は見られず、意外なことに電位依存性カリウムチャネルである *Kcnq1* の発現が低下しても、膵β細胞からのインスリン分泌量や個体における耐糖能には影響が見られなかった。

1997年に、*Kcnq1* 遺伝子は胎生期において、母方アリルからしか発現しないインプリンティング遺伝子であることが報告されている。インプリンティング遺伝子とは、一对の対立遺伝子のうち性に従って片親由来のアリルでのみ発現する遺伝子のことである。インプリンティング遺伝子の発現を決定しているのは、インプリンティング調節領域(ICR)と呼ばれるメチル化可変領域(DMR)である。この領域がメチル化されているか否かで、そのインプリンティングドメイン内のインプリンティング遺伝子発現が決定される。この DMR のメチル化修飾に異常が起こることによって発症する疾患がインプリンティング関連疾患であり、これまでに分かっているインプリンティング関連疾患としては、Prader-Willi 症候群、Beckwith-Wiedemann 症候群、偽性副甲状腺機能低下症の一部、新生児一過性糖尿病、胞状奇胎などがある。このように、いわゆるエピジェネティクス修飾によるゲノム変動が様々な疾患の発症原因となり得ることが明らかとなってきており、代謝疾患もその一つに挙げられる。しかしながらインプリンティング制御の破綻が糖尿病のような common disease を引き起こすことはこれまでに報告されていない。

*Kcnq1* 遺伝子は出生後にインプリンティングが消去されるが、*Kcnq1* 遺伝子領域に存在する他の遺伝子群は母方アリルでのみ発現するインプリンティング遺伝子であり、父方アリルにおいてそれらの遺伝子群の発現を制御しているのは *Kcnq1* 遺伝子内より発現する non-coding RNA '*Kcnq1ot1*'であるこ

とが知られている。*Kcnq1* 遺伝子のイントロン 10 にはインプリンティング調節領域である *Kvdmr1* が存在し、*Kcnq1ot1* のプロモーターとして機能している。通常、父方アリルでは各遺伝子群のプロモーター領域に *Kcnq1ot1* が結合することによって、DNA やヒストンをメチル化し、発現を抑制している。一方、母方アリルの *Kvdmr1* 領域は DNA メチル化されていることによって *Kcnq1ot1* の発現は抑制されているため、母方アリルにおいては *Kcnq1* 遺伝子領域の遺伝子群は発現している(図1)。

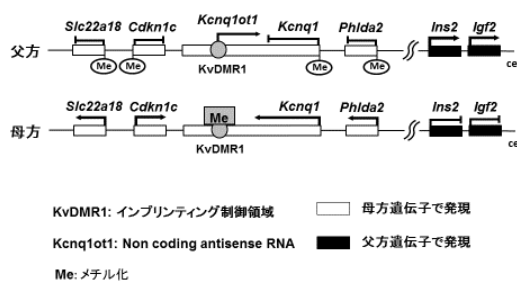
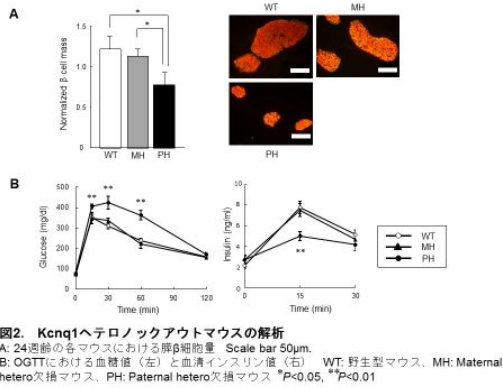


図1 *Kcnq1* 遺伝子領域における発現制御

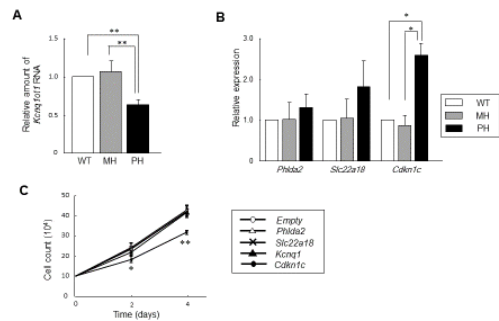
我々は *Kcnq1* 遺伝子領域の変異がインプリンティング遺伝子の発現形式に変化を及ぼす可能性を考え、*Kcnq1* ヘテロ欠損マウスを、父親から変異(ネオマイシン耐性遺伝子)を引き継いだ Paternal hetero 欠損マウス (PH)、母親から変異を引き継いだ Maternal hetero 欠損マウス (MH) および野生型マウス (WT) に分類して再度解析を行った。まず出生時および24週齢における3群間の膵β細胞量を比較検討したところ、興味深いことに PH 群において有意な膵β細胞量減少が認められた。MH 群では WT 群との差を認めなかった。出生後における随時血糖、体重、血清インスリン値においては有意差を認めなかったが、24週齢に OGTT を施行したところ、PH 群において糖負荷後の有意な高血糖と、インスリン分泌の低下が認められた。やはり MH 群と WT 群の間に有意差は認められなかった(図2)。



母方アリルに変異を有する MH では特別な表現型が認められず、父方アリルに変異を有する PH においてのみ膵β細胞量の減少と耐糖能異常が認められたことから、PH の表現型はインプリンティング制御の破綻による可能性が考えられた。Kcnq1 遺伝子領域におけるインプリンティングを制御しているのは Kcnq1ot1 であることから、我々はそれぞれのマウスの膵島における Kcnq1ot1 発現量の検討を行った。その結果、予想通り PH の膵島においてのみ Kcnq1ot1 の発現量減少が認められた。父方アリルにおける Kcnq1ot1 の発現が減少することによって、Kcnq1 locus 遺伝子群の発現抑制が破綻していることが予想される。実際に各群の膵島における Kcnq1 遺伝子群の発現量を検討したところ、それぞれ PH で発現亢進の傾向が認められたが、有意に PH で発現亢進しているのは Cdkn1c のみであった。また、それぞれの分子の発現亢進が膵β細胞量に及ぼす影響について検討するため、各遺伝子(Kcnq1, Phlda2, Slc22a18, Cdkn1c)をマウス膵β細胞株 MIN6 細胞に過剰発現させたところ、Cdkn1c を過剰発現させた細胞群のみ増殖が抑制された。Cdkn1c は cell cycle inhibitor の一つである p57 として知られており、腫瘍細胞の増殖抑制に働くことは知られているが、膵β細胞の増殖抑制においても重要であることが明らかとなった(図3)。

野生型マウスの父方アリルにおいて Kcnq1ot1 が遺伝子発現を抑制するメカニズムに関しては、いくつかの報告が見られる。

Kcnq1ot1 は Kcnq1 locus の遺伝子群のプロモーター領域において、ヒストンメチル化酵素の一つである EZH2 を recruit する機能を担っていることが報告された。EZH2 は H3K27 をメチル化する酵素であり、H3K27 トリメチル化を介して、遺伝子の発現を抑制することが知られている。すなわち、Kcnq1ot1 の発現量が減少することによって EZH2 の Cdkn1c プロモーター領域への移行が阻害されるために、H3K27 トリメチル化



が低下し、遺伝子発現抑制が障害されることが予想される。そこで PH, MH, WT 各マウスの膵島における Cdkn1c プロモーター領域の H3K27 トリメチル化を ChIP アッセイによって検討したところ、PH において有意な H3K27 トリメチル化低下が認められた。また転写の活性化を表す epigenetic mark である H3K9 アセチル化に関しても同様に ChIP アッセイで評価したところ、やはり PH においてのみ有意な H3K9 アセチル化亢進が認められた。これらの結果から、Kcnq1ot1 の発現量減少はヒストン修飾を介して Cdkn1c の発現亢進を促進していると考えられる(図4)。

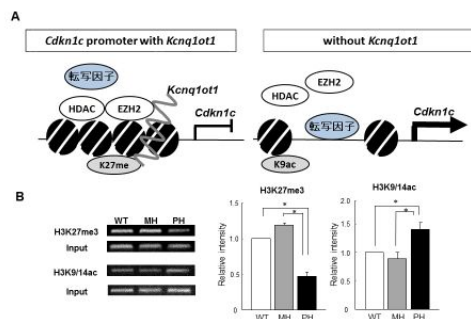


図4. Cdkn1cプロモーター領域におけるヒストン修飾  
 A: Cdkn1cプロモーターにおけるクロマチン構造の制御 HDAC, EZH2: ヒストン修飾酵素  
 B: ChIPアッセイ \*P<0.05

これまでの結果から、PH 群の膵β細胞量減少と耐糖能異常は、膵島における *Kcnq1ot1* の発現低下によるものと考えられる。しかしながら、そもそも *Kcnq1* ノックアウトマウスの *Kcnq1* 遺伝子領域にはネオマイシン耐性遺伝子が挿入されていることから、アーチファクトによる可能性も否定できず、*Kcnq1ot1* 発現低下が直接膵β細胞量を調節しているかどうかに関しては明らかではない。そこで *Kcnq1ot1* promoter の下流に polyadenylation (polyA) を挿入することによって、*Kcnq1ot1* の転写を抑制したマウス (*Kcnq1ot1* truncation マウス) を用いることにした。 *Kcnq1* ヘテロ欠損マウスと同様に、父親から polyA を引き継いだ Truncated Paternal マウス (TP)、母親から polyA を引き継いだ Truncated Maternal マウス (TM) およ

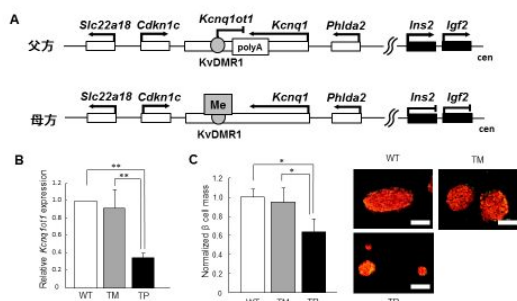


図5. *Kcnq1ot1* truncation マウスの解析  
A: Truncated Paternal マウス (TP) の *Kcnq1ot1* 遺伝子領域におけるコンストラクト  
B: 各マウスの膵島における *Kcnq1ot1* 発現量  
C: 24週齢の各マウスにおける膵β細胞量  
Scale bar 50μm. WT: 野生型マウス. MH: Truncated maternal マウス. PH: Truncated paternal マウス. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01

び野生型マウス (WT) の 3 群に分類して解析を行った。父方アレルにおいて polyA が挿入されたマウス (TP) においてのみ膵β細胞における *Kcnq1ot1* の発現が低下しており、それに伴って出生時および 24 週齢の膵β細胞量も WT, TM と比較して TP においてのみ有意に減少していた (図 5)。24 週齢の膵島における *Cdkn1c* の発現量は TP マウスにおいて有意に増加しており、これにより膵β細胞量が減少していると考えられた。この時点における OGTT では他の 2 つの対照群と比較して TP において有意なインスリン分泌低下と血糖上昇が認められた。

## 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 5 件)

1) Kimura K, Tanida M, Nagata N, Inaba Y, Watanabe H, Nagashimada M, Ota T, **Asahara S**, Kido Y, Matsumoto M, Toshinai K, Nakazato M, Shibamoto T, Kaneko S, Kasuga M, Inoue H. Centra insulin-action activates Kupffer cells by suppressing hepatic vagal activation through nicotinic alpha 7 acetylcholine receptor. **Cell Rep** 査読有 14:2362-2374, 2016

2) **Asahara S**, Etoh H, Inoue H, Teruyama K, Shibutani Y, Ihara Y, Kawada Y, Bartolome A, Hashimoto N, Matsuda T, Koyanagi-Kimura M, Kanno A, Hirota Y, Hosooka T, Nagashima K, Nishimura W, Inoue H, Matsumoto M, Higgins MJ, Yasuda K, Inagaki N, Seino S, Kasuga M, Kido Y. Paternal allelic mutation at the *Kcnq1* locus reduces pancreatic β cell mass via epigenetic modification of *Cdkn1c*. **Proc Natl Acad Sci USA**. 査読有 112(27):8332-8337, 2015

3) Matsuda T, Takahashi H, Mieda Y, Shimizu S, Kawamoto T, Matsuura Y, Takai T, Suzuki E, Koyanagi-Kimura M, **Asahara S**, Bartolome A, Yokoi N, Inoue H, Ogawa W, Seino S, Kido Y. Regulation of pancreatic β cell mass by cross-interaction between CCAAT enhancer binding protein β induced by endoplasmic reticulum stress and AMP-activated protein kinase activity. **PLoS ONE**. 査読有 10:e0130757, 2015

4) Kanno A, **Asahara S**, Masuda K, Matsuda T, Kimura-Koyanagi M, Seino S, Ogawa W, Kido Y. Compensatory hyperinsulinemia in high-fat diet-induced obese mice is associated with enhanced insulin translation in islets. **Biochem Biophys Res Commun**. 査読有 458:681-686,



2015

5) Bartolomé A, Kimura-Koyanagi M, **Asahara S**, Guillén C, Inoue H, Teruyama K, Shimizu S, Kanno A, García-Aguilar A, Koike M, Uchiyama Y, Benito M, Noda T, Kido Y. Pancreatic  $\beta$  cell failure mediated by mTORC1 hyperactivity and autophagic impairment. **Diabetes** 査読有 63:2996-3008, 2014

〔学会発表〕(計 9 件)

1. **Asahara S**

Regulation of pancreatic beta cell mass through type 2 diabetes susceptibility genes. AIBIS 2017、2017.3.4、ソウル(韓国)

2. **Asahara S**

Regulation of pancreatic beta cell mass through type 2 diabetes susceptibility genes. 3<sup>rd</sup> Annual Meeting of Daegyung Diabetes Endocrine Society (Symposium)、2016.11.19. デグ(韓国)

3. **浅原俊一郎**、木戸良明

Regulation of pancreatic beta cell mass through type 2 diabetes susceptibility genes 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会(シンポジウム)、2016.5.20、京都国際会館(京都府)

4. Sugiura Y, **Asahara S**, Kawada Y, Ihara Y, Hara M, Kanno A, Kimura-Koyanagi M, Matsuda T, Seino S, Ogawa W, Kido Y. Histone Deacetylase Regulates Insulin Signaling via Two Pathways in Pancreatic beta cells. 7th AASD Scientific Meeting、2015.11.21、台北(台湾)

5. 原瑞季、**浅原俊一郎**、木戸良明

2 型糖尿病原因遺伝子 Kcnq1 による膵 $\beta$ 細胞量調節機構の解析 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会 2015.11.19、長良川国際会議場(岐阜)

6. **Asahara S**, Ihara Y, Inoue H, Teruyama K, Hara M, Kimura M, Matsuda T, Seino S, Kido Y. Reduction in Pancreatic  $\beta$ -Cell Mass Caused by Enhanced Expression of Cdkn1c via Interaction between C/EBP $\beta$  and Epigenetic Control. 75th Scientific Session of American Diabetes Association. 2015.6.8、ボストン(アメリカ合衆国)

7. 原瑞季、**浅原俊一郎**、伊原佑香、井上裕行、

照山杏子、松田友和、木村真希、中山敬一、木戸良明 膵 $\beta$ 細胞における細胞周期調節因子 p57 の機能解析 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会 2015.5.22、下関(山口県)

8. **浅原俊一郎**、杉浦佑実子、川田有希奈、伊原佑香、原瑞季、木村真希、松田友和、清野進、小川渉、木戸良明 膵 $\beta$ 細胞におけるヒストン脱アセチル化酵素 HDAC の機能解析 第 88 回日本内分泌学会学術総会 2015.4.24、ホテルニューオータニ(東京都)

9. **浅原俊一郎**、伊原佑香、照山杏子、原瑞季、木村真希、松田友和、春日雅人、清野進、小川渉、木戸良明 2 型糖尿病原因遺伝子 Kcnq1 と高脂肪食が膵 $\beta$ 細胞量に及ぼす相乗的効果の検討 第 29 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、2015.2.13、京都大学(京都府)

〔図書〕(計 1 件)

1. **浅原俊一郎**他 診断と治療社 糖尿病学 2016、2016、19-27p

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/fhs-diabetes/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅原 俊一郎(Asahara, Shun-ichiro)  
神戸大学・大学院医学研究科・特命助教  
研究者番号：00570342