

厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

糖尿病に関連した代謝栄養障害の遺伝素因の  
同定と高齢者の栄養指導への応用研究

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 清野 裕

平成13年（2001年）3月

厚生科学研究費補助金  
長寿科学総合研究事業  
目 次

I. 総括研究報告

糖尿病に関連した代謝栄養障害の遺伝素因の同定と高齢者の 栄養指導への応用研究	-----	1
	主任研究者	清野 裕

II. 分担研究報告

1. 糖尿病に関連した代謝栄養障害の遺伝素因の同定と高齢者の 栄養指導への応用研究	-----	7
	京都大学医学研究科病態代謝栄養学	清野 裕
2. 小腸-膵 $\beta$ 細胞枢軸における発現遺伝子のカタログ化とマイクロアレイ 化による糖尿病候補遺伝子群の網羅的解析に関する研究	-----	13
	群馬大学生体調節研究所調節機構部門遺伝情報分野	武田 純

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	15
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	17
-----------------	-------	----

V. 小腸EST情報	-----	45
------------	-------	----

## 【 I 】 総括研究報告

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

総括研究報告書

糖尿病に関連した代謝栄養障害の遺伝素因と高齢者の栄養指導への応用研究

主任研究者 清野 裕 京都大学大学院医学研究科臨床生体統御医学講座教授

研究要旨

高齢者の糖尿病における栄養摂取と血糖コントロールの関連を明らかにし、将来のオーダーメイド栄養処方法の確立を目的とし、以下のような実験を行った。

消化管より分泌される GIP はインスリン分泌に重要な役割を果たす。そこで GIP 受容体ホモ欠損変異マウスを用い、GIP を介した脂質代謝と糖代謝の関係を検討した。GIP シグナルの破綻は糖尿病の病因に一役を担っていることが示唆された。しかし、このシグナルの破綻は高脂肪食によるインスリン分泌の亢進を防止するため、GIP は 2 面の働きが存在することが明らかとなった。

さらに、糖質の最終消化を演じるスクラーゼ・イソマルターゼ (SI) 遺伝子異常とその発現調節につき検討した。日本人糖尿病患者 200 名中 30 名に変異型アリルであることが存在することが明らかになった。さらに若年発症型家族性糖尿病 (MODY) の原因遺伝子である HNF-1 の 15 種の変異型が SI 遺伝子発現に与える影響について検討した。14 種の変異型は正常型と比較して SI 転写活性調節効果は有意に減弱した。これらの遺伝子をマーカーとして行う糖質・脂質摂取の指導法の確立は、高齢者の肥満や食後高血糖の是正をもたらす自立障害の除去の一つの手段となる可能性を示した。

小腸には膵β細胞と類似のグルコース認識機構が存在し、食物摂取によって発生する小腸シグナルによってインスリン分泌が増強される。この両組織の機能連関を知るために、発現遺伝子を EST(expressed sequence tag)として網羅することを試みた。当該年度は、ヒト小腸、ヒトインスリンノーマ EST パネルを完成させた。ヒト正常膵ラ氏島 EST と併せて、ヒト「膵β細胞-小腸枢軸」の EST パネルが完成された。次いでこれらの EST を用いて、DNA マイクロアレイ実験の基礎条件の設定を行っている。

分担研究者 武田 純  
群馬大学生体調節研究所  
遺伝子情報分野 教授

## A. 研究目的

小腸は、食物の消化吸収の主たる場であるとともにインスリン分泌促進シグナルを膵β細胞に伝える機能を持ち、糖代謝・血糖調節システムの重要な構成組織である。そこで、高齢者の糖尿病における栄養摂取と血糖コントロールの関連を明らかにし、将来のオーダーメイド栄養処方の確立を目的とし、初年度分として3種の実験を行った。

①(1)GIP 受容体ノックアウトマウスを作製し、その機能を解析した。(2)GIP 受容体ホモ欠損変異マウスに高脂肪食を3週間負荷し、食餌負荷後の血糖曲線及びインスリン分泌を検討した。

②α-グルコシダーゼ阻害剤は長期間において糖尿病のコントロールに有用な効果をもたらす。このことからα-グルコシダーゼが糖尿病の発症、および進展に関与していることが示唆される。また、日本人は欧米人に比べて糖質中心の食生活であることと、2型糖尿病の頻度が高いことの間には何らかの関連があると思われる。そこで我々はα-グルコシダーゼのひとつであるスクラーゼ・イソマルターゼ(SI)遺伝子の発現調節に関する遺伝的素因を検索し、その分布とSI遺伝子の発現におよぼす影響を検討した。一方、若年発症型家族性糖尿病(MODY)の原因遺伝子であるHNF-1は、肝、膵、小腸、腎などに発現する転写調節因子であるが、小腸におけるHNF-1の機能に関する研究は少なく未だ不明な点が多い。そこで、HNF-1がSI遺伝子の5'上流に結合する(Biochem J; 336:

115-123, 1998)ことに注目し、HNF-1の正常型および15種の変異型がSI遺伝子の発現に与える影響について検討した。

③ヒトおよび実験モデル動物(ラットとマウス)の小腸-膵β細胞軸の発現遺伝子をEST(expressed sequence tag)として網羅し、まずDNAマイクロアレイ解析の研究基盤を構築する。次いで、同アレイと種々の栄養、薬剤を負荷したモデル動物由来のmRNAを用いて、候補遺伝子プールを作成し、SNP(single nucleotide polymorphism)マーカーを獲得して遺伝子診断ツールを開発する。

## B. 研究方法

①(1)我々が作成したGIP受容体ホモ欠損変異マウスを用い、栄養成分を変えた餌にて飼育した。(2)血糖値、血中インスリン値を測定し、GIPを介した脂質代謝と糖代謝の関係を検討した。(3)消化管シグナルが消失した状態(GIP受容体ホモ欠損変異マウス)での代謝状態と正常コントロールを比較検討した。

②(1)SIの5'上流およびエクソン1にプライマーを設定し、2型糖尿病患者40名を対象にPCR-SSCP法により遺伝子変異を検索した。(2)(1)によって得られた各泳動パターンについて塩基配列を決定した。(3)2型糖尿病患者100名および正常コントロール群100名を対象にPCR-SSCP法によって変異保有頻度を検討した。(4)SI上流の1244bpおよびエクソン1の46bpを含むルシフェラーゼ発現ベクターを各遺伝子型について作製し、CHO細胞にトランジェントに遺伝子導入し

、その細胞溶解液をルミノメーターを用いて転写活性を測定した。(5) HNF-1 $\alpha$ の正常型と13種の変異型(L12H, R13W, K158Q, R159Q, R200Q, R203C, R229X, V233L, A239V, R271G, R272H, P379fsdel, T539fsdelC)およびHNF-1 $\beta$ の正常型と2種の変異型(R177X, A263fsinsGG)の翻訳領域全長をpCMV6bベクターに組み込んだ発現プラスミドを作成しCHO細胞またはCaco-2細胞にリポフェクション法を用いてトランジェントに遺伝子導入し、その細胞溶解液をルミノメーターを用いて転写活性を測定した。

### ③ESTクローンの大規模収集

ヒト小腸マウスMIN6 mRNAを用いてそれぞれプラスミドcDNAライブラリーを作成した。ラット正常脾ラ氏島およびRIN細胞のmRNAに関しては、ラムダZAPII XRベクターを用いて一方向性ライブラリーを作成した。ラムダファージライブラリーに関しては、in vivo excision法によりphagemidに変換した後、LB-Ampアガロースプレート上にクローンを生育させた。プレートから無作為にクローンを選択し、cycle sequencing法により両端から部分塩基配列(EST)を決定した。得られたESTmはNCBIのデータベースに電送し、BLAST(BLASTXとBLASTN)プログラムを用いてホモロジーサーチを行った。

(倫理面への配慮)

本研究は本学の倫理委員会に内容を報告し承認されたものであり、検体提供者に十分な説明を行い承諾を得られた者のみより検体の

採取を行った、また検体の採取法は静脈よりの少量の採血のみであり危険性の極めて少ない方法であると考えられる。さらに匿名化の検体を保存しており、研究目的以外の用途での利用は行わない。

実験動物への配慮に関しても「実験動物の飼育および保管に関する基準」(総理府告示第6号)の要件を満たすよう動物実験を実施した。

### C. 研究結果

①(1) GIP受容体ホモ欠損変異マウスは腹腔内グルコース負荷後の耐糖能は対照と差を認めないのに対し、経口グルコース負荷後には著明な耐糖能障害を示した。(2)野生型マウスでは、通常食群、高脂肪食群ともに耐糖能に差はなく、インスリン分泌は高脂肪食群において亢進していた。(3)GIP受容体ホモ欠損変異マウスでは、高脂肪食群で耐糖能は低下したがより増悪は認められず、インスリン分泌の亢進も見られなかった。

②(1) PCR-SSCP法により3種類の泳動パターンが認められた。(2)塩基配列を決定したところ、エクソン1より上流59bpのGがAに置換している1塩基置換(SNP)が発見された。(3)2型糖尿病患者と正常コントロール群では変異保有頻度に有意な差は認められなかった(17 vs 13%)。しかし、ホモ変異保有者は2型糖尿病患者でのみ認められた(3名)。(4)変異型では正常型に比べて転写活性が約1.5倍の高値を示した。(5)CHO細胞において正常HNF-1導入群はSI上流の転写活性をベクタープラスミドのみを

もちいた群に比し約 1/15 に( $p < 0.001$ )抑制した。また Caco-2 細胞において正常 HNF-1 導入群はベクタープラスミドのみをもちいた群に比し転写活性を 10 倍に( $p < 0.001$ )促進した。HNF-1 の変異型を用いた検討では、CHO 細胞において L12H, T539fsdel を除く 13 種の変異型は正常型と比較して SI 転写活性抑制効果が有意に減弱した。Caco-2 細胞において L12H を除く 14 種の変異型は正常型と比較して SI 転写活性促進効果は有意に減弱した。

③ヒト小腸 EST に関しては、11,762 個を集積しパネル化を完了した。ヒト正常豚ラ氏島およびインスリノーマ腫瘍由来の EST も含めて、ヒトの EST 計画は当初の予定通り完了した。現在、ラット正常豚ラ氏島、マウス正常豚ラ氏島、マウスインスリン産生細胞 MIN6-m9 の EST 収集が進行中であり、次年度の前半にて終了を見込んでいる。

#### D. 考察

GIP 受容体ホモ欠損変異マウスでの結果より、経口負荷後に GIP がインクレチンとしてインスリン分泌に関与することが確認され、生体内糖代謝調節因子として重要であることが明らかになった。さらに GIP 受容体ホモ欠損変異マウスの成績から、GIP 欠如はインスリン分泌の不足により耐糖能低下を招くが、GIP 分泌の亢進は高インスリン血症や肥満を招く、GIP の 2 面作用が認められ、GIP 分泌に重要な脂肪摂取の適正化の重要性が示された。

SI 遺伝子の発現調節領域に変異が存在し、

転写活性を亢進させることが認められた。このことから遺伝素因の一つとして  $\alpha G$  の発現が亢進し、これが糖尿病の成因や病態に役割を果たしている可能性が示唆された。また HNF-1 は、SI 転写活性の調節機能を持つこと、この調節効果は細胞特異的であり、発現増強、減弱どちらにも働き得ると思われた、さらに HNF-1 変異型は、正常型に比しその機能が減弱することも認めた。これらの遺伝子変異は  $\alpha$ -グルコシダーゼ発現調節の異常を介して、糖尿病の病態に重要な役割を果たしている可能性が示唆され、これらの遺伝子異常を持つものに対する適正な糖質摂取の指導が重要と思われた。

インクレチン作用とその病態を理解するためには、インクレチン信号の受信に関与する豚  $\beta$  細胞遺伝子群と、その信号の受信に関与する豚  $\beta$  細胞遺伝子群を先ず網羅することが重要であるが、その段階は完了した。共通発現遺伝子をこれらのプールから選別することは、候補遺伝子を濃縮する上で重要である。現在進行中である実験動物 EST が完了すれば、既に作成された遺伝子発現動物および遺伝子欠失動物を用いて、さらに高次の候補を獲得することが可能となる。この段階は次年度の前半で達成される。ヒトゲノム計画が終了したことから、診断に有用な SNP を得ることは困難なことではないので、次年度以降の SNP マーカーによる遺伝子診断法の確立が期待される。

#### E. 結論

生体では脂肪や炭水化物が GIP 分泌を促進

し、この GIP が付加的なインスリン分泌を亢進するが、過度の GIP 分泌は高インスリン血症や肥満を招く。従って GIP シグナルは糖尿病や肥満の病因に一役を担っており GIP 分泌を規定する適切な糖質や脂質量の決定が重要であることが明かとなった。

日本人に比較的高頻度に存在する SNP を S I 遺伝子の転写調節領域に発見した。この変異により  $\alpha$ G の発現が亢進し、糖代謝に影響を与えている可能性が示唆された。さらにさらに HNF-1 変異遺伝子は、正常型に比しその機能が減弱しておりこれが  $\alpha$ G の転写調節異常を介して糖尿病の進展に役割を果たしている可能性が示唆された。これらの遺伝子異常を持つものに対する適正な糖質摂取の指導が重要であることが明かとなった。

ヒト小腸 EST のパネルは完成した。実験動物（ラットとマウス）の EST も近く完了予定であり、DNA マイクロアレイを作成するための分子資源の準備は順調に進んでいる。

これらの遺伝子マーカーをもちいてオーダーメイドの栄養処方を行うことは効率的に高齢者の肥満や食後高血糖の是正をもたらす自律障害の除去の一つの手段となる可能性を示した。

#### F. 健康危険情報

栄養シグナルと連動するインスリン分泌シグナルに関連するマーカーが獲得されれば、高齢者において負担の少ない予防的診断法が開発される。その結果、健康危険マーカーを有する個人に対しては、固有の栄養指導を試み





## 【Ⅱ】分担研究報告

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

糖尿病に関連した代謝栄養障害の遺伝素因と高齢者の栄養指導への応用研究

主任研究者 清野 裕 京都大学大学院医学研究科臨床生体統御医学講座教授

研究要旨

高齢者の糖尿病における栄養摂取と血糖コントロールの関連を明らかにし、将来のオーダーメイド栄養処方 の確立を目的とし、初年度分として 2 種の実験を行い、以下のような結果を得た。

①食事における栄養の構成は環境因子として糖尿病の成因のひとつとなる。消化管より分泌される GIP はインスリン分泌に重要な役割を果たし、GIP 分泌は脂肪や糖質など栄養素の経口摂取によって調節される。そこで我々は GIP 受容体ホモ欠損変異マウスを用い、GIP を介した脂質代謝と糖代謝の関係を検討した。GIP 受容体ホモ欠損変異マウスでは耐糖能の悪化と共に経口ブドウ糖負荷時のインスリン分泌は低下した。さらに高脂肪食を 3 週間負荷した。野生型マウスでは、通常食群、高脂肪食群ともに耐糖能に差はなく、インスリン分泌は高脂肪食群において亢進していた。GIP 受容体ホモ欠損変異マウスでは、高脂肪食群で耐糖能は低下するも増悪は示さず、インスリン分泌の亢進も見られなかった。インスリン抵抗性は代償され糖の恒常性が保たれている。GIP シグナルの破綻は糖尿病の病因に一役を担っていることが示唆された。しかし、このシグナルの破綻は高脂肪食によるインスリン分泌の亢進を防止するため、GIP は 2 面の働きが存在することが明かとなった。

②糖尿病と糖質の消化に注目し、糖質の最終消化を演じる  $\alpha$ -グルコシダーゼの遺伝子異常とその発現調節につき検討した。日本人 200 名について  $\alpha$ -グルコシダーゼの主要なコンポーネントであるスクラーゼ・イソマルターゼ (SI) 遺伝子の変異の有無を検討した。PCR-SSCP による SI 遺伝子変異の検討にて 200 名中 30 名に異なった泳動像がみられ、直接シーケンス法にて転写開始部より 59 塩基上流の G が A に置換したアリルであることが明らかになった。この変異型では正常型に比べて SI 転写活性が約 1.5 倍の高値を示した。さらに若年発症型家族性糖尿病 (MODY) の原因遺伝子である HNF-1 の正常型および 15 種の変異型が SI 遺伝子の発現に与える影響について検討した。CHO 細胞において L12H, T539fsdel を除く 13 種の変異型は正常型と比較して SI 転写活性抑制効果が有意に減弱した。Caco-2 細胞において L12H を除く 14 種の変異型は正常型と比較して SI 転写活性促進効果は有意に減弱した。これらの遺伝子変異は  $\alpha$ -グルコシダーゼ発現調節の異常を介して、糖尿病の病態に重要な役割を果たしている可能性がある。

これらの遺伝子異常を持つものに対する適正な糖質・脂質摂取の指導法の確立は、高齢者の肥満や食後高血糖の是正をもたらす自律障害の除去の一つの手段となる可能性を示した。

A. 研究目的

小腸は、食物の消化吸収の主たる場であるとともにインスリン分泌促進シグナルを膵

$\beta$ 細胞に伝える機能を持ち、糖代謝・血糖調節システムの重要な構成組織である。そこで、高齢者の糖尿病における栄養摂取と血糖コ

ントロールの関連を明らかにし、将来のオーダーメイド栄養処方の確立を目的とし、初年度分として2種の実験を行った。

①(1)GIP 受容体ノックアウトマウスを作製し、その機能を解析した。(2)GIP 受容体ホモ欠損変異マウスに高脂肪食を3週間負荷し、食餌負荷後の血糖曲線及びインスリン分泌を検討した。

② $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤は長期間において糖尿病のコントロールに有用な効果をもたらす。このことから $\alpha$ -グルコシダーゼが糖尿病の発症、および進展に関与していることが示唆される。また、日本人は欧米人に比べて糖質中心の食生活であることと、2型糖尿病の頻度が高いことの間には何らかの関連があると思われる。そこで我々は $\alpha$ -グルコシダーゼのひとつであるスクラーゼ・イソマルターゼ(SI)遺伝子の発現調節に関する遺伝的素因を検索し、その分布とSI遺伝子の発現におよぼす影響を検討した。一方、若年発症型家族性糖尿病(MODY)の原因遺伝子であるHNF-1は、肝、膵、小腸、腎などに発現する転写調節因子であるが、小腸におけるHNF-1の機能に関する研究は少なく未だ不明な点が多い。そこで、HNF-1がSI遺伝子の発現に結合する(Biochem J; 336: 115-123, 1998)ことに注目し、HNF-1の正常型および15種の変異型がSI遺伝子の発現に与える影響について検討した。

## B. 研究方法

①(1)我々が作成した GIP 受容体ホモ欠損変

異マウスを用い、栄養成分を変えた餌にて飼育した。(2)血糖値、血中インスリン値を測定し、GIP を介した脂質代謝と糖代謝の関係を検討した。(3)消化管シグナルが消失した状態(GIP 受容体ホモ欠損変異マウス)での代謝状態と正常コントロールを比較検討した。

②(1)SIの5'上流およびエクソン1にプライマーを設定し、2型糖尿病患者40名を対象にPCR-SSCP法により遺伝子変異を検索した。(2)(1)によって得られた各泳動パターンについて塩基配列を決定した。(3)2型糖尿病患者100名および正常コントロール群100名を対象にPCR-SSCP法によって変異保有頻度を検討した。(4)SI上流の1244bpおよびエクソン1の46bpを含むルシフェラーゼ発現ベクターを各遺伝子型について作製し、CHO細胞にトランジェントに遺伝子導入し、その細胞溶解液をルミノメーターを用いて転写活性を測定した。(5)HNF-1 $\alpha$ の正常型と13種の変異型(L12H, R13W, K158Q, R159Q, R200Q, R203C, R229X, V233L, A239V, R271G, R272H, P379fsdel, T539fsdelC)およびHNF-1 $\beta$ の正常型と2種の変異型(R177X, A263fsinsGG)の翻訳領域全長をpCMV6bベクターに組み込んだ発現プラスミドを作成しCHO細胞またはCaco-2細胞にリポフェクション法を用いてトランジェントに遺伝子導入し、その細胞溶解液をルミノメーターを用いて転写活性を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は本学の倫理委員会に内容を報告し

承認されたものであり、検体提供者に十分な説明を行い承諾を得られた者のみより検体の採取を行った、また検体の採取法は静脈よりの少量の採血のみであり危険性の極めて少ない方法であると考えられる。さらに匿名化のち検体を保存しており、研究目的以外の用途での利用は行わない。

実験動物への配慮に関しても「実験動物の飼育および保管に関する基準」（総理府告示第6号）の要件を満たすよう動物実験を実施した。

#### C. 研究結果

①(1) GIP 受容体ホモ欠損変異マウスは腹腔内グルコース負荷後の耐糖能は対照と差を認めないのに対し、経口グルコース負荷後には著明な耐糖能障害を示した。(2)野生型マウスでは、通常食群、高脂肪食群ともに耐糖能に差はなく、インスリン分泌は高脂肪食群において亢進していた。(3)GIP 受容体ホモ欠損変異マウスでは、高脂肪食群で耐糖能は低下したがより増悪は認められず、インスリン分泌の亢進も見られなかった。

② (1) PCR-SSCP 法により 3 種類の泳動パターンが認められた。(2)塩基配列を決定したところ、エクソン 1 より上流 59bp の G が A に置換している 1 塩基置換 (SNP) が発見された。(3) 2 型糖尿病患者と正常コントロール群では変異保有頻度に有為な差は認められなかった (17 vs 13 %)。しかし、ホモ変異保有者は 2 型糖尿病患者でのみ認められた (3 名)。(4) 変異型では正常型に比べて転写活性が約 1.5 倍の高値を示した。(5) ①

CHO 細胞において正常 HNF-1 導入群は SI 上流の転写活性をベクタープラスミドのみをもちいた群に比し約 1/15 に ( $p < 0.001$ ) 抑制した。また Caco-2 細胞において正常 HNF-1 導入群はベクタープラスミドのみをもちいた群に比し転写活性を 10 倍に ( $p < 0.001$ ) 促進した。②HNF-1 の変異型を用いた検討では、CHO 細胞において L12H, T539fsdel を除く 13 種の変異型は正常型と比較して SI 転写活性抑制効果が有意に減弱した。Caco-2 細胞において L12H を除く 14 種の変異型は正常型と比較して SI 転写活性促進効果は有意に減弱した。

#### D. 考察

GIP 受容体ホモ欠損変異マウスでの結果より、経口負荷後に GIP がインクレチンとしてインスリン分泌に関与することが確認され、生体内糖代謝調節因子として重要であることが明らかになった。さらに GIP 受容体ホモ欠損変異マウスの成績から、GIP 欠如はインスリン分泌の不足により耐糖能低下を招くが、GIP 分泌の亢進は高インスリン血症や肥満を招く、GIP の 2 面作用が認められ、GIP 分泌に重要な脂肪摂取の適正化の重要性が示された。

SI 遺伝子の発現調節領域に変異が存在し、転写活性を亢進させることが認められた。このことから遺伝素因の一つとして  $\alpha G$  の発現が亢進し、これが糖尿病の成因や病態に役割を果している可能性が示唆された。また HNF-1 は、SI 転写活性の調節機能を持つこと

、この調節効果は細胞特異的であり、発現増強、減弱どちらにも働き得ると思われた、さらに HNF-1 変異型は、正常型に比しその機能が減弱することも認めた。これらの遺伝子変異は  $\alpha$ -グルコシダーゼ発現調節の異常を介して、糖尿病の病態に重要な役割を果たしている可能性が示唆され、これらの遺伝子異常を持つものに対する適正な糖質摂取の指導が重要と思われた。

#### E. 結論

生体では脂肪や炭水化物が GIP 分泌を促進し、この GIP が付加的なインスリン分泌を亢進するが、過度の GIP 分泌は高インスリン血症や肥満を招く。従って GIP シグナルは糖尿病や肥満の病因に一役を担っており GIP 分泌を規定する適切な糖質や脂質量の決定が重要であることが明かとなった。

日本人に比較的高頻度に存在する SNP を S I 遺伝子の転写調節領域に発見した。この変異により  $\alpha$ G の発現が亢進し、糖代謝に影響を与えている可能性が示唆された。さらにさらに HNF-1 変異遺伝子は、正常型に比しその機能が減弱しておりこれが  $\alpha$ G の転写調節異常を介して糖尿病の進展に役割を果たしている可能性が示唆された。これらの遺伝子異常を持つものに対する適正な糖質摂取の指導が重要であることが明かとなった。

これらの遺伝子マーカーをもちいてオーダーメイドの栄養処方を行うことは効率的に高齢者の肥満や食後高血糖の是正をもたらす自律障害の除去の一つの手段となる可能性を示

した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Synergistic effect of polymorphisms of uncoupling protein 1 and  $\beta$ 3-adrenergic receptor genes on autonomic nervous system activity.

N. Shihara, Y. Seino et. al. Int. J. Obes. (in press)

2) Wortmannin, PI3-kinase inhibitor: Promoting effect on insulin secretion from pancreatic beta cells through a cAMP-dependent pathway.

K. Nunoi, Y. Seino et. al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 270, 798-805 2000

3) The association between Trp64Arg polymorphism of the  $\beta$ 3-adrenergic receptor and autonomic nervous activity. N. Shihara, Y. Seino et. al.

J. Clin. Endocrinol & Metab 84(5): 1623-1627 1999

4) Disordered expression of the sucrase-isomaltase complex in the small intestine in otsuka long-evans tokushima fatty rats, a model of non-insulin-dependent diabetes mellitus with insulin resistance. Adachi T, Seino Y et. al.

Biochim Biophys Acta 1426(1):126-32  
1999

5) Glucose intolerance caused by a defect  
in the entero-insular axis: a study in  
gastric inhibitory polypeptide receptor  
knockout mice.

K. Miyawaki, Y. Seino, et. al.

Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A.96(26),  
14843-7 1999

## 2.学会発表

第71回日本内分泌学会学術総会

1)GIP 受容体ノックアウトマウスにおけるイ  
ンスリン分泌異常(シンポジウム2-(3))

宮脇一真、清野裕 他

日本内分泌学会雑誌,第75巻,第1号,17.  
2000

第21回日本肥満学会学術総会

GIP 受容体と肥満(S-II-2)

山田祐一郎、清野裕 他

日本肥満学会誌 Supple.6 52 2000

第43回日本糖尿病学会年次学術集会

1)GIP シグナルを介した糖代謝と脂質代謝の  
互用 (II-4-15)

宮脇一真、清野裕 他

糖尿病43 Suppl.1 S-176 2000

2)スクラーゼ・イソマルターゼ遺伝子変異と

その発現調節に及ぼす影響 (I-A-27)

志原伸幸、清野裕 他

糖尿病43 Supple.1 S-107 2000

3)2型糖尿病モデルGKラットのVogli

bos長期投与による食後過血糖抑制作用 (

I-D-01)

足達哲也、清野裕 他

糖尿病43 Supple.1 S-117 2000

4)肥満関連遺伝子変異と自律神経活動

(II-5-15)

安田浩一郎、清野裕 他

糖尿病43 Supple.1 S-181 2000

H.知的所有権の取得状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし





厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）分担研究報告書

「小腸—膵β細胞軸における発現遺伝子のカタログ化とマイクロアレイ化による糖尿病候補遺伝子群の網羅的解析」

分担研究者： 武田 純 群馬大学生体調節研究所  
調節機構部門遺伝情報分野 教授

研究要旨：

小腸には膵β細胞と類似のグルコース認識機構が存在し、食物摂取によって発生する小腸シグナルによってインスリン分泌が増強される。この両組織の機能連関を知るために、発現遺伝子を EST (expressed sequence tag) として網羅することを試みた。ヒト正常膵ラ氏島遺伝子の EST 化は前年度までに既に終了している。当該年度は、ヒト小腸、ヒトインスリノーマ、ラット正常膵ラ氏島、ラットインスリン産生細胞株 RIN、マウスインスリン産生細胞株 MIN6-m9 の EST 化を平行して遂行し、先ずヒト小腸とヒトインスリノーマ EST パネルを完成させた。ヒト正常膵ラ氏島 EST と併せて、ヒト「膵β細胞—小腸軸」の EST パネルが完成された。次いでこれらの EST を用いて、DNA マイクロアレイ実験の基礎条件の設定を行っている。

A. 研究目的

本邦の2型糖尿病は「やせ型インスリン分泌不全」を特徴とし、欧米人の肥満型インスリン抵抗性とは成因が異なる。従って、従来の糖尿病研究は「膵β細胞」と「末梢組織（筋、脂肪）」の2極を中心として展開されてきた。小腸には膵β細胞と類似のグルコース認識機構が存在し、食物摂取によって発生する小腸シグナルによってインスリン分泌が増強される（インクレチン効果）。分担者は、高齢糖尿病患者においてインクレチン機能が減弱している事実と家族性の単因子遺伝の糖尿病の解析結果から、「小腸」が糖尿病関連組織としての第3極として重要であることを新たに提起した。食後に発せられる「小腸シグナル」

を分子レベルで解読することは、食事療法の効果に対する個人差を識別できる遺伝子ツールの開発につながる。本研究では、ヒトおよび実験モデル動物（ラットとマウス）の小腸—膵β細胞軸の発現遺伝子を EST (expressed sequence tag) として網羅し、先ず DNA マイクロアレイ解析の研究基盤を構築する。次いで、同アレイと種々の栄養、薬剤を負荷したモデル動物由来の mRNA を用いて、候補遺伝子プールを作成し、SNP (single nucleotide polymorphism) マーカーを獲得して遺伝子診断ツールを開発する。

B. 研究方法

EST クローンの大規模収集

ヒト小腸マウス MIN6 mRNA を用いてそれぞれプラスミド cDNA ライブラリーを作成した。ラット正常膵ラ氏島および RIN 細胞の mRNA に関しては、ラムダ ZAPII XR ベクターを用いて一方向性ライブラリーを作成した。ラムダファージライブラリーに関しては、in vivo excision 法により phagemid に変換した後、LB-Amp アガロースプレート上にクローンを生育させた。プレートから無作為にクローンを選択し、cycle sequencing 法により両端から部分塩基配列 (EST) を決定した。得られた EST は NCBI のデータベースに電送し、BLAST (BLASTX と BLASTN) プログラムを用いてホモロジーサーチを行った。

#### C. 研究結果

ヒト小腸 EST に関しては、11,762 個を集積しパネル化を完了した。ヒト正常膵ラ氏島およびインスリノーマ腫瘍由来の EST も含めて、ヒトの EST 計画は当初の予定通り完了した。現在、ラット正常膵ラ氏島、マウス正常膵ラ氏島、マウスインスリン産生細胞 MIN6-m9 の EST 収集が進行中であり、次年度の前半にて終了を見込んでいる。

#### D. 考察

インクレチン作用とその病態を理解するためには、インクレチン信号の発信に関与している小腸遺伝子群と、その信号の受信に関与する膵β細胞遺伝子群を先ず網羅することが重要であるが、その段階は完了した。共通発現遺伝子をこれらのプールから選別することは、候補遺伝子を濃縮する上で重要である。現在

進行中である実験動物 EST が完了すれば、既に作成された遺伝子過剰発現動物および遺伝子欠失動物を用いて、さらに高次の候補を獲得することが可能となる。この段階は次年度の前半で達成される。ヒトゲノム計画が終了したことから、診断に有用な SNP を得ることは困難なことではないので、次年度以降の SNP マーカーによる遺伝子診断法の確立が期待される。

#### E. 結論

ヒト小腸 EST のパネルは完成した。実験動物 (ラットとマウス) の EST も近く完了予定であり、DNA マイクロアレイを作成するための分子資源の準備は順調に進んでいる。

#### F. 健康危険情報

栄養シグナルと連動するインスリン分泌シグナルに関連するマーカーが獲得されれば、高齢者において負担の少ない予防的診断法が開発される。その結果、健康危険マーカーを有する個人に対しては、固有の栄養指導を試みることが可能となる。

#### G. 研究発表・知的財産権の出願・登録状況

これらのヒト小腸 EST (報告書内に添付) は DDBJ (DNA Database of Japan) に登録中である。実験動物の EST も完了次第登録し、データベース (dbEST) 上で公開する予定である。これらの EST 配列および関連する遺伝子情報 (SNP など) は広く一般に公開し、すべての研究者が入手可能とする。

### 【Ⅲ】 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
K. Nunoi, Y. Seino 他	PI3-kinase inhibitor: Promoting effect on insulin secretion from pancreatic beta cells through a cAMP-dependent pathway.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	270	798-805	2000
N. Shihara, Y. Seino 他	The association between Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor and autonomic nervous activity.	J.Clin.Endocrinol & Metab	84(5)	1623-1627	1999
T. Adachi, Y. Seino 他	Disordered expression of the sucrase-isomaltase complex in the small intestine in Otsuka-Long-Evans Tokushima fatty rats, a model of non-insulin dependent diabetes mellitus with insulin resistance.	Biochim. Biophys. Acta.	1426	126-132	1999
K. Miyawaki, Y. Seino 他	Glucose intolerance caused by a defect in the entero-insular axis: a study in gastric inhibitory polypeptide receptor knockout mice.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	96(26)	14843-837	1999