

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13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 清野 裕

平成14(2002)年4月

目 次

I. 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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 9
京都大学医学研究科病態代謝栄養学 清野 裕
2. 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・・・・・・・・ 15

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・ 17

IV. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 19

V. ラット EST パネル情報・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 75

【 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の確立を目的とし H13 年度分として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 3 種のダブルノックアウトマウス（GIP 受容体+GLP1 受容体、GIP 受容体+Kir6.2 および GIP 受容体+IRS1）の作製した。3 種のダブルノックアウトマウスおよび各々の単独欠損変異マウスを用いて経口ブドウ糖負荷試験を行いその耐糖能を比較したところダブルノックアウトマウスにおいて血糖値が頂値となる負荷後 30 分値が有意に高値を示し、異なった 3 種の耐糖能障害すべてにおいて GIP を介する消化管シグナルの欠如が病態を増悪させることを確認した。次いで、小腸において糖質の最終消化を演じるマルターゼ遺伝子のクローニングを行いその遺伝子多型の検索を行った。2 つの連関の強い多型が転写調節域に存在すること、さらに、その発現頻度が日本人に多いこと（アリル頻度は 53%）を発見した。さらに、遺伝性肥満糖尿病ラットである OLETF ラットを用いて糖代謝異常と抗重力筋であるヒラメ筋の筋繊維組成の関係を経時的に観察した。糖尿病ラットにおいて著明な高酸化性繊維の減少を認めた。

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) として網羅する計画を遂行している。前年度に、先ず「膵β細胞—小腸軸」のヒト EST パネルを完成した。当該年度は、ラット正常膵島と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 の EST 化を平行して遂行し、ラット EST パネルを完成させた。これらの EST はクラスタリング解析によって分類された後、マイクロアレイ化されて発現プロファイルの解析に供される。

以上の研究により得られた疾患モデルや遺伝子マーカーを用いることにより病態に応じた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ことが期待される。

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場である。これらのシステムは加齢と共に機能低下することが知られている。また骨格筋はインスリン作用発現の場であり、加齢と共にその量は減少するため高齢者の運動能力の維持は、生活の自立と密接に関わっている。そこで、これら的高齢者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、高齢者特有の栄養処方の確立を目的とし、H13年度分として4種の実験を行った。

①初年度に作製した GIP 受容体ノックアウトマウスに異なったタイプの耐糖能障害を示す3種の他のノックアウトマウス (GIP 同様小腸より分泌されるインスリン分泌促進因子である GLP1 の受容体欠損マウス、ブドウ糖に対するインスリン分泌応答の key となる ATP 感受性カリウムチャンネル (Kir6.2) 欠損マウスおよび末梢におけるインスリン作用の key となるインスリン受容体基質 (IRS1) 欠損マウス) を交配し3種のダブルノックアウトマウスを作製し小腸シグナルが異なったタイプの糖尿病状態においていかなる役割を演ずるかを評価した。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、更に空腹時血糖に比し食後血糖の上昇がより顕著である2型糖尿病の頻度が高いこと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-グルコシダーゼの主要な構成酵素の一つであるヒトマルターゼ遺伝子のクローニングを行い、その多型の検索を行った。

③高齢者の自立の重要な阻害因子に筋力低下や体重増加に伴う起立、歩行障害が挙げられる。そこで遺伝性肥満糖尿病ラットである OLETF ラットを用いて糖代謝異常、体重変化と抗重力筋であるヒラメ筋の筋繊維組成の関係を経時的に観察した。

④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 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 マーカーを獲得して遺伝子診断ツールを開発する。初年度は、ヒト EST パネルを完成させた。次年度は、実験動物の解析のためにラットとマウスの EST 収集を集中して行い、ラットの収集を完了させた。

B. 研究方法

①(1)我々が作成した GIP 受容体欠損変異マウスを用い、これを GLP1 欠損マウス、Kir6.2 欠損マウスおよび IRS1 欠損マウスを交配しダブルノックアウトマウスを作製した。(2)作製したダブルノックアウトマウスを用いて経口ブドウ糖負荷試験を行い耐糖能を評価し

た。

② (1) P1 クローニングベクターを用いたヒトゲノムライブラリーより、以下のプライマーペア (sense: agccatttctggcaatgagac /antisense: tcgatatagctccacttggc) を用いてマルターゼ遺伝子をクローニングし、それよりエクソンイントロン配列および 5'上流の配列を決定した。(2) 5'上流域にプライマーを設定し、日本人 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。

(3) (2)によって得られた各泳動パターンについて直接シーケンス法により塩基配列を決定した。

③(1)自由摂食下の 5、9、21 週齢の OLET フラットおよびコントロールである LETO フラット (各 n=6) より採血後、ヒラメ筋を摘出し湿重量を測定した。得られたサンプルを用いて血中 IRI および血糖を測定した。(2) (1)のヒラメ筋を用いて組織標本を作製し筋線維数を算出した。また酵素組織化学的方法 (ATPase 法) にて fiber type の分類をした。

④ラット EST クローンの大規模収集

初年度に、既にラット正常膵島とインスリン産生細胞株 (RIN) 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。インサートはベクターに一方方向性に挿入されている。in vivo excision 法により、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、両端から部分塩基配列を決定した。マウス EST 収集作業も平行して行っている。得られた EST は BLAST プログラムを用いてホモロ

ジー検索を行った。

(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)3 種のダブルノックアウトマウス (GIP 受容体+GLP1 受容体、GIP 受容体+Kir6.2 および GIP 受容体+IRS1) の作製に成功し、サザン法にて遺伝子型を確認した。(2) 3 種のダブルノックアウトマウスおよび各々の単独欠損変異マウスをもちいて経口ブドウ糖負荷試験を行いその耐糖能を比較したところダブルノックアウトマウスにおいて血糖値が頂値となる負荷後 30 分値が他のノックアウトマウスに比し、有意に高値を示し、異なった 3 種の耐糖能障害すべてにおいて GIP を介する消化管シグナルの欠如が病態を増悪させることを確認した。

② (1) 既報の cDNA 配列 (AF016833) の 5' 上流 2600bp の配列を決定した。スタートサイトより 1086bp 上流に TATAbox 様の配列が認められた。(2) PCR-SSCP 法により 5'

上流域約 2000bp の間に 2 箇所が多型が認められた。(3) 直接シーケンス法により塩基配列を決定したところ、ゲノム上においてスタートサイトより 979bp 上流に G と A、1515bp 上流に A と G の多型が認められた。この 2 つの多型はそれぞれ 979-1515→G-A、A-G でリンクしており、A-G アリル頻度は 53%であった。

③(1)21 週齢の OLETF ラットでは IRI、血糖値ともに LETO ラットに比し有意に高値であった。しかし 5, 9 週齢では有意な差は認めなかった。また、筋湿重量は 9 週齢で増加を認めたが、5, 21 週齢では有意な差を認めなかった。(2)ATPase 法による骨格筋繊維組成の検討の結果、遺伝性糖尿病ラットにおいて血糖値が上昇する以前より筋肉における高酸化性繊維の減少がみられ、糖尿病の進展や肥満の進行につれてより著明な骨格筋繊維組成の変化が発生する現象が確認された。

④15,474 個のラット EST を集積してパネル化した。BLAST サーチの結果、約半数の配列が既知遺伝子由来のもので、残りは未知であった(添付した成績を参照)。現在、マウス正常豚ラ氏島、マウスインスリン産生細胞 MIN6 の EST 収集がほぼ終了の段階にある。従って、ヒト正常豚ラ氏島およびインスリン一マ腫瘍由来の EST も含めて、ヒトと実験動物(ラット、マウス)の EST 計画は当初の予定通り進行している。

D. 考察

3 種のダブルノックアウトマウスおよび各々の単独欠損変異マウスをもちいて経口ブ

ドウ糖負荷試験を行いその耐糖能を比較したところダブルノックアウトマウスにおいて血糖値が頂値となる負荷後 30 分値が有意に高値を示し、異なった 3 種の耐糖能障害すべてにおいて GIP を介する消化管シグナルの欠損が病態を増悪させることを確認した。既に日本人糖尿病特に高齢者では GIP の分泌はむしろ現弱することを考え併せると、多因子遺伝疾患である糖尿病において GIP を介する消化管シグナルがその発症や進展、加齢による増悪に重要な役割を示し、病像に大きな影響を与えることを示すものである。

マルターゼ遺伝子のクローニングをおこなったその発現調節領域に高頻度が多型が存在することを発見した。今後発見した遺伝子多型と糖尿病との関連について検討を加えていくとともに、加齢による影響についても明らかにしたい。

遺伝性肥満糖尿病ラットを用いて糖代謝異常と抗重力筋であるヒラメ筋の筋繊維組成の関係を経時的に観察した。著明な高酸化性繊維の減少を認めた、このような高酸化性繊維の減少は、老化により出現することが知られている。しかし、糖尿病ラットでは 9 週齢という若齢期にすでにこの変化が認められる、21 週齢では高酸化性繊維が完全に消失することが示された。このような抗重力筋の変化は体重の増加とあいまって、糖尿病や加齢によって維持能力や持続的な運動能力の低下をもたらすため、これに対する防止策、筋力維持のための高齢者向き糖尿病食事療法を確立する必要がある。

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、マウスを残してその段階はほぼ完了した。これらの EST のアレイ化の条件は昨年度から今年度にかけての予備実験ではほぼ確立されている。培養細胞、トランスジェニック動物、遺伝子欠失動物をアレイ解析に用いることによって、発現変化遺伝子や既知の糖尿病遺伝子の標的分子を同定することができる。実際、この過程は2年度から開始されている。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

3種のダブルノックアウトマウスの作成により、異なった3種の耐糖能障害すべてにおいて GIP を介する消化管シグナルの欠損が病態を増悪させることを確認した。このことは、強い多様性を示す多因子遺伝疾患である糖尿病において GIP を介する消化管シグナルが普遍的に重要な役割を示し、その病像に強く影響することを示すものである。

初年度の研究により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ことを報告したが、ダブルノックアウトマウスの作成により、さらに詳細な糖尿病状態での GIP シグナルの検討が可能となった。

日本人に存在する SNP をマルターゼ遺伝子の転写調節領域に発見した、この SNP は高頻度に存在することから消化管因子の一つの遺伝子マーカーとして活用できるものと思われる。今後今回発見した遺伝子多型と、糖尿病や加齢との関連について検討を加えていくとともに、転写開始点を決定し、転写調節部位を同定することによってそこに存在する遺伝子多型が与える遺伝子発現調節の検討が必要である。

遺伝性肥満糖尿病ラットを用いて糖代謝異常と抗重力筋であるヒラメ筋の筋繊維組成の関係を経時的に観察し、高血糖及び加齢によって著明な高酸化性繊維の減少を認めた。このような抗重力筋における変化の発現メカニズムを検討し、骨格筋繊維組成をマーカーとした食事や運動による治療効果の判定を行うことは、今後の高齢者糖尿病のマネージメントモデル確立に極めて有用である。

さらに、ヒトとラットの EST パネルが完成した。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。

以上の研究により得られた疾患モデルや遺伝子マーカーを用いて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立障害の防止の有用な手段となりうる。

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遺伝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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Normalization of cytoplasmic calcium response in pancreatic beta-cells of spontaneously diabetic GK rat by the treatment with T-1095, a specific inhibitor of renal Na⁺-glucose cotransporters
K. Yasuda, Y. Seino et. al. Horm. Metab. Res. (in press)
- 2) Hepatocyte Nuclear Factor-1 α Recruits the Transcriptional Co-activator p300 on the GLUT2 Gene Promoter.
N. Ban, Y. Seino et.al. Diabetes (in press)
- 3) Genomic variation in pancreatic ion channel genes in Japanese type 2 diabetic patients.
Y. Yamada, Y. Seino et.al.
Diabetes / Metabolism / Research and Reviews (in press)
- 4) Growth-Related Changes in Skeletal Muscle Fiber Type and Insulin Resistance in Diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty Rats
K. Yasuda, Y. Seino et. al. Acta Histochem. Cytochem. 34(5) 371-382 2001
- 5) Synergistic effect of polymorphisms of uncoupling protein 1 and β 3-adrenergic receptor genes on autonomic nervous system activity.
N. Shihara, Y. Seino et. al. Int. J. Obes. 25 761-766 2001
- 6) Heat shock restores insulin secretion after injury by nitric oxide by maintaining glucokinase activity in rat islets.
T. Takeda, Y. Seino et.al. Biomed Biophys Res Commun 284(1) 20-25 2001
- 7) The Pro¹²→Ala substitution in PPAR- γ is associated with resistance to development of diabetes in the general population.
H. Mori, Y. Seino et.al.
Diabetes 50(4) 891-894 2001
- 8) Distinct effect of diazoxide on insulin secretion stimulated by protein kinase A and protein kinase C in rat pancreatic islets.
Z. P. Shen, Y. Seino et.al.
Diabetes Res Clin Prac 53(1) 9-16 2001
- 9) Recovery of function and mass of endogenous β -cells in streptozotocin-induced diabetic rats treated with islet transplantation.
Y. Hamamoto, Y. Seino et.al. Biomed Biophys Res Commun 287(1) 104-109 2001
- 10) A novel glucokinase regulator in pancreatic β cells.
A. Shiraishi, Y. Seino et.al. J Biological Chem 276(4) 2325-2328 2001
- 11) Prior exposure to high glucose augments depolarization-induced release by mitigating the decline of ATP level in rat islets.
S. Fujimoto, Y. Seino et.al.
Endocrinology 143(1) 213-222 2002

2. 学会発表

第 44 回日本糖尿病学会年次学術集会

- 1) 遺伝素因と腸管・膵因子 (公開シンポジウム) 清野裕 糖尿病 44 Supple.1 25 2001
- 2) GIP シグナルによる肥満および糖尿病の発症 (S25-4) 宮脇一真、清野裕 他 糖尿病 44 Supple.1 S-1 2001
- 3) 経口糖負荷試験によるインスリン分泌と抵抗性の評価 (I-C 2-7) 播磨広一 清野裕 他 糖尿病 44 Supple.1 S-16 2001
- 4) HNF-1 β (MODY 5) 変異の α グルコシダーゼ (シクラーゼ・イソマルターゼ複合体 (SI) 遺伝子) 発現調節への影響 (I-I-3) 鈴木菜緒子 清野裕 他 糖尿病 44 Supple.1 S-28 2001
- 5) HNF-1 α (MODY 3) 変異の α グルコシダーゼ (シクラーゼ・イソマルターゼ複合体

(SI) 遺伝子) 発現調節への影響 (I-I-5) 安田浩一朗 清野裕 他 糖尿病 44 Supple.1 S-28 2001

- 6) α 2B アドレナリン受容体 3 アミノ酸欠損遺伝子変異の日本人における分布およびその影響 (II-C 2-25) 志原伸幸 清野裕 他 糖尿病 44 Supple.1 S-88 2001

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

ラット EST (報告書内に添付) は DDBJ に登録中である。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。

【 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

高齢者の糖尿病は活動力の低下と消化吸収や代謝動態が成人と異なるため適切な栄養摂取量の設定が必要である。そこで高齢者特有の栄養指導等の確立が必要となり、遺伝要因を含めて検討を進めている。H13 年度分として 3 種の実験を行い、以下のような結果を得た。

①3 種のダブルノックアウトマウス (GIP 受容体+GLP1 受容体、GIP 受容体+Kir6.2 および GIP 受容体+IRS1) の作成に成功し、サザン法にて遺伝子型を確認した。3 種のダブルノックアウトマウスおよび各々の単独欠損変異マウスを用いて経口ブドウ糖負荷試験を行いその耐糖能を比較したところダブルノックアウトマウスにおいて負荷後 30 分の血糖値が他のノックアウトマウスに対し、有意に高値を示した。異なった 3 種の耐糖能障害すべてにおいて GIP を介する消化管シグナルの欠如が病態を増悪させることを確認した。

②小腸における最終糖質消化酵素である α -グルコシダーゼの主要成分であるヒトマルターゼ遺伝子のクローニングを行い、その多型の検索を行った。ゲノム上においてスタートサイトより 979bp 上流に G と A、1515bp 上流に A と G の多型が認められた。この 2 つの多型はそれぞれ 979-1515→G-A、A-G でリンクしており、A-G アリル頻度は 53%であった。

③高齢者の自立の重要な阻害因子に筋力低下による起立、歩行障害が挙げられる、そこで遺伝性肥満糖尿病ラットである OLETF ラットを用いて糖代謝異常と抗重力筋であるヒラメ筋の筋繊維組成の関係を経時的に観察した。糖尿病ラットにおいて著明な高酸化性繊維の減少を認め、その変化は 9 週齢という若齢期にすでに認められ、21 週齢では高酸化性繊維が完全に消失するという特異な状態を呈することが明らかとなった。

以上の研究により得られた疾患モデルや遺伝子マーカーを用いることにより病態に応じた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防止の有力な手段となることが期待される。

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脾

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場である。これらのシステムは加齢と共に機能低下することが知ら

れている。また骨格筋はインスリン作用発現の場であり、加齢と共にその量は減少するため高齢者の運動能力の維持は、生活の自立と密接に関わっている。そこで、これら的高齢者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、高齢者特有の栄養処方の確立を目的とし、H13年度分として3種の実験を行った。

①初年度に作製した GIP 受容体ノックアウトマウスに異なったタイプの耐糖能障害を示す3種の他のノックアウトマウス (GIP 同様小腸より分泌されるインスリン分泌促進因子である GLP1 の受容体欠損マウス、ブドウ糖に対するインスリン分泌応答の key となる ATP 感受性カリウムチャンネル (Kir6.2) 欠損マウスおよび末梢におけるインスリン作用の key となるインスリン受容体基質 (IRS1) 欠損マウス) を交配し3種のダブルノックアウトマウスを作製し小腸シグナルが異なったタイプの糖尿病状態においていかなる役割を演ずるかを評価した。② α -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、更に空腹時血糖に比し食後血糖の上昇がより顕著である2型糖尿病の頻度が高いこと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 -グルコシダーゼの主要な構成酵素の一つであるヒトマルターゼ遺伝子のクローニ

ングを行い、その多型の検索を行った。

③高齢者の自立の重要な阻害因子に筋力低下や体重増加に伴う起立、歩行障害が挙げられる、そこで遺伝性肥満糖尿病ラットである OLETF ラットを用いて糖代謝異常、体重変化と抗重力筋であるヒラメ筋の筋繊維組成の関係を経時的に観察した。

B. 研究方法

①(1)我々が作成した GIP 受容体欠損変異マウスを用い、これを GLP1 欠損マウス、Kir6.2 欠損マウスおよび IRS1 欠損マウスを交配しダブルノックアウトマウスを作製した。(2) 作製したダブルノックアウトマウスを用いて経口ブドウ糖負荷試験を行い耐糖能を評価した。

② (1) P1 クローニングベクターを用いたヒトゲノムライブラリーより、以下のプライマーペア (sense: agccatttctggcaatgagac /antisense: tcgatatagctccacttggc) を用いてマルターゼ遺伝子をクローニングし、それよりエクソンイントロン配列および5'上流の配列を決定した。(2) 5'上流域にプライマーを設定し、日本人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。

(3) (2)によって得られた各泳動パターンについて直接シーケンス法により塩基配列を決定した。

③(1)自由摂食下の5、9、21週齢のOLETFラットおよびコントロールであるLETOラット(各n=6)より採血後、ヒラメ筋を摘出し湿重量を測定した。得られたサンプルを用いて血中IRIおよび血糖を測定した。(2) (1)

のヒラメ筋を用いて組織標本を作製し筋線維数を算出した。また酵素組織化学的方法 (ATPase 法) にて fiber type の分類をした。(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)3種のダブルノックアウトマウス(GIP受容体+GLP1受容体、GIP受容体+Kir6.2およびGIP受容体+IRS1)の作製に成功し、サザン法にて遺伝子型を確認した。(2)3種のダブルノックアウトマウスおよび各々の単独欠損変異マウスをもちいて経口ブドウ糖負荷試験を行いその耐糖能を比較したところダブルノックアウトマウスにおいて血糖値が頂値となる負荷後30分値が他のノックアウトマウスに比し、有意に高値を示し、異なった3種の耐糖能障害すべてにおいてGIPを介する消化管シグナルの欠如が病態を増悪させることを確認した。

②(1)既報のcDNA配列(AF016833)の5'上流2600bpの配列を決定した。スタートサ

イトより1086bp上流にTATAbox様の配列が認められた。(2)PCR-SSCP法により5'上流域約2000bpの間に2箇所が多型が認められた。(3)直接シーケンス法により塩基配列を決定したところ、ゲノム上においてスタートサイトより979bp上流にGとA、1515bp上流にAとGの多型が認められた。この2つの多型はそれぞれ979-1515→G-A、A-Gでリンクしており、A-Gアレル頻度は53%であった。

③(1)21週齢のOLETFラットではIRI、血糖値ともにLETOラットに比し有意に高値であった。しかし5,9週齢では有意な差は認めなかった。また、筋湿重量は9週齢で増加を認めたが、5,21週齢では有意な差を認めなかった。(2)ATPase法による各週齢のtype別のfiber数の比率(%)は、5,9,21週齢の順に(OLETF vs LETO) typeI(低酸化性繊維): 80.8 ± 2.1 vs 79.4 ± 1.0 , $91.9 \pm 2.2^*$ vs 86.7 ± 0.4 , $99.2 \pm 1.3^{**}$ vs 92.3 ± 0.7 , typeIIa(高酸化性繊維): 12.7 ± 2.7 vs 17.0 ± 1.1 , $0.8 \pm 0.2^{**}$ vs 8.7 ± 1.7 , 0^{**} vs 7.7 ± 0.7 , typeIIc(中間性繊維): 6.6 ± 1.7 vs 3.6 ± 0.9 , 7.3 ± 2.2 vs 4.6 ± 1.5 , 0.8 ± 1.3 vs 0 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)であった。以上の結果より、遺伝性糖尿病ラットにおいて血糖値が上昇する以前より筋肉における高酸化性繊維の減少がみられ、糖尿病の進展や肥満の進行につれてより著明な骨格筋繊維組成の変化が発生する現象が確認された。

D. 考察

3種のダブルノックアウトマウスおよび各々の単独欠損変異マウスをもちいて経口ブドウ糖負荷試験を行いその耐糖能を比較したところダブルノックアウトマウスにおいて血糖値が頂値となる負荷後30分値が有意に高値を示し、異なった3種の耐糖能障害すべてにおいてGIPを介する消化管シグナルの欠損が病態を増悪させることを確認した。既に日本人糖尿病特に高齢者ではGIPの分泌はむしろ現弱することを考え併せると、多因子遺伝疾患である糖尿病においてGIPを介する消化管シグナルがその発症や進展、加齢による憎悪に重要な役割を示し、病像に大きな影響を与えることを示すものである。

マルターゼ遺伝子のクローニングをおこなったその発現調節領域に高頻度に多型が存在することを発見した。今後発見した遺伝子多型と糖尿病との関連について検討を加えていくとともに、加齢による影響についても明らかにしたい。遺伝性肥満糖尿病ラットを用いて糖代謝異常と抗重力筋であるヒラメ筋の筋繊維組成の関係を経時的に観察した。著明な高酸化性繊維の減少を認めた、このような高酸化性繊維の減少は、老化により出現することが知られている。しかし、糖尿病ラットでは9週齢という若齢期にすでにこの変化が認められる、21週齢では高酸化性繊維が完全に消失することが示された。このような抗重力筋の変化は体重の増加とあいまって、糖尿病や加齢によって維持能力や持続的な運動能力の低下をもたらすため、これに対する防止策、筋力維持のための高齢者向き糖尿病食事療法

を確立する必要がある。

E. 結論

3種のダブルノックアウトマウスの作成により、異なった3種の耐糖能障害すべてにおいてGIPを介する消化管シグナルの欠損が病態を増悪させることを確認した。このことは、強い多様性を示す多因子遺伝疾患である糖尿病においてGIPを介する消化管シグナルが普遍的に重要な役割を示し、その病像に強く影響することを示すものである。

初年度の研究により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ことを報告したが、ダブルノックアウトマウスの作成により、さらに詳細な糖尿病状態でのGIPシグナルの検討が可能となった。

日本人に存在するSNPをマルターゼ遺伝子の転写調節領域に発見した、このSNPは高頻度に存在することから消化管因子の一つの遺伝子マーカーとして活用できるものと思われる。今後今回発見した遺伝子多型と、糖尿病や加齢との関連について検討を加えていくとともに、転写開始点を決定し、転写調節部位を同定することによってそこに存在する遺伝子多型を与える遺伝子発現調節の検討が必要である。

遺伝性肥満糖尿病ラットを用いて糖代謝異常と抗重力筋であるヒラメ筋の筋繊維組成の関係を経時的に観察し、高血糖及び加齢によって著明な高酸化性繊維の減少を認めた。このような抗重力筋における変化の発現メカニ

ズムを検討し、骨格筋筋繊維組成をマーカーとした食事や運動による治療効果の判定を行うことは、今後の高齢者糖尿病のマネージメントモデル確立に極めて有用である。

以上の研究により得られた疾患モデルや遺伝子マーカーを用いて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立障害の防止の有用な手段となりうる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Normalization of cytoplasmic calcium response in pancreatic beta-cells of spontaneously diabetic GK rat by the treatment with T-1095, a specific inhibitor of renal Na⁺-glucose cotransporters

K. Yasuda, Y. Seino et. al. Horm. Metab. Res. (in press)

2) Hepatocyte Nuclear Factor-1 α Recruits the Transcriptional Co-activator p300 on the GLUT2 Gene Promoter.

N. Ban, Y. Seino et. al. Diabetes (in press)

3) Genomic variation in pancreatic ion channel genes in Japanese type 2 diabetic patients.

Y. Yamada, Y. Seino et. al.

Diabetes / Metabolism / Research and Reviews (in press)

4) Growth-Related Changes in Skeletal Muscle Fiber Type and Insulin Resistance in Diabetic Otsuka Long-Evans

Tokushima Fatty Rats

K. Yasuda, Y. Seino et. al. Acta

Histochem. Cytochem. 34(5) 371-382

2001

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

N. Shihara, Y. Seino et. al. Int. J. Obes. 25 761-766 2001

6) Heat shock restores insulin secretion after injury by nitric oxide by maintaining glucokinase activity in rat islets.

T. Takeda, Y. Seino et. al. Biomed Biophys Res Commun 284(1) 20-25 2001

7) The Pro¹²→Ala substitution in PPAR- γ is associated with resistance to development of diabetes in the general population.

H. Mori, Y. Seino et. al.

Diabetes 50(4) 891-894 2001

8) Distinct effect of diazoxide on insulin secretion stimulated by protein kinase A and protein kinase C in rat pancreatic islets.

Z. P. Shen, Y. Seino et. al.

Diabetes Res Clin Prac 53(1) 9-16 2001

9) Recovery of function and mass of endogenous β -cells in streptozotocin-induced diabetic rats treated with islet transplantation.

Y. Hamamoto, Y. Seino et. al. Biomed Biophys Res Commun 287(1) 104-109

2001

10) A novel glucokinase regulator in pancreatic β cells.

A. Shiraishi, Y. Seino et al. J Biological Chem 276(4) 2325-2328 2001

11) Prior exposure to high glucose augments depolarization-induced release by mitigating the decline of ATP level in rat islets. S. Fujimoto, Y. Seino et al.

Endocrinology 143(1) 213-222 2002

2. 学会発表

第44回日本糖尿病学会年次学術集会

1) 遺伝素因と腸管・膵因子 (公開シンポジウム) 清野裕 糖尿病 44 Supple.1 25 2001

2) GIP シグナルによる肥満および糖尿病の発症 (S25-4) 宮脇一真、清野裕 他 糖尿病 44 Supple.1 S-1 2001

3) 経口糖負荷試験によるインスリン分泌と抵抗性の評価 (I-C 2-7) 播磨広一 清野裕 他 糖尿病 44 Supple.1 S-16 2001

4) HNF-1 β (MODY5) 変異の α グルコシダーゼ (シクラーゼ・イソマルターゼ複合体 (SI) 遺伝子) 発現調節への影響 (I-I-3)

鈴木菜緒子 清野裕 他 糖尿病 44 Supple.1 S-28 2001

5) HNF-1 α (MODY3) 変異の α グルコシダーゼ (シクラーゼ・イソマルターゼ複合体 (SI) 遺伝子) 発現調節への影響 (I-I-5) 安田浩一郎 清野裕 他 糖尿病 44

Supple.1 S-28 2001

6) α 2B アドレナリン受容体3アミノ酸欠損遺伝子変異の日本人における分布およびその影響 (II-C 2-25) 志原伸幸 清野裕 他 糖尿病 44 Supple.1 S-88 2001

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

「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) として網羅する計画を遂行している。前年度に、先ず「膵β細胞—小腸軸」のヒト EST パネルを完成した。当該年度は、ラット正常膵島と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 の EST 化を平行して遂行し、ラット EST パネルを完成させた。これらの EST はクラスタリング解析によって分類された後、マイクロアレイ化されて発現プロファイルの解析に供される。

A. 研究目的

欧米人の 2 型糖尿病は肥満とインスリン抵抗性を伴って発症する。一方、日本人では、発症初期からやせ型インスリン分泌不全を特徴とする。従って、日本人と欧米人では、遺伝的背景が異なる部分が多いと推定される。従来の糖尿病研究は「膵β細胞のインスリン分泌不全」と「末梢でのインスリン抵抗性」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、食物後の小腸シグナルによってインスリン分泌が増強されることが知られる（インクレチン作用）。高齢の糖尿病患者においてインクレチン作用が減弱している。一方、家族性の単因子遺伝の糖尿病においても、罹患者ではインクレチン作用の減弱が観察さ

れることから、分担者らは小腸に着目した。すなわち、「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という新しい仮説である。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 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 マーカーを獲得して遺伝子診断ツールを開発する。初年度は、ヒト EST パネルを完成させた。次年度は、実験動物の解析のた

めにラットとマウスの EST 収集を集中して行い、ラットの収集を完了させた。

B. 研究方法

ラット EST クローンの大規模収集

初年度に、既にラット正常膵島とインスリン産生細胞株 (RIN) 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。インサートはベクターに一方方向性に挿入されている。in vivo excision 法により、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、両端から部分塩基配列を決定した。マウス EST 収集作業も平行して行っている。得られた EST は BLAST プログラムを用いてホモロジー検索を行った。

C. 研究結果

15,474 個のラット EST を集積してパネル化した。BLAST サーチの結果、約半数の配列が既知遺伝子由来のもので、残りは未知であった (添付した成績を参照)。現在、マウス正常膵ラ氏島、マウスインスリン産生細胞 MIN6 の EST 収集がほぼ終了の段階にある。従って、ヒト正常膵ラ氏島およびインスリン- α 腫瘍由来の EST も含めて、ヒトと実験動物 (ラット、マウス) の EST 計画は当初の予定通り進行している。

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、マウスを残してその段階はほぼ完了した。これらの EST のアレイ化の条件は昨年度から今年度にかけての予備実験でほぼ確立されている。培養細胞、トランスジェニック動物、遺伝子欠失動物をアレイ解析に用いることによって、発現変化遺伝子や既知の糖尿病遺伝子の標的分子を同定することができる。実際、この過程は2年度から開始されている。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

ヒトとラットの EST パネルが完成した。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遺伝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。

G. 研究発表・知的財産権の出願・登録状況

これらのラット EST (報告書内に添付) は DDBJ に登録中である。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