

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14年度

総括・分担研究報告書

主任研究者 清野 裕

平成15(2003)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と高齢者の栄養指導への 応用研究 . . . . .	13
京都大学大学院医学研究科臨床生体統御医学講座	清野 裕
2. 小腸-膵 $\beta$ 細胞枢軸の EST マイクロアレイを用いた栄養代謝の関連 遺伝子の解析 . . . . .	21

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . .	25
-------------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 . . . . .	29
---------------------------	----

## **【 I 】 総括研究報告**

厚生労働科学研究費補助金（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確立を目的とし H14 年度分として以下のような実験を行った。

自律神経系の機能異常は、肥満、糖尿病の進展と密接に関連している。そこで、2種の自律神経関連遺伝子多型と自律神経機能との関連を心拍変動パワースペクトル解析によって評価した。自律神経機能では両変異ともにホモ変異保有群において有意の交感神経機能の亢進が観察された。このことは、受容体以後のシグナル伝達の異常を反映するものと思われる。次に、2種の遺伝性2型糖尿病モデルラットの骨格筋を材料として、酵素組織化学的方法を用いて fiber type を分類し、糖尿病状態における変化を比較検討した。2種ともに、高酸化繊維の減少がヒラメ筋、足底筋でもみられた。これより、異なった遺伝的背景を持つモデルラットにおいて高血糖に加齢の要因が加わることにより骨格筋に著明な変化が生じることが明かとなった。さらに、食事療法の補助療法として臨床で頻用されている $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤を GK ラットに長期に投与し消化酵素等の遺伝子発現量、活性を検討した。その結果この薬剤の酵素活性阻害作用は、投与1日より6ヵ月間安定して発揮されるが、酵素の発現量はむしろ増加する。また、この変化は休薬により速やかに消失し、再投与にて初回と同様の効果が得られることを確認した。

小腸には膵 $\beta$ 細胞と類似のグルコース認識機構が存在する。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た。当該年度は、その内の転写因子 EST アレイを用いることによって小腸—膵 $\beta$ 細胞軸と肝で共通発現する転写因子を求め、コード遺伝子の SNP ハプロタイプを用いて2型糖尿病発症との関連を検討した。その結果、HNF-4 $\alpha$ 遺伝子のミスセンス変異 (T130I) と LRH-1 遺伝子のプロモーター領域の多型において糖尿病発症と有意の関連を認めた。これらの遺伝子多型は栄養代謝の個体差を判定する遺伝マーカーとなり得る。

以上の研究により得られた遺伝子マーカーや疾患モデルでのデータ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立障害の防止の有効な手段となることが期待される。

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

## A. 研究目的

高齢者の糖尿病は身体の恒常性維持能や活動力の低下が、その特有の病態形成に重要な基盤となっている。また、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や治療法の確立が必要である。自律神経系は、身体の恒常性の維持や代謝状態の調節を行っており、その機能異常は、肥満、糖尿病の発症、進展と密接に関連している。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。また、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。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確立を目的とし、H14年度分として3種の実験を行った。

①自律神経系は、身体の恒常性の維持や代謝状態の調節を行っており、その機能異常は、肥満、糖尿病の発症、進展と密接に関連している。そこで、比較的頻度が多いと報告されている2種の自律神経関連遺伝子多型( $\alpha 2$  B アドレナリン受容体3アミノ酸欠損遺伝子変異、G protein  $\beta 3$  subunit (G $\beta 3$ ) 遺伝子多型 (C825T)) の日本人における異常アリルの保有頻度を調べるとともに、自律神経機能との関連を心拍変動パワースペクト

ル解析によって評価した。

②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、昨年引き続き2種の遺伝性2型糖尿病モデルラット(肥満モデルであるOLETFラットと非肥満モデルであるGKラット)のヒラメ筋(遅筋)、足底筋(速筋)を材料として、酵素組織化学的方法を用いてfiber typeを分類し糖代謝異常、体重変化と筋繊維組成の関係を経時的に観察した。

③高齢者の糖尿病においては、身体の恒常性維持能低下のため、血糖降下剤使用中に往々にして重篤な低血糖をきたすため、食事療法が重要視される。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、食事療法の補助療法として臨床で頻用されている $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤をGKラットに最大6ヵ月の長期に投与し消化酵素等の遺伝子発現量の変化やその活性を検討した。

④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)。そこで、小腸における共通発現遺伝子に着目した。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、関連組織で共通発現する遺伝子について SNP ハプロタイプを構築し、糖尿病発症との関連を解析した。

## B. 研究方法

①(1)健常日本人 381 名を対象とした。(2)採血後、体重、身長、空腹時血糖値、血中インスリン値を測定した。(3)α2B-AR 遺伝子変異および Gβ3 遺伝子変異は、PCR-RFLP 法により決定した。(4)各遺伝子群より無作為に抽出した計 100 名について、仰臥位で 10 分間、体位変換後（立位）で 10 分間の心電図の測定を行い、心拍変動パワースペクトル解析により自律神経機能を評価した。

②(1)自由摂食下の 5、9、21 週齢の OLETF、GK および各々のコントロールである LETO、Wistar ラット（各 n=7）より体重測定、採血後、後肢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、血糖、HbA1c を測定した。(2) (1)のヒラメ筋、足底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。

③5 週齢 GK ラットを用い、ボグリボース(10 ppm) 含有を 1 日 3 時間給餌させた。対照としてボグリボース不含を同様に 1 日 3 時間給餌させた。給餌開始後 1 日、1 週間、1 カ月、3 カ月および 6 カ月において血糖、血中インスリン、を測定した。また小腸を摘出し α-G

のうちマルターゼ、イソマルターゼ、スクラーゼ、トレハラーゼおよびラクターゼの活性を Dahlqvist の方法で測定した。またスクラーゼ・イソマルターゼ(SI)について mRNA およびタンパクの発現量をそれぞれノーザンおよびイムノブロット法で定量した。

## ④転写因子遺伝子の SNP 解析

### <HNF-4α 遺伝子>

Thr-130-Ile は糖尿病患者のみならず非糖尿病患者においても見いだされる変異である。軽度な転写因子異常が栄養代謝障害の発症リスクとなる可能性を考えて糖尿病患者における出現頻度を検討した。

### <LRH-1 遺伝子>

SHP は胆汁酸コレステロール代謝における重要な調節因子である。SHP 遺伝子異常は肥満遺伝子であることを既に報告した。さらに、同遺伝子異常は 2 型糖尿病発症のリスク因子であることも既に明らかにした。LRH-1 は SHP 遺伝子発現の調節因子であり、糖尿病遺伝子の重要な候補である。そこで、同遺伝子についてスクリーニングを実施した。

## ヒト転写因子 EST を応用したマイクロアレイの作成

ヒト膵島由来の 21,298 個の EST が 6,704 種類の遺伝子で構成されることを前年度までに明らかにした。当該年度は 256 種類の転写因子を用いたマイクロアレイを開発した。家族生糖尿病 MODY の原因遺伝子は、すべて膵島、肝、小腸で発現するので、この組織分布に着目し、EST アレイを用いて共通発現する MODY 候補遺伝子の獲得を試みた。

(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 $\alpha$ 2B AR 遺伝子変異では、(1)変異遺伝子のホモが51名、ヘテロが162名認められ、アリル頻度は35%であった。(2)ホモ変異群、ヘテロ変異群はともに正常群との間にBMI値、空腹時血糖値、血中インスリン値に差を認めなかった。(3)自律神経系のうち特に交感神経機能に関連するlow frequency (LO) 値、及び交感神経活動による熱産生と密接に関わりがあるvery low frequency (VLO) 値が正常群に比してホモ変異群で有意に高値を示した (LO:  $1078.5 \pm 182.6$  vs  $636.4 \pm 104.5$ ; VLO:  $771.2 \pm 118.4$  vs  $406.2 \pm 61.0$  ms<sup>2</sup> ホモ変異群 vs 正常群  $p < 0.05$ )。また、交感神経活動指標が正常群に比してホモ変異群で有意に高値を示した ( $2.80 \pm 0.31$  vs  $1.62 \pm 0.23$  ホモ変異群 vs 正常群  $p < 0.05$ )。

G $\beta$ 3 遺伝子変異では、(1)正常ホモ (CC) 群 89名、ヘテロ (CT) 群 161名、変異ホモ

(TT) 群 84名でアリル頻度は0.49であった。

(2)体格および血中データに遺伝子型による有意な差は認められなかった。(3)心拍変動パワースペクトル解析の結果、TT群の立位時のvery-low-frequency power (VLO) 値がCCおよびCT群に比べ有意に高値を示した。また、CTおよびTT群でCC群と比較して交感神経活動の指標値であるlow-frequency成分 (LO) とhigh-frequency成分 (HI) のパワー比 (LO / HI) が有意に高値であった。さらに、CCおよびCT群では立位への体位変換直後のLO / HI値は、起立2分後には約30%の減少を示すのに対し、TT群では、起立7分後においてもほとんど減少しなかった。また、TT群では、CCおよびCT群と比べ自律神経機能全体の活動の指標であるTOTAL値が有意に高値を示した。

②(1)OLETFはLETOに比し9週齢より体重、IRI、HbA<sub>1c</sub>が有意に高値であった、さらに21週齢ではIRI、血糖、HbA<sub>1c</sub>有意に高値であった。GKはWistarに比し5週齢より体重が低値、HbA<sub>1c</sub>が有意に高値であった、さらに9、21週齢では血糖、HbA<sub>1c</sub>有意に高値であったが、21週齢ではIRIは有意に低値であった。(2)筋繊維数は各週齢において有意な差を認めなかった。ATPase法による各週齢のtype別のfiber数の比較ではヒラメ筋において5週齢では、OLETF、GKともコントロールと有意な変化はなかった、しかしOLETFにおいては9週齢よりGKにおいても21週齢において高酸化性繊維であるtype IIAが完全に消失していた。同様の高酸化繊維の減少

が足底筋でもみられた。

③実験期間中 6 ヶ月間ボグリボース投与 GK ラットでは食後血糖およびインスリン値が低い傾向にあり、またマルターゼ、スクラーゼ、イソマルターゼは実験期間中 6 ヶ月間小腸全体で活性が有意に抑制されていた。さらにスクラーゼ、イソマルターゼのタンパクおよび mRNA の発現はボグリボース投与群で上昇した。この上昇は特に小腸の遠位に顕著に認められた。しかしながら、遺伝子発現上昇を認めたスクラーゼ、イソマルターゼに関して、酵素活性は有意に抑制されていた。

次にボグリボースの長期投与後の二糖類水解酵素の活性および発現への影響に関する検討を行った。投与 6 ヶ月後に 1 ヶ月間投与を休止した場合、二糖類水解酵素はボグリボース投与-非投与群で活性に差を認めなかった。またスクラーゼ、イソマルターゼのタンパクおよび mRNA の発現にも差を認めなかった。この結果より、ボグリボース投与を休止すると活性および発現レベルは非投与群のレベルに回復することが認められ、活性および発現レベルの上昇は一過性であることが示唆された。さらに、1 日投与を再開した時のマルターゼ、スクラーゼ、イソマルターゼ活性はボグリボース投与群で有意に抑制された。

#### ④転写因子遺伝子の SNP 解析

##### <HNF-4 $\alpha$ 遺伝子>

Thr-130-Ile は糖尿病患者のみならず非糖尿病患者においても見いだされる変異である。Thr-130-Ile 変異は 2 型糖尿病群で有意に高頻度であった。しかし、臨床所見を検討すると、

血糖やインスリン値とは関連せず、HDL コレステロールと有意の関連を認めた。変異蛋白の機能解析の結果、MIN6 細胞では野生型と有意差を認めなかったが、HepG2 細胞と肝細胞では有意の機能低下を認めた。同変異は 2 型糖尿病における小腸-肝の脂質代謝障害のリスク因子であることが明らかとなった。

##### <LRH-1 遺伝子>

SHP は胆汁酸コレステロール代謝における重要な調節因子である。LRH-1 は SHP 遺伝子発現の調節因子であり、糖尿病遺伝子の重要な候補である。同遺伝子についてスクリーニングを実施したところ、多数の SNP を同定した。高感度ハプロタイプの解析により、プロモーター領域の多型と糖尿病発症との間で有意の関連を認めた。転写調節に及ぼす影響を解析したところ、変異は新たな転写抑制因子をリクルートすることが示唆され、下流のインスリン分泌に関連する遺伝子発現が低下することによって、耐糖能障害が生じる機序が考えられた。

##### ヒト転写因子 EST を応用したマイクロアレイの作成

256 種類の転写因子を用いたマイクロアレイを開発した。家族生糖尿病 MODY の原因遺伝子は、すべて膵島、肝、小腸で発現するので、この組織分布に着目し、EST アレイを用いて共通発現する MODY 候補遺伝子の獲得を試みた。その結果、3 組織で共通発現する転写因子を 175 種類検出した。最終的にハウスキーパーを除去することによって 11 種類の新しい重要候補を獲得することに成功した。



#### D. 考察

①日本人に広く存在する2種の遺伝子多型をマーカーとして自律神経機能との関連を検討した。日本人において両多型ともにホモ変異群では、交感神経活動が亢進していることが明らかになった。今回の対象は健常者で、BMI、その他の臨床データに差が認められなかったことから現時点では基礎代謝に群間の差はないと考えられる。両ホモ変異群において、健常者では交感神経活動を亢進させることにより変異による基礎代謝の低下を代償している可能性が推測される。自律神経機能は加齢により低下するが、ホモ変異群において加齢により代償性の交感神経活動が低下するに伴い、変異による代謝異常が顕在化すると予想される。今回の研究により $\alpha 2B$  アドレナリン受容体3アミノ酸欠損遺伝子変異、G protein  $\beta 3$  subunit 遺伝子多型 (C825T) が交感神経活動に影響を与える遺伝子で、代謝異常の指標となりうることが示された。

②2種の異なった背景(肥満、非肥満)遺伝性糖尿病ラットを用いて糖代謝異常と遅筋のヒラメ筋および速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、2種の糖尿病ラットでは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。このような骨格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運動能力の低下をもたらすと思われる。

る。

③長期のボグリボース投与によって、小腸上皮の分化が進行し、その結果として二糖類水解酵素の発現の上昇を引き起こしたと考えられる。しかしながら、この発現上昇を認めたスクラーゼ、イソマルターゼに関して、活性は有意に抑制されていたことから、ボグリボースは上昇した酵素活性に阻害効果を持つことが証明された。

また、長期投与後(6ヵ月)これを休止すると酵素活性および発現レベルは非投与群のレベルに回復することが認められ、活性および発現レベルの上昇は一過性であることが示唆された。さらに、1日投与を再開した時その活性は有意に抑制された。この結果から、ボグリボース長期投与を休止しても再投与によりマルターゼ、スクラーゼ、イソマルターゼ活性を抑制することが可能であり、その結果として1日投与で食後血糖、インスリンレベルの上昇抑制が可能であることが示された。

④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と受診に参与している小腸-膵 $\beta$ 細胞遺伝子群を網羅することが重要であるが、そのデータベース化は予定通りに完了した。これらのESTのマイクロアレイ化の条件も確立された。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供することによって、発現変化遺伝子や転写因子の標的遺伝子を同定することが可能となる。ESTアレイの応用の第一歩として、膵 $\beta$ 細胞-小腸-肝の枢軸について共通の転写因子遺伝子の同定を試みた。見い出

された遺伝子は糖質、脂質の栄養代謝障害の感受性を決定する重要な候補遺伝子群であり、下流遺伝子は新たな小腸シグナルをコードするものも含むと考えられる。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、本研究成果により SNP マーカーによる遺伝子診断法の開発が望める。また、新たな液性シグナル因子は栄養吸収調節のための創薬対象ともなる。

#### E. 結論

日本人に広く存在する遺伝子多型をマーカーとして自律神経機能との関連を検討し、 $\alpha 2B$  アドレナリン受容体 3 アミノ酸欠損遺伝子変異、G protein  $\beta 3$  subunit 遺伝子多型 (C825T) が交感神経活動に影響を与え、代謝異常をまねく 1 つの遺伝子マーカーであることが示された。これらの遺伝子多型の検索は、個人により生理機能の変化に著しい差異の出現する高齢者のオーダーメイド栄養指導において重要な判断材料を提供する。

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。

これまで、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤を用いた糖尿病改善効果を示した研究が多数なされてきた。今回申請者は 2 型糖尿病モデル GK

ラットを用いて長期ボグリボース投与における二糖類水解酵素活性および発現に関して示した。このメカニズムの検討から、ボグリボースは長期的にマルターゼ、スクラーゼ、イソマルターゼ活性を抑制でき、2 型糖尿病における食後血糖、インスリンレベルの上昇抑制に十分効能を継続的に発揮できる薬剤であることが確認された。このことは、この薬剤がインスリン分泌促進作用を有さず、低血糖のリスクを回避できることより高齢者の栄養指導の補助薬剤として有用であることを示している。

さらに、ヒト、ラット、マウスの「膵 $\beta$ 細胞—小腸中枢」の EST パネルが完成した。DNA マイクロアレイを応用し、中枢組織に特異的な転写因子を網羅した。これらは栄養代謝障害の感受性素因を解明するための重要な分子資源である。

以上の研究により得られた遺伝子マーカーや疾患モデルでのデータ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立障害の防止の有力な手段となることが期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

本研究により開発されたヒト、ラット、マウス EST は DDBJ に登録中であり、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。

1. 論文発表
1. 論文発表
- 1) T130I mutation in HNF-4a gene is a loss-of-function mutation in hepatocytes and is associated with late-onset Type II diabetes mellitus in Japanese subjects. Q. Zhu, J. Takeda et.al Diabetologia (In press)
  - 2)  $\alpha$ 2B-adrenergic receptor deletion polymorphism associates with autonomic nervous system activity in young, healthy Japanese. N. Suzuki, Y. Seino et. al. J Clin Endocr Metab 88(3):1184-1187 (2003)
  - 3) Long-term beneficial therapeutic effect of voglibose, a potent intestinal  $\alpha$ -glucosidase inhibitor in spontaneous diabetic GK rats. K. Yasuda, Y. Seino et. al. Diabetes Res Clin Pract 59 113-122 (2003)
  - 4) Genetic variations in calpain-10 gene are not a major factor in the occurrence of type2 diabetes in Japanese. Y. Horikawa Y. Seino et.al. J Clin Endocrinol Metab. 88(1):244-7 (2003)
  - 5) Impaired beta-cell function and insulin sensitivity in Japanese subjects with normal glucose tolerance. A. Kuroe Y. Seino et.al. Diabetes Res Clin Pract. 59(1):71-7 (2003)
  - 6) Genetic variations in *CAPN10* are not a major factor in the occurrence of type 2 diabetes in Japanese. Y. Horikawa, J. Takeda et.al J. Clin. Endocrinol. Metab. 88: 244-247, 2003.
  - 7) Secretory granule-mediated co-secretion of L-glutamate and glucagon triggers glutamatergic signal transmission in islets of Langerhans. M. Hayashi, J. Takeda et.al J. Biol. Chem. 278: 1966-1974, 2003.
  - 8) Effect of High Dietary Fat on Insulin Secretion in Genetically Diabetic Goto-Kakizaki Rats. W. Shang, Y. Seino et. al. Pancreas 25(4):393-399 (2002)
  - 9) Abnormality In Fiber Type Distribution Of Soleus And Plantaris Muscles In Non-Obese Diabetic Goto-Kakizaki Rats. K. Yasuda, Y. Seino et. al. Clini Exp Pharmacol and Physiol. 29:1001-1008 (2002)
  - 10) Hepatocyte Nuclear Factor-1  $\alpha$  Recruits the Transcriptional Co-activator p300 on the GLUT2 Gene Promoter. N. Ban, Y. Seino et.al. Diabetes 51:1409-1418 (2002)
  - 11) Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. T. Kuzuya, Y. Seino et.al. Diabetes Res Clin Pract. 55(1):65-85 (2002)
  - 12) Treatment of streptozotocin-induced diabetes mellitus by transplantation of islet cells plus bone marrow cells via portal vein in rats. K. Ikebukuro, Y. Seino et.al. Transplantation. 73(4):512-8 (2002)
  - 13) Prior exposure to high glucose augments depolarization-induced insulin release by mitigating the decline of ATP level in rat islets. S. Fujimoto Y. Seino et.al. Endocrinology. 143(1):213-21 (2002)
  - 14) Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. K. Miyawaki Y. Seino et.al. Nat Med. 8(7):738-42 (2002)
  - 15) Ouabain suppresses glucose-induced mitochondrial ATP production and insulin release by generating reactive oxygen species in pancreatic islets M. Kajikawa Y. Seino et.al.. Diabetes. 51(8):2522-9 (2002)
  - 16) Cblb is a major susceptibility gene for rat type 1 diabetes mellitus. N. Yokoi Y. Seino et.al. Nat Genet. 31(4):391-4 (2002)
  - 17) C-reactive protein and insulin resistance in

- non-obese Japanese type 2 diabetic patients. A. Taniguchi, Y. Seino et.al. *Metabolism*. 51(12):1578-81 (2002)
- 18) 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<sup>+</sup>-glucose cotransporters. K. Yasuda, Y. Seino et.al. *Horm. Metab. Res.* 34:217-221 (2002)
- 19) High frequency of mutations in the HNF-1a gene (*TCF1*) in non-obese patients with diabetes of youth in Japanese and identification of a case of digenic inheritance. N. Tonooka, J. Takeda et.al. *Diabetologia* 45: 1709-1712, 2002.
- 20) Small heterodimer partner, an orphan nuclear receptor, augments PPAR $\gamma$  transactivation. H. Nishizawa, J. Takeda et.al. *J. Biol. Chem.* 277: 1586-1592, 2002.
- 21) Differential regulation of the orphan nuclear receptor SHP gene promoter by orphan nuclear receptor ERR isoforms. S. Sanyal, J. Takeda et.al. *J. Biol. Chem.* 277: 1739-1748, 2002.
- 22) Identification of a gain-of-function mutation in the HNF-1b gene in a Japanese family with MODY. I. Yoshiuchi, J. Takeda et.al. *Diabetologia* 45: 154-155, 2002.
- 23) Sequence analysis and expressional regulation of mRNAs encoding b-subunits of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in the red-berried newt, *Cynops pyrrhogaster*. A. Saito, J. Takeda et.al. *Biol. Reprod.* 66: 1299-1309, 2002.
- 24) Differential expression of two distinct vesicular glutamate transporters in the rat retina. Y. Mimura, J. Takeda et.al. *Neuroreport*. 13: 1925-1928, 2002.
- 25) Expression of inorganic phosphate / vesicular glutamate transporters (BNPI/VGLUT1 and DNPI/VGLUT2) in the cerebellum and precerebellar nuclei of the rat. S. Hisano, J. Takeda et.al. *Mol. Brain Res.* 107: 23-31, 2002.
- 2.学会発表
- 第 45 回日本糖尿病学会年次学術集会
- 1) 日本人正常耐糖能者におけるインスリン分泌と抵抗性 (I-G402-1-6) 黒江 彰 清野裕 他 糖尿病 45Supple.2 S-98 2002
- 2) 空腹時血糖正常者におけるインスリン分泌と抵抗性：遺伝的素因の影響 (I-G402-1-8) 福島満夫 清野裕 他 糖尿病 45Supple.2 S-99 2002
- 3) ヒト TSC-22 遺伝子多型、特に(-396)A/G 多型と 2 型糖尿病発症との関連性について (IG-402-2-9) 菅原史明 清野裕 他 糖尿病 45Supple.2 S-102 2002
- 4) 生検ヒト十二指腸粘膜を用いたトリグリタゾンの小腸電解質輸送に与える影響の検討 (I-G510-2-11) 細川雅也 清野裕 他 45Supple.2 S-148 2002
- 5) 耐糖能異常群における微量アルブミン尿：遊離脂肪酸の影響 (II-B2-12) 鈴木春彦 清野裕 他 糖尿病 45Supple.2 S-152 2002
- 6) 日本人 2 型糖尿病患者における LRH-1 遺伝子の関連解析 (II-B2-32) 愈力

- 清野裕 他 糖尿病 45Supple.2 S-156  
2002
- 7) 1型糖尿病における膵外分泌組織に対する新規自己抗体-自己免疫性膵外分泌／内分泌症の提唱 (II-R-22) 谷口孝夫 清野裕 他 糖尿病 45Supple.2 S-161 2002
- 8) HGF 遺伝子導入による糖尿病治療の試み (II-D-7) 山田祐一郎 清野裕 他 糖尿病 45Supple.2 S-165 2002
- 9) インスリン分泌促進薬の薬理特性、結合部位の同定と、それに基づく薬剤選択の論拠 (II-D-13) 長嶋一昭 清野裕 他 糖尿病 45Supple.2 S-166 2002
- 10) インスリン分泌促進薬の併用効果、及び長期高濃度負荷による膵β細胞機能への影響についての検討 (II-D-41) 高橋輝 清野裕 他 糖尿病 45Supple.2 S-171 2002
- 11) マウス単離肝細胞糖産生に対するクルクミンの作用の検討 (II-G407-2) 藤原秀哉 清野裕 他 糖尿病 45Supple.2 S-192 2002
- 12) phenytoinによるインスリン分泌抑制効果の機序についての検討 (II-G502-1-11) 奈部浩一郎 清野裕 他 糖尿病 45Supple.2 S-209 2002
- 13) 高濃度ブドウ糖前曝露と phorbol ester 前曝露によるインスリン分泌増強作用の機序は異なる(II-G502-1-12) 藤本新平 清野裕 他 糖尿病 45Supple.2 S-209 2002
- 14) 膵β細胞のインスリン分泌顆粒開口放出機構における代謝シグナルの意義の検討(II-G502-1-13) 下野大 清野裕 他 糖尿病 45Supple.2 S-209 2002
- 15) 高濃度及び低濃度インターロイキン1βによるインスリン分泌障害部位の同定と Heat Shock Protein による保護作用の検討(II-G502-1-20) 武田智美 清野裕 他 糖尿病 45Supple.2 S-210 2002
- 16) D-hydroxybutyrate(D-HB)長期曝露の膵ラ氏島からのインスリン分泌に対する影響(II-G502-1-21) 竹広美方子 清野裕 他 糖尿病 45Supple.2 S-210 2002
- 17) 高脂肪食の GK ラットでのインスリン分泌に及ぼす影響 (II-G502-1-23) 黒瀬健 清野裕 他 糖尿病 45Supple.2 S-211 2002
- 18) 転写因子 Hes5 のインスリンプロモータ活性化機構の解明(II-G502-2-1) 内藤玲 清野裕 他 糖尿病 45Supple.2 S-211 2002
- 19) PAX6 変異ラット(rat Small eye ; rSey)における耐糖能の検討(II-G502-2-9) 浜崎暁洋 清野裕 他 糖尿病 45Supple.2 S-212 2002
- 20) ATP感受性 K<sup>+</sup>チャネル欠損マウスにおける GIP シグナルの役割 (II-G502-2-15) 月山克史 清野裕 他 糖尿病 45Supple.2 S-213 2002

- 2 1) nestin promoter-EGFP トランスジェニックマウス腓ラ氏島からのネスチン陽性細胞の単離 (ⅢD-3) 上野宏行 清野裕 他 糖尿病 45Supple.2 S-242 2002
- 2 2) 時計関連遺伝子 mCry/1/mCry2 ダブルノックアウトマウスにおける耐糖能の検討 (Ⅲ-D-6) 池田弘毅 清野裕 他 糖尿病 45Supple.2 S-243 2002
- 2 3) ラット膵β細胞において pβPCCase は Glucokinase をミトコンドリアに移行させる。(Ⅲ-D-16) 白石彰彦 清野裕 他 糖尿病 45Supple.2 S-244 2002
- 2 4) GIP 受容体欠損 ob/ob マウスにおける肥満抑制効果 (Ⅲ-D501-3) 宮脇一真 清野裕 他 糖尿病 45Supple.2 S-245 2002
- 2 5) インスリン抵抗性モデルにおける GIP シグナルの役割 (Ⅲ-D-501-4) 周赫英 清野裕 他 糖尿病 45Supple.2 S-245 2002
- 2 6) Hes5 の糖代謝における役割~遺伝子欠損マウスによる解析~ (Ⅲ-D501-29) 豊田健太郎 清野裕 他 糖尿病 45Supple.2 S-249 2002
- 2 7) HNF-1α/β 共同作用における MODY3 および5変異体のαグルコシダーゼ(SD)遺伝子発現調節異常 (Ⅲ-D501-36) 安田浩一郎 清野裕 他 糖尿病 45Supple.2 S-250 2002
- 2 8) フィブロネクチン前処置によるラ氏島移植の効率化の検討 (Ⅲ-G402-2-13) 浜本芳之 清野裕 他 糖尿病 45Supple.2 S-257 2002
- 2 9) マルターゼ遺伝子のクローニングと糖尿病関連遺伝子変異の検索 (Ⅲ-G404-8) 志原伸幸 清野裕 他 糖尿病 45Supple.2 S-261 2002

#### H.知的所有権の取得状況

##### 1.特許取得

「HNF-4α遺伝子 T130I変異による2型糖尿病発症リスクの遺伝子診断」

(特許申請中)

##### 2.実用新案登録

なし

##### 3.その他

なし



## **【Ⅱ】 分担研究報告**



厚生労働科学研究費補助金（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や治療法の確立が必要である。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た。H14 年度分として 3 種の実験を行い、以下の結果を得た。

①自律神経系は代謝状態の調節を行っており、その異常は、肥満、糖尿病の進展と密接に関連している。そこで、2 種の自律神経関連遺伝子多型（ $\alpha$ 2B アドレナリン受容体 3 アミノ酸欠損遺伝子変異、G protein  $\beta$ 3 subunit 遺伝子多型（C825T））と自律神経機能との関連を心拍変動パワースペクトル解析によって評価した。各々の変異アリル頻度は 0.35、0.49 であった。自律神経機能では両変異ともにホモ変異保有群において有意の交感神経機能の亢進が観察された。このことは、受容体以後のシグナル伝達の異常を反映するものと思われる。

②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、昨年に引き続き 2 種の遺伝性 2 型糖尿病モデルラット（肥満モデルである OLETF ラットと非肥満モデルである GK ラット）のヒラメ筋（遅筋）、足底筋（速筋）を材料として、酵素組織化学的方法を用いて fiber type を分類し骨格筋の糖尿病状態における変化を比較検討した。各週齢の type 別の fiber 数の比較ではヒラメ筋において OLETF は 9 週齢より GK においても 21 週齢で高酸化性繊維である type IIA が完全に消失していた。同様の高酸化繊維の減少が足底筋でもみられた。これより、異なった遺伝的背景を持つモデルラットにおいて高血糖に加齢の要因が加わることにより骨格筋に著明な変化が生じることが明かとなった。

③高齢者の糖尿病においては、身体の恒常性維持能低下のため血糖降下剤使用中に、往々にして重篤な低血糖をきたすため、食事療法が重要視される。食事療法の補助療法として臨床で頻用されている  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤を GK ラットに最大 6 ヶ月の長期に投与し消化酵素等の遺伝子発現量の変化やその活性を検討した。その結果この薬剤の酵素活性阻害作用は、投与 1 日より 6 ヶ月間安定して発揮されるが、酵素の発現量はむしろ増加する。また、この変化は休業により速やかに消失し、再投与にて初回と同様の効果が得られることを確認した。

以上の研究により得られた遺伝子マーカーや疾患モデルでのデータ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立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

高齢者の糖尿病は身体の恒常性維持能や活動力の低下が、その特有の病態形成に重要な基盤となっている。また、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や治療法の確立が必要である。自律神経系は、身体の恒常性の維持や代謝状態の調節を行っており、その機能異常は、肥満、糖尿病の発症、進展と密接に関連している。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。また、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。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、H14年度分として3種の実験を行った。

①自律神経系は、身体の恒常性の維持や代謝状態の調節を行っており、その機能異常は、肥満、糖尿病の発症、進展と密接に関連している。そこで、比較的頻度が多いと報告されている2種の自律神経関連遺伝子多型( $\alpha 2$ Bアドレナリン受容体3アミノ酸欠損遺伝子変異、G protein  $\beta 3$  subunit ( $G\beta 3$ ) 遺伝子多型(C825T))の日本人における異常アレルの保有頻度を調べるとともに、自律神経機能との関連を心拍変動パワースペクトル

ル解析によって評価した。

②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、昨年に引き続き2種の遺伝性2型糖尿病モデルラット(肥満モデルであるOLETFラットと非肥満モデルであるGKラット)のヒラメ筋(遅筋)、足底筋(速筋)を材料として、酵素組織化学的方法を用いてfiber typeを分類し糖代謝異常、体重変化と筋繊維組成の関係を経時的に観察した。

③高齢者の糖尿病においては、身体の恒常性維持能低下のため、血糖降下剤使用中に往々にして重篤な低血糖をきたすため、食事療法が重要視される。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、食事療法の補助療法として臨床で頻用されている $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤をGKラットに最大6ヵ月の長期に投与し消化酵素等の遺伝子発現量の変化やその活性を検討した。

## B. 研究方法

①(1)健常日本人381名を対象とした。(2)採血後、体重、身長、空腹時血糖値、血中インスリン値を測定した。(3) $\alpha 2$ B-AR遺伝子変異および $G\beta 3$ 遺伝子変異は、PCR-RFLP法により決定した。(4)各遺伝子群より無作為に抽出した計100名について、仰臥位で10分間、体位変換後(立位)で10分間の心電図の測定を行い、心拍変動パワースペクトル解析により自律神経機能を評価した。

②(1)自由摂食下の 5,9,21 週齢の OLETF、GK および各々のコントロールである LETO、Wistar ラット (各 n=7) より体重測定、採血後、後肢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、血糖、HbA1c を測定した。(2) (1)のヒラメ筋、足底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。

③5 週齢 GK ラットを用い、ボグリボース (10 ppm) 含有を 1 日 3 時間給餌させた。対照としてボグリボース不含を同様に 1 日 3 時間給餌させた。給餌開始後 1 日、1 週間、1 カ月、3 カ月および 6 カ月において血糖、血中インスリン、を測定した。また小腸を摘出し  $\alpha$ -G のうちマルターゼ、イソマルターゼ、スクラーゼ、トレハラーゼおよびラクターゼの活性を Dahlqvist の方法で測定した。またスクラーゼ・イソマルターゼ(SI)について mRNA およびタンパクの発現量をそれぞれノーザンおよびイムノプロット法で定量した。

(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  $\alpha$ 2B-AR 遺伝子変異では、(1)変異遺伝子のホモが 51 名、ヘテロが 162 名認められ、アリル頻度は 35%であった。(2)ホモ変異群、ヘテロ変異群はともに正常群との間に BMI 値、空腹時血糖値、血中インスリン値に差を認めなかった。(3)自律神経系のうち特に交感神経機能に関連する low frequency (LO) 値、及び交感神経活動による熱産生と密接に関わりがある very low frequency (VLO) 値が正常群に比してホモ変異群で有意に高値を示した (LO:  $1078.5 \pm 182.6$  vs  $636.4 \pm 104.5$ ; VLO:  $771.2 \pm 118.4$  vs  $406.2 \pm 61.0$  ms<sup>2</sup> ホモ変異群 vs 正常群  $p < 0.05$ )。また、交感神経活動指標が正常群に比してホモ変異群で有意に高値を示した ( $2.80 \pm 0.31$  vs  $1.62 \pm 0.23$  ホモ変異群 vs 正常群  $p < 0.05$ )。

G $\beta$ 3 遺伝子変異では、(1)正常ホモ (CC) 群 89 名、ヘテロ (CT) 群 161 名、変異ホモ (TT) 群 84 名でアリル頻度は 0.49 であった。(2)体格および血中データに遺伝子型による有意な差は認められなかった。(3)心拍変動パワースペクトル解析の結果、TT 群の立位時の very-low-frequency power (VLO) 値が CC および CT 群に比べ有意に高値を示した。また、CT および TT 群で CC 群と比較して交感神経活動の指標値である low-frequency 成分 (LO) と high-frequency 成分 (HI) のパワー比 (LO / HI) が有意に高値であった。さらに、CC および CT 群では立位への体位変換

直後の LO / HI 値は、起立 2 分後には約 30% の減少を示すのに対し、TT 群では、起立 7 分後においてもほとんど減少しなかった。また、TT 群では、CC および CT 群と比べ自律神経機能全体の活動の指標である TOTAL 値が有意に高値を示した。

②(1) OLETF は LETO に比し 9 週齢より体重、IRI、HbA1c が有意に高値であった、さらに 21 週齢では IRI、血糖、HbA1c 有意に高値であった。GK は Wistar に比し 5 週齢より体重が低値、HbA1c が有意に高値であった、さらに 9、21 週齢では血糖、HbA1c 有意に高値であったが、21 週齢では IRI は有意に低値であった。(2)筋繊維数は各週齢において有意な差を認めなかった。ATPase 法による各週齢の type 別の fiber 数の比較ではヒラメ筋において 5 週齢では、OLETF、GK ともコントロールと有意な変化はなかった、しかし OLETF においては 9 週齢より GK においても 21 週齢において高酸化性繊維である type IIA が完全に消失していた。同様の高酸化繊維の減少が足底筋でもみられた。

③実験期間中 6 ヶ月間ボグリボース投与 GK ラットでは食後血糖およびインスリン値が低い傾向にあり、またマルターゼ、スクラーゼ、イソマルターゼは実験期間中 6 ヶ月間小腸全体で活性が有意に抑制されていた。さらにスクラーゼ、イソマルターゼのタンパクおよび mRNA の発現はボグリボース投与群で上昇した。この上昇は特に小腸の遠位に顕著に認められた。しかしながら、遺伝子発現上昇を認めたスクラーゼ、イソマルターゼに関して、

酵素活性は有意に抑制されていた。

次にボグリボースの長期投与後の二糖類水解酵素の活性および発現への影響に関する検討を行った。投与 6 ヶ月後に 1 ヶ月間投与を休止した場合、二糖類水解酵素はボグリボース投与-非投与群で活性に差を認めなかった。またスクラーゼ、イソマルターゼのタンパクおよび mRNA の発現にも差を認めなかった。この結果より、ボグリボース投与を休止すると活性および発現レベルは非投与群のレベルに回復することが認められ、活性および発現レベルの上昇は一過性であることが示唆された。さらに、1 日投与を再開した時のマルターゼ、スクラーゼ、イソマルターゼ活性はボグリボース投与群で有意に抑制された。

#### D. 考察

①日本人に広く存在する 2 種の遺伝子多型をマーカーとして自律神経機能との関連を検討した。日本人において両多型ともにホモ変異群では、交感神経活動が亢進していることが明らかになった。今回の対象は健常者で、BMI、その他の臨床データに差が認められなかったことから現時点では基礎代謝に群間の差はないと考えられる。両ホモ変異群において、健常者では交感神経活動を亢進させることにより変異による基礎代謝の低下を代償している可能性が推測される。自律神経機能は加齢により低下するが、ホモ変異群において加齢により代償性の交感神経活動が低下するに伴い、変異による代謝異常が顕在化すると予想される。今回の研究により  $\alpha 2B$  アドレナリン受容体 3 アミノ酸欠損遺伝子変異、G protein