

## 日本人糖尿病感受性遺伝子に基づく脂肪細胞を分子標的とした糖尿病・肥満の予防及び治療薬の開発

所属 東京大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝内科  
研究者 門脇 孝

### 分担研究者

- (1) 生物医学研究所 板井昭子
- (2) 厚生労働省国立医薬品食品衛生研究所有機化学部生薬 合田幸広
- (3) 東京大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝内科 戸辺一之、山内敏正
- (4) 東京大学大学院医学系研究科リコカハ<sup>®</sup>イノベーション・人材養成エッセ 原 一雄

### 要旨

アディポネクチンが日本人の主要な2型糖尿病感受性遺伝子であること、アディポネクチンがインスリン作用亢進に加えて直接動脈硬化抑制作用があることを初めて明らかにした。更にアディポネクチンはAMPキナーゼを活性化することによってインスリン感受性を亢進させることを初めて明らかにした。

### 1. 研究目的

日本人の糖尿病患者は推定700万人でその数はなお増加の一途をたどっている。糖尿病の大部分を占める一般の2型糖尿病は、複数の遺伝素因が組合わさり、更に生活習慣などの環境因子が重なって発症する多因子病である。近年脂肪細胞は中性脂肪をエネルギーとして貯蔵するのみならず種々のホルモンを分泌する内分泌細胞であることが分かってきた。肥大した脂肪細胞は正常な小型脂肪細胞に比しインスリン抵抗性惹起物質を過剰に分泌するとともに、インスリン感受性促進物質の分泌が低下するために、インスリン抵抗性と糖代謝異常、脂質代謝異常、高血圧などシンドロームXの病態を引き起こす。従って、脂肪細胞の肥大に関与する遺伝子、脂肪細胞から分泌されインスリン感受性を調節する遺伝子の多型が現在激増している2型糖尿病や生活習慣病の主要な遺伝的素因を形成している可能性が高く、その解明は2型糖尿病やシンドロームXの激増を阻止する上で必須である。そこで我々は、多因子病の疾患感受性遺伝子座同定に有効である罹患同胞対法を用いて全ゲノムスキャンを行い日本人2型糖尿病感受性遺伝子領域をマップし、1塩基多型(SNP)を用いた患者対照相関解析によって感受性遺伝子の同定を行う。その中で特に脂肪細胞で発現する遺伝子の機能解析を行い、遺伝子・機能情報に基づいた脂肪細胞を分子標的とする革新的な糖尿病・肥満治療薬を開発する。本研究によって2型糖尿病患者をはじめとする生活習慣病の根本的治療法を開発し活力ある長寿社会の実現に寄与したい。

### 2. 研究方法

#### (1)ゲノム解析による2型糖尿病遺伝素因の解明：

ゲノム解析による2型糖尿病遺伝素因の解明：罹患同胞対を利用した全ゲノムスキャンによってマップされた日本人2型糖尿病感受性領域に存在し、機能的にも感受性遺伝子の候補となる遺伝子について、SNP（1塩基置換）を利用した相関解析を行い、日本人2型糖尿病感受性遺伝子としての意義を検討した。

#### (2)脂肪細胞関連の新規2型糖尿病遺伝子の機能解析

アディポネクチンのrecombinant proteinを作製し、糖尿病のモデルマウスに投与しその作用を詳細に検討した。アディポネクチンのインスリン感受性亢進作用を個体レベルで検討するため、アディポネク

チン欠損マウスを作製しその表現型を詳細に解析した。更に動脈硬化モデル動物であるApoE欠損マウスとアディポネクチン過剰発現マウスを交配し、アディポネクチンの動脈硬化に対する作用を個体レベルで解析した。

### 3. 研究成果

#### (1) 2型糖尿病遺伝素因の全体像の解明

##### (a) 全ゲノムスキャンによる2型糖尿病遺伝素因の解明

日本人2型糖尿病罹患同胞対について全染色体上約400のマイクロサテライトマーカーの遺伝子型を決定し、2型糖尿病原因遺伝子座として有望である領域を1p36-p32, 2q34, 3q26-q28, 6p23, 7p22-p21, 9p, 11p13-p12, 15q13-q21と20q12-q13と9箇所と同定した(*Diabetes* 51:1247-1255, 2002)。特に染色体3番の3q26-28の領域には、肥満・糖尿病などのインスリン抵抗性が共通して認められる疾患で低下していること、逆にインスリン感受性であるPPAR $\gamma$ ヘテロ欠損マウスにおいてDNAチップによる解析で発現が亢進していることからインスリン感受性物質であることが示唆されたアディポネクチン遺伝子が存在する。このことからアディポネクチン遺伝子の機能がSNPなどによって低下しインスリン抵抗性・糖尿病の発症に寄与している可能性が示唆されたため、アディポネクチン遺伝子のSNPを検索し、患者対照相関解析によって2型糖尿病原因遺伝子としての意義を検討した。アディポネクチン遺伝子のイントロン2に存在するSNP276のGG遺伝子型保持者はTT遺伝子型に比して血中アディポネクチンが低値でインスリン抵抗性指標が高値で、更に2型糖尿病発症リスクが有意に上昇した。従ってアディポネクチン遺伝子SNP276は、血中アディポネクチン低値を介してインスリン抵抗性を惹起し、2型糖尿病発症リスクを高めることを明らかにした(*Diabetes* 15:536-540, 2002)。従ってアディポネクチン遺伝子は2型糖尿病・インスリン抵抗性の重要な感受性遺伝子であることが明らかとなった。これと平行して脂肪細胞に発現し機能的にインスリン抵抗性感受性遺伝子の候補であるPGC-1(peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1)についてSNPを検索し患者対照相関解析を行った。比較的頻度の高いSNPを3個同定し、そのうちGly482Ser多型がインスリン抵抗性と相関すること、2つのSNPによるハプロタイプが2型糖尿病と相関しており、PGC-1遺伝子がインスリン抵抗性・2型糖尿病の感受性遺伝子であることが示唆された(*Diabetologia* 45:740-743, 2002)。

#### (2) 脂肪細胞関連の新規2型糖尿病遺伝子の機能解析

高脂肪食下でもインスリン感受性が良好なPPAR $\gamma$ ヘテロ欠損マウスの小型脂肪細胞では、レプチンに加えて、アディポネクチンが野生型と比較して、多く発現しているのが認められ、アディポネクチンがレプチンと共に、脂肪組織由来のインスリン感受性因子であることが示唆された。脂肪細胞が肥大化しインスリン抵抗性を惹起するメカニズムは、インスリン感受性ホルモンの減少とインスリン抵抗性惹起分子の増加であると考えられるが、脂肪細胞が高脂肪食負荷などにより肥大化すると、アディポネクチンなどのインスリン感受性ホルモンが協調的に減少し、TNF $\alpha$ やレジスチンなどのインスリン抵抗性惹起分子も協調的に増加することを明らかにした。また、種々の転写因子の共通の転写共役因子であるCBP(cAMP response element binding protein(CREB) binding protein)のヘテロ欠損マウスにおいて高脂肪食下での脂肪細胞の肥大化やインスリン抵抗性の惹起の抑制が、PPAR $\gamma$ ヘテロ欠損マウスに比しても顕著であった。このことより、脂肪細胞の肥大化にはPPAR $\gamma$ に依存した経路とPPAR $\gamma$ に依存しない経路の2つの経路があることを明らかにした(*Nature Genetics* 30:221-226, 2002)。

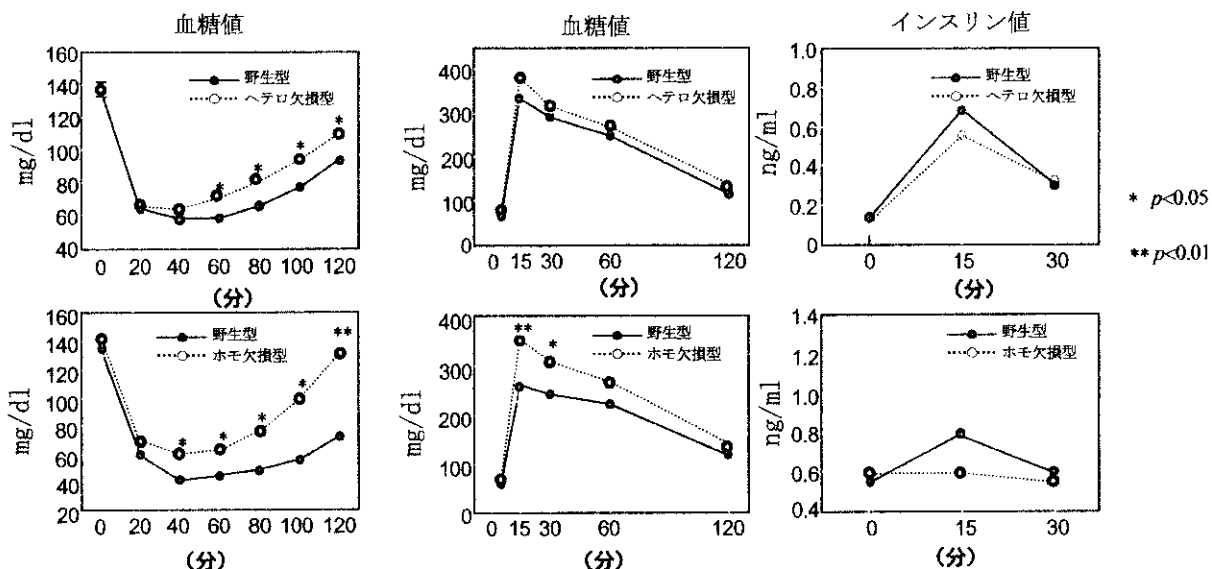
#### (3) 遺伝子・機能情報に基づいた、脂肪細胞を分子標的とする革新的な糖尿病・肥満治療薬の開発

(1)の結果からアディポネクチンの補充はインスリン抵抗性の根本的治療法となりうることが示唆された。そこでアディポネクチンを糖尿病モデル動物へ投与したところ、骨格筋組織内中性脂肪含量が低下するのに伴い、インスリン刺激によるインスリン受容体、IRS-1のチロシンリン酸化、PKBの活性化が増加し、骨格筋でインスリン抵抗性が改善していることが判明した。また、脂肪酸の燃焼に関わるACO(acyl CoA oxidase), UCP(uncoupling protein)2の発現の上昇が認められ、主に骨格筋において脂

脂肪酸燃焼、及びUCP2などエネルギー消費に関わる遺伝子の発現を上昇させることによりインスリン抵抗性を改善することが明らかとなった。これらの結果からアディポネクチンの補充はインスリン抵抗性・糖尿病の根本的治療法となり得ると考えられた。更に、アディポネクチンの作用を個体レベルで明らかにするため、発生工学的手法によってアディポネクチン欠損マウスを作製しその表現型を解析した。アディポネクチンヘテロ欠損マウスはインスリン抵抗性を、ホモ欠損マウスはインスリン抵抗性と耐糖能障害を呈し、アディポネクチンがインスリン感受性の調節に重要であることを個体レベルではじめて明らかにした (*J Biol Chem* 277: 25863-25866, 2002) (図1)。更にアディポネクチンはAMPキナーゼ(5'-AMP-activated protein kinase)を活性化することによって、骨格筋においては脂肪酸燃焼と糖の取り込みを、肝臓では糖新生を抑制しインスリン抵抗性を改善することを明らかにした (*Nature Medicine* 8:1288-1295, 2002)。また、動脈硬化のモデル動物であるApoE欠損マウスとアディポネクチン過剰発現マウスを掛け合わせることでアディポネクチンが直接動脈硬化を抑制する作用があることを個体レベルで明らかにした (*J. Biol. Chem.* 278: 2461-2468, 2003) (図2)。

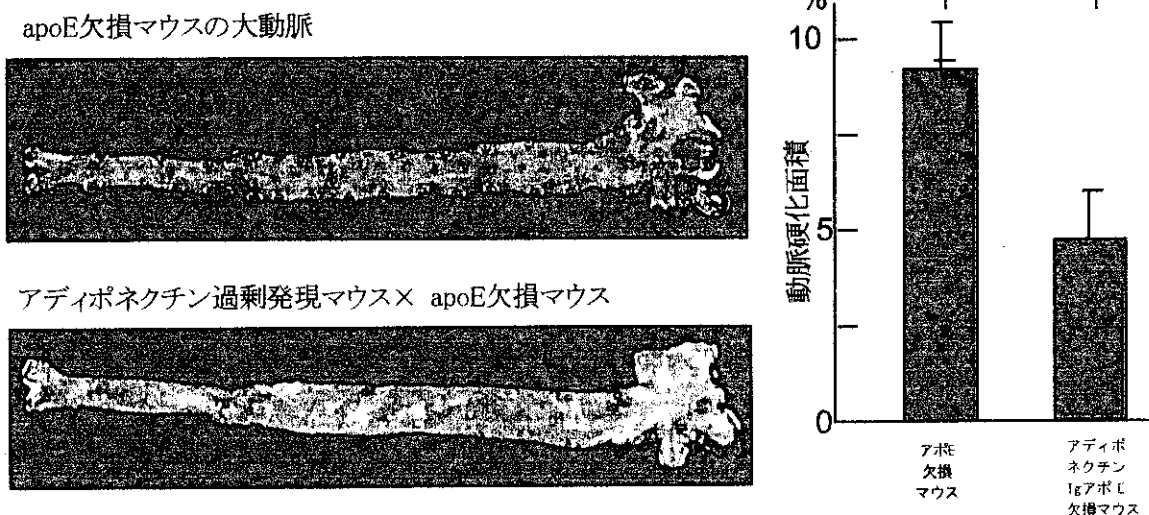
インスリン負荷試験

ブドウ糖負荷試験



(*J Biol Chem* 277 : 25863-25866, 2002)

図1. アディポネクチンヘテロ欠損マウスはインスリン抵抗性を、ホモ欠損マウスはインスリン抵抗性と耐糖能障害を呈した。



(*J Biol Chem* 277:25863-25866, 2002)

図2. アディポネクチンの過剰発現は動脈硬化モデルマウスApoE欠損マウスの動脈硬化巣を減少させた。

#### 4. 考 察

日本人の2型糖尿病感受性遺伝子座を計9箇所の染色体領域に同定し、このうち染色体3番についてはアディポネクチン遺伝子が主要なインスリン感受性遺伝子であることを明らかにした。アディポネクチン遺伝子多型による糖尿病の発症リスク上昇は約2倍と中等度の効果であるものの、その頻度は焼く40%と高いことから日本人集団におけるアディポネクチンの糖尿病発症への影響は高いと考えられる。従ってアディポネクチンを標的とした薬剤の開発は日本人における糖尿病の治療法開発にとって極めて重要であることが明らかとなった。更に本年度の研究で、アディポネクチンはAMPキナーゼ(5'-AMP-activated protein kinase)を活性化することによって、骨格筋においては脂肪酸燃焼と糖の取り込みを、肝臓では糖新生を抑制しインスリン抵抗性を改善することを明らかにした。このことはAMPキナーゼを活性化する薬剤はとりもなおさずアディポネクチン作用を増強し、インスリン抵抗性解除・糖尿病治療薬として作用することを意味している。この様にアディポネクチンの作用機序解明が根本的治療薬の標的分子を更に明確化するという成果をもたらした点で画期的である。また、本年度の研究で、動脈硬化のモデル動物であるApoE欠損マウスとアディポネクチン過剰発現マウスを掛け合わせることでアディポネクチンが直接動脈硬化を抑制する作用があることを明らかにした。このことはアディポネクチンの骨格筋・肝臓・血管壁における作用を増強する薬剤は抗糖尿病・抗動脈硬化治療薬として理想的であることを意味しており今後更に研究を推進していくことが必要であると考えられた。

#### 5. 結論

アディポネクチン遺伝子が日本人2型糖尿病の主要な感受性遺伝子であることを明らかにし、更にその情報に基づきアディポネクチンがインスリン感受性を調節するメカニズムについて研究を進展させることが出来たことは、全ゲノムスキャンによる感受性遺伝子のゲノム上の位置情報とDNAチップによる糖尿病モデル動物の発現プロファイルから得られる情報を有機的に結びつけるというこれまでのアプローチが極めて有効であったことを意味している。今後も同様のアプローチによって、染色体3番以外の8箇所の領域についても感受性遺伝子そのものの同定を目指すとともに、アディポネクチンのインスリン作用機序について詳細を明らかにしていく。2型糖尿病感受性遺伝子の大部分が同定されれば、そのひとつひとつを標的とした抗糖尿病の根本的治療法の開発が可能となる。実際に、アディポネクチン補充療法がインスリン抵抗性を著明に改善することを実験動物のレベルでは確認しており、臨床への応用を図っていく。また、SNPによる糖尿病の遺伝素因の全体像が解明されれば、糖尿病を発症する前の段階で発症を予知すること(易罹患性診断)が可能となり、高リスク群に対して重点的に生活習慣への介入を行うことによって効率的な一次予防が可能となる。また、SNPによる病態の分子的診断法により、個々人にあった最適な薬物療法などの治療法の選択、すなわちテーラーメイド医療の実現に道が開かれるものと考えられる。

#### 6. 研究発表

1. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimozawa N, Hioki K, Uchida S, Ito Y, Matsui J, Eto K, Komeda K, Tsunoda M, Murakami K, Ohnishi Y, Yamamura K, Ueyama Y, Froguel P, Kimura S, Nagai R and **Kadowaki T**. Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and apoE deficient mice from atherosclerosis. *J. Biol Chem* 278: 2461-2468, 2003.
2. Tobe K, Asai S, Matuoka K, Yamamoto T, Chida K, Kaburagi Y, Akanuma Y, Kuroki T, Takenawa T, Kimura S, Nagai R, and **Kadowaki T**. Cytoskeletal reorganization induced by insulin: involvement of Grb2/Ash, Ras and phosphatidylinositol 3-kinase signalling. *Genes Cells* 8:29-40, 2003
3. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB and **Kadowaki T**. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine* 8:1288-1295, 2002.
4. Eto K, Yamashita T, Tsubamoto Y, Terauchi Y, Hirose K, Kubota N, Yamashita S, Taka J, Satoh S, Sekihara H, Tobe K, Iino M, Noda M, Kimura S, and **Kadowaki T**. Phosphatidylinositol 3-kinase suppresses glucose-stim

- ulated insulin secretion by affecting post-cytosolic [Ca(2+)] elevation signals. *Diabetes* 51:87-97, 2002
5. Mori Y, Otabe S, Dina C, Yasuda K, Populaire C, Lecoeur C, Vatin V, Durand E, Hara K, Okada T, Tobe K, Boutin P, **Kadowaki T**, and Froguel P. Genome-wide search for type 2 diabetes in Japanese affected sib-pairs confirms susceptibility genes on 3q, 15q, and 20q and identifies two new candidate Loci on 7p and 11p. *Diabetes* 51: 1247-55, 2002
  6. Eto K, Yamashita T, Matsui J, Terauchi Y, Noda M, and **Kadowaki T**. Genetic Manipulations of Fatty Acid Metabolism in beta-Cells Are Associated With Dysregulated Insulin Secretion. *Diabetes* 51: S 414-20, 2002
  7. Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M, Matsui J, Eto K, Yamashita T, Kamon J, Satoh H, Yano W, Froguel P, Nagai R, Kimura S, **Kadowaki T** and Noda T. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem* 277: 25863-25866, 2002.
  8. Yamauchi T, Oike Y, Kamon J, Waki H, Komeda K, Tsuchida A, Date Y, Li MX, Miki H, Akanuma Y, Nagai R, Kimura S, Saheki T, Nakazato M, Naitoh T, Yamamura K and **Kadowaki T**. Increased insulin sensitivity despite lipodystrophy in Crebbp heterozygous mice. *Nature Genetics* 30: 221-226, 2002.
  9. Hara K, Boutin P, Mori Y, Tobe K, Dina C, Yasuda K, Yamauchi T, Otabe S, Okada T, Eto K, Kadowaki H, Hagura R, Akanuma Y, Yazaki Y, Nagai R, Taniyama M, Matsubara K, Yoda M, Nakano Y, Tomita M, Kimura S, Ito C, Froguel P and **Kadowaki T**. Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes* 51:536-540,2002.
  10. Vasseur F, Helbecque N, Dina C, Lobbens S, Delannoy V, Gaget S, Boutin P, Vaxillaire M, Lepretre F, Sophie Dupont S, Hara K, Clement K, Bihain B, **Kadowaki T**, and Froguel, P. Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. *Human Molecular Genetics* 11, 2607-2614, 2002
  11. Hara K, Boutin, P, Mori, Y, Tobe, K, Dina, C, Yasuda, K, Yamauchi, T, Otabe, S, Okada, T, Kadowaki, H, Hagura, R, Akanuma, Y, Ito, C, Yazaki, Y, Kimura, S, Nagai, R, Taniyama, M, Matsubara, K, Yoda, M, Nakano, Y, Tomita, M, Froguel, P, and **Kadowaki T**. Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes* 51: 536-540, 2002
  12. Hara K, Tobe K, Okada T, Kadowaki H, Akanuma Y, Ito C, Nagai R, and **Kadowaki T**. A genetic variation in the PGC-1 gene may confer insulin resistance and susceptibility to type II diabetes. *Diabetologia* 45:740-743, 2002
  13. Okunuki H, Teshima R, Shigeta T, Sakushima J, Akiyama H, **Goda Y**, Toyoda M, and Sawada J. Increased digestibility of two Products in Genetically Modified Food (CP4-EPSPS and CryI Ab) after Preheating *J.Food Hyg. Soc. Japan* 43: 68-73, 2002

## 7. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得  
東京大学TLOなどによる特許取得は計8件
- 2) 実用新案登録  
なし
- 3) その他  
特記事項なし