

厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

カルパイン 10 関連分子を用いた 2 型糖尿病遺伝子診断法と
新規治療法の開発に関する研究

平成 16-18 年度 総合研究報告書

主任研究者 堀川 幸男

平成 19 年 (2007) 年 4 月

目次

I. 総合研究報告	-----	1
カルパイン 10 関連分子を用いた 2 型糖尿病遺伝子診断法と 新規治療法の開発に関する研究		
	主任研究者	堀川 幸男
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	10
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	16

【1】 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総合研究報告書

カルパイン 10 関連分子を用いた 2 型糖尿病遺伝子診断法と新規治療法の開発に関する研究

主任研究者 堀川 幸男

岐阜大学大学院医学系研究科 臨床教授
岐阜大学医学部附属病院 助教授

研究要旨

我が国の糖尿病患者数は予備軍を含めて 1620 万人、実に 40 歳以上の約 4 人に 1 人に達しており、そのほとんどを占めるのは 2 型糖尿病である。2 型糖尿病の責任遺伝子を同定し分子レベルで成因解明に取り組むことは、新規糖尿病治療剤、予防剤の開発に繋がるため、高齢化社会を迎えつつある我が国において医療行政の観点からも急務である。主任研究者は、世界で初めて 2 型糖尿病遺伝子カルパイン 10 (*NIDDM1*) を発見することに成功した後、カルパイン 10 関連分子を包括的に網羅し、6 種類 (ID 0514, 1312, 1337, 1345, 3424, 7705) の有力関連候補分子を獲得した後、もっとも頻度高く相互作用が認められた ID3424 に先ず注目した。先ず ID3424 の周辺分子を網羅するためのカタログ作成やマイクロアレイ解析を施行し、幾つかの候補関連分子を獲得した。また既にカルパイン発現調節薬が糖尿病治療において有効である可能性を細胞レベルで示していたので、ID3424 の発現レベルやカルパイン 10 との相互作用を制御する薬剤が、2 型糖尿病のより精度の高い治療剤である可能性を考え ID3424 を過剰発現させ、糖尿病治療に有効であることを糖尿病肥満モデルマウスの治療により実証した。この ID3424 のプロモーター部位を精査したところ、若年発症型糖尿病の原因遺伝子である転写因子が特異的に ID3424 の発現レベルをあげており、糖尿病治療の一つの分子標的であることを明らかにすると共に若年型と成人型の糖尿病の共通の分子基盤を同定した。そしてこのレポーターシステムを用いて約 15 個の薬物候補化合物を獲得した。これらは 2 型糖尿病の新規予防剤・治療剤の有力候補であり、また本研究で獲得されたカルパイン 10 関連分子の遺伝子多型と多遺伝子解析ソフトウェアを用いて、タンパク質レベルで証明されている相互作用を遺伝子レベルに還元した高感度糖尿病感受性診断ツール開発も可能となった。

分担研究者

夏目 徹

独立行政法人 産業技術総合研究所

生物情報解析研究センター

機能ゲノムグループ

タンパク質ネットワーク解析

チームリーダー

みると、その責任遺伝子を同定し分子レベルで成因解明に取り組むことは、新規糖尿病治療剤、予防剤の開発に繋がるため、高齢化社会を迎えつつある我が国において急務である。

2 型糖尿病 (*NIDDM*) は多因子遺伝疾患であり、従来の方法では疾患感受性遺伝子の同定は困難とされていた。しかし主任研究者は、ポジショナルクローニングを展開し、世界で初めて 2 型糖尿病遺伝子 (*NIDDM1*) を発見することに成功した。疾患の感受性は、第 2 番染色体上のカルパイン 10 遺伝子によって決定され、この遺伝子構造の変化がコード蛋白の発現量および疾患の発症リスクと有意に関連することを明らかにした。病態が単純な遺

A. 研究目的

我が国の糖尿病患者数は予備軍を含めて 1620 万人、実に 40 歳以上の約 4 人に 1 人に達しており、そのほとんどを占めるのは 2 型糖尿病である。2 型糖尿病に起因する動脈硬化疾患の医療費が 65 歳以上の高齢者にかかる医療費 15 兆円の三分の一を占めている事を鑑

伝様式を示さないこと、環境因子が関与すること、さらにカルパイン 10 が多くの組織で発現するプロセシング蛋白であることを考えると、標的基質や周辺因子が共役グループとして糖尿病発症に働くと考えるのが自然である。この観点からカルパイン 10 関連分子を先ず包括的に網羅し、このプールから有力候補分子の選別を試みてきた。主任研究者は野生型や 2 型糖尿病の関連解析で有意差が認められた変異カルパイン 10 を、微量サンプル用マイクロ流路を備えたナノスケール BIA-MS-MS に供することにより、6 種類 (ID 0514, 1312, 1337, 1345, 3424, 7705) の有力候補分子を獲得した。このうち ID3424 は、各種ホルモンのプロセシングや核内受容体の制御やプロテオソームの活性化に関わることが知られている。本研究ではこの分子とカルパイン 10 の制御関係並びに周辺分子を含んだ糖尿病病態における役割を明らかにする。また研究者らは、既にカルパイン発現調節薬が糖尿病治療において有効である可能性を細胞レベルで示している (特許 : 60/134, 175)、カルパイン 10 関連分子である ID3424 の発現レベルやタンパク質間の相互作用を制御する薬剤が、2 型糖尿病の予防剤、或いはより精度の高い治療剤になる可能性を考え開発する。同時にカルパイン 10 分子と本研究で獲得される他の関連分子の遺伝子多型を獲得し、蛋白レベルで証明されている相互作用を遺伝子レベルに還元し糖尿病感受性診断ツールを開発することを計画した。

B. 研究方法

16 年度 研究方法

膵臓特異的発現遺伝子の収集

ヒト膵島の予備的 EST マイクロアレイは世界で唯一我々が作成に成功していたが、ID3424 の膵島内関連遺伝子のカタログを構築すべく、我々はラット・マウスの膵島発現遺伝子を実験動物を見据え網羅した。発現遺伝子の情報はいまや誰でもデータベースから自由に獲得できるが、実際に EST クローンを所持している有利性をいかして、ラットの膵臓切片を用いたラージスケール *in situ* ハイブリダイゼーションにより獲得遺伝子の膵臓での詳細な発現プロファイルを検討し、膵島特異的発現遺伝子を獲得する。

カルパイン 10 の制御機構の解明と周辺関連分子の同定

カルパイン 10 の膵島特異的基質同定と、周辺関連分子を網羅すべくカルパイン 10 過剰発現マウス単離膵島を我々独自の膵島マイクロアレイにて解析する。また得られた関連分子の発現変化を、反対にカルパインの shRNA を用いてカルパイン 10 の発現を低下させた細胞株で再検定する。以上の過程で得られた各々の関連分子は逐次インスリン産生細胞 (MIN6) で発現させて、そのグルコース応答性のインスリン分泌に及ぼす調節効果を解析する。

ID3424 発現レベル調節機構の解明

ID3424 遺伝子発現調節機構解明のためプロモーター部位を詳細に解析する。予備実験では若年発症型糖尿病の原因遺伝子の結合部位を *in silico* で見出しているため、プロモーター欠失解析により転写コア領域と結合部位をレポーターアッセイにより決定する。さらに EMSA や ChIP アッセイによりこの転写因子の結合を検証する。

17年度 研究方法

ID3424の新規基質および関連蛋白の同定

個々の臓器での ID3424 の役割を明確にするため、アデノウイルスを感染させた培養細胞（膵β細胞株 MIN6）を用いて、遺伝子レベルおよび蛋白レベルでの解析をおこなう。同時に申請者が単離している膵島を用いて、細胞株で得られた結果を検証する。

アデノウイルスによるカルパイン 10、ID3424 過剰発現の個体での作用

研究者らは既に作成が容易で効率良く肝臓に外来遺伝子を発現できるアデノウイルス発現系を立ち上げている。アデノウイルスの感染量をコントロールすることにより、全身における ID3424 の機能評価が可能となるので、感染させたマウス、ラットを用いて、全身での耐糖能、および周辺臓器のインスリン抵抗性の評価を行う。

iSNP マーカーと表現型の関連解析

NIDDM1 遺伝子座の解析知見を参考として、イントロン領域を中心に検出感度の高い ID3424 遺伝子の iSNP 収集を実施する。種々の複合 iSNP セットを LD ブロックにもとづいて構築し、カルパイン 10 関連糖尿病病態の危険度を判定する高感度 iSNP ハプロタイプ診断ツールの開発を試みる。

18年度 研究方法

ID3424の臓器別機能の同定

個々の臓器での ID3424 の役割を明確にするため、アデノウイルスを感染させた培養細胞（肝

細胞株 HepG2、筋細胞株 C2C12）を用いて、遺伝子レベルおよび蛋白レベルでのインスリン分泌・作用解析をおこなう。同時に単離膵島および肝細胞を用いて、細胞株で得られた結果を検証する。

カルパイン 10、ID3424 過剰発現・ノックアウト個体での作用

引き続き、ID3424 アデノウイルスを感染させたマウス、ラットを用いて、全身での耐糖能、および周辺臓器のインスリン抵抗性の評価を行う。また肥満糖尿病モデル動物 ob/ob マウスを用いて、カルパイン 10、ID3424 過剰発現による高インスリン血症の改善が耐糖能の改善にむすびつく可能性も、アデノウイルスの実験系を用いて解析する。また既に作成済みの ID3424 ノックアウトマウスを用いて、糖尿病関連の解析を進めていく。

ID3424 新規発現調節薬の探索と実験動物での検討

若年発症成人型糖尿病の原因遺伝子である転写因子が特異的に ID3424 の発現レベルをあげることより、糖尿病治療の一つの分子標的であることも明らかになったため、このレポーターシステムをケミカルライブラリースクリーニング系に供して新規 ID3424 発現調節化合物を獲得する。その後培養細胞系、「糖尿病モデル動物」に獲得化合物を投与して、種々の条件下でインスリン分泌、作用への効果を判定する。

iSNP マーカーと表現型の関連解析

引き続き *NIDDM1* 遺伝子座の解析知見を参考として、ID3424 のイントロン領域を中心に検

出感度の高い iSNP 収集を実施する。種々の複合 iSNP セットを LD ブロックにもとづいて構築し、デジタル化された表現型との関連を数理統計学的に処理し、カルパイン 10 関連病態の危険度を判定する高感度 iSNP ハプロタイプ診断ツールの開発を試みる。多遺伝子型疾患である糖尿病のような生活習慣病では遺伝子-遺伝子、さらに遺伝子-環境相互作用の数理統計学的解析が必要不可欠となる。これらの解析には同時に多数の遺伝子多型を簡便にかつ正確にハンドリングできるソフトウェアが要求されるのでこれを予め開発する。

倫理面への配慮

全ての実験はヘルシンキ宣言と3省庁合同指針を遵守して行われる。計画そのものは「群馬大学・岐阜大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理審査委員会」の承認を得て、DNA 試料、提供者の個人情報、臨床成績がそれぞれ番号化され連結可能匿名化の状態で保存されている。個人情報は研究に直接関わらない守秘義務を負う識別管理者が保有する。連結匿名化サンプルはプレート番号のみで表されるので2重匿名化となり、被験者のプライバシーは完全に保護される。

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する。

C. 16年度研究結果

膵臓特異的発現遺伝子の収集

我々はラット膵島並びに RINm5F（インスリン分泌能欠失）の EST を約 4 万個採取した。獲得した合計 40710 個のラット正常膵島並び

に RINm5F の EST の分類化、集団化(クラスタリング)を施行し、4078 種類の既知遺伝子と 6328 種類の未知遺伝子を獲得した。次に重複のない EST を用いて、正常膵島とインスリン分泌能の低い RIN での発現レベルに大きな差異のあるものを明らかにした。即ちインスリン分泌・合成に関与している遺伝子と膵島細胞の増殖・分化に関与する遺伝子をそれぞれ正常膵島と RIN から分別獲得した。そして先ず上記の比較でラット正常膵島のみで強く発現している遺伝子を糖尿病モデル GK ラットの発症前後で検討し、CD74 や SPARC（オステオネクチン）の発現レベルが有意に変化していることなどを明らかにした。

カルパイン10、ID3424 の膵島における意義

先ず膵臓にカルパイン10を過剰発現させると特に高濃度ブドウ糖下でのインスリン分泌が亢進することを培養細胞を用いた系で明らかにした。そしてこの効果にはインスリン遺伝子の発現レベル、インスリン含量、細胞内カルシウム濃度、ATP濃度などは関連していないことも明らかにした。そして分泌顆粒そのものの移送が関係している可能性を提示した。反対にカルパイン10をノックアウトしたマウスの単離膵島を用いて飽和脂肪酸脂質によるアポトーシスにカルパイン10が促進的に働いていることも明らかにした。

ID3424 発現レベル調節機構の解明

ID3424 のプロモーターに HNF1 遺伝子の結合部位がコンピューター検索で検出されたので、さらに *in vitro* プロモーターアッセイにより検討した。転写コア部位、結合部位決定後 (-800-1200 bp)、EMSA や ChIP アッセイ実施したところ、インスリン分泌不全を主徴とす

る若年発症成人型糖尿病を来す MODY3 遺伝子も同様に結合するものの、転写活性ドメインの違いによりこの ID3424 の発現活性化ができないことを明らかにした。

iSNP マーカーと表現型の関連解析

NIDDM1 遺伝子座の解析知見を参考として、イントロン領域を中心に検出感度の高い iSNP 収集を実施した。この方法論は *WFS1*, *HIF1A* など他の 2 型糖尿病の候補遺伝子解析に応用し有用であることも実証でき、幾つかの 2 型糖尿病感受性アリル、ハプロタイプを獲得できた。そしてカルパイン10 遺伝子多型を用いた詳細な連鎖不平衡解析を展開し日本人特異の変異 (P200T) や糖尿病関連ハプロタイプ (1-2-1) を同定した。

17 年度 研究結果

ID3424の肝、膵における関連分子の同定

ID3424 を過剰発現させたところカルパイン 10 同様インスリン分泌は高濃度ブドウ糖下で有意に亢進し、shRNA を用いてノックダウンさせるとこの効果が消失することも確認できた。カルパイン 10 ならびに ID3424 の過剰発現が膵島において抗糖尿病効果となることが明らかになった。次に ID3424 の関連タンパクを捉えるためにノックアウトマウスの肝臓を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、GK ラットの糖尿病の発症前後で大きく発現レベルの変化があり、正常膵島でのみ発現が認められた CD74 の発現レベルの低下、アミロイド 1, 2 や膵島の最終分化に関すると考えられている MafB の発現レベルの上昇が認められた。これらの遺伝子は膵臓でも発現しており、膵臓でも同様の制御機構が存在し、イ

ンスリン分泌・作用に関わっている可能性が示唆された。

カルパイン 10、ID3424 の制御機構の解明

カルパイン 10 或いは ID3424 のアデノウイルス過剰発現マウスを作成し、空腹時あるいは随時血糖低下を認めた。そこで糖新生系の代表的酵素である、PEPCK, G6Pase のプロモーターを用いてレポーターコンストラクトを作成し、肝由来の腫瘍細胞にカルパイン 10 或いは ID3424 を共に過剰発現させてインスリン、グルココルチコイド存在下でのレポーター活性を測定し、糖新生系酵素のグルココルチコイドへの応答性の低下を明らかにした。

ID3424 新規発現調節薬の探索と実験動物での検討

既にカルパイン発現調節薬が糖尿病治療において有効である可能性を細胞レベルで示していたが (特許: 60/134, 175)、若年発症成人型糖尿病の原因遺伝子である転写因子が特異的に ID3424 の発現レベルをあげ、糖尿病治療の一つの分子標的であることも明らかになったため、新規治療化合物を確保すべく、このレポーターシステムを供する放線菌ケミカルライブラリースクリーニング系を立ち上げた。さらに今後の候補化合物の薬効検定に供するための ID3424 のノックアウトマウスを作成した。

iSNP マーカーと表現型の関連解析

NIDDM1 遺伝子座の解析知見を参考として、イントロン領域を中心に検出感度の高い iSNP 収集を実施した。既に ID3424 に関しては高密度マッピングを終了しマイナーアリル 10%以上の多型 20 個を含む多型 37 個を獲得し、種々

の複合 iSNP セットを LD ブロックにもとづいて構築し、カルパイン 10 関連糖尿病病態の危険度を判定する高感度 iSNP ハプロタイプ診断ツールの開発を試みた。

18年度 研究結果

ID3424 新規発現調節薬の探索と実験動物での検討

既にカルパイン発現調節薬が糖尿病治療において有効である可能性を細胞レベルで示していたが、ID3424 の高発現が、糖尿病治療に繋がる可能性も明らかになったため、レポーターシステムを放線菌ケミカルライブラリースクリーニング系に供して現在までに約 15 個の候補化合物を獲得し、現在クロマトにて精製中である。

糖尿病モデル動物の治療

既に作成した ID3424 のノックアウトマウスでは高インスリン血症、肝、筋肉でのインスリン抵抗性が主たる糖尿病病態要因であることを明らかにした。反対に、糖尿病肥満モデル動物 ob/ob マウスに ID3424 を過剰発現させ、高インスリン血症や耐糖能が改善することを実証した。同時に不活化 ID3424 では糖関連データが改善しないことも明らかにした。

iSNP マーカーと表現型の関連解析

NIDDM1 遺伝子座の解析知見を参考として、イントロン領域を中心に検出感度の高い iSNP 収集を実施した。既に ID3424 に関しては高密度マッピングを終了し 3 個のミスセンス変異を含む、マイナーアリル 10%以上の多型 20 個を含む多型 81 個を獲得し、種々の複合 iSNP

セットを LD ブロックにもとづいて構築し数理統計学的に処理し、高感度 iSNP ハプロタイプ糖尿病感受性診断ツールの開発を試みた。

先ず、我々は独自に遺伝子多型解析プログラムを開発した (software hermes 1.5)。このプログラムにより多型データプロセッシングに要する時間は大幅に短縮された (数日から数分へ)。このプログラムはタックマンアッセイでタイピングされた生データを入力し、LDMAX,HAPLOVIEW などの連鎖不平衡解析汎用プログラムへの入力ファイルや、遺伝子-遺伝子相互作用解析の汎用プログラム MDR の入力ファイルをミスタイピングの程度により 3 段階に出力できる解析システムである。実際にカンパイン 10 関連分子に既知のエビデンスのある 2 型糖尿病感受性遺伝子多型を加えて遺伝子-遺伝子相互作用解析を施行したところ、アディポネクチン、ポタシウム ATP チャンネル、カルパイン 10、ID3424 の相互作用に有意に再現性のある糖尿病発症遺伝子多型の組み合わせを獲得できた。

D 考察

若年発症成人型糖尿病の一亜型である MODY5 はインスリン分泌予備能が低い日本人ではインスリン分泌低下型を呈するが、分泌能の高い欧米人では 2 型糖尿病の特徴的所見であるインスリン抵抗性型を呈することが報告されている。コンピューター検索を施行し ID3424 のプロモーターに HNF1 遺伝子の結合部位を見出したので、インスリン抵抗性を特徴とするありふれた 2 型糖尿病と共通の分子基盤の存在の可能性を考えプロモーターアッセイにより実証するに至った。興味深いことはインスリン分泌不全を主徴とする若年発症成人型糖尿病を来す MODY3 遺伝子も同

じ結合部位配列に結合するにもかかわらず、転写活性ドメインの違いにより ID3424 の発現活性化ができなかった。また MODY5 は様々な生殖器異常、若年痛風等の合併症を来すことより、腎嚢胞の表現型以外では各臓器ごとに多遺伝子的性質、即ち複数の遺伝子効果の相乗・相加効果による表現型誘導、を有している。ID3424 のような MODY5 遺伝子の各臓器での標的遺伝子は様々な症候における創薬上の分子標的となりうると考えられる。

現在ヒトの遺伝子の約 10% にゲノムナンバードiversityがあることが知られているが、そのゲノム多様性データベースサイト (<http://projects.tcag.ca/variation/>) にて MODY5 領域がその多様性候補領域に存在するため、実際に MODY5 の患者で検証したところ、MODY5 遺伝子領域を含む 1.2 Mb の大欠損を 1 人の患者に認めた。さらに報告のない MODY3 遺伝子の部分エクソン欠損の症例も見いだした。これらも広義のゲノムナンバードiversityに当たると考えられるが、現在までに糖尿病とゲノムナンバードiversityの関連の報告はなく興味深い。

本研究にてカルパイン 10 或いは ID3424 のアデノ過剰発現したマウスを作成し、空腹時あるいは随時血糖低下を認めた。また ID3424 遺伝子のプロモーター部位を精査し、若年発症型糖尿病の原因遺伝子である転写因子の 1 つが特異的に ID3424 の発現レベルをあげ、糖尿病治療の重要な分子標的である事も明らかになった。そして ID3424 の過剰発現が実際に糖尿病治療に有効であることを糖尿病肥満モデルマウス ob/ob の治療により実証できた。さらにこのレポーターシステムを利用することにより、2 型糖尿病の新規予防剤・治療剤の候補化合物を約 15 個獲得している。「カル

パイン 10 異常型糖尿病 (NIDDM1)」という新しい疾患概念を確立すると共に新規糖尿病治療剤の開発を目指した本アプローチは、他の多因子遺伝疾患の解析戦略の良き規範となることは疑いない。また本研究で獲得されたカルパイン 10 関連分子の遺伝子多型を用いた蛋白レベルで証明されている相互作用を遺伝子レベルに還元した高感度糖尿病感受性診断ツール開発のためには、遺伝子-遺伝子あるいは遺伝子-環境相互作用を包括的に捉え解析できるソフトウェアが必要であることは言うまでもなく、我々は MDR に代わる疾患感受性遺伝子多型組み合わせ探索ソフトを開発中である。

E. 結論

主任研究者は、世界で初めて 2 型糖尿病遺伝子カルパイン 10 (*NIDDM1*) を発見することに成功した後、カルパイン 10 関連分子を包括的に網羅し、6 種類 (ID 0514, 1312, 1337, 1345, 3424, 7705) の有力関連候補分子を獲得したが、もっとも頻度高く相互作用が認められた ID3424 に先ず注目した。研究者らは、既にカルパイン発現調節薬が糖尿病治療において有効である可能性を細胞レベルで示していたので (特許: 60/134,175)、ID3424 の発現レベルやカルパイン 10 との相互作用を制御する薬剤が、2 型糖尿病のより精度の高い治療剤である可能性を考えた。先ずこの ID3424 のプロモーター部位を精査したところ、若年発症型糖尿病の原因遺伝子である転写因子が特異的に ID3424 の発現レベルをあげており、糖尿病治療の一つの分子標的であることを明らかにすると共に若年型と成人型の糖尿病の共通の分子基盤を同定した。そして ID3424 の過剰発現が糖尿病治療に有効であることを糖尿病肥

満モデルマウスの治療により実証した。

さらにこのレポーターシステムを用いて 15-20 個の薬物候補化合物を獲得した。今後はこれらを精製し、化合物構造を決定し、各種細胞株や糖尿病モデル動物に投与することにより 2 型糖尿病の新規予防剤・治療剤としての検証を進めていく。また本研究で開発した遺伝統計解析ソフトウェアを用いてカルパイン 10 関連分子の遺伝子多型を用いたタンパク質レベルで証明されている相互作用を遺伝子レベルに還元した高感度糖尿病感受性診断ツールの開発が可能となった。

カルパイン 10 は主任研究者により、世界で初めて 2 型糖尿病遺伝子 (*NIDDM1*) として発見された。カルパインファミリーは 10 数個のメンバーから構成される、カルシウム依存的なプロテアーゼである。これまでアルツハイマー病、筋萎縮症との関連などが示され、その詳細な機能解析に世界中の研究施設がしのぎを削ってきた。しかし、カルパインファミリーはタンパク質として非常に取り扱いにくく、基質特異性、制御メカニズムなどのタンパク質レベルでの研究ははかばかしくない。しかし、今回の蛋白質ネットワーク解析の結果、世界に先駆け、カルパイン 10 が糖代謝に関わるシグナル伝達と、その核内移行に関わる分子群の複合体として働いていることを明らかにするとともに、その制御はインスリンの代謝にも依存しており、カルパイン 10 は糖代謝とインスリン代謝を通して、血糖値の恒常性に関与する重要分子であることが明らかになってきた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 国内

原著論文 0 件

レビューなど 30 件

海外

原著論文 35 件

レビューなど 2 件

2. 学会発表

国内 口頭発表 80 件

海外 口頭発表 10 件

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

「糖尿病予防剤又は治療剤、又は該疾患に係わる方法」について特許申請予定

【II】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

平成 16 年度

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Buijs J, <u>Natsume T</u> 他	Combination Surface Plasmon Resonance with Mass Spectrometry: Identifying Binding Partners and Characterizing Interactions.	R. J. Simpson	Purifying Proteins for Proteomics	Cold Spring Harbor Laboratory	New York	2004	567-578

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Iwasaki N, <u>Horikawa Y</u> , 他	Genetic variants in the calpain-10 gene and the development of type2 diabetes in the Japanese population	J Hum Genet	50	92-98	2005
Nishimura M <u>Horikawa Y</u> , 他	Construction of a multi-functional cDNA library specific for normal mouse pancreatic islets and its application to microarray	DNA Res	11	315-323	2004
Tanaka T, <u>Horikawa Y</u> 他	Expression profile of mRNAs from rat hippocampus and it's application to microarray	Mol Brain Res	129	20-32	2004
Kawamoto T, <u>Horikawa Y</u> 他	Genetic variations in the WFS1 gene in Japanese with type 2 diabetes and bipolar disorder	Mol Genet Metab	82	238-245	2004
Shihara N, <u>Horikawa Y</u> 他	Identification of a <i>de novo</i> case of hepatocyte nuclear factor-1b deficiency with highly varied phenotypes	Diabetologia	47	1128-29	2004
Johnson JD <u>Horikawa Y</u> 他	RyR2 and calpain-10 delineate a novel apoptosis pathway in pancreatic islets	J Biol Chem	279	24794-802	2004
Otani K, <u>Horikawa Y</u> 他	Calpain system regulates muscle mass and glucose transporter GLUT4 turnover	J Biol Chem	279	20915-20	2004

Bannai H, Natsume T 他	An RNA-interacting protein, SYNCRIP (hnRNP Q1/NSAP1) is a component of mRNA granule transported with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 mRNA in neuronal dendrites.	J Biol Chem	279	53427-34	2004
Higo T, Natsume T 他	Subtype-specific and ER-lumenal-environment-dependent Regulation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 1 by ERp44.	Cell	120	85-98	2004
Ishigaki S, Natsume T 他	Physical and functional interaction between dorfin and valosin-containing protein that are colocalized in ubiquitylated inclusions in neurodegenerative disorders.	J Biol Chem	279	51376-85	2004
Komatsu M, Natsume T 他	A novel protein-conjugating system for Ufm1, a ubiquitin-fold modifier	Embo J	23	1977-86	2004
Nakayama K, Natsume T 他	Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis	Dev Cell	6	661-672	2004
Oyama M, Natsume T 他	Analysis of small human proteins reveals the translation of upstream open reading frames of mRNAs	Genome Res	14	2048-2052	2004
Yanagida M, Natsume T 他	Human fibrillarin forms a sub-complex with splicing factor 2-associated p32, protein arginine methyltransferases, and tubulins alpha 3 and beta 1 that is independent of its association with preribosomal ribonucleoprotein	J Biol Chem	279	1607-1614	2004

平成 17 年度

書籍

なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Hishiya A, <u>Natsume T</u> 他	A novel ubiquitin-binding protein ZNF216 functioning in muscle atrophy	EMBO J	25	554-64	2006
Honma M, <u>Natsume T</u> 他	Dok-3 sequesters Grb2 and inhibits the Ras-Erk pathway downstream of protein-tyrosine kinases	Genes Cells	11	143-51	2006
Nakano Y <u>Horikawa Y,</u> 他	A functional variant in the human betacellulin gene promoter is associated with type 2 diabetes	Diabetes	54	3560-3566	2005
Yamada N <u>Horikawa Y,</u> 他	Genetic variation in the HIF-1 α gene is associated with type 2 diabetes in Japanese	J Clin Endocrinol Metab	90	5841-47	2005
Wang H <u>Horikawa Y,</u> 他	Gene expression profile in rat pancreatic islet and RINm5F cells	J Mol Endocrinol	35	1-12	2005
Kojima H, <u>Natsume T</u> 他	STAT3 regulates Nemo-like kinase by mediating its interaction with IL-6-stimulated TGF β -activated kinase 1 for STAT3 Ser-727 phosphorylation	Proc Natl Acad Sci U S A	102	4524-4529	2005
Matsuda N, <u>Natsume T</u> 他	DDB2, the xeroderma pigmentosum group E gene product, is directly ubiquitylated by Cullin 4A-based ubiquitin ligase complex	DNA Repair	4	537-45	2005
Yoshida K, <u>Natsume T</u> 他	JNK phosphorylation of 14-3-3 proteins regulates nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response to DNA damage	Nat Cell Biol	7	278-285	2005
Moriguchi T, <u>Natsume T</u> 他	WNK1 regulates phosphorylation of cation-chloride-coupled cotransporters via the STE20-related kinases, SPAK and OSR1	J Biol Chem	280	42685-42693	2005
Hirano Y, <u>Natsume T</u> 他	A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes	Nature	437	1381-5	2005

平成 18 年度

書籍

なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Horikawa Y.</u>	Type 2 diabetes susceptibility gene-calpain 10	Endoc J	53	567-576	2006
Kitajima TS, <u>Natsume T</u> 他	Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin	Nature	441	46-52	2006
Terasawa K, <u>Natsume T</u> 他	Cdc37 interacts with the glycine-rich loop of Hsp90 client kinases	Mol Cell Biol	26	3378-3389	2006
Yokoi N, <u>Horikawa Y.</u> 他	Association Studies of Variants in the Genes Involved in Pancreatic β -Cell Function in Type 2 Diabetes in Japanese	Diabetes	55	2379-2386	2006
Yamada M <u>Natsume T</u> 他	NARF, an Nemo-like Kinase (NLK)-associated Ring Finger Protein Regulates the Ubiquitylation and Degradation of T Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor (TCF/LEF).	J Biol Chem	281	20749-20760	2006
Sato S <u>Natsume T</u> 他	Proteomic profiling of lipid droplet proteins in hepatoma cell lines expressing hepatitis C virus core protein	J Biochem (Tokyo).	139	921-930	2006
Polouliakh N, <u>Natsume T</u> 他	Comparative genomic analysis of transcription regulation elements involved in human map kinase g-protein coupling pathway	J Bioinform Comput Biol	4	469-482	2006
Hyodo-Miura J, <u>Natsume T</u> 他	XGAP, an ArfGAP, is required for polarized localization of PAR proteins and cell polarity in Xenopus gastrulation	Dev Cell	11	69-79	2006
Hamazaki J, <u>Natsume T</u> 他	A novel proteasome interacting protein recruits the deubiquitinating enzyme UCH37 to 26S proteasomes	EMBO J	25	4524-4536	2006
Kajino T, <u>Natsume T</u> 他	Protein phosphatase 6 down-regulates TAK1 kinase activation in the IL-1 signaling pathway	J Biol Chem	281	39891-39896	2006

Hirano Y, <u>Natsume T</u> 他	Cooperation of Multiple Chaperones Required for the Assembly of Mammalian 20S Proteasomes	Mol Cell	24	977-984	2006
------------------------------------	---	-----------------	----	---------	------

【III】研究成果の刊行物・別刷

*Observation***Identification of a new case of hepatocyte nuclear factor-1 β mutation with highly varied phenotypes**

To the Editor: Mutations in the hepatocyte nuclear factor (HNF)-1 β gene cause a rare form of MODY5 [1]. The various phenotypic features found in patients are related to tissues that express HNF-1 β , including pancreas, kidney, liver and uterus. As the highest level of expression is in the kidney, a range of developmental abnormalities of the kidney, which may cause non-diabetic renal dysfunction, have been described [2, 3, 4, 5, 6]. Of these, multiple renal cysts are the commonest phenotypic feature. Recently, the apparently distinct hereditary diseases, familial hypoplastic glomerulocystic kidney disease and familial juvenile hyperuricaemic nephropathy (FJHN), were also found to be associated with HNF-1 β mutations [3, 4], although there are other established genetic loci for FJHN. Because HNF-1 β is expressed from the earliest stages in the development of Wolffian duct in the fetus, mutations may also be associated with hereditary urogenital dysplasia [5, 6]. Thus, it is important to accumulate knowledge from various cases to understand the broad spectrum of clinical features associated with HNF-1 β mutation. However, only 13 families with mutations have so far been described, regardless of the presence or absence of diabetes. Here, we present a new case of HNF-1 β mutation which has highly varied symptoms.

The affected subject is a 17-year-old woman. Four weeks after birth (full-term birthweight 2930 g) she was found to have renal insufficiency with a blood urea nitrogen level of 15.35 mmol/l and a serum creatinine level of 194.48 μ mol/l. Bilateral multiple renal cysts in normal-sized kidneys were found by ultrasonography. Peritoneal dialysis was initiated at the age of 4 months owing to rapid progress of renal dysfunction. High blood glucose was first noticed at the age of 6 years (insulinogenic index 0.20; HbA_{1c} 7–8%), which is the earliest onset reported to date, when she was admitted to hospital with bacterial meningitis. Autoimmune antibodies were all negative. At the age of 7 years, her left kidney was resected and renal transplantation from her mother was performed. Ultrasonography before the operation showed that she had small kidneys (left 6.2 cm long; right 6.0 cm long). The pathological findings from the resected kidney (weighing 76 g) have previously been reported [7]. Briefly, most of the cut surface of the kidney is occupied by the cortex; the papillae and medulla are small and atrophic. The cortex contained numerous cysts of various sizes, which consisted of a dilated Bowman's space

and collapsed glomerular tufts. Clusters of immature metanephric cells, which were often arranged in a circular pattern forming lumens, were scattered throughout the area. Since the transplanted kidney function is currently normal, renal transplantation is effective for treatment of the renal phenotypes.

After the operation, various doses of prednisolone, ciclosporin and mizoribin were used for immunosuppression. Two years after renal transplant, blood glucose levels were highly elevated and the patient was treated by intensive insulin therapy (48 units/day). Urinary C-peptide level at initiation was 1.92 nmol/l, suggesting that the diabetes became insulin dependent. There has been no obesity throughout the clinical course. There is no diabetic retinopathy or neuropathy at present. Because of early-onset diabetes and multiple renal cysts, which are characteristic of MODY5, all of the exons and flanking regions of the HNF-1 β gene were screened for mutations by direct sequencing, as described previously [1, 2], resulting in the identification of a novel heterozygous frameshift mutation, L95fsinsAGCT (insertion of AGCT at the codon 95 for Leu), which could generate a truncated 116 amino acid protein. Gene testing of both parents, who were shown to be non-diabetic by an oral glucose tolerance test, revealed no mutation in the corresponding site of the gene, indicating that this is in fact a new HNF-1 β mutation.

Based on the diagnosis of MODY5, other tissues expressing HNF-1 β were extensively examined. Magnetic resonance imaging (MRI) revealed bicornuate uterus. Vaginal aplasia was also observed. Since similar abnormalities have been observed in three other families with the mutations, genital malformations may be an important manifestation of MODY5. Liver dysfunction with increased levels of transaminase was noticed shortly after birth in the patient and continues to the present (aspartate aminotransferase 79 U/l, alanine aminotransferase 138 U/l), although the liver size was normal according to MRI. Also observed was HDL-dominant hypercholesterolaemia (total cholesterol 6.31 mmol/l, HDL cholesterol 3.15 mmol/l). However, although the liver expresses both HNF-1 β and a heterodimerising partner HNF-1 α , which was found to be essential for bile acid metabolism and cholesterol metabolism in the liver, this is the first case representing liver dysfunction and hypercholesterolaemia.

The patient also has unusual neurological symptoms of epilepsy and learning difficulty. Similar learning difficulty was previously described in another patient with a mutation in the gene [3]. While HNF-1 β is known to regulate regional specification of zebrafish brain, the significance in human brain development is unknown. The patient also presents the unusual feature of prognathism of mandibula, although HNF-1 β is not expressed in bone tissue. Interestingly, prognathism has previously been described in two families with different mutations in HNF-1 β [3], suggesting that HNF-1 β may regulate genes encoding possible secreted proteins involved in bone growth of the mandibula.

The patient presents highly varied clinical features, some of which are quite severe. To investigate the molecular mechanism by which the mutation might cause the various phenotypic

DOI 10.1007/s00125-004-1402-y

Received: 18 February 2004 / Accepted: 26 March 2004

Published online: 28 May 2004

© Springer-Verlag 2004

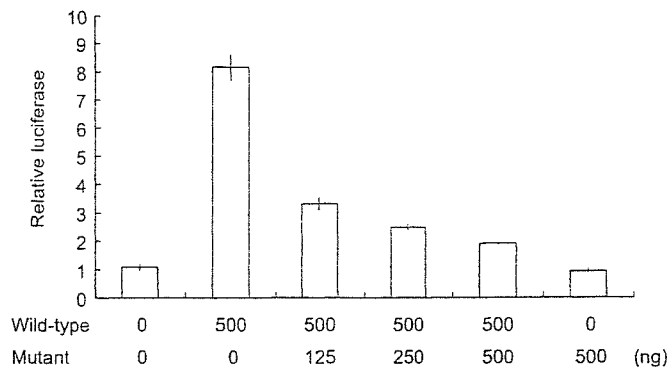


Fig. 1. Functional analysis of the identified HNF-1 β mutation. The wild-type expression construct was prepared using human HNF-1 β cDNA and vector pCMV6b. The L95fsinsAGCT mutation was introduced in the sequence by site-directed mutagenesis and cloned into pCMV6b. The reporter construct pGL3-RA was prepared by cloning the rat albumin gene promoter into the firefly luciferase reporter vector pGL3-Basic (Promega, Madison, Wis., USA). HepG2 cells were transfected with various amounts of the reporter and test plasmid constructs. The transactivation activity of the wild-type and mutant proteins was measured using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) as described previously [8]

ic features, wild-type and mutant proteins were transiently expressed in cultured hepatic cells. Luciferase reporter assay revealed L95fsinsAGCT to be a null function mutation (Fig. 1). However, when co-expressed with wild-type, the mutation behaved as strong dominant negative regulation; an equimolar amount of the mutant reduced wild-type activity by ~85%. However, whether the dominant negative mechanism influences the diversity of phenotypes seen in this patient is unknown.

Since molecular cooperation with other diabetogenes might increase the severity of symptoms or hasten onset, other MODY genes were also screened for mutations in this patient, resulting in the identification of one missense mutation, D78H, in the BETA2/NeuroD1 (MODY6) gene; the allele frequency in the general population is 0.002 (three in 1330 alleles). Since the mutation was transmitted from the non-diabetic mother, this mutation alone should not cause diabetes. However, because HNF-1 directly regulates BETA2/NeuroD1 gene transcription, some synergistic effect on increased morbidity is possible.

This report of a solitary case owing to a new mutation expands our clinical knowledge on HNF-1 β deficiency. Accumulation of additional cases and identification of the molecular participants in the transcriptional events are required to clarify this distinct syndrome of varied phenotypes.

Acknowledgements. We thank S. Oike, Y. Yaginuma, I. Uda and T. Takahashi for excellent technical services. This study was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas from the Japan Ministry of Science, Education, Sports, Culture and Technology, by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Japan Society for the Promotion of Science, by Comprehensive Research on Aging and Health and Research on Human Genome, and Tissue Engineering Food Biotechnology from the Japan Ministry of Health, Labor and Welfare, by the Yamanouchi Foundation for Research, and by Core Research for Evolutional Science and Technology

(CREST) from Japan Science and Technology Corporation (JST).

N. Shihara, Y. Horikawa
Laboratory of Molecular Genetics, Department of Cell Biology, Institute for Molecular and Cellular Regulation, Gunma University, Maebashi, Gunma 371-8512, Japan

T. Onishi, M. Ono, K. Kashimada
Department of Pediatrics and Developmental Biology, Graduate School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University, Japan

J. Takeda
Department of Endocrinology, Diabetes and Rheumatology, Division of Bioregulatory Medicine, Gifu University School of Medicine, Gifu, Japan

References

- Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M et al. (1997) Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 β gene (*TCF2*) associated with MODY. *Nat Genet* 17:384–385
- Nishigori H, Yamada S, Kohama T et al. (1998) Frameshift mutation, A263fsinsGG, in the hepatocyte nuclear factor-1beta gene associated with diabetes and renal dysfunction. *Diabetes* 47:1354–1355
- Bingham C, Bulman MP, Ellard S et al. (2001) Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1beta gene are associated with familial hypoplastic glomerulocystic kidney disease. *Am J Hum Genet* 68:219–224
- Bingham C, Ellard S, van't Hoff WG et al. (2003) Atypical familial juvenile hyperuricemic nephropathy associated with a hepatocyte nuclear factor-1beta gene mutation. *Kidney Int* 63:1645–1651
- Linder TH, Njolstad PR, Horikawa Y, Bostad L, Bell GI, Sovik O et al. (1999) A novel syndrome of diabetes mellitus, renal dysfunction and genital malformation associated with a partial deletion of the pseudo-POU domain of hepatocyte nuclear factor-1beta. *Hum Mol Genet* 11:2001–2008
- Iwasaki N, Okabe I, Momoi MY, Ohashi H, Ogata M, Iwamoto Y (2001) Splice site mutation in the hepatocyte nuclear factor-1 beta gene, IVS2nt+1G>A, associated with maturity-onset diabetes of the young, renal dysfunction and bicornuate uterus. *Diabetologia* 44:387–388
- Takeda A, Ohgushi H, Mizusawa Y et al. (1999) Dysplastic glomerulocystic kidney. *Clin Exp Nephrol* 1:51–53
- Tomura H, Nishigori H, Sho K, Yamagata K, Inoue I, Takeda J (1999) Loss-of-function and dominant negative mechanisms associated with hepatocyte nuclear factor-1 β mutations in familial Type 2 diabetes mellitus. *J Biol Chem* 274:12975–12978

Y. Horikawa (✉)

Laboratory of Molecular Genetics,
Department of Cell Biology,
Institute for Molecular and Cellular Regulation,
Gunma University, 3-39-15, Showa-machi, Maebashi,
Gunma 371-8512, Japan
E-mail: yhorikaw@showa.gunma-u.ac.jp
Tel.: +81-27-2208831, Fax: +81-27-2208889

Abbreviations: HNF, hepatocyte nuclear factor · MRI, magnetic resonance imaging · FJHN, familial juvenile hyperuricaemic nephropathy