

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

インスリン分泌促進型経口糖尿病薬の薬物応答関連
遺伝子の多型探索及びそのテーラーメイド投薬への応用

平成19年度 総括・分担研究報告書
(H17-ファーマコー一般-004)

主任研究者 齋藤 嘉朗

平成20(2008)年3月

目 次

I. 総括研究報告

インスリン分泌促進型経口糖尿病薬の薬物応答関連遺伝子の多型探索及び
そのテーラーメイド投薬への応用 ----- 1
齋藤 嘉朗

II. 分担研究報告

1. インスリン分泌促進型経口糖尿病薬の薬物応答関連遺伝子の多型探索の
ための臨床パネルの作成および新規候補遺伝子の探索 ----- 13
安田 和基

2. インスリン分泌促進型経口糖尿病薬の薬物応答関連候補遺伝子の多型解析
----- 22
齋藤 嘉朗

3. インスリン分泌促進型経口糖尿病薬による二次無効発現に関するゲノム網羅
的遺伝子多型解析 ----- 30
前川 京子

4. インスリン分泌促進型経口糖尿病薬の薬物応答関連遺伝子の多型に関する
機能解析 ----- 36
埴岡 伸光

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 45

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 47

I. 総括研究報告

インスリン分泌促進型経口糖尿病薬の薬物応答関連遺伝子の多型探索
及びそのテーラーメイド投薬への応用

主任研究者 齋藤嘉朗 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部 室長

研究要旨： インスリン分泌促進型経口糖尿病薬、特にスルホニルウレア剤の薬効最適化とその持続を目指して、患者毎の遺伝子型に基づく投薬法（投薬量及び薬物選択法）を確立することを目的とする。一次無効との相関解析関連では、これまでに同定したアミノ酸置換を伴う新規 *HNF4A* および *CYP2C8* 多型の *in vitro* 機能解析を行い、*CYP2C8* の1種の多型が酵素活性を完全に欠損させるものであることを明らかとした。二次無効との相関解析関連では、二次無効の発現機構は不明なため、*in vitro* で確立したインスリン分泌障害モデルを用い、二次無効を起こしやすい薬物と起こしにくい薬物により誘導が異なる遺伝子を DNA チップで検索し、さらに実際のインスリン分泌への影響を siRNA により確認し、3種の遺伝子がインスリン分泌障害に関与することが示唆された。二次無効群、長期有効群（対照群）、早期無効群の検体を用いた相関解析では、ゲノム網羅的遺伝子多型解析を継続し、SU 剤長期有効患者 140 名、二次無効患者 71 名の相関解析の結果、100 個の多型が $p < 0.001$ で二次無効と相関し、これらの中には、アポトーシス関連のシグナル伝達分子、脂質代謝に関与する分子、蛋白質分解酵素等をコードする遺伝子の領域内または、その近傍に位置する多型が含まれていた。また QQ p-value plot による多重比較法において4個の多型が二次無効と有意に相関した。また候補遺伝子多型解析では、主として、SU 剤有効 11 年以上の長期有効患者 130 名及び SU 剤使用 10 年以内でインスリン治療に移行した二次無効患者 42 名というフェノタイプが大きく異なるサブグループ間で、23 遺伝子 65 多型のアリル頻度等を比較し、単相関解析で9種の有意に異なる多型を見いだした。さらに本研究で相関が明らかとなった多型を用いた多変量解析を行い、二次無効予測モデルを確立した。

分担研究者

国立国際医療センター研究所

代謝疾患研究部長 安田 和基

岡山大学大学院

医歯薬学総合研究科准教授 埴岡 伸光

国立医薬品食品衛生研究所

機能生化学部主任研究官 前川 京子

A. 研究目的

本邦の糖尿病患者は約900万人に達する

。糖尿病は治癒することはない、失明・腎症等の合併症を引き起こす。2型糖尿病の治療にはインスリン分泌促進型経口糖尿病薬が多用されている。しかし、低血糖等の副作用や、一定の割合で投与初期から十分な薬効が得られない「一次無効」が起こり、また一旦は薬効が得られたものの長期連用により薬効が消失する「二次無効」が約2割で発生し臨床問題となっている。これらには遺伝因子の関与も示唆されている

が、相関する遺伝子多型の報告は極めて少ない。

本研究はインスリン分泌促進型経口糖尿病薬、特にスルホニルウレア剤（以下、SU剤）の薬効最適化とその持続の予測モデルを確立するため、新規候補遺伝子探索、候補遺伝子及び網羅的遺伝子多型解析、新規同定多型の機能解析等を行う。これらにより、患者毎の背景因子や遺伝子型に基づく投薬法（投薬量及び薬物選択法）を確立することを目的とする。

今年度は、一次無効との相関解析関連で、新規に同定した *HNF4A* および *CYP2C8* の遺伝子多型、計 3 種の *in vitro* 機能解析を行った。また二次無効発現との相関解析関連では、新規二次無効候補遺伝子の同定のために、確立した二次無効を起こしやすい薬物によるインスリン分泌障害モデルを用いて、siRNA 等により、二次無効発現との関連が示唆される遺伝子を 3 種同定した。検体を用いた相関解析では、アフィメトリクス 250 K アレイを用いたゲノム網羅的遺伝子多型解析も継続した。また候補遺伝子多型解析では、膵β細胞の維持に重要と思われる遺伝子で、日本人の多型情報が乏しい 2 遺伝子につきシーケンシングによる多型探索を行った。またタイピング系により、膵β細胞機能関連の 21 遺伝子の多型解析をタイピングにて行い、ケース群とコントロール群のアリル頻度等を比較して、二次無効発現と相関する多型を探索した。

B. 研究方法

I 一次無効関連

1) 新規遺伝子多型の機能解析

a) *HNF4A* 多型の機能解析

野生型 *HNF4A* (1 型及び 2 型) cDNA を

肝全 RNA より調製した肝全 cDNA よりクローニングした (1-WT, 2-WT)。さらに、2 つの連鎖する遺伝子変異 (1154C>T (A385V) 及び 1193T>C (M398T)) を導入した (1-Mutant, 2-Mutant)。また cDNA を挿入していない Blank ベクターも作製した (Blank)。配列確認後、これら計 5 種を哺乳動物発現用ベクターに組換えた後、トランスフェクションに用いた。レポーターベクターとしては、*HNF1A* のプロモーター領域 (*HNF4α* 結合部位を含む) を挿入したものを調製した。

デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイによる *HNF4α* 転写活性測定では、*HNF4α* 発現ベクターおよびレポーターベクターを COS-7 細胞に同時トランスフェクションした。さらに 24 時間培養した後、野生型および変異型 *HNF4α* の転写活性を測定した。転写活性はそれぞれの細胞におけるホタルルシフェラーゼ活性 (Fluc) とウミシイタケルシフェラーゼ活性 (Rluc) の比 (Fluc/Rluc) として表した。

b) 野生型及び変異型 *CYP2C8* の機能解析

野生型 *CYP2C8* (*CYP2C8*1A*) cDNA はヒト肝全 RNA から逆転写反応により調製した肝全 cDNA よりクローニングした。その際は酵母用ベクターにクローニングするための *HindIII* 認識配列および酵母コンセンサス配列を付加した。アミノ酸置換を伴う新規遺伝子多型 *CYP2C8*X* 及び *CYP2C8*Y* の cDNA は、*CYP2C8*1A* を鋳型にして部位特異的変異導入法により調製した。配列確認後、これら計 3 種のベクターを制限酵素 *HindIII* で完全消化後、DNA を精製した。また、酵母発現用ベクター pGYR I (酵母の P450 oxidoreductase cDNA を組み込み済) も *HindIII* で完全消化し、ベクターのセルフラ

イゲーションを防ぐため、5'-末端リン酸基を除去した。次に、野生型及び変異型 CYP2C8 cDNA を pGYR I の HindIII 切断部位にライゲーションし、大腸菌 DH5 α を形質転換した。目的 cDNA の挿入及び pGYR I ベクターの発現プロモーターに対する挿入方向はシーケンシングにより確認した。

本ベクターを用いて酵母細胞 *Saccharomyces cerevisiae* AH22 株を形質転換し、順にスケールアップし、最終的に 1.8 L の培養液から、酵母細胞を回収し、さらにマイクロソーム画分を調製した。陰性対照として pGYR I のみをトランスフェクションしたものを同様に作製した (mock)。CYP 含量 (ホロ蛋白量) は、マイクロソーム画分を用いて、還元型 CO 差スペクトルを測定して算出した。またアポ+ホロ蛋白量はイムノブロッティングにより測定した。野生型および変異型 CYP2C8 の酵素活性は、パクリタキセル 6 α -水酸化活性を、Soyama らの方法 (Soyama et al., Biol Pharm Bull. 24: 1427-1430 (2001)) に準じて測定した。即ち、CYP2C8 発現酵母マイクロソームを除く上記の反応混合液を、37°C で 1 分間予備反応した後、CYP2C8 発現酵母マイクロソームの添加によって反応を開始した。37°C で 10 分間反応した後、酢酸エチルを 3 mL 添加して反応を停止した。内部標準物質としてドセタキセルを加えて攪拌後、その有機溶媒相を分取し乾固した。残渣を 50% methanol に溶解し、その一部を HPLC に付した。

II 二次無効関連

1) 新規候補遺伝子探索のための、膵 β 細胞における SU 剤によるインスリン分泌障害モデルの解析

a) SU 剤による膵 β 細胞分泌障害モデルにおける遺伝子発現変化の解析

培養株の中でも生理的な β 細胞にその性質が近いとされる、ラット INS-1D 細胞を用いて、数種の SU 剤をそれぞれ 16hr 作用させた後、インスリン分泌反応を検討した平成 18 年度の検討において、インスリン含量当たりの分泌は、1 μ M、10 μ M の Glibenclamide で 25mM グルコース (以下 G25) 刺激による分泌が低下し、いわゆるグルコース反応性インスリン分泌 (glucose-stimulated insulin secretion、以下 GSIS) が障害されていた。一方、二次無効を生じにくい Tolbutamide では、比較的 GSIS が保たれていた。そこで、細胞を培養して前記と同様のモデルを作成し、Qiagen 社 RNeasy キットを用いて Total RNA を抽出した後、Affymetrix 社 GeneChip システム・Rat Genome 2.0 Array (約 3 万転写産物) にて遺伝子発現を網羅的に解析した。その結果、Glibenclamide による GSIS 障害モデルで特異的に発現が変化する遺伝子、その逆に GSIS が保たれるモデルでのみ発現が変化する遺伝子、を選定した。

b) siRNA を用いた発現抑制

それぞれの遺伝子に対し、それぞれ 3 種の siRNA を作成し INS-1D 細胞へ導入した。最終 siRNA 濃度は、10nM とした。24 時間後に RNA を回収して、TaqMan 法により、該当遺伝子の発現をコントロール siRNA 導入細胞と比較した。50%以上のノックダウンがみられた siRNA について、各遺伝子 2 種ずつを選び、改めて INS-1D 細胞へ導入し、72 時間後にバッチインキュベーション法によりインスリン分泌を検討した。刺激メデイウムとしては、グルコース 3mM (以下 G3)、25mM (G25) 及び KCl 30mM (K30) を用いた。上清を完全に除いた後、酸エタノール溶液を細胞に加え、-20°C で

24hr 静置した後回収し、インスリン含量アッセイに供した。また、上記遺伝子のノックダウンの効果を、Glibenclamide 処理 GSIS 障害モデルにおいて検討するため、siRNA を投与して 56 時間後に、薬剤を含む培地に交換し、16 時間インキュベートした後 (siRNA 投与後 72 時間になる)、やはりバッチインキュベーション法により、インスリン分泌を検討した。

2) 患者検体の解析

検体は、分担研究者である国立国際医療センター研究所・安田和基部長より、昨年度供与頂いたもの (計 389 検体) を使用した。「二次無効群」は「3 年以上 SU 剤を使用しインスリン治療に移行した」群、「長期有効群 (対照群)」は「5 年以上 SU 剤を使用し現在もインスリン治療へ移行していない」群、「早期無効群」は「SU 剤使用期間が 3 年未満でインスリン治療に移行した」群である。

a) ゲノム網羅的遺伝子多型解析

長期有効群 (対照群) 及び二次無効群の検体を対象に、Affymetrix 社 Gene Chip Human Mapping 250K Nsp Array を用いてゲノム網羅的遺伝子多型解析を継続した。即ち、ゲノム DNA 250 ng を制限酵素 Nsp I で処理し、アダプターをライゲーションした。アダプターを付加した DNA フラグメントを PCR 増幅後、アガロースゲル電気泳動にて 250-2000 bp のサイズのフラグメントが優先的に増幅していることを確認した。精製した PCR 産物を定量し、その一部を DNase I で処理した。アガロースゲル電気泳動にて 180 bp 以下のサイズに断片化されたことを確認し、さらに末端標識した。標識した鋳型 DNA を含むハイブリダイゼーションカ

クテルを 49°C で 17 時間インキュベートして、アレイにハイブリダイズさせた。アレイを洗浄・染色後、専用スキャナーにて蛍光画像を解析した。各プローブのシグナル強度を算出し、Dynamic Model (DM) アルゴリズムにより各アレイのアレル判定率を評価し、93%以上の場合のみ Bayesian Robust Linear Model with Mahalanobis distance classifier (BRLMM) アルゴリズムを用いてクラスタリング解析を行い、得られたジェノタイプを最終判定結果とした。

全タイピングデータは、関連解析ツール GQuest (Stargen, Tokyo, Japan) により (A) 「各多型につきアレル判定率が 90%以上であり」、かつ (B) 「Fisher の正確確率検定を用いた Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) 法則への適合度検定により $p > 0.05$ (多重性は Bonferroni により補正)」、かつ (C) 「minor allele frequency (MAF) が 5%以上であること」の 3 つの条件でフィルタリングを行い、全てを満たす多型を相関解析に用いた。なお、二次無効群及び長期有効群 (対照群) の各群別の HWE 法則への適合性は SNPalyze (Dynacom, Yokohama, Japan) により評価した。

相関解析には、GQuest を使用し、アレルの個数に基づく傾向性の有無をコクラン・アーミテージ検定により検定した。さらに (1) 対立遺伝子 (Allele) モデル、(2) 共有性 (codominant) モデル、(3) 優性 (dominant) モデル、(4) 劣性 (recessive) モデルに対するカイ二乗検定または Fisher の正確確率検定により p 値を算出した。多重比較法として、log Quantile-Quantile (QQ) p -value plot を用いた。相関解析における検出力の算出には、GdesignPlus (Stargen) またはフリーソフトウエアの R を使用した。

b) 候補遺伝子多型解析

b-1) シーケンシングによる遺伝子多型同定

今年度、解析した *TXNIP* 及び *GLRX* のシーケンシングの概略は以下の通りである。対象領域はプロモーター領域、エクソン領域およびその近傍のイントロン領域とした。患者検体のゲノム DNA を用いて、マルチプレックスのロングレンジ PCR 法にて、まず第 1 段目の増幅を行った。第 2 段目の PCR 反応は各エクソン（領域）を増幅するために行った。PCR 産物を精製後、サイクルシーケンシング反応を行い、配列を解析した。低頻度で検出された多型については、再度ゲノム DNA からの増幅・シーケンシングを行い、その存在を確認した。

連鎖不平衡解析はソフトウェア SNPalyze ver. 7.0 により行い、 $|D'|$ 値および r^2 値で連鎖の強さを評価した。またハプロタイプ解析をソフトウェア LDSUPPORT (Kitamura Y. et al., Ann. Hum. Genet. 66: 183-193 (2002)) により行った。

b-2) タイピング系の開発

今年度は転写因子関連の 2 遺伝子 (*Gene X* 及び *Gene Y*) について、ハプロタイプ解析結果に基づき、パイロシーケンシング法による簡便なタイピング系を開発し、患者検体の解析に利用した。対象は頻度約 3% の以上のハプロタイプのタグ多型、計 10 種とした。まず各多型部位を含む断片をビオチン標識プライマーを用いてゲノム DNA より増幅した。PCR 産物をストレプトアビジンビーズに結合させ、アルカリ処理にて 1 本鎖化後、シーケンシングプライマーとハイブリダイズさせた。これをミニシーケンシングして多型を解析した。

b-3) 二次無効と候補遺伝子多型との相関解析

供与された、長期有効患者 290 名、二次

無効患者 83 名、早期無効患者 16 名分の検体のうち、抗グルタミン酸デカルボキシラーゼ抗体陽性が疑われる患者等を除き、長期有効群（対照群）278 名、二次無効群 80 名、早期無効群 15 名分を、相関解析に供した。また SU 剤有効 11 年以上の長期有効群 130 名（SU 剤使用歴 17 ± 4 年、中央値 \pm 四分位偏差）及び SU 剤使用 10 年以内でインスリン治療に移行した二次無効群 42 名（ 6 ± 2 年）という、フェノタイプの差が大きいサブグループの検体間でも解析を行った。なお、サブグループ間では、SU 剤使用歴（および現在の HbA_{1c} 値）を除き、患者背景因子において有意な差は認められなかった。多型の解析方法としては、シーケンシング法、パイロシーケンシング法及び TaqMan 法を用い、その結果を相関解析に用いた。今年度解析が終了した多型は、*SLC30A8*, *TCF7L2*, *PPARG*, *HHEX*, *IGF2BP2* 等の 2 型糖尿病との相関が示された遺伝子、及びインスリン分泌、酸化ストレス、アポトーシス関連等の計 23 遺伝子の約 65 多型であり、アレル頻度差およびゲノタイプ頻度差を中心に解析した。また統計解析は、Fisher の正確確率検定を Prism ver. 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) または SNPalyze ver. 7.0 で、多変量解析を JMP ver. 6.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) により行った。

（倫理面への配慮）

本研究は患者検体由来のヒトゲノム DNA を対象にし、遺伝子多型解析を行うと共に、臨床データを取り扱うものであり、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、研究倫理審査委員会の承認のもとに行った。

C. 研究結果

I 一次無効関連

1) 新規遺伝子多型の機能解析

a) 野生型及び変異型 HNF4 α の機能解析

COS-7 細胞で発現させた HNF4 α 蛋白質 (1-WT、1-Mutant、2-WT 及び 2-Mutant) の細胞ライセート画分における発現をウェスタンブロット法により確認した。野生型及び変異型 HNF4 α の転写活性 (Fluc/Rluc) は、HNF4 α の 1 型及び 2 型のいずれにおいても、野生型と変異型の間で有意な差は認められなかった (1 型, $p=0.059$; 2 型, $p=0.136$)。

b) 野生型及び変異型 CYP2C8 酵素の機能解析

酵母細胞で発現させた野生型及び変異型 CYP2C8 酵素蛋白質 (アポ+ホロ酵素) のマイクロゾーム画分における発現レベルは、野生型、CYP2C8.X 及び CYP2C8.Y ではほぼ同程度であった。また、マイクロゾーム画分を用いた還元型 CO 差スペクトルによるホロ酵素含量の測定において、野生型及び CYP2C8.X では 450 nm に吸収極大が認められ、機能性 CYP 含量はそれぞれ 26.4 及び 10.6 pmol/mg protein であった。一方、CYP2C8.Y では 450 nm における吸収極大のピークは全く認められなかった。次に、野生型及び変異型 CYP2C8 の酵素活性を解析するため、CYP2C8 発現マイクロゾームのパクリタキセル 6 α -水酸化活性を測定した。野生型 CYP2C8 の基質濃度 10 μ M におけるパクリタキセル 6 α -水酸化活性は、4.68 pmol/min/CYP であった。CYP2C8.X の活性は野生型 CYP2C8 とほぼ同程度であったが、CYP2C8.Y では全く活性は検出されなかった。

II 二次無効関連

1) 新規候補遺伝子探索のための、膵 β 細胞

における SU 剤によるインスリン分泌障害モデルの解析

a) 膵 β 細胞における SU 剤 16 時間処理による遺伝子発現変化

本年度は、GSIS 障害を生じた 10 μ M Glibenclamide 処理群で発現が変化した遺伝子群と、GSIS がほぼ保たれていた 100 μ M Tolbutamide 処理群で発現が変化した遺伝子群とを比較した。前者に含まれ後者に含まれない (すなわち 10 μ M Glibenclamide 処理群でのみ発現が変化したもの) 遺伝子を 6 種選定した (Group1)。これらは、SU 剤による GSIS 障害に関連がある可能性があり、二次無効に関与する分子の有望なリストである。またその逆に、100 μ M Tolbutamide 処理群で発現が変化し、10 μ M Glibenclamide 処理群で変化しなかった遺伝子を 5 種選定した (Group2)。これらは、SU 剤による GSIS 障害に防御的にはたらく可能性、あるいは GSIS に有利にはたらく可能性も期待された。

b) SU 剤反応性遺伝子のインスリン分泌における意義の解析

b-1) siRNA を用いた発現抑制

まず、siRNA 投与 24 時間後に回収した RNA を用いてリアルタイム RT-PCR 法 (TaqMan 法) を行い、それぞれのノックダウン効率を検証した。各遺伝子とも siRNA を 3 種デザインしたが、種々の条件検討を行い、コントロール siRNA 処理細胞と比較して、おおよそ 50% 程度の発現抑制が得られた。

b-2) 発現抑制によるインスリン分泌への効果

Group1 遺伝子群のうち、Glibenclamide 処理群で発現が増加していた 5 遺伝子については、10 μ M Glibenclamide 処理による

GSIS 障害モデルにおいて、あらかじめ遺伝子をノックダウンしておくことで、表現型をレスキューできるかどうか（すなわち GSIS を保てるかどうか）、を検討した。ネガティブコントロール siRNA 投与では、10 μ M Glibenclamide 処理により高グルコース刺激 (25mM Glucose) によるインスリン分泌の低下 (GSIS 障害モデル) に影響は見られなかった。5 遺伝子のうち、3 遺伝子については、複数の siRNA にて、高グルコース刺激によるインスリン分泌が改善していた。このうち、Prss23、Zfp36l2 のノックダウンでは、低グルコース (3mM Glucose) 刺激での分泌も上昇しており、いわゆる「グルコース反応性」が改善している証拠は必ずしも得られなかったが、Rps6ka のノックダウンでは、いわゆる GSIS も改善していた。また、3 遺伝子のいずれにおいても、高 K (30mM KCl) 刺激による分泌は増加していた。

Group1 遺伝子群のうち、Glibenclamide 処理群で発現が低下していた1遺伝子および Group2 の遺伝子のうち、Tolbutamide 処理群で発現が増加していた4遺伝子については、通常培地における遺伝子ノックダウンの効果を検討したが、いずれの発現抑制においても、ネガティブコントロール siRNA 処理細胞と比較して、GSIS、high K 刺激による分泌のいずれも有意な変化はみられなかった。100 μ M Tolbutamide 処理群で発現が低下していた1遺伝子については、発現低下により Glibenclamide 処理時の GSIS 障害を改善 (レスキュー) できる可能性を考え、ノックダウンしたのちに 10 μ M Glibenclamide で 16 時間処理してインスリン分泌を測定した。しかしネガティブコントロール siRNA 投与細胞と同様であり、GSIS 障害をレスキューすることはできな

かった。

2) 患者検体の解析

a) ゲノム網羅的遺伝子多型解析

SU 剤長期有効患者 140 名、二次無効患者 71 名につき、実験を終了した。DM アルゴリズムによる平均アレル判定率は 94.72% であり、BRLMM アルゴリズムによる平均アレル判定率は 98.39% であった。なお、SU 剤長期有効患者及び二次無効患者の平均 SU 剤使用期間は、それぞれ 15.0 ± 6.7 年、 11.2 ± 7.3 年であった。

Nsp Array に含まれる 262,264 個の一塩基多型のうち、3 種のフィルタリング条件を全て満たした多型は 176,826 個であり、全多型総数の 67.4% であった。これらの多型は全ての染色体に均等に分布していた。

各種の統計モデルにより SU 剤長期有効患者群と二次無効患者群間で相関解析を行った。コクラン・アーミテージ検定で $p < 0.001$ を示した遺伝子多型のうち、対立遺伝子モデル、共有性モデル、優性モデル、劣性モデルのいずれかに対するカイ二乗検定 (または Fisher の正確確率検定) においても $p < 0.001$ を示した多型数は 100 個であった。低い p 値を示した多型の中には、アポトーシス関連のシグナル伝達分子、脂質代謝に関与する分子、蛋白質分解酵素等をコードする遺伝子の領域内または、その近傍に位置する多型が含まれていた。また、上記 4 つのモデルのいずれかに対するカイ二乗検定 (または Fisher の正確確率検定) または、コクラン・アーミテージ検定において $p < 0.001$ 及び $p < 0.01$ を示した多型の数は、それぞれ 267 個及び 3005 個であった。

各モデルで得られた検定結果の p 値に対して log Quantile - Quantile (QQ) p-value plot を作製し、多重比較法による検討を行った。低い p 値を示した上位 4 個の多型におい

て、それらの p 値が、観測値の一様分布から外れて期待値よりも小さい値を示したことから、二次無効との関連性が強く示唆された。これらのうち、2 個は 7 番及び 12 番染色体の遺伝子のない領域に属していたが、残り 2 個は、共に 9 番染色体に位置し、それぞれ RNA のプロセッシングに関与する因子及び転写制御因子をコードする遺伝子の近傍に位置していた。

b) 候補遺伝子多型解析

b-1) シーケンシングによる遺伝子多型同定

TXNIP は膵β細胞にて高グルコース刺激で発現レベルが上昇し、アポトーシスを誘導することが知られている。酸化ストレス耐性を与えるチオレドキシシンと相互作用し、その活性を押さえる働きをする。SU 剤有効 14 年以上の長期有効群 92 名及び SU 剤使用 10 年以内でインスリン治療に移行した二次無効群 42 名の検体をシーケンシング解析したところ、16 種の新規を含む 21 多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴うものは 4 種であり、すべて新規であった。1 ブロックとしてハプロタイプし、18 種のハプロタイプが推定された。このうち頻度約 1% 以上のものは 7 種であった。

GLRX がコードするグルタレドキシシンは、上記チオレドキシシンと並ぶ重要な酸化ストレス蛋白である。SU 剤有効 14 年以上の長期有効群 92 名及び SU 剤使用 10 年以内でインスリン治療に移行した二次無効群 42 名の検体をシーケンシング解析したところ、3 種の新規を含む 8 多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴うものは含まれていなかった。1 ブロックとしてハプロタイプし、11 種のハプロタイプが推定された。このうち頻度約 1% 以上のものは 7 種であった。

b-2) タイピング系の開発

転写因子関連の遺伝子 *Gene X* 及び *Gene Y* の、それぞれ 6, 4 種のタグ多型につき、開発したパイロシーケンシング法によるタイピングを試みたところ、解析した全ての多型及び検体 (389 例) につき明瞭なタイピング結果が得られた。また、数検体につき直接シーケンシングを行い、その結果を本パイロシーケンシング法による結果と比較したところ、完全に一致した。

b-3) 二次無効と候補遺伝子多型との相関解析

まずシーケンシングを行った *TXNIP* 及び *GLRX* については、長期有効群と二次無効群間の比較で、有意な頻度差を示す多型・ハプロタイプは認められなかった。次に、タイピング系を開発した *Gene X* 及び *Gene Y* に関し、長期有効群 278 名及び二次無効群 80 名の間で、多型頻度及びハプロタイプ頻度を比較したが、有意な差は認められなかった。しかし、SU 剤有効 11 年以上の長期有効群 130 名及び SU 剤使用 10 年以内でインスリン治療に移行した二次無効群 42 名という、フェノタイプの差が大きいサブグループ間で比較したところ、有意な差が認められる遺伝子多型を 2 種見いだした (*Gene X*、多型 A: $p=0.0036$, 多型 B: $p=0.039$)。本サブグループ間の解析では、この他に TaqMan 法で解析した 19 遺伝子 26 多型中、4 遺伝子の 7 多型がゲノタイプモデルやアレルモデルで有意となった ($p=0.045\sim 0.0029$)。

有意な頻度差が多く認められた本サブグループの検体に関して、昨年度および今年度で有意となった 6 遺伝子の 11 多型、並びに患者背景因子を説明変数として多変量解析を行ったところ、4 種の多型が二次無効発現の有意な説明変数となり、二次無効予測モデルを確立した。SU 剤の開始年齢等の

患者背景因子は有意な変数として残らなかった。

D. 考察

1) 一次無効関連

新規相関多型の同定のため、今年度も日本人で新たに見出された変異型 HNF4 α の転写活性並びに変異型 CYP2C8 の酵素機能について、*in vitro* 機能解析を行った。

HNF4A では野生型と変異型の間で、1型及び2型の HNF4 α いずれにおいても転写活性に有意な差は認められず、2 つの連鎖する一塩基多型 1154C>T (A385V) 及び 1193T>C (M398T)は、転写活性に顕著な影響を与えないことが示唆された。

一方、CYP2C8 では、CYP2C8.Y に関して、アポ+ホロ酵素の発現は野生型と同程度であったものの、ホロ酵素の発現は認められず、またパクリタキセル 6 α -水酸化活性も全く有していなかった。これはホロ酵素発現のなさを概ね反映したものと思われ、CYP2C8.Y が有するアミノ酸置換は、酵母細胞での酵素蛋白質発現過程における蛋白質の折りたたみやその構造安定性に影響を与えている可能性が考えられる。また、CYP2C8.Y におけるアミノ酸置換部位はパクリタキセルに対する代謝能を規定する重要なアミノ酸残基であることが示唆された。一方、CYP2C8.X でもホロ酵素の発現レベルが野生型の約 40%に低下していたものの、蛋白質当たりのパクリタキセル 6 α -水酸化活性は野生型と同程度であった。本ホロ酵素の発現レベルの低下が、哺乳動物細胞でも見られるか否かは今後の検討課題である。

2) 二次無効関連

二次無効の発現機構としては、SU 剤による膵 β 細胞の機能障害及び細胞死（アポ

トーシス）が一因として考えられている。例えば、持続的な β 細胞の興奮（特に、持続的な細胞内 Ca 濃度上昇）による β 細胞死、SU 剤による強制的な分泌刺激による小胞体（ER）ストレスや、酸化ストレスの関与も考えられている。最終的には β 細胞数の減少を伴う不可逆な現象と思われるが、比較的初期に生じている現象が明らかになれば、介入の標的となる可能性が考えられる。一方で、SU 剤の中でも二次無効を起こしやすいものと、起こしにくいものがあるとされ、特に作用が強力かつ持続時間の長いグリベンクラミドは二次無効を生じやすく、作用時間の比較的短いトルブタミド、あるいは抗酸化作用をもつグリクラジドは、比較的二次無効を生じにくいといわれる。

今回用いた SU 剤障害 *in vitro* モデル系では、細胞数の明らかな減少は認めず、機能障害（インスリン分泌障害）のみ認められること、GSIS の低下が見られるが高 K 刺激によるインスリン分泌は比較的保たれていること、機能障害が二次無効を生じやすい Glibenclamide でみられ Tolbutamide でみられなかったこと、などから、二次無効のきわめて初期に生じている現象を反映する、非常に有用なモデルが作成できた可能性が期待できる。

本年度は、網羅的発現解析から得られた遺伝子について、興味深い変動をするものを選び、機能的意義を解析した。このうち、Group1（Glibenclamide 処理でのみ発現が変化していた遺伝子）は、GSIS 障害に直接関与している可能性が考えられた。興味深いことに、Glibenclamide 処理で発現増加していた 5 遺伝子のうち、Rps6ka2、Prss23、Zfp3612 の 3 種については、あらかじめ siRNA でノックダウンしておいたのちに Glibenclamide で処理すると、高グルコース

刺激でのインスリン分泌が改善された。したがって、これらの遺伝子はインスリン分泌と関係するだけでなく、SU 剤による膵β細胞障害を防ぐ、治療介入の標的となりうる可能性もある。Rps6ka2 及び Zfp3612 は、細胞の増殖に関係すると考えられ、膵β細胞の増殖や生存に重要な意義を持つ可能性がある。これらの遺伝子は、二次無効の候補遺伝子としての解析も期待され、今後さらに研究を進めてゆきたい。

患者検体の解析では、二次無効の発現機構が不明なため、ゲノム網羅的遺伝子多型解析を行った。しかし、本解析においては、多量な遺伝子多型データを扱うため、その品質管理が不可欠である。解析多型の抽出条件として、昨年の予備解析と同様、各 Chip のアレル判定率を 93%以上とし、多型ごとのアレル判定率を 90%以上、マイナーアレル頻度を 5%以上に設定した。これらにより、タイピングの正確性及び遺伝継承法則への適合性は、十分に保証されていると考える。今回、SU 剤長期有効患者 140 名、二次無効患者 71 名における相関解析から、100 個の多型が $p < 0.001$ で二次無効と相関した。これらの中には、アポトーシス関連のシグナル伝達分子、脂質代謝に関与する分子、蛋白質分解酵素等をコードする遺伝子の領域内または、その近傍に位置する多型等が含まれていた。しかしながら、タイプ I の誤りの多重性を考慮すると、現時点で、これらの多型が二次無効に関与すると判断することはできない。また、QQ p -value plot における多重比較法において有意であった 4 個の多型の検出力は、0.55 - 0.65 であり十分ではなかった。

一方、候補遺伝子としては、今年度は 23 遺伝子 65 多型につき対象患者検体の解析を行った。昨年度分と合わせて、約 40 遺伝子

115 多型の解析を行ったことになる。相関解析は、主として、SU 剤有効 11 年以上の長期有効群 130 名及び SU 剤使用 10 年以内でインスリン治療に移行した二次無効群 42 名というフェノタイプが大きく異なるサブグループ間でアレル頻度等を比較した。その結果、5 種の遺伝子の 9 多型が有意な頻度差を示した。これらの遺伝子は、膵β細胞におけるインスリン分泌能及びその維持等に重要な遺伝子であり、二次無効発現との相関は合理的に説明可能である。また多型を含めた多変量解析では、患者背景因子が有意な変数とならず、4 種の遺伝子多型のみが有意となった。このことから本予測系を用いれば、患者背景因子に左右されず遺伝子多型結果のみで、二次無効発現をある程度事前予測しうると考えられる。従って、本系は二次無効回避を目的として、各患者に適した医薬品を選択する際に、非常に有用と考えられる。本系で二次無効発現が予測された場合には、他の薬物治療やインスリン治療に移行するなどの対策を早期に取ることにより、合併症の減少や患者の QOL 改善につながると期待される。今後は、ゲノム網羅的解析で同定した遺伝子多型の二次スクリーニングを行い、有用多型を更に同定し、二次無効予測法の精度を上げることに全力を尽くす。

E. 結論

インスリン分泌促進型経口糖尿病薬につき、患者毎の遺伝子型に基づく投薬法（投薬量及び薬物選択法）を確立することを目指して研究を進めた。

一次無効との相関解析関連では、これまでに同定したアミノ酸置換を伴う新規 *HNF4A* および *CYP2C8* 多型の *in vitro* 機能解析を行った。*HNF4A* の 2 つの連鎖する遺

伝子多型では、有意な転写活性への影響は認められなかった。一方、CYP2C8 の 2 種の多型に関しては、CYP2C8.X でパクリタキセル 6 α -水酸化活性が野生型とほぼ同程度であったのに対し、CYP2C8.Y ではその活性は完全に欠損していた。本結果は一次無効の予測モデル作製において参考データとして用いた。

一方、二次無効との相関解析関連では、二次無効の発現機構は不明なため、*in vitro* で確立したインスリン分泌障害モデルを用い、二次無効を起こしやすい薬物と起こしにくい薬物により誘導が異なる遺伝子を DNA チップで検索し、さらに実際のインスリン分泌への影響を siRNA により確認し、3 種の遺伝子がインスリン分泌障害に関与することが示唆された。二次無効群、長期有効群（対照群）、早期無効群の検体を用いた相関解析では、ゲノム網羅的遺伝子多型解析を継続し、SU 剤長期有効患者 140 名、二次無効患者 71 名における相関解析の結果、100 個の多型が $p < 0.001$ で二次無効と相関し、これらの中には、アポトーシス関連のシグナル伝達分子、脂質代謝に関与する分子、蛋白質分解酵素等をコードする遺伝子の領域内または、その近傍に位置する多型が含まれていた。また QQ p-value plot による多重比較法において 4 個の多型が二次無効発現と有意に相関した。また候補遺伝子多型解析では、主として、SU 剤有効 11 年以上の長期有効群 130 名及び SU 剤使用 10 年以内でインスリン治療に移行した二次無効群 42 名というフェノタイプが大きく異なるサブグループ間で、23 遺伝子 65 多型のアリル頻度等を比較し、単相関解析で 9 種の有意な多型を見いだした。さらに本研究で相関が明らかとなった多型 11 種を用いた多変量解析を行い、二次無効予測モデルを確立した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hanioka N, Tsuneto Y, Saito Y, Sumada T, Maekawa K, Saito K, Sawada J, Narimatsu S.: Functional characterization of two novel CYP2C19 variants (CYP2C19*18 and CYP2C19*19) found in a Japanese population. *Xenobiotica*, 37:342-355, 2007.
- 2) Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Maekawa K, Hasegawa R, Suzuki K, Yanagawa T, Kajio H, Kuzuya N, Noda M, Yasuda K, Tohkin M, Sawada J.: Genetic variations of the ABC transporter gene ABCC3 in a Japanese population. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 22: 129-135, 2007.
- 3) Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Maekawa K, Kamatani N, Kajio H, Kuzuya N, Noda M, Yasuda K, Sawada J.: Genetic variations and haplotype structures of a transcriptional factor Nrf2 and its cytosolic reservoir protein Keap1 in Japanese. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 22: 212-219, 2007.
- 4) Saito K, Dan H, Masuda K, Katsu T, Hanioka N, Yamamoto S, Miyano K, Yamano S, Narimatsu S.: Stereoselective hexobarbital 3'-hydroxylation by CYP2C19 expressed in yeast cells and the roles of amino acid residues at positions 300 and 476. *Chirality* 19: 550-558, 2007.
- 5) Takeuchi F, Yanai K, Inomata H, Kuzuya N, Kajio H, Honjo S, Takeda N, Kaburagi Y, Yasuda K, Shirasawa S, Sasazuki T, Kato N.: Search of type 2 diabetes susceptibility gene on chromosome 20q. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 357:1100-1106, 2007.

- 6) Hanioka N, Tsuneto Y, Saito Y, Maekawa K, Sawada J, Narimatsu S.: Influence of *CYP2C19*18* and *CYP2C19*19* alleles on omeprazole 5-hydroxylation: in vitro functional analysis of recombinant enzymes expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 102:388-393 2008.
- 7) Takeuchi F, Ochiai Y, Serizawa M, Yanai K, Kuzuya N, Kajio H, Honjo S, Takeda N, Kaburagi Y, Shirasawa S, Sasazuki T, Kato N.: Search for type 2 diabetes susceptibility genes on chromosome 1q, 3q and 12q. *J. Hum. Genet., in press*, 2008.

2. 学会発表

- 1) Y. Saito, M. Tohkin, H. Fukushima-Uesaka, K. Maekawa, K. Sai, R. Hasegawa, N. Kamatani, K. Suzuki, H. Kajio, N. Kuzuya, M. Noda, T. Yanagawa, K. Yasuda, and J. Sawada: Haplotype structures of *ABCC8* and *KCNJ11* genes and their influence on glimepiride efficacy. 8th International Society for the Study of Xenobiotics Meeting, (October 11, 2007, Sendai, Japan,).
- 2) 中田晋太郎, 斎藤嘉朗, 佐伯真弓, 澤田純一, 埴岡伸光, 成松鎮雄: ヒト *HNF4α* を介した転写活性化に及ぼす *SHP* の影響。第 46 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 (平成 19 年 11 月、高知)
- 3) 斎藤嘉朗, 頭金正博, 福島 (上坂) 浩実, 前川京子, 佐井君江, 長谷川隆一, 鎌谷直之, 鈴木佳寿子, 柳川達生, 梶尾裕, 葛谷信明, 野田光彦, 安田和基, 澤田純一: スルホニルウレア剤グリメピリドの有効性に対する受容体 *ABCC8* 及びトランスポーター *ABCG2* のハプロタイプの影響。

第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会 (平成 19 年 12 月、横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

二次無効発現と相関する遺伝子多型につき、特許出願を予定している (平成 20 年 5 月頃出願予定)。

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（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

インスリン分泌促進型経口糖尿病薬の薬物応答関連遺伝子の多型探索のための
臨床パネルの作成および新規候補遺伝子の探索

分担研究者 安田和基（国立国際医療センター研究所 代謝疾患研究部長）

研究要旨

インスリン分泌促進型経口糖尿病薬として繁用されているスルホニルウレア剤（SU 剤）が、膵β細胞の機能障害を生じることがあり、臨床的な「二次無効」との関連で注目される。そこでその分子メカニズムを解析するために、INS-1D 細胞を用いて SU 剤による *in vitro* のグルコース反応性インスリン分泌（GSIS）障害モデルを構築した。GeneChip システムを用いた網羅的な遺伝子発現解析により、特に Glibenclamide による GSIS 障害モデルで特異的に発現が変化する遺伝子を6個、その逆に GSIS が保たれるモデルでのみ発現が変化する遺伝子を5個選び、それぞれ siRNA によるノックダウンを行って、インスリン分泌に対する効果を検討した。その結果、3個の遺伝子について、発現抑制がインスリン分泌障害を軽減する可能性が示され、治療介入の標的分子となりうる可能性も示唆された。

A. 研究目的

スルホニルウレア剤（以下、SU 剤）は糖尿病の経口治療において最も頻繁に使用される薬剤であるが、一旦治療効果を発揮した SU 剤が一定期間経過した後臨床的に効かなくなり、インスリン治療へ移行する、という現象、いわゆる「二次無効」、が知られている。二次無効は臨床的にきわめて重要であるが、その分子メカニズムは諸説ありまだ明らかでない。SU 剤は、膵β細胞に対して、短期的には K-ATP チャネルの閉鎖を通じてインスリン分泌を促進するが、比較的長期に作用させた場合、β細胞の表現型に変化をもたらす可能性があり、SU 剤自体が膵β細胞障害の惹起・進展に寄与するのではないかと、という仮説がある。この点の検証は、二次無効のメカニズムの解明にも寄与すると考えられるので、我々は SU 剤によるβ細胞障害の *in vitro* 解析系を構築

し、表現型の変化にどのような分子が関与するのかを検討することとした。

B. 研究方法

（1）SU 剤による膵β細胞分泌障害モデルにおける遺伝子発現変化の解析

培養株の中でも生理的なβ細胞にその性質が近いとされる、ラット INS-1D 細胞を用いて、数種の SU 剤をそれぞれ 16hr 作用させた後、インスリン分泌反応を検討した。いずれも、DMSO 溶解液で 1000 倍濃度のストックを作成して添加しているため、コントロールも 0.1%DMSO 加培地とした。

平成18年度の検討により、インスリン含量当たりの分泌をみると、各 SU 剤群で 3mM グルコース下（いわゆる basal、以下 G3）の分泌はほぼ同等だったが、1μM、10μM の Glibenclamide で 25mM グルコース（以下 G25）刺激による分泌が低下し、

いわゆるグルコース反応性インスリン分泌 (glucose-stimulated insulin secretion、以下 GSIS) が障害されていた。一方、二次無効を生じにくい Tolbutamide では、比較的 GSIS が保たれていた。なお、high K (30mM KCl) による刺激でも分泌が若干低下しているがその障害は GSIS ほどではなかった。

そこで、細胞を培養して前記と同様のモデルを作成し、6 cm dish にて Qiagen 社 RNeasy キットを用いて Total RNA を抽出した後、Affymetrix 社 GeneChip システム・Rat Genome 2.0 Array (約 3 万転写産物) にて遺伝子発現を網羅的に解析した。

(2) SU 剤反応性遺伝子のインスリン分泌における意義の解析

前記モデルにおいて発現が変化する遺伝子では、異なる SU 剤で共通に発現変化をおこすものと、特定の SU 剤のみで変化するものとがみられた。Glibenclamide 曝露により、GSIS が特異的に低下することから Glibenclamide 曝露とその他の SU 剤曝露とで差のみられる遺伝子に注目し、インスリン分泌、特に GSIS における意義を検討した。具体的には、Glibenclamide による GSIS 障害モデルで特異的に発現が変化する遺伝子を 6 個、その逆に GSIS が保たれるモデルでのみ発現が変化する遺伝子を 5 個、合計 11 遺伝子 (表 1) を選んだ。

① siRNA を用いた発現抑制

それぞれの遺伝子に対するそれぞれ 3 種の siRNA を作成し (アプライドバイオシステムズ社)、リポフェクション法により INS-ID 細胞へ導入した。最終 siRNA 濃度は、10nM とした。24 時間後に RNA を回収して、TaqMan 法により、該当遺伝子の発現をコントロール siRNA 導入細胞と比較した。

② 発現抑制によるインスリン分泌への効果

50% 以上のノックダウンがみられた siRNA について、各遺伝子について 2 つずつを選び、改めてリポフェクション法にて INS-ID 細胞へ導入し、24 穴プレート (CellBind) 上で、72 時間後にバッチインキュベーション法によりインスリン分泌を検討した。具体的には、PBS による洗浄の後、KRH 溶液により 30 分プレインキュベーションを行い、各ウェル 500 μ l の刺激メディウムを加えて 37 $^{\circ}$ C で 60 分インキュベーションし、上清を回収してインスリン ELISA 測定キット (シバヤギ) で duplicate にて測定した。刺激メディウムとして具体的にはグルコース 3mM (以下 G3)、25mM (G25) 及び KCl 30mM (K30) を用いた。上清を完全に除いた後、酸エタノール溶液を細胞に加え、-20 $^{\circ}$ C で 24hr 静置した後回収し、インスリン含量アッセイに供した。

また、上記遺伝子のノックダウンの効果を、Glibenclamide 処理 GSIS 障害モデルにおいて検討するため、siRNA を投与して 56 時間後に、薬剤を含む培地に交換し、16 時間インキュベートした後 (siRNA 投与後 72 時間になる)、やはりバッチインキュベーション法により、インスリン分泌を検討した。

③ GSIS への関与が示唆された遺伝子について、網羅的遺伝子発現解析を用いた分子メカニズムの検討

以上で、ノックダウンにより GSIS への効果が見られた遺伝子については、そのメカニズムを明らかにするために、siRNA でノックダウンした細胞と、コントロール siRNA 処理細胞とを、RNA 抽出後、再び網羅的な遺伝子発現解析をおこなった。

(倫理面への配慮)

本研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究

に関する倫理指針」(平成 13 年 4 月施行、平成 16 年 12 月全部改正、平成 17 年 6 月一部改正)に従い、当センター倫理委員会の承認を受けている。(ただし、本年度報告分の実験については、直接該当しない)

C. 研究結果

(1) 膵β細胞における SU 剤 16 時間処理による遺伝子発現変化

平成 18 年度までに、各 SU 剤による遺伝子発現変化を比較しているのので、ここでは詳細は省略する。本年度は特に、GSIS 障害を生じた 10 μM Glibenclamide 処理群で発現が変化した遺伝子群と、GSIS がほぼ保たれていた 100 μM Tolbutamide 処理群で発現が変化した遺伝子群とを比較した。前者に含まれ後者に含まれない(すなわち 10 μM Glibenclamide 処理群でのみ発現が変化したもの)遺伝子を 6 つ選択した(Group1)。これらは、SU 剤による GSIS 障害に関連がある可能性があり、二次無効に関与する分子の有望なリストである。またその逆に、100 μM Tolbutamide 処理群で発現が変化した、10 μM Glibenclamide 処理群で変化しなかった遺伝子を 5 つ選択した(Group2)。これらは、SU 剤による GSIS 障害に防御的にはたらく可能性、あるいは GSIS に有利にはたらく可能性も期待された。

(2) SU 剤反応性遺伝子のインスリン分泌における意義の解析

① siRNA を用いた発現抑制

まず、siRNA 投与 24 時間後に回収した RNA を用いてリアルタイム RT-PCR 法(TaqMan 法)を行い、それぞれのノックダウン効率を検証した。各遺伝子とも siRNA を 3 個デザインしたが、コントロール siRNA 処理細胞に対して、お

よそ 50%程度の発現抑制であった。これは必ずしも満足できる効果ではなく、検討する時間が早すぎる(48 時間などのほうがよい)、最終 siRNA 濃度が低すぎる(今回 10nM だったが 20nM、50nM、100nM などのほうがよい)、などの可能性も考えられた。ここでは詳細は省くが、こうした点の予備実験もおこなっており、発現抑制の程度は、24 時間と 48 時間ではほぼ同等であること、siRNA 濃度を高くしても抑制効果の増強は見られなかったこと、を確認した。

② 発現抑制によるインスリン分泌への効果

Group1 遺伝子群のうち、Glibenclamide 処理群で発現が増加していた 5 遺伝子については、10 μM Glibenclamide 処理による GSIS 障害モデルにおいて、あらかじめ遺伝子をノックダウンしておくことで、表現型をレスキューできるかどうか(すなわち GSIS を保てるかどうか)、を検討した。図 1 に示すように、ネガティブコントロール siRNA 投与では、10 μM Glibenclamide 処理により高グルコース刺激(25mM Glucose)によるインスリン分泌の低下(GSIS 障害モデル)に影響は見られなかった。5 遺伝子のうち、Rps6ka、Prss23、Zfp3612 の 3 遺伝子については、複数の siRNA にて、高グルコース刺激によるインスリン分泌が改善していた。このうち、Prss23、Zfp3612 のノックダウンでは、低グルコース(3mM Glucose)刺激での分泌も上昇しており、いわゆる「グルコース反応性」が改善している証拠は必ずしも得られなかったが、Rps6ka のノックダウンでは、いわゆる GSIS も改善していた。また、3 遺伝子のいずれにおいても、高 K(30mM KCl)刺激による分

泌は増加していた。

Group1 遺伝子群のうち、Glibenclamide 処理群で発現が低下していた1遺伝子については、通常培地における遺伝子ノックダウンの効果を検討した。2種の siRNA のうち1種で、ノックダウンによりむしろ GSIS が増強される傾向が見られた。

Group2 の遺伝子群のうち、Tolbutamide 処理群で発現が増加していた4遺伝子については、通常培地における遺伝子ノックダウンの効果を検討した。図2に示すように、5つの遺伝子のいずれの発現抑制においても、ネガティブコントロール siRNA 処理細胞と比較して、GSIS、high K 刺激による分泌のいずれも有意な変化はみられなかった。100 μ M Tolbutamide 処理群で発現が低下していた1遺伝子については、発現低下により Glibenclamide 処理時の GSIS 障害を改善（レスキュー）できる可能性を考え、ノックダウンしたのちに10 μ M Glibenclamide で16時間処理してインスリン分泌を測定した。しかしネガティブコントロール siRNA 投与細胞と同様であり、GSIS 障害をレスキューすることはできなかった。

③GSIS への関与が示唆された遺伝子発現抑制による、網羅的遺伝子発現解析

遺伝子をノックダウンして GSIS に変化が見られた細胞について、どのような現象が起きているのかをさぐるために、網羅的な遺伝子発現解析をおこない、対照（ネガティブコントロール siRNA 投与）細胞と比較した。それぞれ有意な変化を示した遺伝子は数十〜百以上見られたが、3つの遺伝子で共通に動いた遺伝子はほとんど見られず、また既知のインスリン分泌関連遺伝子もみられなかった。

D. 考察

SU 剤「二次無効」は非常に不均一な病態と考えられるが、SU 剤自体による膵 β 細胞の機能障害の可能性は注目される。たとえば、持続的な β 細胞の興奮が持続的な細胞内 Ca 濃度上昇をきたし、これがインスリン分泌抑制、さらには β 細胞死を引き起こす、という説、また SU 剤による強制的な分泌刺激による小胞体 (ER) ストレスや、酸化ストレスの関与も想定されている。最終的には β 細胞数の減少を伴う不可逆な現象と思われるが、比較的初期に生じている現象が明らかになれば、薬物等による介入の標的となる可能性が考えられる。

今回作成した SU 剤障害 *in vitro* モデル系では、細胞数の明らかな減少は認めず、機能障害（インスリン分泌障害）のみ認められること、GSIS の低下が見られるが高 K 刺激によるインスリン分泌は比較的保たれていること、機能障害が二次無効を生じやすい Glibenclamide でみられ Tolbutamide でみられなかったこと、などから、二次無効のきわめて初期に生じている現象を反映する、非常に有用なモデルが作成できた可能性が期待できる。

本年度は、網羅的発現解析から得られた遺伝子について、興味深い変動をするものを選び、機能的意義を解析した。このうち、Group1 (Glibenclamide 処理でのみ発現が変化していた遺伝子) は、GSIS 障害に直接関与している可能性が考えられたが、機能的なアノテーションからは、インスリン分泌との関係は事前には全く想定できなかった。興味深いことに、Glibenclamide 処理で発現増加していた5遺伝子のうち、Rps6ka2、Prss23、Zfp3612 の3つについては、あらかじめ siRNA でノックダウンしておいたのちに Glibenclamide で処理すると、高グルコー