

200907007B

厚生労働科学研究費
創薬基盤推進研究事業

体脂肪減少因子を用いた2型糖尿病の治療に関する研究

平成19~21年度 総合研究報告書

主任研究者 武田 純

平成22年(2010) 5月

【目次】

1 総合研究報告	_____	2
----------	-------	---

「体脂肪減少因子を用いた2型糖尿病の治療に関する研究」

岐阜大学大学院医学系研究科 内分泌代謝病態学
健康障害半減講座（岐阜県）

岐阜大学医学部附属病院 糖尿病代謝内科
医療連携センター
生体支援センター

武田 純（代表）

堀川幸男

鈴木英司

飯塚勝美

2 研究成果の刊行に関する一覧表	_____	14
------------------	-------	----

3 研究成果の刊行物	_____	18
------------	-------	----

【1】 総合研究報告

体脂肪減少因子を用いた2型糖尿病の治療に関する研究

主任研究者 武田 純

岐阜大学大学院医学系研究科

分子構造学講座 内分泌代謝病態学分野 教授

研究要旨

日本人の2型糖尿病はインスリン分泌不全を一義的な病態とし、インスリン抵抗性の付加に対して十分な代償が得られないために耐糖能が破綻する。従って、軽度の肥満であってもその分泌負荷は大きく、先ず初期分泌から障害されて食後血糖の上昇をきたす。血糖の適正化には液性因子が重要な働きを担っているため、本研究では、トランスクリプトーム研究により血糖値に関する液性因子の探索スクリーニングを実施し、同定された蛋白の作用機序の解明と共に、糖脂質代謝異常の診断法の開発と治療への応用を目指した。モデル動物の発現プロファイル解析により、体脂肪蓄積を減少させると共に、血糖を低下させる32kDa分泌蛋白を同定した。アデノウイルス系を用いた発現実験で、血糖降下の機序として肝臓での糖取込みが重要である可能性を明らかにした。32kDa蛋白を過剰発現する実験動物の作成も試み、治療薬への展開も模索した。さらに、ヒトにおける血中測定系を開発し、表現型における意義や早期診断マーカーの可能性についても臨床的に検討を加えた。コード遺伝子多型のスクリーニングも行い、血中レベルと有意に相関するマーカーを同定した。肝の糖脂質代謝に関連する肝因子ChREBPと液性因子FGF21の解析も平行して行った。

分担者

岐阜大学医学部附属病院

医療連携センター

堀川幸男（准教授、副センター長）

健康障害半減講座（岐阜県）

鈴木英司（准教授）（平成21年度に岐阜県総合医療センターへ異動）

岐阜大学医学部附属病院

生体支援センター

飯塚勝美（講師）

A 研究目的

日本人の2型糖尿病は比較的やせ型であり、インスリン分泌不全を主たる病態とする。初期の潜在的な分泌不全に軽度の抵抗性が重なることにより、代償能が不十分な体質では耐糖能異常が惹起される。従って、2型糖尿病の治療や予防において肥満の有無やその程度は大きな検討課題である。

最近の日本人の病態を知るために岐阜市で実施された糖尿病の実態調査（40歳以上から無作為抽出の1,070人を対象とした75g経口糖負荷試験

GTT) では、日本人の病態はインスリン分泌不全であり、特に初期分泌から障害されて食後血糖の上昇が始まることが確認された (insulinogenic index は境界型 (男性: 0.5 ± 0.4 、女性: 0.5 ± 0.4) の段階で既に正常型 (男性: 0.9 ± 2.4 、女性: 1.0 ± 6.0) の約半分に低下していた)。肥満の有無に影響されなかったため、これは日本人に特有な基本病態と考えられた。しかも、合併する肥満やインスリン抵抗性が軽度であり (糖尿病型 HOMA-R: 男性 2.1 ± 1.3 、女性 2.8 ± 2.7)、補完するインスリン分泌能が備わっていないことも確認された (欧米人のような HOMA- β 高値は見られなかった)。食事療法による減量は長期の努力を要するが、十分な改善を見るに至らない場合が多く、運動療法はインスリン抵抗性の改善に欠かせないが、心機能の低下、腎障害、増殖網膜症、関節障害、リハビリなどを有する状態では困難である。従って、効率的な体脂肪減が望め、しかも血糖改善を同時に見込める治療は理想的である。

我々は、臍島トランスクリプトーム研究の過程において、特に分泌蛋白をコードする遺伝子に焦点を当ててきた。その理由は、患者の血中測定と治療的な投与が容易であり、臨床応用に直結するからである。正常と糖尿病における発現プロフィール解析から、幾つかの変化遺伝子に着目した。実験動物の肝で過剰発現させたところ、生理機能が不明な 32kDa 分子が血糖値を低下させ、興味深いことに体脂肪減少も観察された。

本研究では、同分子について作用機序を解明すると共に、同じく血糖低下と体脂肪減を生じる他の液性因子についても検討を加えた。

近年、内臓脂肪型肥満を基盤とし、耐糖能障害、脂質異常症、高血圧などを合併した病態はメタボリック症候群とよばれ、心血管障害の危険因子として広く知られる。高炭水化物及び高脂肪食により誘発される臓器内脂肪蓄積はインスリン感受性

の低下の原因として注目される。この際の脂肪合成はインスリンとグルコースによる相乗効果とされる。近年我々はグルコース活性化転写因子に注目し、ChREBP の機能抑制が耐糖能、脂肪肝、肥満などの病態が改善することを明らかにした。ChREBP は cAMP および AMP により転写活性が抑制され、肥満糖尿病モデルマウスで脂肪肝が改善することが報告されている。さらに脂肪肝が生じた際に部分的な効果として求心性の迷走神経シグナルを介した脂肪燃焼作の存在が報告されていることから、同病態では肝臓からのある種の分泌蛋白が放出されると考えた。

本年度の研究では、食後血糖の改善に関する上記の液性因子の解析と肝臓での糖脂質代謝との関連について解析する。さらに、GLP-1 も同様に血糖低下と体脂肪を減少させる効果を併せ有するので、本研究の一環としてインクレチン経路の関連遺伝子解析も実施した。

B 研究方法

インスリン分泌に対する効果の解析

マウスインスリン産生細胞株 MIN6 に過剰発現させ、種々のグルコース濃度に対する分泌量を測定することによってインスリン合成と分泌に対する 32kDa 分子の効果を解析した。個体レベルでは、アデノウイルスによる発現系を構築したので、ラットで過剰発現させ血中レベルを上昇させて耐糖能 (糖負荷試験) とインスリン分泌に関する生理学的機能を解析した。ヒトでも血中測定系を開発したので、糖尿病が疑われる症例について 75g 糖負荷試験を実施し、耐糖能を 3 群 (正常型、境界型、糖尿病型) に区分して各々のグループでインスリン分泌との関連を解析した。

体脂肪量に対する効果の解析

3T3L1 細胞が脂肪細胞へ分化する過程での 32kDa 分子の発現レベルの変化を検討した。

アデノウイルス発現系を用いて腹腔内に投与し、32kDa 分子を肝で強発現させることによって血中濃度を上昇させた。体脂肪の蓄積量の変化を、褐色(BAT)と白色脂肪組織(WAT)に区分して検討した。また、種々のアディポサイトカインの分泌に対する効果も検討した。ヒトでは、血中測定により肥満や動脈硬化マーカーとの相関を解析した。

32kDa 蛋白トランスジェニックマウスの作成

CMV プロモーターを用いて全身に 32kDa 蛋白を過剰発現させた。すなわち、pCXN2 (pCAGGS) に human 32kDa 蛋白 cDNA を入れ、pCXN2-hLT を用いて TG マウスを作成した。

32kDa 蛋白と臨床表現型との相関解析

対象は、当院に入院中の糖尿病患者男性 67 人、女性 38 人、計 105 人 (1 型糖尿病 5 人、2 型糖尿病 100 人)。年齢は 20⁻83 歳 (平均 58.9±13.5 人)、平均 BMI 25.2±5.5、平均 HbA1c 8.8±1.7% である。早朝空腹時と朝食後 2 時間後に採血し、血糖値 (mg/dl)、C ペプチド (ng/ml)、32kDa 蛋白 (ng/ml) を測定した。そのほかに、腎機能の指標として eGFR (ml/min/1.73m²) と、動脈硬化の指標として baPWV (上腕-足首間脈波伝播速度) および総頸動脈内中膜複合体厚 (IMT) を解析に用いた。

遺伝子多型を用いた関連解析

32kDa 分子のコード遺伝子の 10 エクソンを直接シーケンスで解析したが、糖尿病の原因となる変異は同定されなかった。次いで、全域を SNP スクリーニングして頻度の高い 12 SNP を見出した。連鎖不平衡解析により、2 つの LD ブロックを見出した。代表 SNP を用いた糖尿病発症との関連解析の結果、ボーダーラインの関連を認めた。さらに、症例を増やすことによる確認とサブ表現型との関連解析が次年度において重要である。

ChREBP の肝における糖脂質代謝の解析

ChREBP の機能抑制はメタボリックシンドロームの病態改善につながることから、本計画では ChREBP

の活性制御による肥満糖尿病の治療法を確立することを目指し、以下の目標を立てている。1) ChREBP の転写活性を抑制する新規薬剤の開発

M1x は ChREBP とヘテロダイマーを形成し、核内で ChRE (Carbohydrate response element) に結合する。そこで、M1x の機能変異体はデコイとして ChREBP の転写活性抑制をおこなえると考えた M1x を 4 つの細胞内ドメインでわけ、変異体のスクリーニングを行い、抑制的デコイとなる可能性を検討した。

2) ChREBP により発現調節をうける分泌蛋白の探索と発現機序の解明

グルコース活性化転写因子 (ChREBP) は、肝臓における脂肪合成の約 60% を制御する転写因子であり、代謝症候群の肝臓では ChREBP の活性が亢進する。ChREBP の機能抑制は肥満糖尿病の改善につながることから、本申請計画は ChREBP の活性制御による肥満糖尿病治療法を確立することを目指した。本年度は、ChREBP 過剰発現マウスを用いた DNA マイクロアレイにより発現増加のみられた分泌蛋白を複数獲得した。FGF-21 は血糖降下作用、肥満改善効果を有しているため、ChREBP との相互作用について検討した。

3) ChREBP 転写活性抑制薬のスクリーニング

グルコース反応性遺伝子発現能が保存されているラット膵β細胞株 INS-1E 細胞を用いて、免疫染色 (核内への移行)、two hybrid アッセイ (ChREBP と M1x の分子間結合をみる)、CHIP アッセイ (ChREBP と ChoRE の結合をみる)、レポーターアッセイ (実際の転写活性) の組み合わせを検討した。

インクレチン関連遺伝子多型と関連解析

今年度はインクレチン (GLP-1) の合成と分解に関連する経路の責任遺伝子についても検討を加えた。GCG、GLP1R、DPP4、PCSK1、GIP、GIPR の全 79 エクソン領域について、2 型糖尿病 86 人のサンプルを用いて直接シーケンスにより変異スクリー

ニングを行い、ミスセンス変異に関しては正常対照を最大 567 人までシーケンスし比較した。また関連解析については、SNP-200 と SNP-232 について、新たに 2 型糖尿病 743 人、正常 442 人を用いた遺伝子パネルを用いて関連解析を行い、再現性を検討した。また機能解析として、MIN6 を用いたレポーターアッセイにて、SNP-232 の転写活性への影響について検討した。

倫理面への配慮

全ての実験はヘルシンキ宣言と研究指針を遵守して行われる。本計画は医学部の遺伝子解析と臨床研究に関する倫理審査委員会の承認を既に受けている。DNA と血液試料はインフォームドコンセントを取得した後に提供を受け、連結可能匿名化で保存されている。匿名化 DNA はさらにプレート番号のみで表されるので二重に匿名化され、被験者のプライバシーは完全に保護される。

個人情報はずべて本研究に関わらない秘守義務を負う識別管理者（倫理委員会の指定者）が管理する。保存コンピュータはインターネットに連結せず、専用で独立である。

C 研究結果

インスリン分泌に対する効果の解析

32kDa 分子はラット正常膵島では高い発現が認められたが、インスリン分泌能を欠失した膵β細胞由来株 RINm5F 細胞では mRNA 発現は認められなかった。一方、GK 糖尿病ラットから抽出した膵島では 3W に比して、逆に糖尿病を発症した 8W では 32kDa 分子は約 3 倍に発現が亢進していた。この相違は現時点では不明である。

マウスインスリン産生細胞株 MIN6 に過剰発現させると、5.5 mM と 25 mM グルコースのいずれにおいても、軽度ではあるが有意にインスリン分泌を亢進させた ($p < 0.01$)。正常ラットを用いた糖負

荷試験では、前、30 分、120 分のいずれにおいても血糖の低下を認めたが、対応するインスリン分泌については試料が十分ではなく 2 年度の課題となった。

2 年度の正常ラットを用いた糖負荷試験では、前、30 分、120 分のいずれにおいても血糖低下が再現された。前年度は対応するインスリン分泌については試料が十分ではなく測定できなかったが、当該年度は個体数を増やすことで検討することができた。その結果、インスリン合成と分泌には有意な変化を認めなかった (Ad-GFP 前 0.24 ± 0.05 、30 分 0.43 ± 0.11 、vs Ad-32kDa 前 0.27 ± 0.05 、30 分 0.44 ± 0.08 、NS)。血糖降下作用はインスリン分泌とは直接的に関連しないものと結論された。本年度は食餌負荷における血糖の変化についても検討した。その結果、空腹時 (対照 108 ± 10 vs 32kDa 67 ± 14 , $p < 0.05$) も ad. lib. Fed (対照 132 ± 17 vs 32kDa 103 ± 16 , $p < 0.05$) のいずれにおいても有意に血糖は低下した。一方、インスリン負荷による末梢組織の感受性についても検討したが、過剰発現にて有意差は認めなかった。

HbA1c 5.5 以上のヒト 78 人について 75g 経口糖負荷試験を実施したところ、糖尿病型では全時点で低分泌が観察された。境界型と糖尿病型の症例数が十分ではなかったため、2 年度はさらに症例数 (188 人) を増やして検討を加えた (正常型 68 人、境界型 21 人、糖尿病型 99 人)。その結果、糖尿病にて弱いながらも有意な血中レベルの低下を認めた ($p < 0.05$)。

肝における糖代謝の解析

肝臓は食事由来の門脈血のグルコースを取り込む。一方、空腹時にはグリコーゲンを分解して糖新生を行い、血糖の恒常性を維持している。糖負荷試験で血糖降下を説明できるほどのインスリン分泌の亢進は認められなかったため、肝における糖の出入りの影響が示唆された。そこで、糖代謝に関

連する分子の転写レベルでの変化を解析した。各々の mRNA を前値と相対比較すると、解糖系の酵素は有意に亢進し (GK 2.25 ± 0.09)、糖新生系の酵素は有意に減少していた (PEPCK 0.33 ± 0.01)。一方、肝のグリコーゲンの蓄積量は有意に減少していた (対照 118 ± 13 vs 32kDa 73.6 ± 23.7 , $p < 0.05$)。

体脂肪量に対する効果の解析

3T3L1 細胞を脂肪細胞に分化させると、32kDa 分子は TGF β と同程度のレベルで誘導された。そこで、脂肪細胞における 32kDa 分子の生理的機能を理解するために、アデノウイルス発現系を用いてラットの腹腔内に投与して血中に過剰発現させた。その結果、個体の体重を変化させないで、WAT と BAT 量を有意に減少させた。肝臓の重量は上昇しており、中性脂肪で占められた。以上から、32kDa 分子は体脂肪を分解して遊離脂肪酸として血中に放出し、過剰分は肝臓に取り込まれて中性脂肪として蓄積されたと推定された。

32kDa 分子の過剰発現により、体脂肪蓄積は減少したが、本年度は個体数を増やして脂質レベルに対する影響を解析した。血中の中性脂肪は空腹時 (対照 129 ± 24 vs 32kDa 156 ± 36 , $p < 0.05$) と ad. lib. Fed (対照 149 ± 20 vs 32kDa 176 ± 29 , $p < 0.05$) のいずれにおいても有意に上昇した。しかしながら、遊離脂肪酸は空腹時 (対照 225 ± 0.09 vs 32kDa 2.70 ± 0.19 , $p < 0.05$) においてのみ有意差を認め、食後には関連を認めなかった。肝臓の中性脂肪の蓄積量は有意に増加していた (対照 10.3 ± 1.9 vs 32kDa 33.0 ± 9.9 , $p < 0.05$)。

脂質代謝に関連する分子の転写レベルでの変化を解析した。各々の mRNA を前値と相対比較すると、脂質合成と分解に関しては、糖代謝と異なり、有意な変化は認めなかった (ACC2, CPT1, ACOX, ACC1, FAS)。

32kDa 分子のトランスジェニックマウスの作成

アデノウイルスの発現系を用いて腹腔内に投与し、肝臓から高分泌させた解析を行ったが、ウイルスそのものの影響の関与が示唆された。そこで、CMV プロモーターを用いて全身に 32kDa 蛋白を過剰発現させた。生まれた仔のゲノムタイピングの結果、得られたファウンダーラインは 5 系統であった。そのうち、3 系統が次の世代でタイピング陽性 (# 68, 90, 118) であった。残念ながら発現レベルは対照に比して有意差なく、大きな表現型の違いは見出すことができなかった。その考察として、第一に、全身で発現するプロモーターを使用したので、胎生期に高発現動物は致死性であった可能性がある。ヒトと比べてマウスでは血中レベルが高いことも関連すると思われる。そこで、もとより膝島で同定された分子であるので、発現分子が門脈に放出されて肝臓で機能を発揮するモデル作成のために、新たにインスリンプロモーターを有するベクター (pINS) を用いた TG マウスを作成することに変更した。

32kDa 蛋白と臨床表現型との相関解析

ヒトでは、BMI と中性脂肪において正の相関が認められた。空腹時血糖とは負の相関があり、空腹時インスリンとは正の相関を認めた。アディポサイトカインでは、アディポネクチンと負の相関があり、PAI-1 とは正の相関を示した。

血中 32kDa 濃度は、空腹時 1 型糖尿病では平均 8.6 ± 5.2 ng/ml、2 型糖尿病で 9.8 ± 7.4 ng/ml、食後 2 時間で 1 型糖尿病では平均 7.4 ± 4.0 ng/ml、2 型糖尿病で 9.2 ± 6.7 ng/ml であり、1 型と 2 型の間で有意差を認めなかった。男女別では空腹時で男性 10.3 ± 8.4 ng/ml、女性 8.8 ± 4.5 ng/ml、食後 2 時間で男性 9.5 ± 7.4 ng/ml、女性 8.4 ± 4.6 ng/ml であり、男女間で有意差を認めなかった。

全体群では年齢、BMI、罹病年数、eGFR、血糖値、C ペプチド、HbA1c、baPWV、平均 IMT と空腹時および食後 2 時間での血中 32kDa 値に相関は見られ

なかった。次に対象症例のうち SU 薬とインスリンを使用していなかった 28 人（男性 15 人、女性 13 人）のみについて、同様の解析を行った。その結果、少ないサンプル数ではあるが、食後 2 時間での血中 32kDa 値と血中 C ペプチド濃度の間に相関を認めた ($p=0.0046$ 、 $r=0.513$)。

ChREBP の肝における糖脂質代謝の解析

(1) ChREBP の転写活性調節抑制能を有する Mlx 機能変異体の同定

N 端及び DNA 結合領域である basic 領域を欠失させた変異体には、ChREBP 転写活性の抑制作用があることがわかった。同変異体をアデノウイルスにより肝細胞で強発現させたところ、transketolase (ChREBP の活性化物質である Xylulose-5-phosphate の合成酵素) や ChREBP のグルコースによる誘導が阻害された。すなわち、グルコースによる ChREBP の活性化には positive feedback loop が存在することが明らかとなった。また、同変異体を糖尿病予備軍である加齢マウスに過剰発現させたところ、血糖降下と中性脂肪減少がみられた。その際、肝臓内 Elov1-6 や glucose-6-phosphatase の発現は低下した。Elov1-6 抑制は肝内脂肪組成の不飽和脂肪酸含量を減少させ、インスリン感受性を改善することや G-6Pase の発現低下は肝糖放出を抑制することから、Elov1-6 および G-6-Pase の発現抑制は血糖降下作用の一部を説明すると考えられた。

(2) ChREBP による血糖降下作用を有する分泌蛋白 FGF21 の発現調節機構の解明

ラット肝細胞において、グルコース刺激および ChREBP の過剰発現により FGF-21 の発現が顕著に誘導されること、かつ ChREBP の転写活性を阻害する優性阻害 Mlx (dn-Mlx) の過剰発現によりグルコースによる FGF21 の誘導が阻害されることを明らかにした。さらにマウス FGF-21 プロモーターの機能解析により FGF21 遺伝子のグルコース反応領

域を同定した。次に、FGF-21 発現アデノウイルス感染マウスを作成し、肝臓で強発現させたところ血糖降下作用および ChREBP 標的遺伝子の発現レベルが低下した。また FGF21 をラット肝細胞に過剰発現した場合は in vivo での成績と異なり、ChREBP の標的遺伝子の発現レベルは不変であった。従って、ChREBP は FGF21 の発現を転写レベルで制御するが、FGF21 は全身での血糖降下作用により間接的に ChREBP の転写活性を抑制することが明らかになった。

(3) ChREBP 転写活性抑制薬のスクリーニング法の確立

ChREBP の活性化には、脱リン酸化、Mlx との結合、核内移行、標的遺伝子の ChoRE (Carbohydrate response Element) への結合の各ステップが必要である。ChREBP に作用する薬剤をスクリーニングする際に、どのステップに作用するかがわかれば、作用機序から副作用をふくめた作用が予想できると考えた。そこで、グルコース反応性遺伝子発現能が保存されているラット膵β細胞株 INS-1E 細胞を用いて、核内移行の免疫染色、two hybrid アッセイ、CHIP アッセイ、レポーターアッセイを組み合わせた検出系を構築した。同法により、ChREBP の転写活性能への影響だけでなく薬剤の作用部位の同定まで 系統的にかつ迅速におこなうことが可能となった。

遺伝子多型を用いた関連解析

32kDa 分子のコード遺伝子の 10 エクソンを直接シーケンスで解析したが、家族性糖尿病 (MODY) の原因となる変異は同定されなかった。次いで、全域を SNP スクリーニングして頻度の高い SNP を 18 個見出した。連鎖不平衡解析により既に 2 つの LD ブロックを見出している。代表 SNP を用いた 32 kDa 分子の血中レベルとの相関解析の結果、イントロン 8 に存在する SNP-136 において弱いながらも有意の相関を認めた ($p=0.011$)。この差は女性にお

いて大きい傾向が見られたが、性差の確認にはさらに症例を増やすことによる確認が必要である。インクレチン合成と作用経路の関する遺伝子多型 GLP-1 は体重減少効果と血糖低下作用を有する液性因子である。関連遺伝子のエクソン領域の直接シーケンスにて新規の40個を含む108個の変異を検出した。ミスセンス変異は21個で、うち3個は正常対照群に認められず、他は患者群と対照群に頻度に有意差を認めなかった。SNP-200とSNP-232についての関連解析の結果は、年齢、性別、BMIにて補正を行うと、SNP-200では有意差を見なかったが、SNP-232で $p=0.056$ と有意な傾向を認め、パネル1と2を合計すると(DM 1,303人、対照 1,018人) $p=0.044$ (OR 0.869 : 95%CI 0.758-0.996)とボーター領域の有意差を認めた。レポーターアッセイによる機能解析ではSNP-232のアリル1はアリル2に比べ転写活性が0.77倍に低下していた。

SNP-232はイントロン多型であるが、独立DNAパネルにて再現性が確認されたこと、機能解析でアリルによる転写活性の相違を認めたことから、SNP-232は転写活性を介してGLP-1分泌に影響し、糖尿病発症に関連する可能性が示唆された。現在、正常ボランティアにおけるSNP-232と食前後の血中GLP-1濃度との相関について解析を行っている。

D 考察

インスリン抵抗性の改善のために、2型糖尿病の予防と治療の双方に過体重の解消は重要である。動脈硬化による心血管イベントの予防にも解消は欠かせない。しかし、食事療法と運動療法を中心とした減量は不断の長期努力を要するので、続かず十分な改善に至らない場合がほとんどである。特に高齢者では、循環器疾患を既に合併していたり、整形外科的な障害のために運動制限がある場合が多い。従って、効果的な減量と耐糖能の改善を同時に見込める治療は理想的である。特に、継

続的な運動やインスリン治療が困難な高齢化社会では、このような治療法は老人の生活自立障害を予防する。

一方、内蔵肥満があると軽度の耐糖能障害であっても、心血管イベントリスクとなることが明らかにされている。従って、壮年期からの健康診断による効率歴なりリスクグループの早期検出と保健指導は予防策として重要である。75g糖負荷試験は耐糖能異常を検出する鋭敏な検査法であるが、少なくとも2時間を要すること、費用、煩雑な手間から一次健診には適するとは言えない。32 kDa分子の随時の1回採血で高リスク者が検出されれば健診効率は上昇すると期待される。

32 kDa分子は主として肝臓の糖代謝に作用して血糖値を低下させる可能性が考えられるが、全身に高発現させるTGマウスの解析は功を奏さなかった。もとより臍島で同定された分子であるので、同細胞での発現と門脈への放出が自然であり、戦略が不適切であった可能性がある。現在、臍島で発現させる修正方向で研究戦略を再構築している。一方、ヒトでの検査成績はゲッ歯動物の生理学的解析結果と異なる部分が多く認められた。これは種差に起因するものと考えられるので、実験動物から得られた成績の解釈は慎重になるべきである。臨床応用においては、今後は臨床解析を中心に行うことが重要であると認識した。一方、患者解析では、32 kDa分泌がインスリン分泌のサロゲートマーカーとなる可能性が示唆されたので、もし変化が病態に先行するならインスリン分泌不全の予知的マーカーとなりうると考え、現在検討数を増やしている。

本邦においても、DPP4阻害薬とGLP-1受容体作動薬による2型糖尿病の新たな治療が開始され、体脂肪減少因子であり、血糖改善薬でもあるGLP-1についての研究の重要性は益々高まる。我々は、GLP-1関連4遺伝子(GCG, GLP1R, DPP4, PCSK1)

の多型について関連解析を行い、有意な関連を示した2個のSNP (SNP-200、SNP-232)を見出したが、今回更にその解析を進めることができた。これらの遺伝マーカーは薬剤感受性の指標となる可能性が期待される。

E 結論

血糖低下と体重減少に関わる3種類の液性因子(32kDa 蛋白、FGF21、インクレチン)について研究を進めてきた。前2者については臨床診断マーカーの可能性のみならず、治療薬の可能性も期待されるので、今後も臨床応用を中心とした研究が重要である。特に、32 kDa 分子は主として肝糖代謝に作用して血糖低下させると考えられたので、インスリンの初期分泌不全と抵抗性に次いで、食後高血糖の第3の可能性が提起された。従って、32 kDa 分子の適正な調節は理にかなった2型糖尿病の治療であるかもしれない。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

論文発表

M. Hamaguchi, T. Kojima, N. Takeda, C. Nagata, J. Takeda, H. Sarui, Y. Kawahito, N. Yoshida, A. Suetsugu, T. Kato, J. Okuda, K. Ida and T. Yoshikawa.

Nonalcoholic fatty liver disease is a novel predictor of cardiovascular disease.

World J. Gastroenterol. 13: 1579-1584, 2007.

N. Oda, S. Imamura, T. Fujita, Y. Uchida, K. Inagaki, H. Kakizawa, N. Hayakawa, A. Suzuki, J. Takeda, Y. Horikawa, and M. Itoh.

The ratio of leptin to adiponectin can be used

as an index of insulin resistance.

Metabolism 57: 268-273, 2008.

K. Miyake, Y. Horikawa, K. Hara, K. Yasuda, H. Osawa, H. Furuta, Y. Hirota, K. Yamagata, Y. Hinokio, Y. Oka, N. Iwasaki, Y. Iwamoto, Y. Yamada, Y. Seino, H. Maegawa, A. Kashiwagi, K. Yamamoto, K. Tokunaga, J. Takeda, H. Makino, K. Nanjo, T. Kadowaki, and M. Kasuga.

Association of TCF7L2 polymorphisms with susceptibility to type 2 diabetes in 4,087 Japanese subjects.

J. Hum. Genet. 53: 174-180, 2008.

Y. Horikawa, K. Miyake, K. Yasuda, M. Enya, Y. Hirota, K. Yamagata, Y. Hinokio, Y. Oka, N. Iwasaki, Y. Iwamoto, Y. Yamada, Y. Seino, H. Maegawa, A. Kashiwagi, K. Yamamoto, K. Tokunaga, J. Takeda, and M. Kasuga.

Replication of genome-wide association studies of type 2 diabetes susceptibility in Japan.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 93: 3136-3141, 2008.

K. Kajita, T. Mune, T. Ikeda, M. Matsumoto, Y. Uno, C. Sugiyama, K. Matsubara, H. Morita, M. Takemura, M. Seishima, J. Takeda, and T. Ishizuka.

Effect of fasting on PPAR γ and AMPK activity in adipocytes.

Diabetes Res. Clin. Pract. 81: 144-149, 2008.

M. Enya, Y. Horikawa, E. Kuroda, K. Yonemaru, N. Tonooka, H. Tomura, N. Oda, N. Yokoi, K. Yamagata, N. Shihara, K. Iizuka, T. Saibara, S. Seino, and J. Takeda.

- Mutations in the small heterodimer partner gene increase morbidity risk in Japanese type 2 diabetes patients.
Hum. Mutat. 29: E271-1277, 2008.
- K. Yasuda, K. Miyake, Y. Horikawa, K. Hara, H. Osawa, H. Furuta, Y. Hirota, H. Mori, A. Jonsson, Y. Sato, K. Yamagata, Y. Hinokio, H-Y. Wang, T. Tanahashi, N. Nakamura, Y. Oka, N. Iwasaki, Y. Iwamoto, Y. Yamada, Y. Seino, H. Maegawa, A. Kashiwagi, J. Takeda, E. Maeda, H-D. Shin, Y-M. Cho, K-S. Park, H-K. Lee, M. Ng, R. Ma, W-Y. So, J. Chan, V. Lyssenko, T. Tuomi, P. Nilsson, L. Groop, N. Kamatani, A. Sekine, Y. Nakamura, K. Yamamoto, T. Yoshida, K. Tokunaga, M. Itakura, H. Makino, K. Nanjo, T. Kadowaki, and M. Kasuga. Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus.
Nat. Genet. 40: 1092-1097, 2008.
- A. Sasaki, Y. Horikawa, T. Suwa, M. Enya, SI. Kawachi, and J. Takeda.
Case report of familial Carney complex due to novel frameshift mutation c.597del C (p.Phe200LeufsX6) in PRKAR1A.
Mol. Genet. Metab. 95: 182-187, 2008.
- K. Iizuka, J. Takeda, and Y. Horikawa.
Hepatic overexpression of dominant negative Mlx improves metabolic profile in diabetes-prone C57BL/6J mice.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 379: 499-504, 2009.
- K. Iizuka, and Y. Horikawa.
Regulation of lipogenesis via BHLHB2/DEC1 and ChREBP feedback looping.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 374: 95-100, 2008.
- K. Iizuka, and Y. Horikawa.
ChREBP: a glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome.
Endocr J. 55: 617-24, 2008.
- Iizuka K, Takeda J, Horikawa Y.
Hepatic overexpression of dominant negative Mlx improves metabolic profile in diabetes-prone C57BL/6J mice.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 379: 499-504, 2009
- Kuroda E, Horikawa Y, Enya M, Oda N, Suzuki E, Iizuka K, and Takeda J.
Identification of minimal promoter and genetic variants of Kruppel-like factor 11 gene and association analysis with type 2 diabetes in Japanese.
Endocr. J. 56: 275-286, 2009.
- Miyake K, Yang W, Hara K, Yasuda K, Horikawa Y, Osawa H, Furuta H, Ng MCY, Hirota Y, Mori H, Ido K, Yamagata K, Hinokio Y, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Wang HY, Tanahashi T, Nakamura N, Takeda J, Maeda E, Yamamoto K, Tokunaga K, Ma RCW, So WY, Chan JCN, Kamatani N, Makino H, Nanjo K, Kadowaki T, Kasuga M. Construction of a prediction model for type 2 diabetes mellitus in the Japanese population based on 11 genes with strong evidence of the association. .

J. Hum. Genet. 54: 236-241, 2009.

Iizuka K, Takeda J, Horikawa Y.

Glucose induces FGF21 mRNA expression through ChREBP activation in rat hepatocytes.

FEBS Lett. 583: 2882-2886, 2009

学会発表

志原伸幸、堀川幸男、飯塚勝美、武田 純

ラット膵島発現分泌蛋白の探索

第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会、仙台、5 月、2007

石山雅美、鈴木英司、廣田卓男、伊藤 勇、後藤忍、藤田民夫、武田 純

糖尿病患者における冠動脈石灰化形成と骨血管相関についての検討

第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会、仙台、5 月、2007

宗 友厚、棚橋弘成、五島英一、川地慎一、佐々木昭彦、諏訪哲也、堀川幸男、山本眞由美、武田則之、安田圭吾、武田 純

高インスリン血症と遅延型低血糖を認めたインスリン受容体異常

第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会、仙台、5 月、2007

伊藤 勇、鈴木英司、廣田卓男、石山雅美、後藤忍、村瀬 寛、武田 純

糖尿病患者の閉塞性動脈硬化症と壁硬化による機能的下肢血流障害の臨床的背景の検討

第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会、仙台、5 月、2007

塩谷真由美、堀川幸男、黒田英嗣、武田 純

2 型糖尿病における GLP 1 関連遺伝子多型の検討
第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会、仙台、5 月、2007

黒田英嗣、堀川幸男、塩谷真由美、武田 純
日本人 2 型糖尿病患者における MODY7 遺伝子 (KLF11) の検討

第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会、仙台、5 月、2007

佐藤大仁、堀川幸男、飯塚勝美、桜井敬子、田中毅、志原伸幸、大島明彦、武田 純、三國雅彦
視床下部グルココルチコイド反応性遺伝子の大規模解析

第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、5 月、2008

黒田英嗣、堀川幸男、塩谷真由美、飯塚勝美、武田 純

日本人 2 型糖尿病患者における MODY7 遺伝子 (KLF11) の検討

第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、5 月、2008

西村英尚、堀川幸男、黒田英嗣、塩谷真由美、木全康良、武田 純

日本人 2 型糖尿病患者における膵分泌蛋白 IGFBP-7 の検討

第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、5 月、2008

塩谷真由美、伊藤 勇、服部泰輔、堀川幸男、武田 純

適正な食事療法によって高用量インスリンを著明に減量できた肥満 2 型糖尿病の 2 症例

第 12 回日本病態栄養学会年次学術集会、京都、1

月、2009

堀川幸男

2型糖尿病感受性遺伝子同定の軌跡

第43回糖尿病学の進歩、松本、2月、2009

飯塚勝美、堀川幸男、武田 純

転写因子 Mlx の肝糖脂質代謝調節における役割

第52回日本糖尿病学会、大阪、5月、2009

塩谷真由美、堀川幸男、西村英尚、武田 純

全ゲノム関連解析により獲得された2型糖尿病感受性 SNPs の統合的解析

第52回日本糖尿病学会、大阪、5月、2009

徳永あゆみ、堀川幸男、秋田悦子、沖田孝平、岩橋見、下村伊一郎、武田 純、山県和也

日本人非肥満2型糖尿病患者において、HNF-4 α 遺伝子 P2 プロモーター領域の SNP がインスリン分泌と関連する

第52回日本糖尿病学会、大阪、5月、2009

武田 純

日本人2型糖尿病と食後血糖の管理

第82回日本内分泌学会、前橋、4月、2009

武田 純

糖尿病の薬物特性に基づく最新薬物療法

α グルコシダーゼ阻害薬の特性と病態の予防効果について

第82回日本内分泌学会、前橋、4月、2009

武田 純

日本人の体質を考えた2型糖尿病の治療

第45回日本内科学会生涯教育講演会、名古屋、6月、2009

武田 純

日本人2型糖尿病におけるインスリン抵抗性をどう考えるか？

第46回日本内科学会生涯教育講演会、岐阜、6月、2009

H 知的財産権の出願・登録

1 特許取得

なし

2 実用新案登録

なし

3 その他

なし

【2】研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻	ページ	出版年
E. Kuroda, et al.	Identification of minimal promoter and genetic variants of Kruppel-like factor 11 gene and association analysis with type 2 diabetes in Japanese.	Endocrine Journal	56	275-286,	2009
K. Iizuka, et al.	Hepatic overexpression of dominant negative Mlx improves metabolic profile in diabetes-prone C57BL/6J mice.	Biochemical and Biophysical Research Communications	379	499-504	2009
K. Miyake, et al.	Construction of a prediction model for type 2 diabetes mellitus in the Japanese population based on eleven genes with strong evidence of the association.	Journal of Human Genetics	54	236-241	2009
K. Iizuka, et al.	Glucose induces FGF21 mRNA expression through ChREBP activation in	FEBS Letter	583	2832-2836	2009

	rat hepatocytes.				
Y. Horikawa, et al.	Replication of genome-wide association studies of type 2 diabetes susceptibility in Japan.	Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism	93	3136-3141	2008
K. Kajita, et al.	Effect of fasting on PPAR γ and AMPK activity in adipocytes.	Diabetes Research and Clinical Practice	81	144-149	2008
K. Izuka and Y. Horikawa.	ChREBP: A glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome.	Human Mutation	29	E271-1277	2008
K. Iizuka, and Y. Horikawa.	Regulation of lipogenesis via BHLHB2/DEC1 and ChREBP feedback looping.	Biochemistry. Biophysics, Research and Communication	2374	95-100	2008
K. Iizuka, J. Takeda, and Y. Horikawa.	Hepatic overexpression of dominant negative Mlx improves metabolic profile in diabetes-prone C57BL/6J mice.	Biochemistry. Biophysics, Research and Communication	379	499-504	2008

K. Miyake, et al.	Association of TCF7L2 polymorphisms with susceptibility to type 2 diabetes in 4,087 Japanese subjects.	Journal of Human Genetics	53	174-180	2008
N. Oda, et al.	The ration of leptin to adiponectin can be used as an index of insulin resistance.	Metabolism	57	268-273	2008
M. Zenibayashi, et al.	Lack of association of LRP5 and LRP6 polymorphisms with type 2 diabetes mellitus in the Japanese population.	Endocrine Journal			2008

【3】研究成果の刊行物・別刷

Association of *TCF7L2* polymorphisms with susceptibility to type 2 diabetes in 4,087 Japanese subjects

Kazuaki Miyake · Yukio Horikawa · Kazuo Hara · Kazuki Yasuda · Haruhiko Osawa · Hiroto Furuta · Yushi Hirota · Kazuya Yamagata · Yoshinori Hinokio · Yoshitomo Oka · Naoko Iwasaki · Yasuhiko Iwamoto · Yuichiro Yamada · Yutaka Seino · Hiroshi Maegawa · Atsunori Kashiwagi · Ken Yamamoto · Katsushi Tokunaga · Jun Takeda · Hideichi Makino · Kishio Nanjo · Takashi Kadowaki · Masato Kasuga

Received: 16 August 2007 / Accepted: 16 November 2007 / Published online: 21 December 2007
© The Japan Society of Human Genetics and Springer 2007

Abstract Transcription factor 7-like 2 (*TCF7L2*) has been shown to be associated with type 2 diabetes mellitus in multiple ethnic groups. Regarding the Asian population, Horikoshi et al. (*Diabetologia* 50:747–751, 2007) and Hayashi et al. (*Diabetologia* 50:980–984, 2007) reported that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *TCF7L2* were associated with type 2 diabetes in the Japanese

population, while contradictory results were reported for Han Chinese populations. The aim of this study was to investigate the associations of the *TCF7L2* gene with type 2 diabetes using a relatively large sample size: 2,214 Japanese individuals with type 2 diabetes and 1,873 normal controls. The minor alleles of rs7903146, rs11196205, and rs12255372 showed significant associations with type 2

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10038-007-0231-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

K. Miyake · Y. Hirota · M. Kasuga (✉)
Division of Diabetes, Metabolism and Endocrinology,
Department of Internal Medicine, Kobe University Graduate
School of Medicine, 7-5-1 Kusunoki-cho, Chuo-ku,
Kobe 650-0017, Japan
e-mail: kasuga@med.kobe-u.ac.jp

Y. Horikawa · J. Takeda
Department of Diabetes and Endocrinology Division
of Molecule and Structure, Gifu University School
of Medicine, Gifu, Japan

Y. Horikawa
Laboratory of Medical Genomics, Biosignal Genome Resource
Center, Institute for Molecular and Cellular Regulation,
Gunma University, Maebashi, Japan

K. Hara · T. Kadowaki
Department of Metabolic Diseases, Graduate School
of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan

K. Yasuda
Department of Metabolic Disorder, Research Institute,
International Medical Center of Japan, Tokyo, Japan

H. Osawa · H. Makino
Department of Molecular and Genetic Medicine, Ehime
University Graduate School of Medicine, Ehime, Japan

H. Furuta · K. Nanjo
The First Department of Medicine, Wakayama Medical
University, Wakayama, Japan

K. Yamagata
Department of Metabolic Medicine, Graduate School
of Medicine, Osaka University, Osaka, Japan

Y. Hinokio · Y. Oka
Division of Molecular Metabolism and Diabetes, Tohoku
University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan

N. Iwasaki · Y. Iwamoto
Department of Medicine, Diabetes Center,
Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

Present Address:
Y. Yamada
Department of Internal Medicine, Akita University School
of Medicine, Akita, Japan

Y. Seino
Kansai Electric Power Hospital, Osaka, Japan

H. Maegawa · A. Kashiwagi
Division of Endocrinology and Metabolism Department
of Medicine, Shiga University of Medical Science, Shiga, Japan

K. Yamamoto
Department of Molecular Genetics, Medical Institute
of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka, Japan