

20024258A

**厚生労働科学研究費  
難治性疾患克服研究事業**

**MODY1-6 の病態調査と鑑別的診断基準の策定**

**平成 22 年度 総括研究報告書**

**主任研究者 武田 純**

**平成 23 年 (2011) 5 月**

## 【目次】

1 総括研究報告	_____	2
----------	-------	---

「MODY1-6 の病態調査と識別的診断基準の策定」  
岐阜大学大学院医学系研究科 内分泌代謝病態学

武田 純（代表）  
堀川幸男  
山縣和也  
今川彰久

2 研究成果の刊行に関する一覧表	_____	1 1
------------------	-------	-----

3 研究成果の刊行物	_____	1 5
------------	-------	-----

4 巻末 別表		
---------	--	--

## 【 1 】 総括研究報告

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
総括研究報告書

MODY1-6 の病態調査と識別的診断基準の策定

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：

MODY1-6 調査（文献調査、アンケート調査、原因遺伝子の再解析）により、各病型の大凡の頻度を算出した（MODY1: 0.3%, MODY2: 7%, MODY3: 18%, MODY4: 0%, MODY5: 2%, MODY6: 0%）。全 MODY 遺伝子の再シーケンスの結果、検索依頼された遺伝子以外で原因となる変異が多く認められた。また、変異を有する両親の未発症家系と変異を有さない de novo 変異も認めたので、遺伝様式を考慮した 3 世代罹患と若年発症の MODY 判断基準は不十分であり、孤発例も考慮した新たな基準設定が必要と考えられた。更に、MODY3 と MODY5 において、日本人でも CMV 多型が存在することが判明したので、MODY 診断にはエクソン解析だけでは不十分であることが明らかになった。

2 世代家系群を中心に、SNP 連鎖解析によるゲノム全域スクリーニングの結果、日本人の新たな MODY 遺伝子座を第 14 番染色体上にマップすることに成功した。

未知 MODY を含めていずれの病型にてもインスリン分泌不全が一義的であるが、程度や特徴的な病態については不明である。病態識別を容易化するために先ず MODY1 (HNF-4 $\alpha$ ) 標的に注目した結果、新規標的分子として Anks4b の同定に成功した。

研究分担者：

堀川幸男	岐阜大学医学部附属病院	医療連携センター	準教授
山縣和也	熊本大学大学院医学研究科	生体機能病態学	教授
今川彰久	大阪大学大学院医学研究科	内分泌代謝内科	講師

## A. 研究目的

インスリン分泌不全を若年発症する稀な単一遺伝子病がある (MODY; maturity-onset diabetes of the young)。臨床像は耐糖能異常以外も多様であり、各々の MODY 固有の重篤な病態 (生殖器異常、腎機能低下、発癌、心血管イベント、精神遅滞など) のために、若年発症であることは生涯を通しての生活質を甚だしく低下させる。

現在までに MODY1-6 の原因遺伝子が同定されており、申請者らは 4 種類を世界に先駆けて発見した (MODY1 (HNF-4  $\alpha$  異常): Nature 1996, MODY2 (グルコキナーゼ GCK 異常): Nature 1992, MODY3 (HNF-1  $\alpha$  異常): Nature 1996, MODY5 (HNF-1  $\beta$  異常): Nature Genet. 1998)。他の 2 MODY は IPF-1 遺伝子 (MODY4) と Beta2/NeuroD 遺伝子 (MODY6) の異常に起因する。先駆的立場から、我々は全国から DNA 診断依頼を受けており、同定した遺伝子変異は世界最多を誇る。しかし、各病型は 0.1-5 万人と推定されるが、概数や家系内浸透率は不明である。MODY 判定が困難な理由として、1) 核家族と少子化により遺伝様式が不明な場合が多い、2) 一般の 2 型糖尿病が低年齢化して MODY との識別が困難になっている、3) 原因遺伝子の de novo 変異が少なくない可能性がある、4) 修飾因子のために表現型が多様になる、5) 新しく存在が判明したコピー数多型 (CNV) が日本人で検討されていない、6) 煩雑な DNA シーケンス法が唯一の診断法である、7) 検査費用と検査施設が充分に得られないので全 MODY 遺伝子が検査されていない、こと等が挙げられる。

本研究では MODY1-6 について実態調査を行い、臨床所見の解析から病型の特徴的症候と識別基準を明確にすると共に、DNA シーケンスの適応基準を設定する。

先ず、初年度から、現在までに全国から依頼例について、承諾のもとに全 MODY 遺伝子の再スクリーニングを実施した。更に、新しく提供された MODY 家系を加えて SNP 連鎖解析を実施し、ゲノム上に日本人のメジャー MODY の責任遺伝子座をマップすることも試みた。平行して、全国の関連する医療施設 (内科、小児科) に対して若年糖尿病に関する一次アンケート調査を実施した。

識別的に診断を行うためには、病因に基づいた特徴的な病態を理解することが重要である。しかし、稀な疾病であることから臨床所見のみから抽出することは困難であるので、転写標的の分子の生理作用から逆行的に推定する事が効率的と思われる。6 種類のいずれの病型においてもインスリン分泌不全が基本病態として認められるが、その程度や特徴的な病態については明らかではない。各病型に特徴的な差異を明らかにするため、先ず、コード転写因子の標的遺伝子について検索を試みた。

## B. 研究方法

以下の MODY 判定の問題点の解決を研究全体 (3 年間) の到達目標とする。

1) 疾患頻度: 若年糖尿病における MODY の頻度は? 各 MODY 病型の頻度は? 新規の MODY は存在するか?

2) 遺伝様式: 家系内での浸透率は? 孤発例での de novo 変異の頻度は? CNV 多

型は？

3) 肥満度：MODY における、肥満と非肥満のカットオフ基準は？

4) 膵β細胞機能：インスリン分泌不全の程度は？抵抗性の関与は？

5) 病態：亜型に特徴的な臨床所見は？有効治療はあるのか？発癌の頻度は？

#### 【H22-24 年度を通じた基本計画】

##### <MODY 変異の再スクリーニング>

小児内分泌学会や関連団体の協力を得て、基準を満たす約 60 の MODY 家系を集積してきた。その後も、全国からの MODY 検査依頼を受諾し、現時点で合計 308 家系に相当する発端者が集積された。

##### 1) 全 MODY 遺伝子のスクリーニング

今までは検査費用の関係で、依頼遺伝子のエクソンのみをスクリーニングしてきた。従って、他の MODY 変異を見逃した可能性があるため、全遺伝子領域の再スクリーニングを行う。病態がメンデル遺伝形式を示さない家系では、de novo 変異の可能性とその出現頻度を求める。

##### 2) アリルのコピー数多型 (CNV ; copy number variant) の検討

病態から推定した候補遺伝子でも、通常のエクソンシーケンスで症例に原因となる変異が見出されない場合がしばしばある。最近、アリル部分欠損により遺伝子広領域の欠落する多型 (CNV) が存在することが報告された。日本人 MODY においても、CNV に起因する病態が存在する可能性について検討する

##### 3) 頻度に関する全国アンケート調査

若年糖尿病の患者数と全体での割合や、常染色体優性遺伝を呈する家系頻度を調

査し (一次調査)、上記の再スクリーニングの結果を総合して、全国レベルでの各 MODY 型の頻度を推定する。

MODY 症例を保有する診療施設を対象に、MODY 亜型の病態について二次調査を次年度以降に実施する。未診断に関しては確定のために DNA 検体の提供を依頼する。

##### 4) MODY 転写標的の特定と生理作用の解析による特徴的臨床像の推定

β細胞特異的 HNF4 ノックアウトマウス膵島とコントロールマウス膵島から RNA を抽出し、マイクロアレイを用いた発現遺伝子の網羅的解析を行った。

##### <MODY 臨床像の解析と判定基準の策定>

MODY1-6 は類似した臨床像を呈するが、原因遺伝子の発現組織の違いに応じた特徴が存在する。肥満の有無、治療とその有効性、合併症、検査所見、変異保有者の予後などを調査する。MODY3 ではグルコース刺激以外のインスリン分泌経路は保たれるので、経口剤の調査は重要である。MODY5 はネフロン形成不全による腎不全が多いので、正常遺伝子を導入する腎移植の有効性について調査を行う。さらに、女性生殖器の異常も多いので、妊娠・出産への影響についても調査する。MODY6 における精神発達の頻度と程度も調査する。これらは、一次調査で MODY を経験したと回答した施設を対象とする (二次調査として予定)。

MODY 変異の再スクリーニングで集積された臨床情報、アンケート調査結果に加えて、学会発表・文献検索や日本糖尿病学会の遺伝子診断支援事業の情報などを統合して判定基準を検討する。

### <新規 MODY の同定の試み>

提供された未知 MODY 家系（3 世代を満たさない小家系群）を用いて、常染色体優性モデルとして SNP 連鎖解析により、日本人のメジャー MODY 遺伝子座をゲノム上にマップする。

### <MODY 標的的同定による亜型の病態の多様性に対する理解の試み>

MODY 遺伝子のコード蛋白は基本的に転写因子であることから、病態の特徴は転写下流の標的遺伝子の生理機能に依るところが多い。この標的群が不明であることから臨床病態の実態が明らかとならない背景がある。そこで、MODY 転写因子の評定同定の基礎研究も同時に行うことにより、作用経路の病態を加味した上で、識別的な MODY 診断基準の精度上昇を目指す。

そこで、最も上位の上位転写因子である HNF4 に着目し、 $\beta$  細胞特異的 HNF4 ノックアウトマウス腓島とコントロールマウス腓島から RNA を抽出し、マイクロアレイを用いた発現遺伝子の網羅的スクリーニングを行った。

## C. 研究結果

### 1) 各 MODY 頻度に関して

まず、遺伝子検査の精度の安定化と効率化のために、PCR プライマーの再検討を行った（巻末 別表）。以降の MODY スクリーニングは本条件で実施とする。

現時点での MODY1-6 遺伝子の解析では、発症年齢が 15 歳以下、BMI が 25 未満の発症者では、MODY3 (HNF-1 $\alpha$  変異) が 18%、MODY2 (GCK 変異) が 7% (GCK に関しては、現時点で 80 症例分のみ再シーケンスが終了)、MODY5 (HNF-1 $\beta$  変異) が 2%、MODY1

(HNF-4 $\alpha$ ) が 0.3% の順であった。MODY4 (IPF) と MODY6 (Beta2/NeuroD 変異) についても再シーケンスを進めているが、現時点では疾患の原因となる遺伝子変異の同定には至っていない。

### <現時点での本邦の MODY1-6 変異>

下線：本調査で新たに判明した変異

#### 【MODY1】

R127W, R244Q

#### 【MODY2】

V55G, R186X, IVS1+1G>T, A379E,  
Q239N240fsdelCAGAATG, E442X

#### 【MODY3】

L12H, F48fsdelG, R131Q, R131W,  
S142fsdelG, N149Y, K158N, R159Q,  
G191D, R200W, R200Q, R203C, R203H,  
K205Q, R229X, V233L, A239V, V259D,  
T260M, R263C, Y265C, W267R, R271G,  
R271Q, R271W, R272C, R272H,  
P291fsdelc, P379fsdelCT, T392fsdelA,  
G415R, L518P519fsTCC>A, T521I,  
T539fsdelC, V567I, R583G,  
L584S585fsinsTC,

Large deletion intron1-5

#### 【MODY4】

変異を認めず

#### 【MODY5】

S36F, L95fsinsAGCT, S148W, H153N,  
R177X, IVS2+1G>A, IVS2+2delAAGT,  
A263fsinsGG, R276X, Q354X, S465R,  
Large deletion (all exons)

#### 【MODY6】

変異を認めず

以上のうち、CNV は HNF-1 $\alpha$  のイントロン

1-5 の欠失 1 人、HNF-1 $\beta$  の約 1Mb の大規模欠失が現時点で 2 人に認められている。

## 2) 糖尿病の孤発例の頻度

### GCK 変異 (MODY2) :

変異の見つかった 4 症例のうち、家族歴ありは 3 例、そのうち家族サンプルのある 2 症例では同一変異を認めた。家族歴なしは 1 症例であった。耐糖能異常が軽度であるために、正常型や境界型が多くなり、病態が多世代に亘っていないことが背景と考えられた。

### HNF-1 $\alpha$ 変異 (MODY3) :

遺伝子変異を有した 25 症例のうち糖尿病の家族歴があるものは 15 家系 (両親サンプルなし 9 家系)、家族歴の無いものは 3 家系 (両親サンプルなし 2 家系)、家族歴の不明なものは 7 家系 (両親サンプルなし 4 家系) であった。糖尿病の家族歴が有りながら、両親に遺伝子変異が認められなかった発端者の de novo 変異は 3 症例であった。

### HNF-1 $\beta$ 変異 (MODY5) :

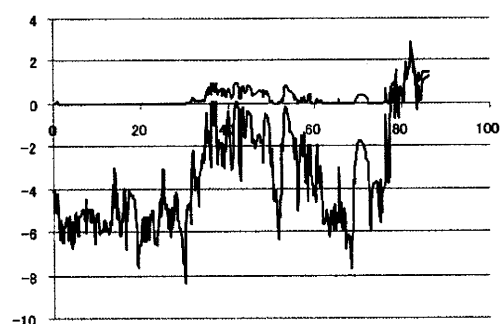
遺伝子変異の見つかった 5 家系 (ナンセンス変異 1 個、フレームシフト変異 2 個、アレル欠失 2 個) のうち糖尿病の家族歴ありは 1 家系であった。家族歴なしは 3 家系で、de novo 変異が疑われた。1 家系は詳細が不明であり、また、家族サンプルなしが 3 家系であった。家族サンプルありの 1 症例では罹患者に一致して同一変異を認めた。

以上から、総じて家族歴を認めない場合の 54% が孤発例と推定された。

## 3) 新規 MODY 遺伝子座のマッピング

SNP HiTLink プログラム (906,600 個の SNP) と 3 世代の罹患を満たさない小家系群を用いて全ゲノム (SNP 間隔 80-120 kb) を連鎖解析でスクリーニングした。

常染色体優性遺伝モデルで Parametric 解析を行った結果、第 14 番染色体上に最も連鎖の強い新たな MODY 遺伝子座をマップすることに成功した (下図)。次いで、第 8, 11, 18 番染色体においても弱い連鎖領域を見出した。



## 4) HNF 標的としての Anks4b の同定

アレイ解析により、 $\beta$  細胞特異的 HNF4 ノックアウトマウスの膵島で発現低下している遺伝子を約 50 個同定した。同遺伝子群のプロモーター領域のモチーフ解析により、複数の遺伝子において HNF4 の結合配列を見出したため、それら遺伝子の発現を中心に HNF4 ノックダウン MIN6 細胞において検討した。その結果、HNF-4 $\alpha$  の発現が低下した状態では、機能未知のアンキリンリピートモチーフをもつ新規分子 Anks4b の発現が著明に低下していることが判明した。さらに、同遺伝子のプロモーター領域には HNF-4 $\alpha$  のみならず、HNF-4 $\alpha$  の認識サイトも存在したので、MODY1 と MODY3 の双方の標的である事が判明した。従って、同分子の生理作用の解析は、MODY1 と MODY3 の臨床像の類似



性と差異に双方の理解において有用である。

#### 5) MODY1-6 に関する全国アンケートの一次調査

全国レベルでの各 MODY 型の頻度と概数を推定するため、小児内分泌学会員と糖尿病学会専門医合わせて 5,524 名にアンケート調査を施行し、1,815 名からの回答の結果、MODY を疑う症例（25 歳以下の発症で 3 世代以上の糖尿病家族歴（原則として非肥満）、家族歴不明で 15 歳以下の糖尿病発症（非肥満）、抗 GAD 抗体、IA-2 抗体などの自己抗体が陰性）が 790-806 例、一方 15 歳以下の糖尿病発症で肥満例が 1,170-1,200 例確認できた。本調査の結果、多くの MODY を疑わせる症例が存在することが明らかとなったが、同時にサブタイプが確定されていない実態も明らかとなった。

詳細な臨床情報などは今後の 2 次調査で確保していくとともに、確定診断のための DNA 調査を次年度から実施していく予定である。

#### D. 考察

日本では核家族と少子化のために遺伝学的解析に適した大家系入手は極めて困難である。欧米でも大家系は解析しつくされ、また欧米では肥満が多く非 MODY の可能性の除外が困難になり、新たな責任遺伝子座を同定できない状況にある。

申請者らは、若年糖尿病のスクリーニングにより、日本人では 15 歳以下の非肥満インスリン分泌不全は、家族歴を考慮しなくてもほぼ全てが MODY であることを示唆しており、これは顕著な肥満体質を

持たない日本人ならでは簡易判定法であり、新規発症例や小家系を多く集積する原動力となる。

鑑別診断だけでなく、治療選択の選別にも基準を発展させることが望ましい。インクレチン薬は糖尿病治療の多くの部分を変化させつつあるが、インクレチンホルモンや DPP-IV のコード遺伝子は一連の MODY 蛋白で制御されることが判明している。従って、治療内容も調査対象に含めることによって、オーダーメイド的な診療への展開が期待される。

#### 今回、新たに生じた問題点

今回の一次アンケート調査の結果、多くの回答を得ることができた。その結果、各々の MODY に特徴的な病態が確認された一方で、症例情報の増加に伴って新たな臨床像も示唆された。

従って、本研究が目指すサブ表現型の二次調査結果が期待される場所であるが、不幸なことに 3 月の東北の大震災によって主に関東以北の臨床情報や遺伝子シーズの入手が困難となったことは想定外であった。当該域に関する調査は、到達目標の期限を少し延期する事で臨むこととした。

#### F. 結論

1) 臨床像から疑われた候補遺伝子と異なる分子が真の原因遺伝子であった例が少なくない。

2) MODY2 では家系内に未発症例、他の MODY では de novo 変異が認められることから、孤発例のスクリーニング基準の設定が必要である。

- 3) 日本人 MODY にも CMV 変異は存在した。
- 4) SNP 連鎖解析により、日本人の新たな MODY 遺伝子座が同定された。
- 5) 新たに示唆された病態について、また未診断の MODY について、早急に二次調査を立ち上げることが必要である。
- 6) HNF 標的分子の一つが同定された。

## G. 研究発表

### 論文発表

- 1) Yano M, Watanabe K, Yamamoto T, Ikeda K, Senokuchi T, Lu M, Kadomatsu T, Tsukano H, Ikawa M, Okabe M, Yamaoka S, Okazaki T, Umehara H, Gotoh T, Song WJ, Node K, Taguchi R, Yamagata K, Oike Y. Mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species impair insulin secretion in sphingomyelin synthase 1 null mice. *J Biol Chem* 286:3992-4002, 2011
- 2) Sano H, Terasaki J, Mishiba Y, Imagawa A, Hanafusa T. Exenatide, a glucagon-like peptide 1 receptor agonist, suppresses pancreatic  $\beta$ -cell destruction induced by encephalomyocarditis virus. *Biochem Biophys Res Commun* 404:756-761, 2011
- 3) Higuchi Y, Shiraki N, Yamane K, Qin Z, Mochitate K, Araki K, Senokuchi T, Yamagata K, Hara M, Kume K, Kume S. Synthesized basement membrane direct the differentiation mouse embryonic stem cells into pancreatic lineages. *J Cell Sci* 123:2733-2742, 2010.
- 4) Uno S, Imagawa A, Saisho K, Okita K, Iwahashi H, Hanafusa T, Shimomura I. Expression of chemokines, CXC chemokine ligand 10 (CXCL10) and CXCR3 in the inflamed islets of patients with recent-onset autoimmune type 1 diabetes. *Endocr J* 57:991-996, 2010.

### 学会発表

#### (国内学会および研究会)

- 1) 堀川 幸男、塩谷真由美、川地慎一、飯塚勝美、諏訪哲也、武田 純  
 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤と DPP4 阻害剤による combination therapy  
第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会
- 2) 塩谷真由美、堀川 幸男、飯塚勝美、武田 純  
2 型糖尿病発症におけるインクレチン関連遺伝子多型の影響について  
第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会
- 3) 堀川 幸男  
トランスクリプトーム解析による合併症関連遺伝子の網羅的獲得  
第 25 回日本糖尿病合併症学会
- 4) 堀川 幸男  
 $\alpha$ -グルコシダーゼと DPP4 の阻害による combination therapy  
第 2 回東海インクレチン研究会
- 5) 秋田悦子、徳永あゆみ、岩橋博見、沖田考平、今川彰久、船橋徹、下村伊一郎、山縣和也  
糖毒性軽減後に正常なインスリン初期分泌を有する日本人 2 型糖尿病患者の臨床的特徴  
第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会
- 6) 小澤純二、沖田考平、岩橋博見、船橋徹、山縣和也、今川彰久、下村伊一郎

肥満および非肥満 2 型糖尿病患者におけるインクレチン分泌様式の検討

第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会

7) 沖田考平、岩橋博見、岡内幸義、小澤純二、米田祥、芳川篤志、山岡正弥、檜根晋、中川靖彦、北村哲宏、福井健司、岸田堅、大月道夫、松久宗英、山縣和也、船橋徹、今川彰久、下村伊一郎

インスリン治療中の 2 型糖尿病患者におけるインスリン感受性評価；インスリン負荷試験の有用性について

第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会

8) 山縣和也

生活習慣病の予防と治療-分子・遺伝学的理解-

平成 22 年度全国研究教育栄養士協議会九州ブロック研修会

9) Yamagata K.

Regulation of insulin secretion by HNF-4 transcription factor.

第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会大会

10) 佐藤叔史、山縣和也、今川彰久、下村伊一郎、井上正宏

HIF-1a による酸素消費の抑制は膵β細胞の細胞内低酸素を回避する

第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会大会

11) 八田光世、Fazlul Karim、佐藤叔史、瀬ノ口隆文、山縣和也

膵β細胞における新規 HNF-4α 標的遺伝子 Anks4b の機能解析

第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会大会

1) Horikawa Y

The Genetics of Type 2 Diabetes: What have we Learned from GWAS? What is Next?

Japanese-Danish Kick-off Workshop “Molecular Diabetology” Kobe, March 8<sup>th</sup>, 2011

#### H. 知的所有権の取得状況

- |           |    |
|-----------|----|
| 1. 特許取得   | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他    | なし |

(国際学会)

## 【2】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

### 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
Y. Sato, et al.	Cellular hypoxia of pancreatic beta cells due to high levels of oxygen consumption for insulin secretion in vitro.	J. Biol. Chem.	286	12524-12532	2010
K, Yamagata, et al.	Voltage-gated K <sup>+</sup> channel KCNQ1 regulates insulin secretion in MIN6 beta-cell line.	BBRC	407	620-625	2011
M. Yano, et al.	Mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species impair insulin secretion in sphingomyelin synthase.	J. Biol. Chem.	286	3992-4002	2011
J. Kozawa, et al.	Similar incretin secretion in obese and non-obese Japanese subjects with type 2 diabetes.	BBRC	393	410-413	2010
M. Koga, et al.	Serum 1,5-anhydroglucitol levels in patients with fulminant type 1 diabetes are lower than those in patients with type 2 diabetes.	Clin. Biochem.	43	1265-1267	2010

H. Sano, et al.	Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, suppresses pancreatic beta-cell destruction induced by encephalomyocarditis virus.	BBRC	404	756-761	2011
堀川幸男、他	DPP-4 阻害薬の作用機構と臨床成績	Progress in Medicine	30	345-352	2010
堀川幸男、他	ポスト GWAS の新規糖尿病感受性遺伝子同定戦略	医学のあゆみ	232	1201-1206	2010
塩谷真由美、他	DPP-4 阻害薬 Q&A	薬局	61	78-82	2010
堀川幸男、他	SU 薬でコントロール不良患者の治療	日本医事新報	4478	94-95	2010
堀川幸男、他	インスリン抵抗性：第一選択薬は抵抗性改善薬かインクレチンか？	治療	92	611-617	2010
山縣和也	単一遺伝子病タイプの糖尿病遺伝子	医学のあゆみ	232:	1173-1177	2010

### 著書

発表者氏名	論文タイトル名	出版社	ページ	発刊年
堀川幸男、他	インクレチン・エンハンサーとその作用. 日本人の糖尿病における DPP-IV 阻害薬の位置づけ	先端医学社	345-352	2010
山縣和也	転写因子による $\beta$ 細胞機能の調節	メディカルレビュー社	36-37	2010

## 業績集

発表者氏名	論文タイトル名	名称	ページ	発刊年
飯塚勝美、他	グルコース感受性転写因子 ChREBP に注目した 2 型糖尿 病患者の膵β細胞機能 障害（ブドウ糖毒性）の分子 機構の解明	大和証券ヘル ス財団研究業 績集	34:78-83	2010

### **【3】研究成果の刊行物・別刷**



# Cellular Hypoxia of Pancreatic $\beta$ -Cells Due to High Levels of Oxygen Consumption for Insulin Secretion *in Vitro*<sup>\*S</sup>

Received for publication, October 17, 2010, and in revised form, February 1, 2011. Published, JBC Papers in Press, February 4, 2011, DOI 10.1074/jbc.M110.194738

Yoshifumi Sato<sup>#S</sup>, Hiroko Endo<sup>‡</sup>, Hiroaki Okuyama<sup>‡</sup>, Takaaki Takeda<sup>‡</sup>, Hiromi Iwahashi<sup>S</sup>, Akihisa Imagawa<sup>S</sup>, Kazuya Yamagata<sup>¶</sup>, Ichi Shimomura<sup>S</sup>, and Masahiro Inoue<sup>‡1</sup>

From the <sup>‡</sup>Department of Biochemistry, Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases, 1-3-3 Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-8511, the <sup>S</sup>Department of Metabolic Medicine, Graduate School of Medicine, Osaka University, Suita, Osaka, and the <sup>¶</sup>Department of Medical Biochemistry, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University, Kumamoto 860-8556, Japan

Cellular oxygen consumption is a determinant of intracellular oxygen levels. Because of the high demand of mitochondrial respiration during insulin secretion, pancreatic  $\beta$ -cells consume large amounts of oxygen in a short time period. We examined the effect of insulin secretion on cellular oxygen tension *in vitro*. We confirmed that Western blotting of pimonidazole adduct was more sensitive than immunostaining for detection of cellular hypoxia *in vitro* and *in vivo*. The islets of the diabetic mice but not those of normal mice were hypoxic, especially when a high dose of glucose was loaded. In MIN6 cells, a pancreatic  $\beta$ -cell line, pimonidazole adduct formation and stabilization of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) were detected under mildly hypoxic conditions. Inhibition of respiration rescued the cells from becoming hypoxic. Glucose stimulation decreased cellular oxygen levels in parallel with increased insulin secretion and mitochondrial respiration. The cellular hypoxia by glucose stimulation was also observed in the isolated islets from mice. The MIN6 cells overexpressing HIF-1 $\alpha$  were resistant to becoming hypoxic after glucose stimulation. Thus, glucose-stimulated  $\beta$ -cells can become hypoxic by oxygen consumption, especially when the oxygen supply is impaired.

Hypoxia is a common challenge for living organisms that depend on oxygen (1). Although each organism has evolved to adapt to this challenge, hypoxia is closely related to various pathological conditions (2). Cellular oxygen tension is determined by the balance between supply and demand of oxygen. In mammals, oxygen is delivered by the circulatory system and is consumed by the cells, especially by oxidative phosphorylation in mitochondria. Although hypoxia due to poor oxygen supply by factors such as impaired perfusion has been intensively studied, hypoxia as a consequence of an imbalance between oxygen demand and supply has not been well recognized.

Cellular oxygen consumption is one of the determinants of intracellular oxygen levels (3, 4). Hagen *et al.* (3) reported that inhibitors of mitochondrial respiration, such as nitric oxide,

prevent the stabilization of hypoxia-inducible factor (HIF)<sup>2</sup> during hypoxia. HIF-1 $\alpha$  is a transcription factor that regulates gene expression under hypoxic conditions (5). HIF-1 $\alpha$  protein is constitutively synthesized but degraded under normoxic conditions by the ubiquitin/proteasome system, whereas it is stabilized under hypoxic conditions because of the requirement for molecular oxygen in the degradation machinery. Once stabilized, HIF-1 $\alpha$  binds to HIF-1 $\beta$  to form heterodimers and acts as a transcription factor. Thus, expression levels of HIF-1 $\alpha$  are sensitive to intracellular oxygen levels. Inhibition of mitochondrial oxygen consumption increases intracellular oxygen levels, and consequently HIF degradation is maintained even under extracellular hypoxic conditions (3). In addition, Doege *et al.* (4) showed that at an intermediate oxygen concentration (3% O<sub>2</sub>), the formation of pimonidazole adduct can be detected, although pimonidazole is supposed to form adducts with cellular macromolecules only under severely hypoxic conditions (6). The presence of pimonidazole adducts was diminished by inhibition of mitochondrial respiration (4).

Under conditions of high oxygen demand, cells can become hypoxic due to high oxygen consumption (7–9). For example, neurosecretory cells require high mitochondrial activity, mostly due to the requirement of ATP to re-establish the resting membrane potential and to maintain intracellular Ca<sup>2+</sup> equilibrium by ion pumps (7). In working skeletal muscle cells (8), in which increased cellular ATP demand is facilitated by mitochondrial biogenesis, elevated oxygen demand stimulates the expression of a cohort of hypoxia-inducible genes (9).

The insulin secretion from pancreatic  $\beta$ -cells is critical for the homeostasis of systemic glucose metabolism. How glucose triggers insulin release from pancreatic  $\beta$ -cells has been intensively studied (10–12). Glucose is metabolized in the cytoplasm via the glycolytic pathway to pyruvate, which is rapidly degraded in the mitochondrion to produce ATP by oxidative phosphorylation. A rise in the cytoplasmic ATP/ADP ratio triggers the closure of the ATP-sensitive potassium (K<sub>ATP</sub>) channels, which leads to depolarization of the plasma membrane and the opening of voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels. Consequently, Ca<sup>2+</sup> influx into a cell triggers Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis, resulting in insulin release from  $\beta$ -cells. Thus,  $\beta$ -cells require large amounts of oxygen to produce ATP for the insulin

\* This work was supported in part by a grant-in-aid for scientific research from the Japan Society for the Promotion of Science.

<sup>S</sup> The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. 1–6.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed. Fax: 81-6-6973-5691; E-mail: inoue-ma2@mc.pref.osaka.jp.

<sup>2</sup> The abbreviations used are: HIF, hypoxia-inducible factor; CCCP, carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone; KRBH, Krebs-Ringer-bicarbonate HEPES; CA, constitutively active.

secretion process. Insulin secretion and mitochondrial functions are tightly linked because insulin secretion is impaired in patients with mitochondrial DNA mutations as well as in cells in which mitochondrial DNA is artificially removed (13).

We undertook a series of studies to examine the effect of insulin secretion on cellular oxygen tension. Considering the formation of pimonidazole adducts and also the elevated expression levels of HIF-1 $\alpha$  proteins,  $\beta$ -cells can be hypoxic after high glucose loads due to high oxygen consumption under mildly hypoxic or at physiological oxygen tension. Response to the cellular hypoxia might play a role in  $\beta$ -cell function.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Reagents**—Antimycin A, rotenone, carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP), and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma-Aldrich.

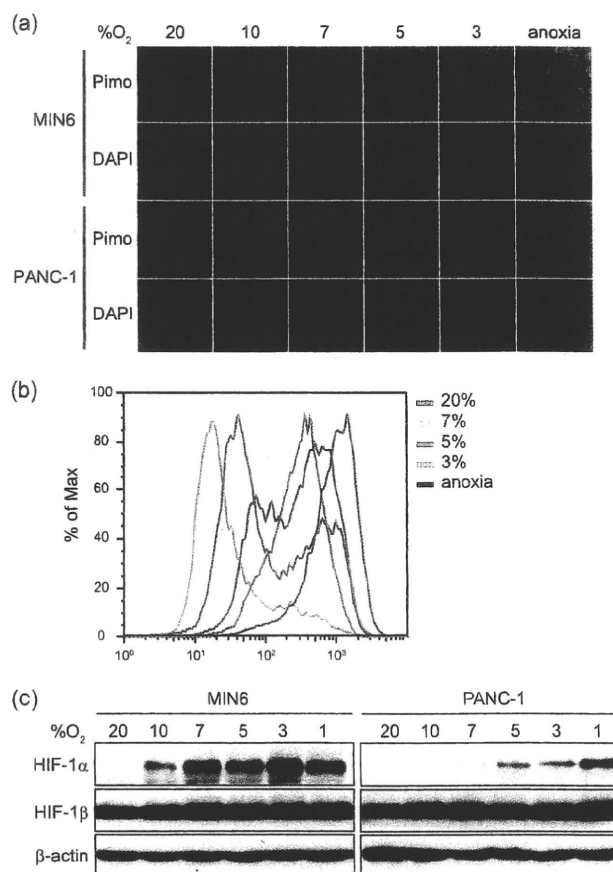
**Cells and Cell Culture**—The mouse insulinoma cell line, MIN6, was a gift from Dr. J. Miyazaki (Osaka University) (14). MIN6 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen) containing 450 mg/dl glucose, 10% fetal bovine serum, penicillin, and streptomycin, 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol at 37  $^{\circ}$ C under 5% CO<sub>2</sub>, 95% air conditions. A human pancreatic cancer cell line, PANC-1, was obtained from ATCC. PANC-1 cells were cultured in DMEM, containing 450 mg/dl glucose, 10% fetal bovine serum, penicillin, and streptomycin. Hypoxic culture was performed in a Multigas incubator (ASTEC, Fukuoka, Japan) or an Invivo<sub>2</sub>400 hypoxia workstation (Ruskin, Leeds, UK). Anoxia (0% O<sub>2</sub>) was achieved by the AnaeroPack system (Mitsubishi Gas Chemical, Tokyo, Japan).

**Measurement of Oxygen Consumption**—MIN6 cells were trypsinized to prepare single cells and preincubated with Krebs-Ringer-bicarbonate HEPES (KRBH) buffer containing 4 mg/dl glucose for 1 h. The cells ( $5 \times 10^6$  cells) and the medium were added to a small closed chamber and incubated at 37  $^{\circ}$ C for 30 min. Oxygen tension was measured using a Clark-type oxygen electrode system (model 203, Instech Laboratories, Plymouth Meeting, PA). After injection of 400 mg/dl glucose, MIN6 cells were incubated for 30 min. The oxygen tension was constantly recorded before and after glucose stimulation. Oxygen consumption was calculated as previously described (15).

**Measurement of Insulin Concentration**—Insulin secretion into the culture medium from MIN6 cells was measured by Mesacup Insulin ELISA (MBL, Nagoya, Japan) according to the manufacturer's protocol. For details, see the supplemental material.

**Immunocytochemistry**—Immunocytochemistry was performed as described previously (16). The details are described in the supplemental material. The fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled Hypoxyprobe-1 monoclonal antibody (mAb1) (NPI, Belmont, MA) was used.

**Flow Cytometric Analysis**—The cells were treated with pimonidazole in the same manner as in the immunocytochemistry assays. The cells were dispersed with trypsin/EDTA for 15 min at 37  $^{\circ}$ C. Cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) once, fixed with 2% formalin overnight, and washed in PBS twice. The cells were permeabilized with 0.5% Triton, 0.5% BSA in PBS for 10 min at room temperature. The cells were



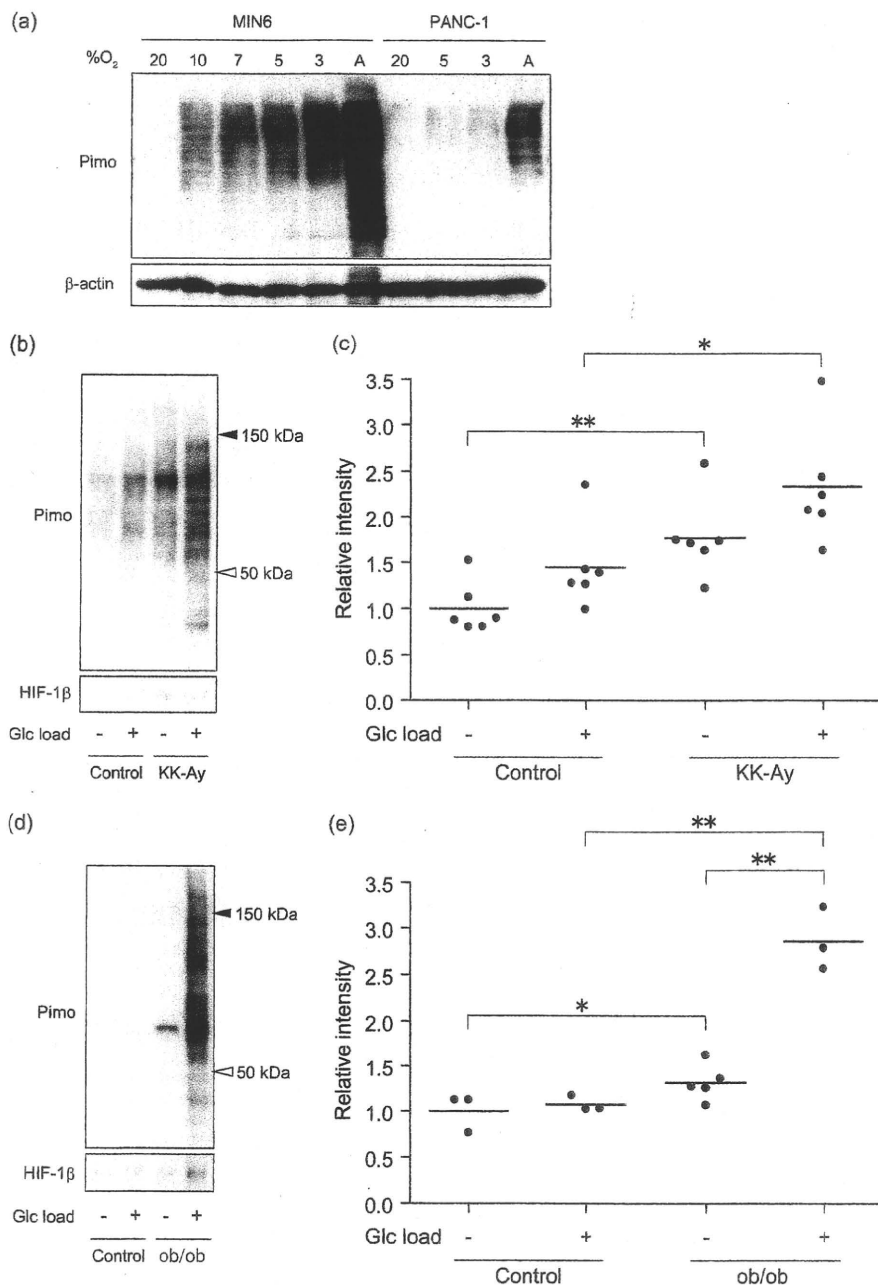
**FIGURE 1. Pimonidazole binding under mildly hypoxic conditions was greater in MIN6 cells than in PANC-1 cells.** *a*, pimonidazole immunocytochemistry of the cells. MIN6 cells and PANC-1 cells were incubated at various oxygen tensions as indicated in the presence of pimonidazole (10  $\mu$ M) for 3 h. *Green*, pimonidazole; *blue*, DAPI. *b*, the MIN6 cells in *a* were subjected to flow cytometric analysis of pimonidazole staining. *c*, MIN6 cells and PANC-1 cells were incubated at various oxygen tensions as indicated for 6 h. The cell lysates were subjected to Western blotting for HIF-1 $\alpha$  and HIF-1 $\beta$ . Blotting of  $\beta$ -actin is shown as a control.

then incubated with the Hypoxyprobe-1 mAb1 (1:1000 in 0.5% BSA in PBS) in the dark for 30 min, washed once, passed through a 40- $\mu$ m filter, and subjected to flow cytometric analysis. Stained cells were analyzed using a FACSCaliber apparatus (BD Biosciences) with FlowJo software (Tomy Digital Biology, Tokyo, Japan). The data were reported as percentage of maximum, which is the number of cells in each bin divided by the number of cells in the bin that contains the largest number of cells.

**Western Blotting Analysis**—Western blotting analysis was done as described previously (17) (see the supplemental material). The primary antibody against HIF-1 $\alpha$  (NB100-105, NB100-479) was purchased from Novus Biologicals (Littleton, CO), HIF-1 $\alpha$  (clone 54) from BD,  $\beta$ -actin (A5060) from Sigma, HIF-1 $\beta$  (clone 29) from BD Biosciences, and pimonidazole (Hypoxyprobe-1 Mab1) from NPI (Belmont, MA).

**Plasmids**—The construction of pMX-HIF-1 $\alpha$  CA5 is described in the supplemental material. Retroviral transfection was carried out as described previously (18). After selection with puromycin for 1 week, the cells were subjected to further experiments.

## Cellular Hypoxia by Insulin Secretion



**FIGURE 2. Western blotting was useful for detecting pimonidazole adduct *in vitro* and *in vivo*.** *a*, cell lysates from the cells in Fig. 1*a* were subjected to Western blotting, and pimonidazole-adducted proteins were detected in MIN6 cells and in PANC-1 cells. Blotting of  $\beta$ -actin is shown as a control. *A*, anoxia. *b* and *d*, Western blotting of pimonidazole adducts (*Pimo*) in the pancreatic islets of KK-Ay mice, 13 weeks of age (*b*), and ob/ob mice, 12 weeks of age (*d*), compared with age-matched C57BL/6 mice (*Control*) injected with saline (*Glc load* -) or 2 g/kg glucose (*Glc load* +), respectively. Blotting of HIF-1 $\beta$  is shown as a loading control. Representative results are shown. *c* and *e*, relative intensity of pimonidazole in KK-Ay mice (*n* = 6) (*c*) and ob/ob mice (*n* = 3–5) (*e*), compared with control mice under the same conditions as in *b* and *d*. Each value from a pool of the islets of a mouse is plotted as a dot, and the mean of values is shown as a bar (\*, *p* < 0.05; \*\*, *p* < 0.01).

**Animal Studies**—The animal studies were approved by the animal care committee of Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases. C57BL/6J mice and leptin-deficient (ob/ob) male mice were purchased from Charles River Laboratories Japan Inc. (Yokohama, Japan). KK-Ay female mice were from Japan CREA (Tokyo, Japan). Mice were maintained on a 12-h light/12-h dark cycle with free access to water and normal chow and housed in specific pathogen-free barrier facil-

ities. To detect tissue hypoxia, pimonidazole (60 mg/kg body weight) was intraperitoneally injected to the mice fed *ad libitum*. At the same time, glucose (2 g/kg body weight) or saline was intraperitoneally injected into both control and diabetic mice. After 2 h, the islets were isolated as described below, lysed, and subjected to further analysis. Pimonidazole adduct formation was evaluated by Western blotting. The image of the Western blotting film was captured by an image scanner,

GT-9300UF (EPSON, Tokyo, Japan), and the intensity of the bands from 50 to 150 kDa was measured using Photoshop (Adobe Systems Inc., San Jose, CA). The pimonidazole/HIF-1 $\beta$  ratio was calculated to standardize the protein loading. The lysate of the MIN6 cells cultured at 15% oxygen tension for 3 h was included in each experiment and used as an internal control for standardization.

**Pancreatic Islet Isolation Studies**—Pancreatic islets of Langerhans were isolated by collagenase digestion as described previously (19). The isolated islets were cultured overnight in RPMI1640 (Invitrogen) medium containing 200 mg/dl glucose, 10% fetal bovine serum, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, penicillin, and streptomycin, at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub>, 95% air. All islets were preincubated in KRBH buffer containing 40 mg/dl glucose for 30 min and divided into two groups. One group was maintained in KRBH buffer containing 40 mg/dl glucose and pimonidazole (10  $\mu$ M) for 2 h, and the other was stimulated in KRBH buffer containing 400 mg/dl glucose and pimonidazole for 2 h. For immunocytochemistry, islets were embedded in collagen gel using Cell Matrix Type 1A (Nitta Gelatin, Osaka, Japan) and fixed with formalin for paraffin sections. The isolated islets were divided into three groups by their diameters: small (<50  $\mu$ m), intermediate (50–100  $\mu$ m), and large (>100  $\mu$ m). The pimonidazole staining patterns were divided into three groups: positive staining, where islets were stained overall by pimonidazole; central staining, where the central region, occupying less than 50% of total area, was stained by pimonidazole; and negative staining, where no pimonidazole staining was observed. These samples were also subjected to Western blotting.

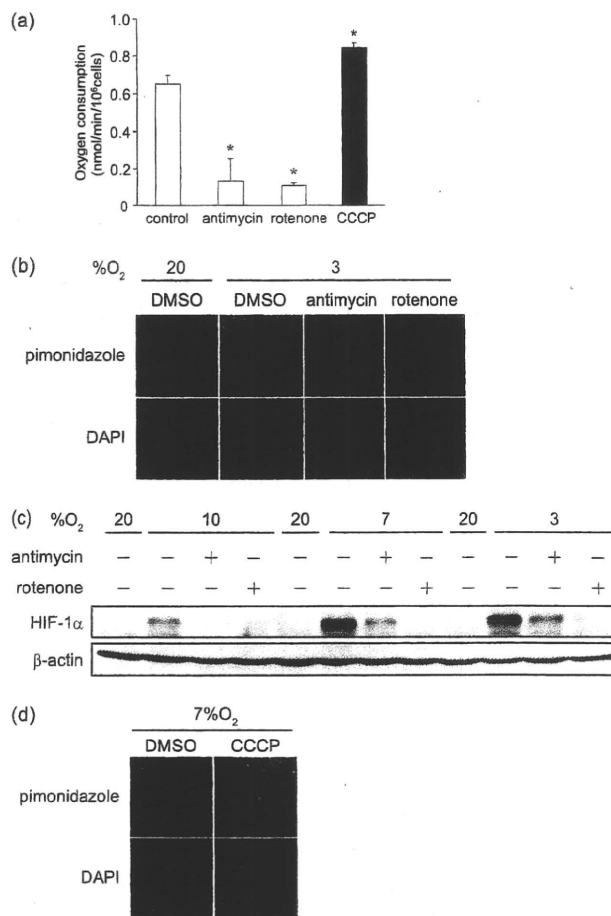
**Statistical Analysis**—Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, La Jolla, CA). The statistical significance of the results was tested with the unpaired *t* test. A value of *p* < 0.05 was considered to be statistically significant.

## RESULTS

**Pimonidazole Adduct Was Detected under Mildly Hypoxic Conditions in MIN6 Cells**—Because it is difficult to measure accurate oxygen tension inside a living cell with current technology, we estimated oxygen tension within a cell by pimonidazole staining, which has been widely used to detect cellular and tissue hypoxia (4, 20). Although pimonidazole forms adducts with intracellular biomolecules only in severe hypoxia, it can also detect the decrease of cellular oxygen tension when the cells were cultured under moderately hypoxic conditions (4).

Because pancreatic islet and  $\beta$ -cell lines are known to consume substantial amounts of oxygen when the cells secrete insulin in response to glucose stimulation (21–23), the cultured  $\beta$ -cell line would also show severe cellular hypoxia under moderately hypoxic culture conditions upon the secretion of insulin.

We examined the pimonidazole staining pattern in MIN6 cells in comparison with non-endocrine cancer cells, PANC-1, by immunocytochemistry (Fig. 1*a*). We detected pimonidazole staining in PANC-1 cells only under anoxic conditions but not at 3% oxygen tension. In striking contrast, MIN6 cells showed positive pimonidazole staining even at 7% oxygen tension.



**FIGURE 3. Mitochondrial oxygen consumption contributed to cellular hypoxia in MIN6 cells.** *a*, the effect of respiratory inhibitors and an uncoupler on oxygen consumption of MIN6 cells. The cells were incubated with the indicated reagents (antimycin A (10 nM), rotenone (100 nM), and CCCP (5  $\mu$ M)) for 30 min. Oxygen consumption of the cells were measured, and the means  $\pm$  S.D. of values from each group are shown (\*, *p* < 0.001). The experiments were repeated at least three times. *b*, immunocytochemistry of pimonidazole staining (green) of MIN6 cells treated with antimycin A, rotenone, and DMSO as a control for 3 h at 20 or 3% oxygen tension. The cell nuclei were stained with DAPI (blue). *c*, the effect of respiratory inhibitors on HIF-1 $\alpha$  protein levels. Western blotting of HIF-1 $\alpha$  in the MIN6 cells cultured under the indicated conditions for 6 h is shown. *d*, immunocytochemistry of pimonidazole staining (green) of MIN6 cells treated with CCCP or with DMSO as a control for 3 h at 7% oxygen tension. The cell nuclei were stained with DAPI (blue).

Intensity of the staining was higher in MIN6 cells than in PANC-1 cells at each oxygen tension examined below 7%. Furthermore, pimonidazole staining was examined by flow cytometry (Fig. 1*b*). Consistent with the observations by immunocytochemistry, the fluorescence was inversely correlated with the oxygen tension. The shift of the peak was observed at 7% oxygen tension in MIN6 cells.

We next examined the protein levels of HIF-1 $\alpha$  (Fig. 1*c*). In several cell lines, HIF-1 $\alpha$  levels were stabilized at oxygen tensions below 5% (24, 25). Indeed, in PANC-1 cells, HIF-1 $\alpha$  was detected at oxygen tensions below 5% but only weakly in cells exposed to 7% oxygen tension (Fig. 1*c*). In striking contrast, in MIN6 cells, HIF-1 $\alpha$  was detected even at 10% oxygen tension, whereas no change was observed in HIF-1 $\beta$  levels (Fig. 1*c*). The increased mRNA levels of HIF-1 $\alpha$  target genes, including