

図 現在までに同定されている HNF-1α 遺伝子異常

チャンネルの活性制御に関与していることが判明している。

HNF-1β は MODY5 の原因遺伝子として同定された転写因子である<sup>4)</sup>。構造上は HNF-1α と類似しているが、発現パターンは HNF-1α と異なり膵の導管に選択的に発現している。発生早期において HNF-1β は膵前駆細胞に発現しているが、ngn3 陽性の膵内分泌前駆細胞における発現は消失し、導管に限定した発現を示すようになる。HNF-1β のノックアウトマウスでは膵の形成不全が起こり、MODY5 患者においてもしばしば膵の萎縮など形成異常が認められる。

IPF-1/PDX-1 はインスリンやソマトスタチン遺伝子の転写因子として同定されたが、ノックアウトマウスでは膵の形成が認められないことから、膵の分化・発生に必須の分子であると考えられる。ヒトにおいても IPF-1 遺伝子のホモ変異 (P63fsdelC) で同様の膵の無形成が起こる。ヘテロ遺伝子変異により MODY (MODY4) が発症するが、その発症平均年齢は MODY3 に比してやや高く、臨床像は比較的軽度であるとされる。

TCF7L2 は WNT シグナルに属する膵β細胞発現転写因子である。TCF7L2 遺伝子の第3イントロンに存在する rs7903146 多型は、日本人を含めほぼすべての人種において2型糖尿病と相関を示す。2型糖尿病患者では膵β細胞における TCF7L2 の発現が亢進していること、TCF7L2 を膵β細胞に過剰発現させるとインスリン分泌が低下することなどが報告されている<sup>5)</sup>。

**現在のトピックス・今後の展望**

本稿で述べた転写因子は、インスリン分泌や膵の分化・発生に関与している。これら転写因子がどのような遺伝子の発現を制御することによってその機能を発揮しているのか、ノックアウトマウスなどを用いた検討が進んでいる。またこれら転写因子の膵β細胞における発現制御機構については不明な点が多く、今後の課題である。HNF-4α や TCF7L2 は一般の2型糖尿病の発症にも関与していることから、その詳細な機能を明らかにすることで、インスリン分泌不全の新たな治療戦略が開発されることが期待される。

**References**

- 1) Yamagata K et al : Nature 384 : 455-458, 1996
- 2) Triggs-Raine BL et al : Proc Natl Acad Sci U S A 99 : 4614-4619, 2002
- 3) Yamagata K et al : Nature 384 : 458-460, 1996
- 4) Horikawa Y et al : Nat Genet 17 : 384-385, 1997
- 5) Lyssenko V et al : J Clin Invest 117 : 2155-2163, 2007

**関連事項**

インスリン分泌における K <sub>ATP</sub> チャンネルの役割	46 頁
2 型糖尿病遺伝子	122 頁
MODY	144 頁

大和証券ヘルス財団の助成による…

# 研究業績集

第34集

財団  
法人 大和証券ヘルス財団

# 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

岐阜大学医学部附属病院 生体支援センター  
講師 飯塚 勝美

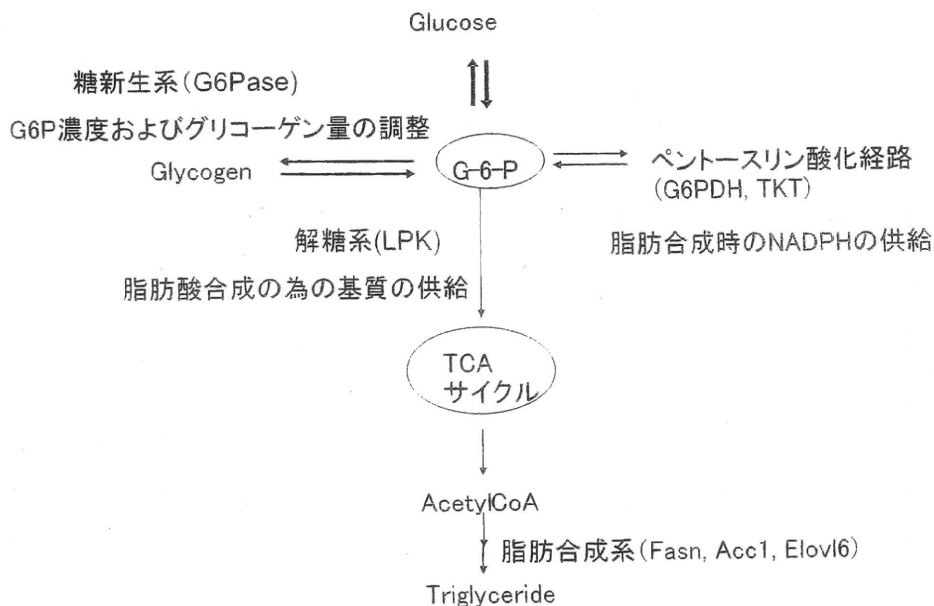
(共同研究者)

岐阜大学大学院医学系研究科 内分泌代謝病態学 准教授 堀川 幸男  
岐阜大学大学院医学系研究科 内分泌代謝病態学 教授 武田 純

## 緒言

現代社会においては、過剰な糖質や脂質の摂取がメタボリックシンドロームを引き起こし、重大な社会問題となっている。過剰な糖質が摂取された場合、肝臓では貯蔵効率の悪いグリコーゲンでなく効率の良い中性脂肪として貯蔵する。その際に中心的な働きをする転写因子としてインスリンにより活性化される SREBP1c とグルコースにより活性化される Carbohydrate Response Element Binding Protein (ChREBP) が知られている。我々はこれまでメタボリックシンドロームにおける ChREBP の役割について明らかにしてきた。ChREBP は脂肪合成に直接関与する解糖系や脂肪合成系遺伝子のみならずエネルギー代謝調節に関与する分泌蛋白や時計関連遺伝子の発現をつかさどることを明らかにした (図 1)。さらに、ChREBP の機能抑制により遺伝性肥満モデルマウスである ob/ob マウスで見られる耐糖能障害、肥満、脂肪肝などの代謝異常が改善することを明らかにした。したがって肝臓での ChREBP の機能抑制は糖尿病の改善効果があることは証明されたが、他の臓器における役割は不明のままであった。

図1 ChREBPの標的遺伝子と機能



そのほか、時計遺伝子、血糖降下ホルモンなどがある。

他方、日本人2型糖尿病の特徴の一つとして、インスリン分泌の相対的な低下すなわち膵β細胞の機能不全が挙げられる。膵β細胞の機能不全を引き起こす主要な要因の一つは高血糖状態であることから、グルコース刺激により活性化されるグルコース感受性転写因子 Carbohydrate Response Element Binding Protein (ChREBP) の膵β細胞における役割に注目する。本研究ではChREBPとグルコースによる膵β細胞機能不全(ブドウ糖毒性)との関連を明らかにし、ChREBPの機能抑制が糖尿病状態における膵β細胞の機能保持に寄与するかを培養細胞および糖尿病モデル動物を用いて明らかにする。

### 方法と結果

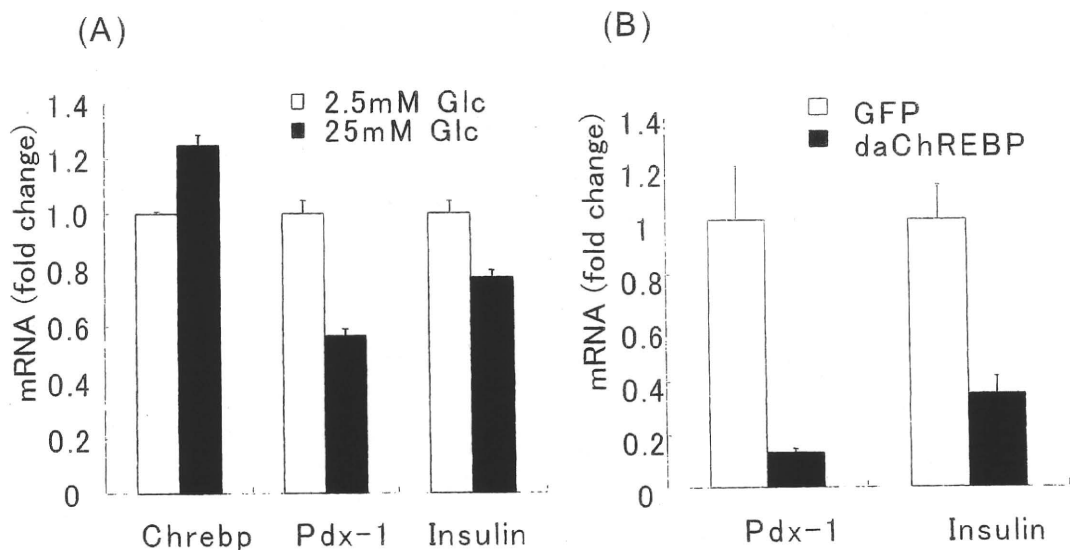
インスリン分泌におけるグルコース応答性の保持されているラットインスリノーマINS-1E細胞を用いて、以下の解析をおこなった。

1) グルコースおよびChREBP過剰発現アデノウイルスの感染によるPDX-1遺伝子発現への効果。

INS-1細胞において、グルコース刺激およびアデノウイルスを用いた恒常活性型ChREBPの過剰発現により、ChREBPの標的遺伝子群は発現誘導が見られ、逆にinsulin

遺伝子やPdx-1 遺伝子は発現抑制が見られた(図2Aおよび2B)。次に、Pdx-1はinsulin 遺伝子の発現に加えて膵β細胞の分化に関わる遺伝子の発現を制御することから、Pdx-1 発現へのChREBP の関与を検討した。Pdx-1 遺伝子に関しては、上流-4kbp のプロモーターのdeletion study ではChREBP の過剰発現では変化が見られなかったため、ChREBP による直接的な発現調節をうけないと考えられた。

図2 グルコース刺激と恒常活性型ChREBP 過剰発現(正常の7倍)によるPdx-1およびinsulin遺伝子発現変化



2) グルコースおよび ChREBP 過剰発現アデノウイルスの感染による Thioredoxin interacting protein(Txnip) 遺伝子発現への効果。

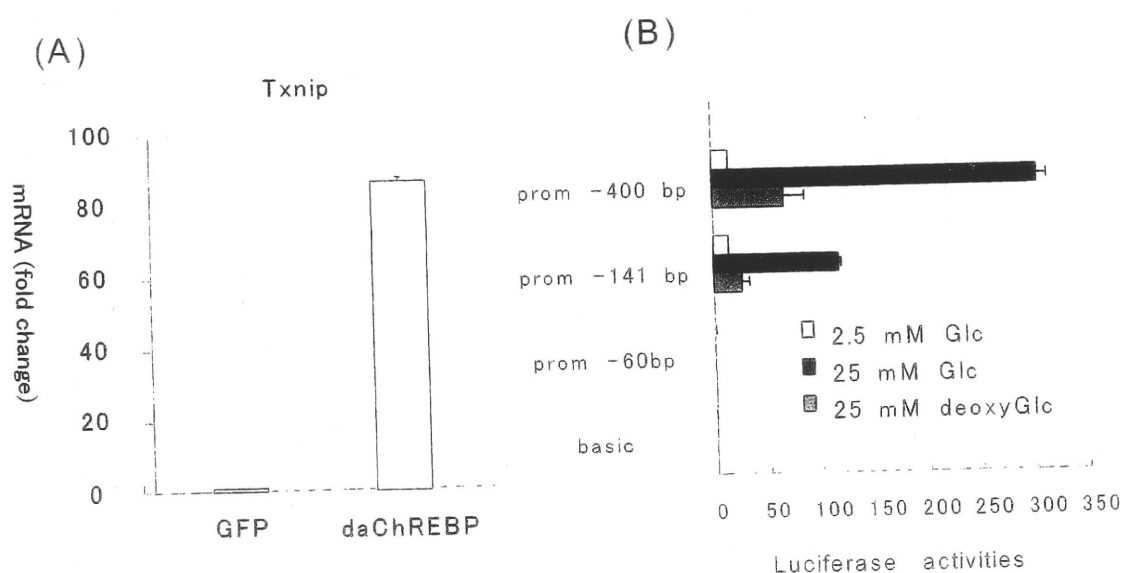
β細胞におけるChREBP活性化メカニズムは、ペントースサイクルはβ細胞ではあまり使われてないため、肝臓で見られるChREBP活性化機構とは異なる可能性がある。

Txnipは膵β細胞におけるブドウ糖毒性において重要な役割をされると考えられているため、同遺伝子に注目してChREBP活性化機構について検討した。

Txnipはグルコースおよび恒常活性型ChREBPの過剰発現により誘導される。さらにChREBPの転写活性を阻害するdominant negative Mixを過剰発現し、グルコースによるTxnipの誘導を調べたところ、他のChREBP標的遺伝子の発現が抑制されたあともTxnip遺伝子の発現は部分的にしか抑制されなかった。グルコースによるTxnip遺伝子発現機構にChREBPを介さない経路が存在すると考え、2-デオキシグルコースによ

る ChREBP 活性化の可能性を検証した。2-デオキシグルコースは、グルコース-6-リン酸レベルまでしか代謝されず、解糖系代謝産物や ATP の増加にいたらないグルコールアナログ(結果としてグルコース-6-リン酸の ChREBP 転写活性化への寄与をみる)である。他の ChREBP 標的遺伝子と異なり、Txnip は 2-デオキシグルコースにより誘導された。次に、グルコースや 2-デオキシグルコースによる ChREBP の Txnip 遺伝子プロモーター内 ChREBP 結合部位 (ChoRE) に対する結合能を調べたところ、グルコース刺激では ChREBP の ChoRE への結合能が増加するのに対して、2-デオキシグルコース刺激では逆に ChREBP の ChoRE への結合は阻害された。この現象に一致して、Txnip 遺伝子の ChoRE を 3 つタンデムに並べたエレメントを含む pGL3 プロモーターベクターを用いたレポーターアッセイでもグルコースに対する反応は見られたものの、2-デオキシグルコースに対する反応は見られなかった。したがって、グルコースによる Txnip 遺伝子誘導効果は、ChREBP 依存性、非依存性の 2 つの経路があることが明らかになった。

図 3 TXNIP はグルコースおよび 2-デオキシグルコースにより活性化される。

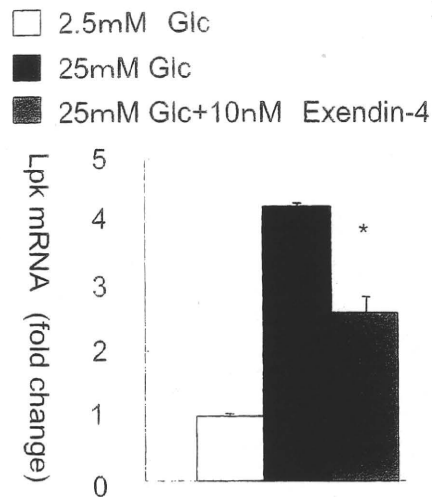


### 3) cAMP および GLP-1 による ChREBP 転写活性抑制効果の検証

cAMP は ChREBP の転写活性を抑制することが既に知られている。INS-1E 細胞でも同様のメカニズムが成立することを確認するために、1mM dibutyril-cAMP 存在下で ChREBP の転写活性を測定した。INS-1 細胞でも同様の抑制が確認された。次に新規糖尿病治

療薬であるインクレチン (GLP-1) による ChREBP 転写活性抑制効果を調べたところ、弱いながらもグルコースによる Txnip 遺伝子の発現誘導が抑制された(図4)。

図4 GLP-1によるグルコース誘導性LPK遺伝子抑制効果



### 考察

膵β細胞においても肝臓同様に、グルコースにより ChREBP は活性化され、ChREBP の抑制は膵β細胞のブドウ糖毒性からの解除に有用と考えられた。しかしながら、グルコースによる Pdx-1 やインスリン遺伝子の発現低下さらに高グルコース刺激によるアポトーシスの発症に関与するとされる Txnip 遺伝子の発現には、部分的に関与し、ChREBP 非依存性の経路が存在することが示された。これはとりもなおさず、ChREBP の機能抑制だけでなく高血糖状態の是正が膵β細胞のブドウ糖毒性の解除に重要であると思われる。幸いなことに全身での ChREBP の抑制でも血糖が改善することから、今回一例として示したGLP-1はChREBPの機能抑制を介した有望な糖尿病治療薬といえる。

### 要約

ChREBP は肝臓において脂肪合成系酵素の発現を調節する転写因子である。膵β細胞においても ChREBP は発現し、グルコースによる遺伝子発現を制御する。ChREBP は膵β細胞の主要遺伝子であるインスリンおよび Pdx-1 の発現を間接的に抑制し、ブドウ糖毒性に関与する Txnip 遺伝子を部分的に調節する。したがって、ChREBP に加えて高血

糖解除が重要である。最後に新規糖尿病薬である GLP-1 は ChREBP の機能を抑制することから、ChREBP も GLP-1 による治療標的のひとつであることが示唆された。

### 謝辞

本研究を遂行するに当たり研究助成を賜りました財団法人和証券ヘルス財団に深謝いたします。

### 文献

- 1) Iizuka K, Horikawa Y. ChREBP: a glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome. *Endocr J*: 55(4):617-624, 2008.
- 2) Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD, Uyeda K. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:7281-7286, 2004.
- 3) Iizuka K, Miller B, Uyeda K. Deficiency of carbohydrate-activated transcription factor ChREBP prevents obesity and improves plasma glucose control in leptin-deficient (ob/ob) mice *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 291:E358-364, 2006.
- 4) Iizuka K, Horikawa Y. Regulation of lipogenesis via BHLHB2/DEC1 and ChREBP feedback looping. *Biochem Biophys Res Commun*. 374:95-100, 2008.
- 5) Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol*. 11:136-140, 2010.



## HNF1B 条件表

プライマー	配列	アニーリング	延長	サイクル	酵素	DMSO	機械
HNF1B-PF	CCC TTC CTA AGT GGT CAG TT	60	1分30	35	LAQ	×	9700
HNF1B-e1-R4	GAC TTC TCT GGT GGG AAA CG						
HNF1B-PseqF	CTG GGC CAC CAC CTG CGT CG						
HNF1B-PseqF2	TTG CAT CCA GGC GAA AGC TG						
HNF1B-e1-F4	TTT TCC GTC CTT GGA AAA TG						
HNF1B-e2-F2	GCA TAG AOC ATA GGT AGC AC	64	40	35	ExTaq	×	9700
HNF1B-e2-R	GAG AGG GCA AAG GTC ACT TCA G						
HNF1B-e2-F	CTC CCA CTA GTA CCC TAA CC						
HNF1B-e2seqR	TTG AGG CAG AGG CAG GAT GA						
HNF1B-e3-F2	AGC TGG CTA TGT TTG AGC TC	64	40	35	ExTaq	×	9700
HNF1B-e3-R	TTC CTG GGT CTG TGT ACT TGC						
HNF1B-e3-R2	CAGAGTATCTTCCTGGAAG						
HNF1B-e3seqF	GCT TTG CTG GAG CAA CTG AG						
HNF1B-e4-F	TGT GTT TTG GGC CAA GCA CCA	64	40	35	ExTaq	×	9700
HNF1B-e4-R	AAC CAG ATA AGA TCC GTG GC						
HNF1B-e5-F	TGC CGA GTC ATT GTT CCA GG	60	40	35	ExTaq	×	9700
HNF1B-e5-R	CCG CTT ATC TTA TCA GGT CCA G						
HNF1B-e6-F	CTG CTC TTT GTG GTC CAA GTC C	60	40	35	ExTaq	×	9700
HNF1B-e6-R	GAG TTT GAA GGA GAC CTA CAG						
HNF1B-e7-F2	ACA CTT GCC TCC CAT GGA AT	64	40	35	ExTaq	×	9700
HNF1B-e7-R	ACT TCC GAG AAA GTT CAG ACC						
HNF1B-e8-F2	CAA GCA TCC ACA TGC TTT CG	64	40	35	ExTaq	×	9700
HNF1B-e8-R	GGC GAG TCC ATG CTT GCC AG						
HNF1B-e8seqF	ACT TGG AAT TTA CAT GAA TC						
HNF1B-e9-F2	TGT GCC TCA GCA TGA AAA CT	60	40	35	ExTaq	×	9700
HNF1B-e9-R2	CAG TGT GTT TGG CTC AGT TCA						
HNF1B-e9seqF	CTC CAC CTG CTG CTC TTT GC						
HNF1B-e9-F3	GGC GTA CTG TCT ATG TTG TG	64	40	35	ExTaq	×	9700
HNF1B-e9-R3	GCA GGG AAA GTA TCA GAG AC						

## IPF1 条件表

プライマー	配列	アニーリング	延長	サイクル	酵素	DMSO	機械
IPF1-P-F2	GAA TGC CAG AGT TTC GTG TG ACT GGA CTA GAG AAG CAC TG	64	1:20	35	KOD	×	9700
IPF1-e1-R3							
IPF1-P-seqF	CIT CTG ACC TAG AGA GCT GG						
IPF1-E1-F3	CTA ATG TTT TCG TGA GCG CC	64	1:00	35	KOD	×	9700
IPF1-e1-R3	ACT GGA CTA GAG AAG CAC TG						
IPF1-E1seqF1	ACC GCC AGC TGC CCG TTC AG GAG ATC AGT GCG GAG CTG TC						
IPF1-E1seqF2							
IPF1-e2F	TTGGCAGAGCCCAAGCTTAGG	65	1:00	35	ExTaq	×	9700
IPF1-e2R	CAACGCCAATCCAGTATCAC						
IPF1-e2seqF	CTACACTAGGCGCTGAAATG						

# HNF1A 条件表

プライマー	配列	アニーリング タッチダウン(60→55)	延長	サイクル	酵素	DMSO	機械
HNF1A-proF3	cctgcattctctctctata				ExTaq	×	9700
HNF1A-proR3	tagcgaagggaactgaacttt				ExTaq		
HNF1A-Pseq1	atctctgtaactgctctacacag				ExTaq	×	9700
HNF1A-proF4	gcagcaaggcattttggctc	66	30	30	ExTaq	×	9700
HNF1A-proR4	ccggcagacacaacaaccaaac						
HNF1A-proF2	agcattgattcccctctacaagggt				ExTaq	×	9700
HNF1A-P-U3	CCC CAG CTC CAA TGT AAA CAG	タッチダウン(65→60)					
HNF1A-e1-L	TGT CCC CCT TCC CAG CAA CTA						
HNF1A-Pseq2	GAT TCA CCG GCC GGT GGG GC						
HNF1A-Pseq3	GCC ATG GTT TCT AAA CTG AG						
HNF1A-e2-F2	CAT GAC CAT GTG TCT GTG TC	60	30	30	ExTaq	×	9700
HNF1A-e2-R2	ATG CAG GTT CAA TCC CAC TG						
HNF1A-e2seqF	GTT GAG AAG GTT CCA GCA CC						
HNF1A-e3-F2	GTT GGT AGG AAA GCA TTC AG	66	25	30	mix	×	9800
HNF1A-e3-R2	CCA GGC TAA GCC AAT ATC AG						
HNF1A-e4-F2	GAC TGT CAA TTG CCC AAG GT	60	30	30	ExTaq	×	9700
HNF1A-e4-R2	GGG TTA ATT GTG GTG GAT GG						
HNF1A-e5-U2	CTT CAA GGA ACT GGG AGC AG	60	30	30	ExTaq	×	9700
HNF1A-e5-L2	ACC AGC TTA CCG ATG ACC AG						
HNF1A-e5seqF	AAG GCA GAT TTG CTG GCT GC						
HNF1A-e6-U3	GCT GGT GAG TGT CCT TGC TTG	60	30	30	ExTaq	×	9700
HNF1A-e6-L3	TGA GTT GCT GAG ATT TTG GTG						
HNF1A-e6seqF	GAT TCT GGA GCA GTC CCT AG						
HNF1A-e7-U4	TTT GAA CAA GTC ACC GCC TG	60	30	30	ExTaq	×	9700
HNF1A-e7-L4	GAC ACA TGC AGA CTG CAA TG						
HNF1A-e7seqF	AAC CAC GGG CTG TGG GAA GG						
HNF1A-e8-U2	TGT AAT GGG GAG AGGATC TG	60	30	30	ExTaq	×	9700
HNF1A-e8-L2	CTG GAG GCC TCA GTG TCT G						
HNF1A-e8seqF	ATC AGC CCT GGA TCT CCA AC						
HNF1A-e89-U	TGC GGC CAG CCCTCT ACA G	66	30	30	ExTaq あり(0.5)		9700
HNF1A-e89-L	CGG ACA GCA ACA GAA GGG GTG						
HNF1A-e10-U	GAC TTT GGG GTTCTT GTT ATC	60	30	30	ExTaq	×	9700
HNF1A-e10-L	AAG ACT GTA TCC CAC GAA GCA						
HNF1A-e10seqF	CTG TGA TCC AGG AGG TGT GG						

# GCK 条件表

プライマー	配列	アニーリング タッチダウン(65→60)	延長	サイクル	酵素	DMSO	機械
GCK-e1a-F2	CAT GGC AGC TCT AAT GAC AG				Extaq	X	9700
GCK-e1a-R	CCT TCT CAA AGA GGC TGT GC						
GCK-e1a-seqF2	CTA ATG ACA GGA TGG TCA GC						
GCK-e1a-seqR	GGC TGT GCA TAA AAT CAG AT						
GCK-e1b-F	GGC AGC AAT CCC TAC CCC AT	60	35	30	Extaq	X	9700
GCK-e1b-R	GTG CCC CAA GGC TGC TGG CC						
GCK-e1c-F	GGC TTC TGG AGG TGG GGT CA	66	35	30	Extaq	X	9700
GCK-e1c-R	GTG GAA GCA GGG CGT CAG GC						
GCK-e1c-seqF	CTG TCT CTG TAC TGA TGG CT						
GCK-e2F3	TGG TAC CAG ACT CTG CTC TT	タッチダウン(65→60)			Extaq	X	9700
GCK-e2R3	CAA GTC GAG GAC TTC ATT GC						
GCK2-U2	GGG GGT CAG AAG ACA GAA GG						
GCK-e3-F	CCC CTT CCA CAG TTG ACA CT	60	35	30	Extaq	X	9700
GCK-e3-R	CCG GGT CAG ATT TCT GTT CT						
GCK-e4-F	CGG AAG AGG AGA GGG AAA CT	60	35	30	Extaq	X	9700
GCK-e4-R	GTG GGG TGA TCA TAG CTG GT						
GCK-e56F3	CAG AGC TGT GCA GTA CAA CA	64	35	30	Extaq	X	9700
GCK-e56R3	TAC ACG GTG CTT CCA TCT TG						
GCK-e56-F	CAA GGA GAA TGG TTC CCA AA						
GCK-e7-F	AGG TAA CAG GCA GGG AAG GT	60	35	30	Extaq	X	9700
GCK-e7-R	GCA GGT CAT GAC TGA GCA GA						
GCK-e7seqF	TGT CCC TGG CCA CTG AAG CA						
GCK-8-U	CGT GAC CTC AGT GGG GAG	タッチダウン(65→60)	35		Extaq	あり(0.5)	9700
GCK-8-L	AGA CCA AGT CTG CAG TGC C						
GCK-8seqF	CAG TGG GGA GCA GTG GGG CC						
GCK-e9-F3	AAG GCG CGG CAT GGT TGA CA	55	35	35	Extaq	あり(0.5)	9700
GCK-e9-R3	GGA CTA CGA AAT CTT GGA GC						
GCK-e9F	CCT CCC TGG AGA ACG AGA G						
GCK-e10-F3	CTC CAA GGT TCC TTG CGG TT	60	35	30	Extaq	X	9700
GCK-e10-R3	CCA CAG TCC TAA TGG ACA GA						
GCK-e10seqF	TTC GTA GTG CTC TTC TOG TC						

## HNF4A 条件表

プライマー	配列	アニーリング	延長	サイクル	酵素	DMSO	機械
HNF4A-P2-F3	TGT ACT AGC AGT GAG ACT CC	60	1:20	30	ExTaq	X	9700
HNF4A-P2-R3	TAA TGC ACC AGC AAC GTG AC						
HNF4A-P2-F2	CCC ACT ACT TGC TGC ATG GT						
HNF4A-e1a-F3	CAA GGT CCC AGT TAG TAG AC	65	1:20	30	KOD	X	9700
HNF4A-e1a-R2	TTC ACT TGG CAA CAC CTG TG						
HNF4A-e1aF2	TCC AGA AGA TTG GCA TCT GG						
HNF4A-e2-3F	GTC TGT GAA GTC ACA ACC AG	60	1:10	30	KOD	X	9700
HNF4A-e2-3R	CCA AGA GTG GGA GCT TAT CT						
HNF4A-e4-F2	GCT GAT GGG TGG ATC ACT CT	60	1:00	30	ExTaq	X	9700
HNF4A-e5-R	CAT AGG TGA GGA GAT TGG GG						
HNF4A-e4seqF	TCA TTC CAC ATG CTG ATG TG				ExTaq	X	9700
HNF4A-e5seqF	ACC CTG AGC TTC CTT CAG AG						
HNF4A-e6-7F	AGT TCA AGG ACA GAG TCA GC	タッチダウン			ExTaq	X	9700
HNF4A-e6R2	CTT GCA TTR GAG GGC TCC AG						
HNF4A-e6F2	TTC TTT CCC CTT CCA GGT TT						
HNF4A-e7F	CAG TTC CAG AAT CTG GTC CT	60	35	30	ExTaq	X	9700
HNF4A-e6-7R2	TAG CCA GGC TCA TCT TGA AC						
HNF4A-e7seqF	TGC CTA TCA GGT GAC CTT TG						
HNF4A-e8-F2	GCT AGG TGC TTA TTG GAT GC	60	1:20	30	ExTaq	X	9700
HNF4A-e8-R2	GCA CAA GAG TCA CCA CTT CA						
HNF4A-e9-F	GGT TTT TTG GGG TCC TCT TA	60	35	30	ExTaq	X	9700
HNF4A-e9-R	CTT TCT CCT GCC TCC TGT C						
HNF4A-e10-F2	GCA GTC CAA GTC TGC ATA TC	60	1:20	30	ExTaq	X	9700
HNF4A-e10-R2	GTC CAA GGC AGT AGA GGT CT						

