

Kcnq1 遺伝子領域が膵β細胞に及ぼす影響の解析

神戸大学大学院 保健学研究科 病態解析学領域 分析医科学分野
木戸 良明

1. はじめに

2型糖尿病発症には膵β細胞からのインスリン分泌不全と各臓器におけるインスリン抵抗性が主要な2つの要因として知られている。特に日本を中心とした東アジア諸国の2型糖尿病患者では、肥満が少なく糖尿病発症早期からインスリン分泌量が低下していると言われており、2型糖尿病発症に膵β細胞不全が強く関わっていることが明らかとなってきた。

近年、日本人2型糖尿病患者のSNP解析の結果、第11番染色体のKcnq1遺伝子のSNPが有意な危険因子であることが報告された(1, 2)。Kcnq1は電位依存性K⁺チャネルとして心筋や腎尿細管・消化管・膵β細胞に発現し、細胞膜の再分極や水・塩類の輸送に関わっている。このKcnq1は代表的なimprinting遺伝子としても知られており、Kcnq1遺伝子領域内から発現するnon coding antisense RNA であるKcnqlot1によって制御されている。父親から受け継いだ遺伝子からのみ発現するKcnqlot1はヒストン修飾やDNAメチル化を介して、同一領域のKcnq1とその周辺遺伝子の発現を抑制している。Kcnqlot1によって制御されるKcnq1の周辺遺伝子には計8種の遺伝子が存在しており、このうち細胞周期調節因子であるp57kip2や塩類のトランスポーターであるSLC22a18など計4種の遺伝子が出生後の胎児で制御されている。これらはKcnq1遺伝子と同様に母親から受け継いだ遺伝子でのみ発現するインプリンティング遺伝子である。周辺遺伝子の中に存在するp57kip2は細胞周期調節因子として細胞増殖を負に制御することが知られている。ヒトの膵β細胞にはp57kip2の発現が多く認められており、膵β細胞量維持にp57kip2の発現が強く関わっていることが予想される。このp57kip2は母親から受け継いだアレルからのみ発現していることが知られているが、Kcnqlot1の発現を人工的に抑制したマウスの脳や胎盤では父親から受け継いだ遺伝子からも発現することが明らかとなっており、Kcnqlot1とp57kip2の関係性は明らかとなりつつある。

このようにKcnq1の機能や、Kcnq1とその周辺遺伝子のインプリンティング制御に関して多くの報告が出ているが、Kcnq1遺伝子領域内の変異がどのようにして2型糖尿病発症に関わっているのかは全く分かっていない。今回我々はKcnq1遺伝子変異が膵β細胞へ及ぼす影響を検討し、2型糖尿病発症のメカニズムの解明を目的として解析を行った。

2. 方法

Kcnq1ヘテロ欠損マウスを父親から変異を引き継いだ父方ヘテロ、母親から変異を引き継いだ母方ヘテロに区別した上で、野生型マウスとの比較検討を行う。まずそれぞれのマウスの経時的な代謝データ（血糖値、血清インスリン値、体重）を測定すると同時に、膵β細胞量の測定を行う。これにより出生時において父方ヘテロで有意に減少していた膵β細胞量が成長してどのように推移するかを検討する。またそれぞれのマウスの膵島を単離し、遺伝子発現解析を行う。non-coding RNA Kcnqlot1の発現量を検討し、またKcnqlot1によって制御されるKcnq1 locus遺伝子群の発現解析も行う。この実験系と並行して、Kcnqlot1の発現量の変化が直接膵β細胞量に影響するかどうかを確認するため、Kcnqlot1をtruncateすることによって機能を失活させたKcnqlot1 truncationマウスの解析を行う。Kcnq1欠損マウスと同様に代謝データ、膵β細胞量の測定、単離膵島における遺伝子発現解析を行う。さらにKcnqlot1の発現・機能低下によるKcnq1 locusへの影響を確認するために、H3K27トリメチル化やH3K9アセチル化などのヒストン修飾をChIPアッセイにて検討する。

3. 結果

Kcnq1の機能欠損では膵β細胞機能・耐糖能に影響を与えない。

生体におけるKcnq1の機能を検討するため、全身性Kcnq1欠損マウスを使用した(3)。Kcnq1ホモ欠損マウスは内耳平衡機能の異常により過運動を呈するため、代謝データはKcnq1ヘテロ欠損マウスを用いて検討した。野生型・Kcnq1ヘテロ欠損マウスを通常食・高脂肪食で飼育し、それぞれの体重・血糖値・血清インスリン値を経時的に比較したが、有意な差は認められなかった。さらに高脂肪食飼

育した12週齢のマウスに経口糖負荷試験を行ったところ、やはり有意な差は認められなかった。膵β細胞のインスリン分泌能に対するKcnq1の機能を検討するために野生型マウスとKcnq1ホモ欠損マウスから膵島を単離した。グルコース、KCL、SU剤を使用し、膵島刺激後のインスリン分泌能を測定したが、どの刺激に対しても両群間に有意な差は認められなかった。これらの結果よりKcnq1の機能欠損ではインスリン分泌能や耐糖能に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

Kcnq1の父親由来の変異は膵β細胞量を減少させ、耐糖能を悪化させる。

Kcnq1の機能欠損では耐糖能に及ぼす影響が認められなかったので、Kcnq1のインプリンティング遺伝子としての役割に注目することにした。その為、Kcnq1ヘテロ欠損マウスを野生型マウス(Wild type; WT)、母親から受け継いだアリルに変異を有するマウス(Maternal Hetero; MH)、父親から受け継いだアリルに変異を有するマウス(Paternal Hetero; PH)の3群に分けて解析した。

インプリンティング制御は胎生期から生じる現象であるため、出生時体重を測定したが3群間に有意な差は認められなかった。しかし、出生時及び胎生15.5日の膵β細胞量を定量したところ、PHでは有意に減少していることが明らかとなった。随時体重・血糖値・血清インスリン値を測定した結果、3群間で有意な差は認められなかったが、高脂肪食で飼育した24週齢のマウスではPHで膵β細胞量の減少が認められ、経口糖負荷試験の結果、有意なインスリン分泌量の低下と、それに伴う血糖値の上昇が認められた。これらの結果よりKcnq1の父親由来の変異は膵β細胞量の減少を誘導し、耐糖能を悪化させることが明らかとなった。

Kcnq1の父親由来の変異はインプリンティング制御の破綻を招き、p57kip2の発現を誘導する。

Kcnq1の父親由来の変異によって、どのようなメカニズムにより膵β細胞量の減少を誘導するのかを検討した。3群のうち、PHにおいてのみ膵β細胞量の減少が認められたので、父方アリルのKcnq1遺伝子領域内に変異が存在することでKcnq1のインプリンティング制御になんらかの影響が及ぼされているのではないかと考えた。

そこでKcnq1遺伝子領域のインプリンティング制御を司るKcnq1の発現量をReal-time PCRを用いて検討したところ、WT・MHと比較してPHでは有意にその発現が低下していた。

この結果から、PHではKcnq1の発現量が減少することで、父方アリルのKcnq1とその周辺遺伝子に対するKcnq1の発現抑制が减弱し、それらの遺伝子の発現が亢進することで膵β細胞量の減少を引き起こしているのではないかと予想した。

そこでKcnq1とその周辺遺伝子のレトロウイルスベクターを作成し、マウス膵β細胞株であるMIN6細胞に恒常的過剰発現させたところ、p57kip2を過剰発現させた細胞でのみ増殖能の低下とPCNAの発現量の低下が認められた。細胞周期調節因子であるp57kip2やp27kip1が膵β細胞の増殖やアポトーシスに重要な役割を果たしていることは明らかになっており、PHにおける膵β細胞量の減少がp57kip2の発現亢進が原因によるものと考えた。Kcnq1によるp57kip2の発現抑制に関してはヒストンのメチル化、特にH3K27me3が大きく関与していることがわかっており、アセチル化は、その領域の転写を活性化させることが知られている。そこで3群のマウスより膵島を単離し、膵島におけるp57kip2のプロモーター領域におけるH3K27me3とH3のアセチル化の検討をChIP assayを用いて行った。その結果、PHではp57kip2プロモーター領域のH3K27me3の有意な低下とH3のアセチル化の亢進が認められた。以上より、PHの膵島ではp57kip2の発現が亢進しやすい状況下にあることが明らかとなった。

実際にp57kip2の発現を生後1週齢のマウスと高脂肪食負荷を掛けた24週齢のマウスの膵島を単離し、Western blotting, Real-time PCRで検討したところ、PHではWT・MHと比較してその発現が有意に増加していた。

これらの結果より、PHの膵β細胞量の減少の原因は、父方アリルのKcnq1領域に変異が存在することでKcnq1の発現量が減少し、周辺遺伝子のエピジェネティクス修飾が変化することで誘導されたp57kip2の発現亢進によるものであることが明らかとなった。

父方アリルのKcnq1発現抑制により膵β細胞量は減少する。

Kcnq1の発現量低下が直接膵β細胞量の減少に関わっているかどうかを検討するため、Kcnq1 truncation マウスの解析を行った。このマウスはKcnq1のpromoter領域の下流にpolyAを挿入することでKcnq1の発現を人工的に抑制させたマウスである(4)。このマウスを野生型(Wild type; WT)、母方アリルに変異を有するマウス(Truncated Maternal; TM)、父方アリルに変異を有するマウス(Truncated Paternal; TP)の3群に分けて、その表現型を解析した。

real-time PCR法を用いてKcnq1の発現を定量化したところ、TPではWT、TMと比べて、その発現が有意に低下していた。

Higginsらの報告によると、p57kip2の発現は臓器特異的に制御されていることが明らかになっており、Kcnq1単独で制御される臓器とKcnq1とインスレーターであるCTCFの2重支配によって制御される臓器が存在している。そこで胎生15.5日の各種臓器におけるp57kip2の発現量を蛋白レベルで検討したところ、脳や胎盤ではp57kip2の発現亢進が認められたが、肝臓や腎臓においては発現に変

化がないことが認められた。このマウスの出生時の膵β細胞量を測定したところ、TPではWT、TMと比べて有意な膵β細胞量の減少が認められた。さらに6週齢、24週齢の膵β細胞量を測定したところ、やはりTPでは膵β細胞量が有意に減少していることが明らかとなった。この時p57kip2の発現をReal-time PCRで検討したところ、いずれの週齢においてもTPでは発現亢進が認められた。

通常食飼育した24週齢のマウスに経口糖負荷試験を行ったところTPではWT、TMと比較して有意なインスリン分泌量の低下と、それに伴う血糖値の上昇が認められた。

これらの結果より、Kcnqlot1の発現量低下により膵β細胞量が減少することが直接示された。

4. 考察

日本人は欧米人と比べて肥満を伴わない2型糖尿病患者が多く、また膵β細胞からのインスリン分泌量が少ないということが知られている。ヒトでは2型糖尿病発症に膵β細胞量が重要であるという考え方は一般的となっている。電位依存性カリウムチャネルであるKcnq1遺伝子のSNPが2型糖尿病発症の有意な危険因子であるという報告は、日本のみならず多くの東アジア諸国の検討から明らかとなっており、東アジア人特有の危険因子であることが示唆されている。これまでに、ラット膵β細胞株INS-1細胞ではKcnq1がカリウムチャネルとしてインスリン分泌に関わっていることが報告されている。しかし培養細胞を用いた検討のみがされており、生体における検討は行われていなかった。そこで今回我々は、全身性Kcnq1欠損マウスを用いて糖代謝におけるKcnq1の役割について検討を行った。解析の結果、Kcnq1の機能欠損では耐糖能・インスリン分泌能に与える影響は認められなかった。電位依存性カリウムチャネルはKcnq1以外にも多く存在しており、それらのカリウムチャネルがKcnq1機能欠損の代償をしていることが考えられる。Kcnq1の機能欠損では耐糖能に及ぼす影響が認められなかったので、Kcnq1のインプリンティング遺伝子としての働きに注目することにした。つまりKcnq1遺伝子領域の変異がKcnq1とその周辺遺伝子のインプリンティング制御になんらかの影響を及ぼすのではないかと仮定した。解析の結果、驚くべきことにKcnq1の父親由来の変異を有するマウスでは膵β細胞量の減少と耐糖能の悪化が認められた。これはKcnqlot1の発現量低下によって、周辺遺伝子のエピジェネティクス修飾が変化することで、細胞周期調節因子であるp57kip2の発現亢進が誘導されたことによるものであることが明らかとなった。Kcnqlot1 truncation マウスはKcnqlot1の発現を人工的に抑制させたマウスである。このマウスを用いてKcnqlot1の発現減少と膵β細胞量の減少とが直接関わっているのかを検討した。その結果、Kcnqlot1を発現抑制したマウスでは膵β細胞量の減少と膵β細胞内におけるp57kip2発現量の亢進・耐糖能の悪化が認められた。これらの結果より、膵島においてKcnqlot1の発現量が減少すると、エピジェネティクス修飾の変化を介してp57kip2の発現を誘導し、膵β細胞量の減少をきたすことが初めて明らかとなった。東アジア人のインスリン分泌量が欧米人と比べて少ないのは膵β細胞量の違いに由来する可能性が考えられているが、今回の我々の検討から、その原因としてKcnqlot1の発現量の違いが可能性の1つとして挙げられる。また最近ではKcnq1遺伝子にSNPが存在するヒトでは出生時体重が軽いという臨床データが報告されている。これはKcnqlot1 truncation マウス (Truncated Paternal) の表現型と一致している点で、非常に興味深い。つまり、Kcnq1遺伝子にSNPを有するヒトではTruncated Paternalと同様に出生時から膵β細胞量が減少している可能性が考えられる。しかし、Kcnq1遺伝子のSNPとKcnqlot1の発現量との関連に関しては現在のところ全く分かっておらず、今後の検討課題として挙げられる。Kcnq1のSNPを受け継いできた集団では元々Kcnqlot1の発現量が低いのか、SNPが存在する場所がKcnqlot1の発現を調節している領域なのか、或いは全く別の機序によるものなのかについては大変興味深く、今後の追加検討に期待したい。

5. 参考文献

- (1) Yasuda K, Miyake K, Horikawa Y, et al. (2008) Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 40: 1092- 1097.
- (2) Unoki H, Takahashi A, Kawaguchi T, et al. (2008) SNPs in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes in East Asian and European populations. *Nat Genet* 40: 1098- 1102.
- (3) Casimiro MC, Knollmann BC, Ebert SN, (2001) Targeted disruption of the Kcnq1 gene produces a mouse model of Jervell and Lange-Nielsen Syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 27;98(5):2526-31.
- (4) Shin JY, Fitzpatrick GV, Higgins MJ. (2008) Two distinct mechanisms of silencing by the KvDMR1 imprinting control region. *EMBO J*. 9;27(1):168-78.