HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	モノカルボン酸輸送担体（MCT）11が2型糖尿病病態に与える影響に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	木村, 有希
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第14410号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81477
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuki_Kimura_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（臨床薬学）　　氏 名　　木村 有希

学 位 論 文 題 名

モノカルボン酸輸送担体（MCT）11 が 2 型糖尿病病態に与える影響に関する研究

糖尿病は、インスリンの産生や作用が不足することで発症し、血糖値の上昇を特徴とする慢性の代謝性疾患である。2 型糖尿病（Type 2 diabetes；T2D）は、糖尿病全体の約 9 割を占めており、今後も世界的に患者数の増加が懸念されている。その要因には遺伝因子と環境因子が知られており、これまでに T2D 発症リスク因子として数十種類の遺伝子が報告されている。

モノカルボン酸輸送担体（Monocarboxylate transporter；MCT）は、推定 12 回膜貫通型の膜タンパク質であり、14 種類のアイソフォームが知られている。中でも、乳酸やピルビン酸を輸送する MCT1 の遺伝子多型は糖尿病と関連することが報告されてきた。近年、メキシコ人やラテンアメリカ人におけるゲノムワイド関連解析（Genome Wide Association Study；GWAS）により、*MCT11* 遺伝子多型が T2D の発症リスク因子となることが報告された。しかしながら、MCT11 の基質や生体内における機能は不明であり、MCT11 が T2D リスク因子となるメカニズムやその病態に及ぼす影響の詳細も分かっていない。そこで本研究では、MCT11 の機能や T2D 病態に及ぼす影響に関する基礎研究並びに臨床研究を計画し、T2D の個別化医療の一助とすることを目的として、種々検討を行った。

1. 健常人における *MCT11* 遺伝子多型

MCT のいくつかのアイソフォームでは、その遺伝子多型が疾患の発症や病態に関連することが報告がされている。*MCT11* は 5 つの一塩基多型（Single Nucleotide Polymorphism ； SNP）からなるハプロタイプが T2D の発症に関与するとされているものの、日本人における SNP やハプロタイプ頻度の報告はない。そこで、まず日本人における *MCT11* プロファイルについて明らかにすべく、日本人健常者での MCT11 遺伝子多型頻度を解析することとした。

対象者は、T2D に罹患していない健常人 92 名とした。唾液から gDNA を抽出し、ダイレクトシーケンス法にて *MCT11* 遺伝子領域の塩基配列の解析を行った。解析の結果、*MCT11* コーディング領域内で、rs117767867（c.G337A, p.V113I）、 rs13342692（c.A380G, p.D127G）、rs13342232（c.T561C, silent）、rs75418188（c.G1018A, p.G340S）、rs75493593（c.C1327A, p.P443T）の 5 つの SNP が確認された。これらの SNP は全てヘテロ変異型として確認され、C1327A は 13 名（Minor allele frequency；MAF = 0.071）、残りの 4 つの SNP は 12 名（MAF = 0.065）で見られた。12 名で同時にこれら 5 つの SNP が確認されたことから、ハプロタイプ解析を行い、この 5 つの SNP はこの集団でハプロタイプにあることが推定された。以降、このハプロタイプを 5SNP haplotype とする。5SNP haplotype は、T2D リスク因子として報告されている遺伝子多型である。対象者 92 名中、5SNP haplotype の保持者は 12 名であり、ハプロタイプ頻度は 0.065 であった。なお、*MCT11* のハプロタイプとして、5SNP haplotype の他に 2SNP（A380G, T561C）によるハプロタイプも知られているが、本集団では確認されなかった。

2. 2 型糖尿病患者における *MCT11* 遺伝子多型

5SNP haplotype は GWAS で T2D 発症リスク因子であることが明らかにされたものの、T2D 病態に及ぼす影響に関する臨床研究の報告はほとんどない。そこで、*MCT11* 遺伝子多型が T2D 病態に及ぼす影響に関して検討すべく、T2D 患者における *MCT11* 遺伝子多型並びに各種検査値等との関連を検討することとした。

対象患者は、2014 年 4 月から 2017 年 3 月に北海道大学病院内科II病棟に入院した T2D 患者 85 名とした。血液から gDNA を抽出し、ダイレクトシーケンス法を用いて *MCT11* 遺伝多型頻度解

析を行った結果、rs201214748（c.C79G, p.P27A）、G337A、A380G、T561C、G1018A、C1327A の 6 つの SNP が確認された。これらの SNP は全てヘテロ変異型として確認され、C79G は 1 名（MAF = 0.006）、C1327A は 14 名（MAF = 0.082）、残りの 4 つの SNP は 13 名（MAF = 0.076）で見られた。C79G 以外の 5 つの SNP は 13 名で同時に見られ、ハプロタイプ解析により、これらの SNP はこの集団でハプロタイプ（5SNP haplotype）にあることが推定された。対象の T2D 患者 85 名における 5SNP haplotype の保持者は 13 名（以後、5SNP haplotype キャリアとする）であり、ハプロタイプ頻度は 0.076 であった。また、このハプロタイプ頻度に関して、日本人健常者群との有意な差は見られなかった。

次に、T2D 病患者 85 名を 5SNP haplotype の非キャリア 72 名とキャリア 13 名の 2 群に分け、各種検査値の比較を行った。解析の結果、早朝空腹時血糖（Fasting Plasma Glucose ; FPG : 140 mg/dL vs. 152 mg/dL, $P = 0.037$）、総コレステロール（Total cholesterol ; T-CHO : 164 mg/dL vs. 182 mg/dL, $P = 0.049$）、LDL コレステロール（Low-density lipoprotein cholesterol ; LDL-C : 97 mg/dL vs. 130 mg/dL, $P = 0.009$）において、非キャリア群と比較してキャリア群で有意に高値であった。なお、2 群間で使用薬や合併症有病率に有意な差は見られなかったことから、*MCT11* 5SNP haplotype は糖や脂質の代謝に影響を及ぼすことが示唆された。したがって、本検討により *MCT11* 5SNP haplotype は T2D の病態や進行に関与することが推察された。

3. MCT11 の生体内機能の探索

MCT11 に関する基礎的検討の報告は限られており、脂質や糖代謝への影響に関する見解は一致していない。MCT11 の基質や生体内における機能は未だ検討の余地があることから、その基質及び機能の探索を行った。

pCI-neo Mammalian Expression Vector に *MCT11* ORF 配列（1.5 kb）を組み込んだプラスミドベクターを作製し、PCR 法による部位特異的変異導入により、5SNP haplotpye に含まれる 5 つの SNP（G337A、A380G、T561C、G1018A、C1327A）の導入を行った。以後、空プラスミドを Vector、野生型 MCT11 プラスミドを WT、5SNP 変異型プラスミドを 5SNP と表記する。リポフェクション法により HEK293T 細胞（Human Embryonic Kidney cell：ヒト胎児腎細胞）に 3 種類のプラスミドを導入したところ、*MCT11* mRNA の発現が顕著に上昇し、強制発現細胞の構築に成功した。作製した強制発現系を用いて各種検討を行った。以下、各プラスミドを導入した細胞を Vector 細胞、WT 細胞、5SNP 細胞と表記する。

MCT11 の基質としてピルビン酸が示唆されていることから、液体シンチレーションカウンター（Liquid Scintillation Counter ; LSC）法にてピルビン酸の取り込み実験を行った。検討の結果、いずれの群においてもピルビン酸の取り込みに差は認められなかった。また、細胞内ピルビン酸濃度を測定した結果、3 群間に有意な差は見られなかった。したがって、ピルビン酸は MCT11 の基質とならない可能性が示唆された。同じ MCT アイソフォームである MCT1 はピルビン酸や乳酸を基質とすること、これらの基質は糖代謝や T2D 病態に関連することが知られている。そこで、次に乳酸に関して LSC 法で取り込み実験を行ったところ、Vector 細胞と比較して、WT 細胞、5SNP 細胞で有意に取り込み量の低下が見られた。また、細胞内乳酸の濃度測定を行ったところ、Vector 細胞と比較して WT 細胞、5SNP 細胞で有意に乳酸濃度が高値であった。なお、MCT1 および MCT4 の発現は各細胞で有意な差は見られなかった。更に、T2D 患者において、5SNP haplotype の有無で FPG に有意差が見られたことから、グルコースについても LSC 法による取り込み実験及び細胞内濃度測定を行ったところ、乳酸と同様に、Vector 細胞と比較して、WT 細胞、5SNP 細胞で有意に取り込み量が低下し、細胞内濃度が高値であった。

以上の結果から、MCT11 は乳酸代謝や糖代謝経路に関わる可能性が示された。

以上、本研究では、*MCT11* 遺伝子多型解析を行い、日本人健常人及び T2D 患者における遺伝子多型頻度を調査した。T2D 患者において、*MCT11* 5SNP haplotype キャリアは、非キャリアと比較して、FPG や LDL-C が有意に高く、MCT11 が糖や脂質代謝に影響を与える可能性を見出した。更に、*in vitro* MCT11 発現系を用いて、MCT11 が乳酸や糖代謝に関わる可能性を示した。