

# 「小腸・膵β細胞」を枢軸とした候補遺伝子プールの構築による糖尿病遺伝子の同定

●堀川 幸男

群馬大学 生体調節研究所 岐阜大学医学部附属病院 糖尿病・代謝内科

## ＜研究の目的と進め方＞

MODY (maturity-onset diabetes of the young) は常染色体優性遺伝の2型糖尿病であり、「やせ型でインスリン分泌不全」を特徴とするので、日本人の2型糖尿病の魅力的なモデル疾患である。現在までに6種類の原因遺伝子が同定されているが、これらの遺伝子は同一カスケード内で相互に機能連関したHNF転写因子をコードする。欧米人では大部分のMODYの原因遺伝子が明らかとなったが、日本人のそれはまだ大部分 (MODYX) が原因不明のままである。

Frequency of MODYs in Japanese and Caucasians

MODY	Genes	Frequency in MODY	
		Japanese	Caucasians
MODY1	HNF-4α	<1%	<1%
MODY2	Glucokinase	<1%	50-60%
MODY3	HNF-1α	15-20%	30-50%
MODY4	IPF-1	<1%	<1%
MODY5	HNF-1β	3-5%	<1%
MODY6	NeuroD	<1%	<1%
MODYX	?	~80%	~20%

しかも発生原基がβ細胞と共通である小腸ですべて発現しているため、代表者らは、「小腸」が糖尿病関連組織としての膵β細胞、末梢組織（骨格筋、脂肪）に次ぐ第3極として重要であることを新たに提起した。本研究のゴールは、後述する「小腸・β細胞の連動システム」に焦点を当てることによって候補遺伝子プールの構築し、大量マーカー集積と関連解析を展開することによってMODYならびにありふれた2型糖尿病遺伝子を同定することである。

## 既知MODY遺伝子の発現プロファイル

HNF-4 α (MODY1)	Liver	β-cell	Intestine	Kidney
Glucokinase (MODY2)	Liver	β-cell	Intestine	
HNF-1α (MODY3)	Liver	β-cell	Intestine	Kidney
IPF-1 (MODY4)		β-cell	Intestine	
HNF-1β (MODY5)	Liver	β-cell	Intestine	Kidney
NeuroD (MODY6)		β-cell	Intestine	
GLUT2 (Fanconi-Bickel)	Liver	β-cell	Intestine	Kidney
HNF-3 β	Liver	β-cell	Intestine	
HNF-3 α	Liver	β-cell	Intestine	
HNF-6	Liver	β-cell	Intestine	
Diabetes gene	Liver	β-cell	Intestine	Kidney

## ＜研究開始時の研究計画＞

1) 我々は、まずヒト膵島から発現遺伝子 (EST) を多数集積しマイクロアレイ化する。さらにヒト小腸のESTを大量集積する。ヒト膵島の予備的ESTマイクロアレイは世界で唯一我々が作成に成功している。さらに我々は実験動物を見据えラット・マウスの膵島発現遺伝子なども網羅していく。

2) 小腸にはβ細胞と同じグルコース認識・輸送機構が存在し、食後に発生した小腸栄養シグナルによってインスリン分泌が増強される「インクレチン効果」が知られている。2型糖尿病では、この現象は欠如または著明に低下していることが知られている。最近報告されたインクレチン受容体欠損マウスの成績では、シグナル経路を遮断するとインスリン低分泌の糖尿病が惹起されたので、小腸・β細胞ラインの障害は単独で糖尿病の成因となり得ることが明らかとなった。我々は、MODYにおいても糖尿病に先行してインクレチン障害が出現することを既に明らかにしているため、主たる糖尿病遺伝子はHNF転写カスケードに属し小腸・β細胞で連動している可能性を強く示唆するものであり、これら候補遺伝子を獲得する。

3) MODYの延長に捉えている「ありふれた」2型糖尿病発症には遺伝素因と環境要因の両方が係っていることは明らかであるが、生理的あるいは心理的なストレス性刺激というものの糖尿病発症への影響は意外に高いということが判明してきている。脳の海馬は記憶や学習に重要な役割を果たすのみならず、ストレスの影響を受け易いことが明らかになっている。海馬は、視床下部-下垂体-副腎皮質系 (Hypothalamic-pituitary-adrenal axis: HPA系) を抑制的に支配する上位中枢であるとともに、グルココルチコイドを介した慢性ストレスの影響を受け易い部位であるため、ストレス関連疾患の病態生理あるいはストレスへの脆弱性の形成に関与していると考えられる。グルココルチコイドが2型糖尿病発症に大きく影響していることは糖新生のみならず、これを活性化させる11βHSD-1を脂肪細胞に過剰発現させたマウスやin vitroの膵島を用いた実験系で次々に明らかにされている。そのため、海馬で発現している遺伝子 (Expressed Sequence Tags: ESTs) を包括的に解析することは、糖尿病を含むストレス関連疾患の発症機構の解明において重要であると考えられる。そこで本研究では、ストレス関連疾患状態における海馬機能の分子機構を研究するためのツールを開発するため、ラット海馬のcDNAライブラリーからランダムに選択した大量クローンの部分塩基配列の決定を行い、海馬における発現遺伝子のカタログ化を試みる。

4) 糖尿病における3大合併症においても遺伝素因の関与は指摘されており、様々な疾患感受性遺伝子が報告されている。糖尿病網膜症は増殖糖尿病網膜症まで進展すると視力予後が悪く全国で年間約3000人の中途失明者を生じさせ、日本の成人失明原因の第一位である。網膜症の原因として劣悪な血糖コントロールや高血圧症や高脂血症の合併による細小血管症の進展がその理由と考えられているが、大規模な2型糖尿病患者の検討で家族集積性が示され、遺伝背景の関与も指摘されている。糖尿病網膜症は環境因子の関与も大きく、また遺伝素因も複数の遺伝子が複雑に関与していると考えられることから、機能既知の候補遺伝子を選択して解析するのみでなく、発現遺伝子を網羅的にプロファイリングする研究戦略も不可

欠となる。そこで我々は正常ラット網膜の発現遺伝子プロフィールを作成する。これらの発現遺伝子クローンは独自のマイクロアレイ作成や in situ hybridization 法などに応用でき、また膵島を始めとする他臓器のプロフィールと比較することにより、臓器特異性遺伝子や共通発現遺伝子獲得に利用することができる。

#### 5) 大規模 in-situ ハイブリダイゼーション

発現遺伝子の情報はいまや誰でもデータベースから自由に獲得できるが、実際にクローンを所持している有利性をいかしてラジスケール in situ ハイブリダイゼーションにより獲得遺伝子の膵臓での詳細な発現プロフィールを検討し、適宜候補遺伝子を獲得する。

#### 6) 2型糖尿病サンプルでの関連解析

疾患対照関連解析に供するための患者サンプル収集後、データベースと独自に獲得した単純塩基多型 (SNPs) を用いて適宜ラジスケールの関連解析を進める。

#### 7) 倫理問題への対応

我々の究極の目標であるオーダーメイド医療の前ステップであるヒト疾患対照関連解析に供するために患者サンプルを収集する。遺伝子解析の指針を遵守する上で、今後サンプル数を増やしていく過程において倫理的問題にもとづくサンプル収集の遅れが生じる可能性が危惧されるので、「群馬大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理審査委員会」を立ち上げ社会的コンセンサスを得ながら進める。

### 〈研究期間の成果〉

#### 1) 膵β細胞と小腸遺伝子の大規模収集

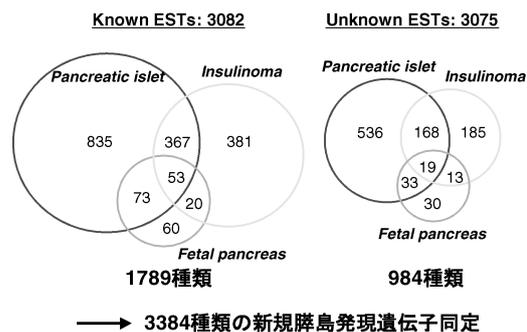
先行して獲得したヒト正常膵β細胞、ヒトインスリン産生細胞株、ヒト小腸のEST合計約3万個のESTの分類化、集団化(クラスターリング)を施行し、約5000種類の既知遺伝子を確認し、そのうち約300種類の共通遺伝子を同定している。我々は現在までヒト・ローデント合わせて約10万個の糖尿病遺伝子候補プールを獲得していることになる。

#### 膵島、小腸の発現遺伝子 (EST) の大規模集積

ヒト	膵島	10,000
	インスリノーマ	22,000
	小腸	19,000
ラット	膵島	21,000
	RIN	20,000
マウス	膵島	12,000
	MIN6	20,000
	小腸	5,000

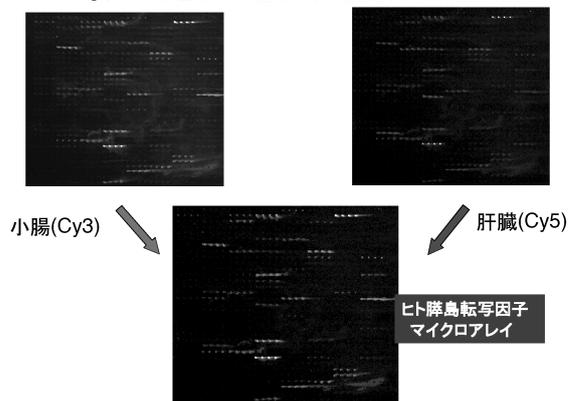
獲得した合計25753個のヒト膵島腫瘍細胞ESTの分類化、集団化(クラスターリング)を施行し、適宜膵島発現遺伝子データベース (EPConDB) と照合した結果 3 0 8 2 種類の既知遺伝子と 3 0 7 5 種類の未知遺伝子を獲得した。そして新たに3384個の遺伝子が膵島に発現していることも明らかにした。

### データベース上の膵島関連 ESTs (dbEST, EPconDB) との照合



さらに機能別分布も施行し、遺伝子発現・蛋白生成に関与するESTが既知のものでは最も多くなかでも転写因子が256種類を占めることを確認した。我々はこれらの糖尿病候補転写因子を独自にマイクロアレイ化し小腸、肝臓での発現を検討することにより3つの臓器に特異的に発現している11個の新規糖尿病候補転写因子を確保した。

### 膵島、小腸と肝の遺伝子発現プロフィール



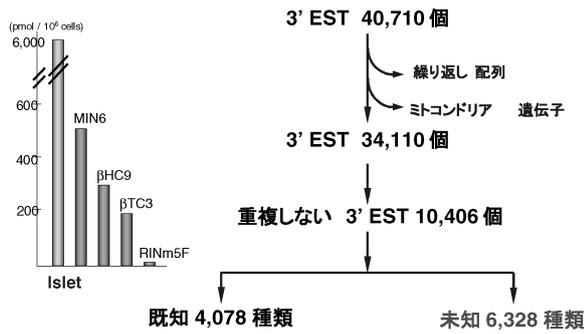
### 膵島、小腸共通に発現している転写因子

遺伝子	位置	肝	小腸
HB9 homeobox	7q36	+	+
Homeobox protein (HOX-1.3)	7p15-p14	+	+
LRR-containing protein	16q12-13	+	+
NK2 transcription factor homolog B	20pter-q11.23	+	+
Smad-interacting protein-1	2q22-q23	+	+
T-box 21	17q21.2	+	+
Zinc finger protein 74	22q11.2	+	+
BETA2 (MODY6)	2q32	-	+
Islet-1	5q	-	+
Protein inhibitor of activated STAT 1	15q	-	+
Suppressor of Ty 3 homolog	6p21.1-21.3	-	+

#### 2) ラット膵島並びにRINm5F発現遺伝子の大規模収集

我々はラット膵島並びにRINm5F (インスリン分泌能欠失) のESTを約4万個採取した。獲得した合計40710個のラット膵島並びにRINm5FのESTの分類化、集団化(クラスターリング)を施行し、4078種類の既知遺伝子と6328種類の未知遺伝子を獲得した。

## ラット膵島と RINm5F 細胞の EST



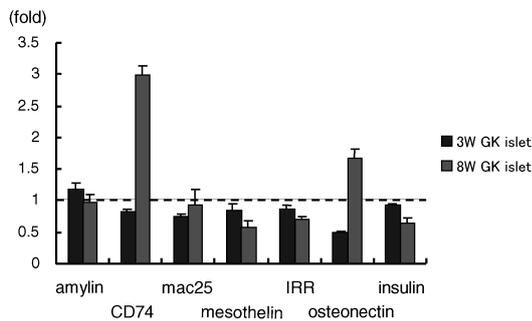
次にこの重複のないESTを用いて正常膵島、RINの発現遺伝子の差異を明らかにした。即ちインスリン分泌・合成に関与している遺伝子と膵島細胞の増殖・分化に関与する遺伝子をそれぞれ正常膵島とRINから獲得することを目標とした。

### ラット正常膵島・ RIN特異的発現遺伝子

遺伝子	膵島	RIN
Insulin	3734	12
Islet amyloid polypeptide (IAPP)	321	0
MHC class II-associated invariant chain (CD74)	28	0
Follistatin-like protein (mac25)	24	0
Megakaryocyte potentiating factor (mesothelin)	23	0
Major alpha-globin	23	0
Insulin receptor-related receptor (IRR)	18	0
Secreted acidic cystein-rich glycoprotein (osteonectin)	17	0
Interferon-related developmental regulator 1	0	53
DNA topoisomerase II alpha	0	43
Proliferating cell nuclear antigen	0	26
Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein homolog	0	24
Casein kinase 1 gamma 2 isoform	0	22
Ran-GTPase activating protein 1	0	21

そして上記の比較でラット正常膵島のみで強く発現している遺伝子を糖尿病モデルGKラットの発症前後で検討し、CD74とSPARCの発現レベルが有意に変化していることを明らかにした。これらはインスリン合成・分泌に関与している可能性が強く、糖尿病候補遺伝子としても興味深い。

### 膵島特異的遺伝子のGKラットにおける発現変化

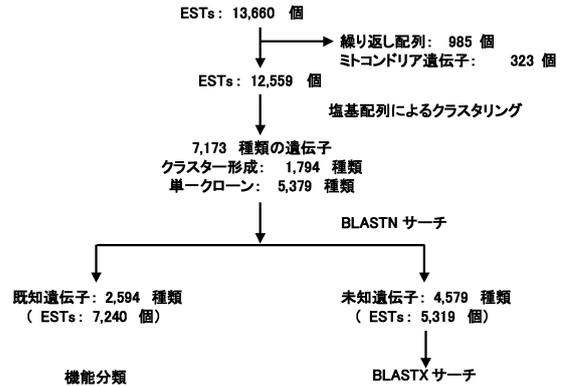


### 3) ラットの海馬発現遺伝子の大規模収集

成獣ラットの正常海馬組織の両方向性cDNAライブラリーをin vivo excision法により、プラスミドに変換した後、約15,000個のクローンを無作為に選択しプラスミドDNAを抽出した。プラスミドに挿入されたcDNAクローンの3'もしくは5'端から200-500 bpの部分塩基配列はABI PRISM 377 DNA sequencerを用い決定した。ミトコンドリアDNAと繰り返し配列を除いた13,660個のクローンに対しクラスタリング解析を行ったところ、それらのESTs

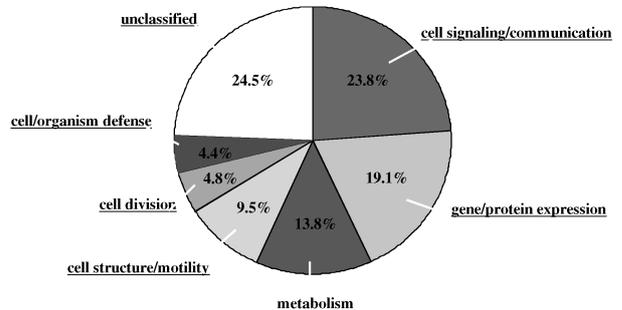
は7,173種類の独立した遺伝子で構成されており、そのうち1,794種類はクラスターを形成し、残りの5,379種類はシングルトンであった。ヌクレオチドのデータベース検索の結果、獲得されたESTsは2,594種類の既知の遺伝子と4,579種類の未知遺伝子から構成されていることが明らかになった。ヌクレオチドデータベースにマッチしなかった未知遺伝子については更にペプチドデータベース検索を行ったところ、それらのうち599種類の遺伝子は他の種の既知遺伝子のラットホモログあるいは遺伝子ファミリーの新規メンバーであることがわかった。

### ラット海馬の発現遺伝子の網羅

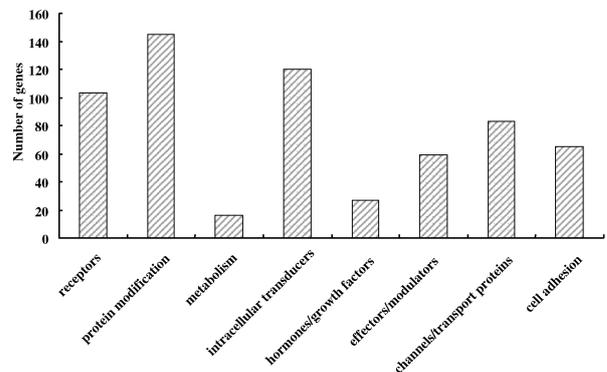


最も多く認められた「細胞内シグナル伝達」に関与する遺伝子群の中で、特にタンパク質の修飾に関与する遺伝子群が最も多く認められた。

### ラット海馬 既知遺伝子の機能分類



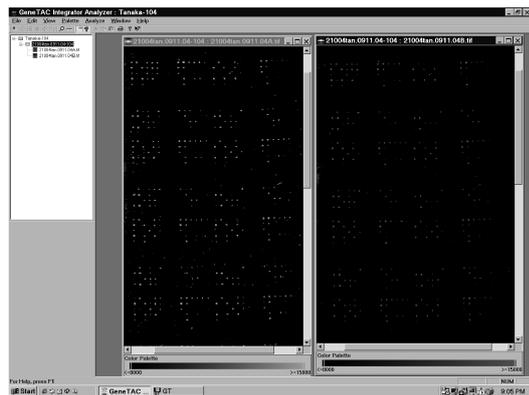
### シグナル伝達関連遺伝子の亜分類



獲得されたESTsの既知遺伝子のうちストレスに特に関与していると考えられている「cell/organ defense」のカテゴリーに分類された106個のESTsを用いて独自のマイ

クローアレイを作製した。

### ESTsを用いた独自の海馬マイクロアレイ



#### 4) ラージスケール *in situ* ハイブリダイゼーション

獲得したラットのESTを用いて現在まで3326種類の *in situ* ハイブリを行い、129個の膵島特異的発現遺伝子を獲得した。

#### ESTを用いた大規模 *in situ* hybridization による膵島特異的遺伝子の同定

発現パターン	膵島	RIN	膵島 & RIN
	2405	142	650
	109	0	20

#### 大規模 *in situ* hybridization 法により同定された既知膵島特異的発現遺伝子

Function	Gene name	Rat islet	RIN
apoptosis	Bcl2-like 2	1	0
carrier proteins	adaptor-related protein complex 2nu 1 subunit	11	1
carrier proteins	Solute carrier family 4, member 2, anion exchange protein 2	2	2
Carrier proteins	solute carrier family 28 (nucleoside transporters), member 40	0	0
cell cycle	CLK3 protein	3	1
cell signaling (protein modification)	protein tyrosine phosphatase TD14	1	0
cytoskeletal	plakophilin-3 (Pkp3)	2	0
DNA synthesis	p105 coactivator	6	1
Effectors/modulators	Arlapin 2	1	1
hormone	MEGF2	6	1
hormone	Pancreatic polypeptide	10	0
hormone	growth factor binding protein-1	2	0
immunology	ladinin	3	2
intracellular transducers	rabphilin3A-like (without C2 domains)	3	0
nucleotide	nucleoside diphosphate kinase DR-nm23	2	0
protein turnover	cathepsin B	3	0
Receptors	insulin receptor	3	3
receptors	inatrielin-4 receptor (membrane-bound form)	3	0
targeting	GMEB-2b	4	0
targeting	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 2	1	1
transcription factor	pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (Pdx1)	1	6
transcription factor	ring finger protein 25 (Rnf25)	1	0
transcription factor	immediate early gene transcription factor NGF1-B (Nr4a1)	3	2
transcription factor	inhibitor of DNA binding mRNA	1	2
transcription factor	TATA box binding protein-like protein (Tf)	1	2
transcription factor	special AT-rich sequence binding protein 1	1	0
transcription factor	RE1-silencing transcription factor (REST) co-repressor 2	2	3
unclassified	CARDIOTROPIN-1	4	0
unclassified	response gene to complement 32 protein	8	0
unclassified	PMSG-induced ovarian mRNA	5	0
unclassified	mRNA for RUS, complete/cd.	2	0
unclassified	rod outer segment membrane protein 1	1	2
vesicular transport	synaptotagmin2 (Synj2)	2	0

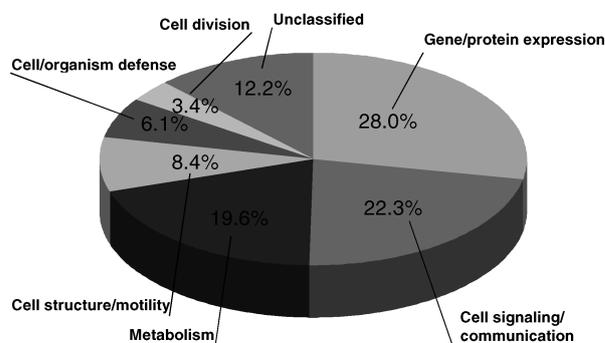
上記の遺伝子群はその一部分であるが、膵島特異的に発現しておりヒトのホモログは糖尿病候補遺伝子として興味深いため、現在若年発症型、ありふれた2型糖尿病含め詳細な遺伝子解析に供している。

#### 5) ラット網膜発現遺伝子の網羅

ラット正常網膜の一方方向性cDNAライブラリーから予備実験で1000個のクローンを無作為に選択し、プラスミドDNAを抽出した。部分塩基配列 (expressed sequence tag; EST) を決定してNCBIデータベース解析を行った。重複する配列はクラスタリング解析によって識別した。1000

個の3'-ESTのうち、繰り返し配列(100個)とミトコンドリア配列(103個)を除いた有効配列は797個であった。クラスタリング解析の結果、これらのESTは694種類の遺伝子で構成されており、そのうち639種類はシングルトンであった。さらに核酸データベース(BLASTN)検索の結果、獲得されたESTsは296種類の既知遺伝子と398種類の未知遺伝子から構成されていることを明らかにした。ラットの正常網膜で発現回数の多かった遺伝子はphosphodiesterase 6G, guanine nucleotide binding protein alpha transducing1, opsinで、これらは光情報伝達に重要な役割を果たしていることが知られている。既知遺伝子についてコード蛋白の機能別に分類すると、cell division (3.4%), cell signaling (22.3%), cell structure 8.4%, cell defense (6.1%), gene/protein expression (28.0%), metabolism (19.6%), unclassified (12.2%)であった。最も種類が多いgene/protein expression群の細分類では、転写因子が最も多く31クローンで28遺伝子であった。

#### 既知遺伝子の機能分類



#### ラット膵島・網膜 共通発現転写因子

elongation factor 1-alpha	putative nucleic acid binding protein
activating transcription factor ATF-4	poly(rC) binding protein 3
transcription elongation factor B	M-phase phosphoprotein homolog
unc-50 related protein (UNCL) ( Uncl)	rRNA promoter binding protein
eukaryotic initiation factor 5 ( eIF-5)	putative transcription factor LUZP ( Luzp)
ZHX1 gene for transcription factor zinc-fingers	developmentally down-regulated gene 4 (Nek4)
stauflin, RNA binding protein, homolog 2	hypoxia-inducible factor-1 alpha (Hif1a)
eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 2 (beta, 36kD)	hfb2
eukaryotic translation initiation factor 3	general transcription factor Ila, 2
SECIS binding protein 2 (sbp2 gene).	nuclear protein, ataxia-telangiectasia
eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 3	TAR DNA binding protein ( Tarldp)
neuron-specific enolase	PHD finger protein 2
orphan nuclear receptor OR-1	neural activity-related ring finger protein
CLIP-associated protein CLASP2.	CLOCK
transcription factor ( Olf-1)	BTB (POZ) domain containing 1 (Btbl1)
GHO protein homolog (edg2)	Bach protein 2
F-box and leucine-rich repeat protein 5	GA binding protein (GABP-beta2 subunit)
transcriptional repressor NAB1	ring finger protein 8
Olf-1/EBF associated Zn finger protein	Roaz, alternatively spliced form

類の共通発現遺伝子を同定したが、これらは糖尿病や糖尿病網膜症の候補遺伝子と考えられ、その内、低酸素下でVEGFや解糖系酵素を促進する転写因子HIF-1β遺伝子を選択し2型糖尿病や糖尿病網膜症の候補遺伝子として解析を進めた。

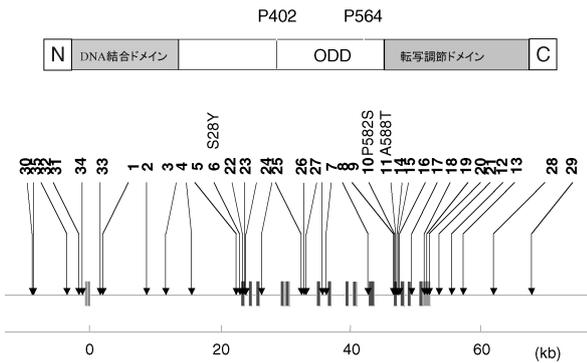
#### 6)膵島発現2型糖尿病候補遺伝子を用いた関連解析

一般的なタンパクは低酸素条件下で合成が低下するのに対してVEGF mRNAレベルは上昇することが知られているが、これはVEGF遺伝子の5'側上流約1kbの部分に存在するHypoxia Response Element (HRE) にHIF-1が結合し転写活性が上昇することによって明らかになっている。HIF-1ββ遺伝子はフィンランド人で糖尿病感受性遺伝子座が同定されているββ番染色体の長腕に位置し、その発現タンパクは826個のアミノ酸からなる。β末端にはbasic helix-loop-helix (bHLH)ドメインと呼ばれる2量体形成にも機能しているDNA結合モチーフとPASドメイン

と呼ばれるタンパク質間相互作用に重要と考えられているモチーフがありC末端には転写調節ドメインがある。この2つの遺伝子は上記の膵島発現遺伝子網羅的解析からも中から高頻度で獲得されており、糖尿病候補遺伝子の可能性が高いため、先ず我々はVEGFを活性化させる転写活性因子HIF-1 $\beta$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ) の全遺伝子領域に単一塩基多型 (SNP) を獲得し、2型糖尿病患者群と正常群を用いて関連解析を施行した。さらにこの遺伝子における連鎖不平衡 (LD) ブロックのパターンを評価し、ハプロタイプ解析を施行した。

日本人16人のゲノムDNAを用いてHIF-1 $\beta$  遺伝子領域の全15エクソンを含む(GeneAccession nt-10268~68133)までの 78 kb中38 kbを検索し、合計35個のSNPを同定した。これら35個のSNPは対照者96人(192アレル)と2型糖尿病患者88人(176アレル)で検索しアレル頻度を算出した。我々が同定した35個のSNPのうち27個はIMS-JST SNP database (<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/index.html>) またはNCBI db SNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) で既に報告されていたが、残りの8個 (SNP-6, SNP-12, SNP-18, SNP-19, SNP-31, SNP-32, SNP-33, SNP-34)は新規に同定したSNPであった。35個のSNPのうちの3つは翻訳領域にあり、それぞれエクソン2に1個 (S28Y) エクソン12に2個 (P582S, A588T)同定した。

### HIF-1 $\alpha$ 遺伝子領域に同定した SNPs

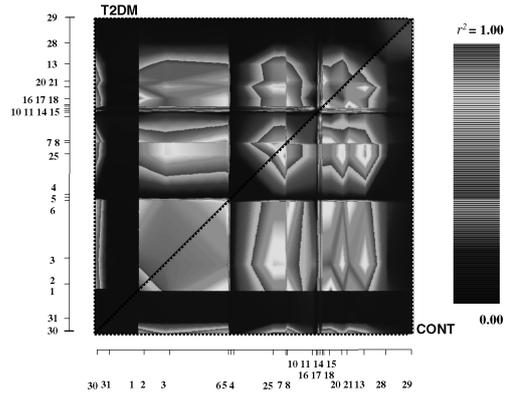


### HIF-1 $\alpha$ 遺伝子領域のSNPsのアレル頻度

SNP	Position	JSNP ID	dbSNP ID	AA change	Variation	Location	MAF
30	-8393		rs7400961		C>G	5'flanking	0.19
35	-8088		rs12717492		G>A	5'flanking	0.19
32	-7058				A>G	5'flanking	0.063
31	-4800				T>C	5'flanking	0.093
34	-1169				ACT>C	5'flanking	0.0052
33	-907				T>C	5'flanking	0.0056
1	2506	IMS-JST057041	rs2301104		G>C	Intron1	0.094
2	2598	IMS-JST057042	rs2301105		C>T	Intron1	0.16
3	8904	IMS-JST023401	rs1951795		C>A	Intron1	0.23
4	23170	IMS-JST140142	rs3783752		G>A	Intron1	0.22
5	23956	IMS-JST035040	rs2284999		T>C	Intron1	0.19
6	24625			S28Y	C>A	Exon2	0.01
22	25200		rs10137588		G>T	Intron2	0.19
23	25289		rs10148514		T>C	Intron2	0.19
24	27009		rs4899056		C>T	Intron4	0.19
25	34776		rs12434438		A>G	Intron6	0.25
26	34942	IMS-JST057045	rs2301108		G>A	Intron6	0.19
27	35074	IMS-JST057046	rs2301109		A>G	Intron6	0.19
7	37679	IMS-JST057048	rs2301111		C>G	Intron7	0.22
8	37996	IMS-JST057049	rs369824		C>T	Intron7	0.18
9	44026	IMS-JST057051	rs2301113		A>C	Intron10	0.45
10	45035		rs11549485	P582S	C>T	Exon12	0.06
11	45035		rs11549487	A588T	G>A	Exon12	0.04
14	45483		rs4902080		C>T	Intron12	0.21
15	45952		rs4902081		C>G	Intron12	0.46
16	46572		rs8020184		T>C	Intron12	0.2
17	46820	IMS-JST140141	rs3783751		G>C	Intron12	0.21
18	48445				G>T	Intron14	0.23
19	50292				C>T	3'UTR	0.05
20	51326		rs2057482		C>T	3'UTR	0.17
21	52853		rs994740		C>T	3'UTR	0.16
12	53485				C>G	3'flanking	0.25
13	56703		rs1319462		A>G	3'flanking	0.2
28	62194		rs7143626		G>A	3'flanking	0.5
29	68040		rs2165601		T>C	3'flanking	0.16

連鎖不平衡パターンの評価のために頻度の低いSNPは除外した10個のSNPを用いてLDパターンを作成した。その結果この遺伝子領域は一つの大きな連鎖不平衡ブロック内に存在することがわかった。5つのSNP (g.25200, g.25299, g.27009, g.34942, g.35074)と3つのSNP (g.45483, g.46572, g.46820)はそれぞれ、完全連鎖不平衡を呈していた。

### HIF-1 $\alpha$ 遺伝子領域の連鎖不平衡の分布



次に440人の2型糖尿病患者を用いて同定した全SNPで2型糖尿病との関連を検討した。ミスセンス変異をもつ3個のcSNPを同定し、そのうちP582Sでは2型糖尿病患者で変異が有意に少なかった (p=0.0028)。またロジスティック回帰分析で性差、年齢、BMIで補正しても有意差を得た (p=0.0048)。

### HIF-1 $\alpha$ 遺伝子領域のSNPsでの関連解析

SNP name	Position genome	Frequencies of minor allele		T2DMvsControls	
		CONT(n=572)	T2DM(n=440)	$\chi^2$	p
SNP30	-8393	0.141	0.144	0.042	0.837
SNP31	-4800	0.065	0.060	0.195	0.658
SNP1	2506	0.073	0.073	0.007	0.934
SNP2	2598	0.133	0.127	0.134	0.714
SNP3	8904	0.200	0.186	0.553	0.457
SNP4	23170	0.147	0.145	0.007	0.932
SNP5	23956	0.137	0.146	0.392	0.532
SNP6(cSNP)	24625	0.014	0.009	1.141	0.285
SNP25	34776	0.222	0.188	3.465	0.063
SNP7	37679	0.225	0.196	2.481	0.115
SNP8	37996	0.148	0.148	0.000	0.996
SNP9	44026	0.429	0.416	0.320	0.572
SNP10(cSNP)	45035	0.073	0.041	8.925	0.003
SNP11(cSNP)	45053	0.044	0.047	0.141	0.708
SNP14	45483	0.129	0.126	0.038	0.846
SNP15	45952	0.431	0.424	0.120	0.729
SNP16	46572	0.129	0.126	0.038	0.846
SNP17	46820	0.129	0.126	0.038	0.846
SNP18	48445	0.128	0.122	0.194	0.660
SNP20	51326	0.199	0.173	2.140	0.143
SNP12	52853	0.132	0.135	0.061	0.804
SNP13	56703	0.222	0.211	0.314	0.575
SNP28	62194	0.335	0.327	0.160	0.690
SNP29	68040	0.097	0.109	0.768	0.381

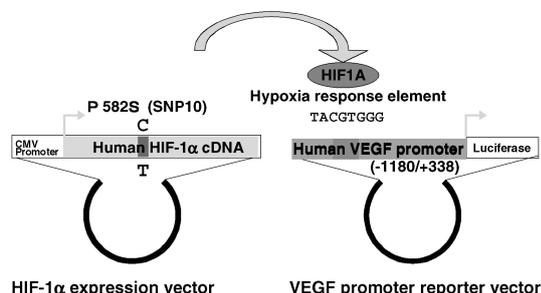
次にこの領域で頻度の高いSNPsを2個づつ用いたすべての組み合わせのハプロタイプ関連解析を施行したところ、SNP-25とSNP-13で非常に強い有意差を得ることができた。さらに詳細なハプロタイプを複数のSNPsで構築し検討したところ、P582SのマイナーアレルはSNP-25とSNP-13のマイナーアレル同士で構築されたハプロタイプにすべて認められた。SNP-25とSNP-13のマイナーアレル同士で構築されたハプロタイプは対照群に有意に多く認められていることから、このS582アレルは糖尿病発症に対して保護的因子であることが示唆された。

### 連鎖不平衡ブロックにおけるハプロタイプ

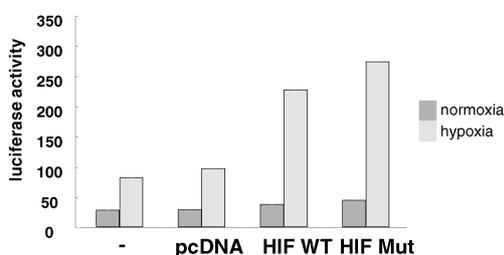
SNP-25	SNP-7	SNP-8	SNP-9	SNP-10 (P582S)		SNP-14	SNP-15	SNP-18	SNP-20	SNP-12	SNP-13	Frequency	
				CONT	T2DM								
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.537	0.543
1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	0.213	0.215
2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	0.108	0.085
2	2	1	2	2	1	2	1	2	1	2	2	0.070	0.035
2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	0.017	0.022
2	2	2	1	1	1	1	2	1	1	2	2	0.017	0.017

さらに我々はこの同定したHIF-1 $\beta$ 変異蛋白をVEGFのプロモーター配列を用いたレポーターコンストラクトと共に過剰発現させ、正常酸素分圧あるいは低酸素分圧における変異蛋白の活性変化を検定した。

### HIF-1 $\alpha$ 変異蛋白のレポーターアッセイ



### HIF-1 $\alpha$ 変異蛋白(P582S)のレポーターアッセイ



その結果この変異蛋白は低酸素下でより強くVEGFの発現を上げることが明らかとなった。

予備軍を含め1300万人と推定されている全糖尿病患者群の実に90%を占める2型糖尿病は環境因子と遺伝因子の関与から発症する生活習慣病である。その発症遺伝子としてCalpain-10遺伝子やPPAR $\beta$  遺伝子、Kir6.2遺伝子などが報告されているがまだまだ未知の遺伝因子が複雑に作用して疾患発症に至っていると考えられている。これまでに我々の研究室ではラット膵島やラット網膜のmRNA発現プロファイルを作成し網羅的な組織特異的発現遺伝子の同定を試みており、この中には膵島の分化・増殖、増殖糖尿病網膜症における新生血管形成や網膜血管の透過性亢進に中心的な役割を果たすVEGFや低酸素下で多くのタンパク質合成に重要な役割を果たす HIF-1 $\beta$  などが含まれていた。今回我々は低酸素下でVEGFの発現を促進するのみならず、解糖系に關与する複数の酵素発現をも促進する転写活性因子の一つであるHIF-1 $\beta$  遺伝子に注目し、2型糖尿病について関連解析を行った。その結果 $\beta$  個のSNPを同定し、その内ミスセンス変異を持つcSNPで糖尿病との有意な関連を認めた。そしてこのcSNP P582S変異は対象群で多く認められ、糖尿病発症に抑制的な変異と考えた。

この変異ではHIF-1 $\beta$  タンパク質の分解が抑制され結果的に蛋白レベルが亢進することが別のグループからも報告されており、二次的にVEGFなどの標的遺伝子の発現レベルが高くなると考えられるし、我々の機能実験でも再現された。膵島の発生・分化においてVEGFが重要な役割を果たしていることを鑑みると、HIF-1 $\beta$  は成人後の膵島のインスリン分泌能を発生過程時あるいは成熟後の新陳代謝回転において規定しているかもしれない。

## HIF-1 $\alpha$ 遺伝子多型と糖尿病発症リスクとの関連

HIF-1 $\alpha$	Odds Ratio (95% C.I.)	P-value
P582S	0.57 (0.37-0.88)	0.0103

S582: dominant、性別、年齢、BMIで補正

網膜症との関連は OR 1.84 (0.40-8.47) P-value 0.433

### 〈国内外での成果の位置づけ〉

我々は、膵 $\beta$ 細胞の特異的マイクロアレイを有する世界で唯一のグループである。候補遺伝子をまず網羅するために、我々はヒト正常膵ラ氏島、ヒト膵島腫瘍細胞と小腸のESTを大量集積した。さらに研究期間中に糖尿病病態に大きな影響を与え得るグルココルチコイド関連遺伝子の網羅を試みるべく、ストレス制御系で最上位に位置する海馬の発現遺伝子収集を追加した。また今後の糖尿病合併症の増加が想像されるが、なかでも直接患者さんのQOLに係る網膜症の遺伝素因を同定する第一ステップとして先ず網膜に発現している遺伝子群の獲得も開始した。

これら糖尿病関連臓器の発現遺伝子群のニーズの高さは外国を含む数多くのデータベースに対する問い合わせからも明らかであるし、今後の糖尿病原因遺伝子同定戦略上の重要な分子基盤であることに疑いはない。

また最後に示した関連解析の成功例で実証された様に、トランスクリプトームの観点より有力候補遺伝子を絞り込み、その遺伝子のSNPを大量獲得して大規模関連解析の分子基盤を構築して、新規糖尿病遺伝子の同定を実現するモデル研究と成り得る。

### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

マイクロアレイ解析での再現性の確保が予想外に困難であり、HNF-1Aの野生型、変異型の過剰発現での標的遺伝子の差異検索に遅れが生じた。得られた糖尿病候補遺伝子に関してもマイクロアレイのみならず、適宜リアルタイムPCRを追加して検定する必要があり、現在時間をかけながら逐一検定作業を進めている。

### 〈今後の課題〉

多因子疾患である糖尿病は、環境因子に加え多数の感受性遺伝子が関与しあって発症する。現在までに罹患同胞対解析によって得られた各民族の糖尿病感受性領域についても様々な報告がなされており、同一の民族でも必ずしも一致した結果は得られていない。サンプルの不均質性も否定できないが、この不均質性こそが糖尿病が「遺伝学者の悪夢」と言われる所以である。しかし糖尿病を代表とするこれら多因子型疾患に対しても、完全長cDNAプロジェクトなどトランスクリプトーム情報や蛋白相互作用などインタラクトーム情報、あるいは代謝系・産物などのメタボローム情報などからなる「機能ゲノム情報」と現在までに構築されてきたSNPs、連鎖不平衡マップなどの「基盤ゲノム情報」を融合させることにより原因・感受性遺伝子の特定が可能となり、次世代のゲノム創薬、オーダーメイド医療など「応用実践ゲノム」に発展していくと考えているが、本研究での糖尿病関連臓器の発現遺伝子群の網羅的獲得はその第一歩であることに疑いの余地はない。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

論文

1. 0303252231  
Tonooka N, Tomura H, Takahashi Y, Onigata K, Kikuchi N, Horikawa Y, Mori M, Takeda J.  
High frequency of mutations in the HNF-1  $\beta$  gene in non-obese patients with diabetes of youth in Japanese and identification of a case of digenic inheritance.  
Diabetologia 45:1709-12, 2002
2. 0303252241  
Horikawa Y, Oda N, Yu L, Imamura S, Fujiwara K, Makino M, Seino Y, Itoh M, Takeda J.  
Genetic variations in calpain-10 gene are not a major factor in the occurrence of type 2 diabetes in Japanese.  
J Clin Endocrinol Metab 88: 244-247, 2003
3. 0304301557  
Zhu Q, Yamagata K, Miura A, Shihara N, Horikawa Y, Fukui K, Imagawa A, Iwahashi H, Takeda J, Miyagawa J-I, Matsuzawa Y  
T130I mutation in HNF-4  $\beta$  gene is a loss-of-function mutation and is associated with late-onset type 2 diabetes in Japanese subjects  
Diabetologia 46: 567-573, 2003
4. 0404051711  
Jin L, Wang H, Narita T, Kikuno R, Ohara O, Shihara N, Nishigori T, Horikawa Y, Takeda J.  
Expression profile of mRNAs from human pancreatic islet tumors.  
J Mol Endocrinol 31:519-528, 2003
5. 0404061717  
Weedon MN, Schwarz PEH, Horikawa Y, Iwasaki N, Illig T, Holle R, Rathmann W, Selisko T, Schulze J, Owen KR, Evans J, del Bosque-Plata L, Hitman G, Walker M, Levy JC, Sampson M, Bell GI, McCarthy MI, Hattersley AT, Frayling TM.  
Meta-analysis confirms a role for Calpain-10 variation in type 2 diabetes susceptibility  
Am. J. Hum. Genet 73: 1208-1212, 2003
6. 0601272010  
Shihara N, Horikawa Y, Onishi T, Ono M, Kashimada K, Takeda J.  
Identification of a de novo case of hepatocyte nuclear factor-1  $\beta$  mutation with highly varied phenotypes.  
Diabetologia 47: 1128-29, 2004
7. 0601272013  
Kawamoto T, Horikawa Y, Tanaka T, Kabe N, Takeda J, Mikuni M. Genetic variations in the WFS1 gene in Japanese with type 2 diabetes and bipolar disorder.  
Mol. Genet. Metab 82: 238-245, 2004
8. 0601272020  
Tanaka T, Horikawa Y, Kawamoto T, Kabe N, Takeda J, Mikuni M.  
Expression profile of mRNAs from rat hippocampus and its application to microarray.  
Mol Brain Res 129: 20-32, 2004
9. 0503291442  
Iwasaki N, Horikawa Y, Tsuchiya T, Kitamura Y, Nakamura T, Tanizawa Y, Oka Y, Hara K, Kadowaki T, Awata T, Honda M, Yamashita K, Oda N, Yu L, Yamada N, Ogata M, Kamatani N, Iwamoto Y, Hanis CL, del Bosque-Plata L, Hayes MG, Cox NJ, Bell GI.  
Genetic variants in the calpain-10 gene and the development of type 2 diabetes in the Japanese population.  
J Hum Genet 50: 92-98, 2005
10. 0601272024  
Wang H, Horikawa Y, Jin L, Narita T, Yamada S, Shihara N, Tatamoto K, Muramatsu M, Mune T, Takeda J.  
Gene expression profile in rat pancreatic islet and RINm5F cells  
J Mol Endocrinol 35: 1-12, 2005
11. 0601272028  
Yamada N, Horikawa Y, Oda N, Iizuka K, Shihara N, Kishi S, Takeda J  
Genetic variation in the HIF-1 $\alpha$  gene is associated with type 2 diabetes in Japanese  
J Clin Endocrinol Metab 90: 5841-47, 2005

特許申請

「HNF-4 $\alpha$ 遺伝子T130I変異による2型糖尿病発症リスクの遺伝子診断」(分担)

データベース

1) 0105

<http://imcr.showa.gunma-u.ac.jp/lab/genetics/isletDB.xls.zip>

2) 0106

<http://imcr.showa.gunma-u.ac.jp/lab/genetics/RHippocampus.zip>