

## 全ゲノム解析結果に基づいた2型糖尿病候補遺伝子解析と糖尿病網膜症関連遺伝子の解析

●岩崎直子

東京女子医科大学第三内科学(糖尿病センター)

### 〈研究の目的と進め方〉

糖尿病および糖尿病網膜症の遺伝素因を明らかにすることを目的とする。

#### (1) 2型糖尿病候補遺伝子の解析

多因子遺伝による2型糖尿病に関しては、罹患同胞対法を用いた全ゲノム解析の結果、連鎖の可能性が示唆された領域の候補遺伝子についてSNPを用いた症例対照研究を行う。21番染色体で最大のLod scoreが得られ、サブ解析によりピークがさらに上昇することが認められたため、21番染色体から開始する。

#### (2) 新規MODY遺伝子の探索

単一遺伝による糖尿病に関しては、MODY症例パネルを用いた候補遺伝子の変異スクリーニング、大家系を用いた連鎖解析の2通りのアプローチを行う。

#### (3) 糖尿病網膜症関連遺伝子の解析

網膜症の感受性遺伝子検索に関しては多数例を用いた症例対照研究を行う。その結果を前向き追跡研究において検証する。

### 〈研究開始時の研究計画〉

2型糖尿病の表現型には明らかに人種差が存在することから、日本人2型糖尿病の原因遺伝子の解明を目的として罹患同胞対法を用いた全ゲノム解析を行う。連鎖の認められた領域については、dense mappingおよび候補遺伝子アプローチを用いて、日本人2型糖尿病の遺伝素因に1型糖尿病におけるHLAやメキシコ系アメリカ人2型糖尿病におけるNIDDM1のようなmajor geneが存在するの否かを明らかにする。さらにcase-control association studyを加えて遺伝素因を構成しているgeneの変異頻度や関与の程度を明らかにしたい。日本人固有の遺伝子マーカーの同定により、創薬に役立てると共に、疾患の予知・予防が可能となると考えられる。2型糖尿病および網膜症の疾患感受性遺伝子多型の同定を目的とする。

さらにMODY症例パネルを用いて新規MODY遺伝子を同定する。

### 〈研究期間の成果〉

#### (1) 2型糖尿病候補遺伝子の解析

日本人2型糖尿病を対象として、罹患同胞対法を用いた全ゲノム解析を終了し、報告した(0301061548)。その結果、染色体21番に最も高いピークを見出した(統計学的には有意には至っていないものの連鎖の可能性の否定はできないレベル)。さらに、この領域に関して、検討を進めることとして、21番染色体上に存在する81種類の遺伝子リストすべてについて、おのおのSNPを選択した。罹患同胞対法の各家系より1名ずつ選択した155名および糖尿病のない対照200例について上述のSNPの比較検討を施行中である(タイピングは東大徳永研に依頼)。

また、既に2型糖尿病との関連が報告されている

Calpain10遺伝子多型の日本人2型糖尿病の発症に及ぼす効果について、多数例を用いたメタ解析を終了した(0503291442)。

#### (2)-a 新規MODY遺伝子の探索

臨床診断でMODYと考えられる148症例のパネルを用いて、新たな候補遺伝子と考えられるMafA遺伝子の変異スクリーニングを行った。その結果、4種類の変異を見出した(Frame shift 1種類、3塩基の挿入1種類、およびSNP2種類)。SNP2種類と挿入は正常対照者109例との比較で有意差は認めず、疾患の成因とは関連しない変異であると考えられる。また、Frame shiftに関してはプロモーターの15塩基挿入多型。コーディング領域に対象例にのみ認めたミスセンス変異について、細胞導入を行い転写機能解析を行ったが、転写能の明らかな低下は証明できなかった。しかし、1種類の解析しか終了していないので、さらに検討の余地はある(2006年アメリカ糖尿病学会に抄録提出)。

#### (2)-b MODY-X家系の連鎖解析

11名の糖尿病患者を含む、3世代31名のDNAを用いた。発端者は21歳で2型糖尿病と診断されており、既知のMODY遺伝子(MODY1-6)には変異を認めていない。従って、新たなMODY遺伝子を見出せる可能性がある。発端者以外に25歳未満で診断された者は少なくとも2名存在する。

模擬解析ではlod scoreが3を超える確率は30%であった。10 cM間隔のマイクロサテライトマーカー(ABI Linkage Mapping Set Ver. 2.5)と、解析にはMLINK(two-point)とGENEHUNTER-PLUS(multi-point)を使用。two-point analysisでは最も高いスコアが染色体7番で得られたので、7番領域は5 cMとなるようにタイピングを追加し、合計384種類のマーカーを用いた。

multi-point analysisでも7番染色体の同一領域を含む範囲でLod scoreが2.51となった。さらに、境界型の者のaffection statusの設定により、染色体22番でもLod score 2.9が得られる事が示された。

(2004年アメリカ糖尿病学会で発表、Late Breaking Abstract: Genetics 44-LB, 2004) (0602132302)

#### (3) 糖尿病網膜症関連遺伝子の解析

2型糖尿病を有する症例でかつ網膜症を有する者約500例、網膜症を認めない者約400例について、検討した結果、VEGF遺伝子2578多型の網膜症発症のORは約4、進展のORは約7であることが示された。(2005年アメリカ糖尿病学会で発表、Diabetes 54:SupplA-223, 2005; 2005年日本眼科学会で報告、特許出願手続き中)(0602132235)

### 〈国内外での成果の位置づけ〉

世界的にみて2型糖尿病のように効果の小さな多数の遺伝子と環境因子の相互作用によって発症する疾患の感受

性遺伝子へのアプローチは、複数の罹患同胞対法を含めた連鎖解析の成績の比較検討に基づいて領域を狭め、該当領域に存在する候補遺伝子を検討する手法が主流である(白人では1q21-24、3q27、11q、20q13の4領域についてコンソーシアムが結成されている)。

罹患同胞対法を用いた日本人2型糖尿病感受性遺伝子座位の成績は東京大学と我々の2種類のみであり、ミレニアム研究やアジア人2型糖尿病の成績などを参考にし、候補領域について検討を進めることは極めて重要である。(0301061548)

MODY家系を用いたclassical linkage analysisの報告は今回の成績が日本では最初である。(0602132302)

網膜症関連遺伝子多型としてVEGF2578遺伝子と網膜症の発症および進展に有意の関連があること認め、アメリカ糖尿病学会で報告した。網膜症ある群となし群500例づつと多数例を用いた研究は世界的にも認めず、我々の報告が最初である。(0602132235)

MafA遺伝子変異を人において同定し、機能解析を行った報告はまだ認められていないので、われわれの成績が世界初である。

MODY家系を対象とした連鎖解析を実施した報告は我が国では他に認められず、独創的である。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

21番染色体上に存在する81種類の遺伝子全てを選択し、罹患同胞対法の各家系より1名ずつ選択した155名および糖尿病のない対照200例について上述のSNPの比較検討を施行中であるが、徳永研でのタイピングが現時点で終了していない。

糖尿病網膜症関連遺伝子の前向きコホート研究の立ち上げの倫理審査手続きは終了できたが、登録スピードが遅い。調査表の作製とデータ入力のための具体的な進め方、大量のタイピングとその解析、及びこれらに関わるコスト、などの調整に時間を要する。

#### 〈今後の課題〉

糖尿病網膜症関連遺伝子の前向きコホートの登録スピードを速める。VEGF遺伝子多型のValidationをこのコホートを用いて行う。さらに網膜症の進展効果および予防効果の双方に着目して各々候補遺伝子を選択して、cross-sectionalな検討を多数例を用いて行う。

網膜症関連遺伝子多型の組み合わせによる網膜症進展リスクを実用化できるように、cross-sectionalな検討で得られた成績をprospective-follow-up studyによってvalidateする計画であり、何らかの結果を得る可能性は十分にある(既にB開始済)。

MafA遺伝子スクリーニングの研究をさらに推進する。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

1)論文/プロシーディング  
1) (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,

- 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
- 2) (0602132235) Iwasaki N, Nakamura S, Nakamura T, Funatsu H, Ogata M, Yoshinaga Y, Kamatani N, Kitano S, Iwamoto Y. Genetic variation in the VEGF gene is associated with Diabetic retinopathy in Japanese. *Diabetes* 54 Supplement A-223, 2005
- 3) (0602132302) Iwasaki N, Saito M, Saito A, Ogata M, Kamatani N, Iwamoto Y. Linkage analysis of the MODY-X Pedigree in Japanese *Diabetes Late Breaking Abstracts* p-11, 2004
- 4) Shibata K, Ito T, Kitamura Y, Iwasaki N, Tanaka H, Kamatani N. Simultaneous estimation of haplotype frequencies and quantitative trait parameters: applications to the test of association between phenotype and diplotype configuration. *Genetics* 168: 525-539, 2004
- 5) (0404061717) Weedon NM, 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) (0301061548) Iwasaki N, Cox NJ, Wang YQ, Schwartz PEH, Bell GI, Honda M, Imura M, Ogata M, Saito M, Kamatani N, Iwamoto Y. Mapping genes influencing Type 2 diabetes Risk and body mass index in Japanese. *Diabetes* 52:209-213, 2003
- 7) (0203261907) Ogata M, Awaji T, Iwasaki N, Miyazaki S, Iwamoto Y. Nuclear Translocation of SHP and Visualization of Interaction with HNF-4  $\alpha$  in Living Cells. *Bioch Bioph Res Com* 292:8-12, 2002
- 8) (0111101618) Iwasaki N, Babazono T, Tsuchiya K, Tomonaga O, Suzuki A, Togashi M, Ujihara N, Sakka Y, Yokokawa H, Ogata M, Nihei H, Iwamoto Y. Prevalence of the A-to-G mutation at nucleotide 3243 of the mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) gene in Japanese patients with diabetes mellitus and end-stage renal disease. *J Hum Genet* 46: 330-334, 2001
- 9) (0111101633) Iwasaki N, Okabe I, Ohashi H, Ogata M, Momoi M, Yokokawa H, Iwamoto Y. A Novel Splice Site Mutation in the Hepatocyte Nuclear Factor-1b Gene, IVS2nt+1G>A, Associated with Maturity-Onset Diabetes of the Young, Agenesis of the Left Kidney and Bicornuate Uterus. *Diabetologia* 44: 387-388, 2001
- 10) (0202142241) Iwasaki N, Babazono T, Tomonaga O, Ogata M, Yokokawa H, Iwamoto Y. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1b (MODY5) gene are not a major factor contributing to end-stage renal disease in Japanese people with diabetes mellitus. *Diabetologia* 44: 127-128, 2001
- 11) (0202252350) Hara M, Wang X, Paz VP, Iwasaki N, Honda M, Iwamoto Y, Bell GI. Identification of three missense mutations in peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  in Japanese subjects with MODY but no association with diabetes *Hum Genet* 46:285-

288, 2001

- 12) Mori H, Ikegami H, Kawaguchi Y, Seino S, Yokoi N, Takeda J, Inoue I, Seino Y, Yasuda, K, Hanafusa T, Yamagata K, Awata T, Kadowaki T, Hara K, Yamada N, Gotoda T, Iwasaki N, Iwamoto Y, Sanke T, Nanjo K, Oka Y, Matsutani A, Maeda E, Kasuga M. The Pro12 → Ala substitution in PPAR-gamma is associated with resistance to development of diabetes in the general population: possible involvement in impairment of insulin secretion in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* 50(4):891-4, 2001
- 13) del Bosque-Plata L, Lin J, Horikawa Y, Schwarz PEH, Cox NJ, Iwasaki N, Iwamoto Y, German MS, Bell GI.  $\beta$ -Cell Transcription Factors and Diabetes: No Evidence for Diabetes-Associated Mutations in the Coding Region of the Proendocrine Neurogenin 3 Gene (NEUROG3) in Japanese Patients with MODY. *Diabetes* 50:694-696, 2001
- 14) Mori H, Ikegami H, Seino S, Takeda, Seino Y, Hanafusa T, Awata T, Kadowaki T, Yamada N, Iwasaki N, Sanke T, Nanjo K, Oka Y, Maeda E, Kasuga M. The Met416 to Val variant in the glycogen synthase gene. *Diabetes Care* 23:1709-1710, 2000
- 15) Horikawa Y, Horikawa Y, Cox NJ, Iwasaki N, Ogata M, Iwamoto Y, German MS, Bell GI.  $\beta$ -Cell Transcription Factors and Diabetes: No Evidence for Diabetes Associated Mutations in the Gene Encoding the Basic-Helix-Loop-Helix Transcription Factor Neurogenic Differentiation 4 (NEUROD4) in Japanese Patients with MODY. *Diabetes* 49:1955-1957, 2000
- 16) Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Lil X, Melander MO, Hara M, Hinokio Y, Lindner TH, Mashima H, Schwarz PEH, del Bosque-Plata L, Horikawa Y, Oda Y, Yoshiuchi I, Colilla S, Polonsky KS, Wei S, Concannon P, Iwasaki N, Schulze J, Baier LJ, Bogardus C, Groop L, Boerwinkle E, Hanis CL, Bell GI. Genetic variation in the calpain 10 gene (CAPN10) is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature Genet.* 26: 163-175, 2000
- 17) Hinokio Y, Horikawa Y, Furuta H, Cox NJ, Iwasaki N, Honda M, Ogata M, Iwamoto Y, Bell GI.  $\beta$ -Cell Transcription Factors and Diabetes: No Evidence for Diabetes Associated Mutations in the Hepatocyte Nuclear Factor-3b Gene (HNF3B) in Japanese Patients with MODY. *Diabetes* 49: 302-305, 2000
- 18) Hara M, Wang, X, Paz VP, Cox NJ, Iwasaki N, Iwamoto Y, Bell GI. No diabetes-associated mutations in the coding region of the hepatocyte nuclear factor-4g(HNF4G) in Japanese patients with MODY. *Diabetologia* 43:1064-1069, 2000

2) データベース/ソフトウェア

該当なし

3) 特許

出願番号：特願2003-143091

発明の名称：Calpain（カルパイン）10遺伝子による

2型糖尿病のリスク診断法

出願日：平成15年5月21日