

## 網膜マイクロアレイと候補SNPを用いた糖尿病網膜症の遺伝素因の同定

●武田 純

岐阜大学大学院医学系研究科内分泌代謝病態学

### 〈研究の目的と進め方〉

ヒトゲノムが明らかになったにも関わらず、糖尿病の遺伝素因を同定することは依然至難である。第一の理由は、血糖・インスリン値が連続した量的形質であるので、また中年以降の発症であるために、患者と対照の明確な区分が困難であることがある。罹患同胞対法は検出感度が低いので、SNPを用いた関連解析が主流となっている。しかし、SNP解析で全ゲノムを網羅するには、膨大な時間と費用を要する。本計画では、この二つの問題点を解決することによって、糖尿病網膜症の遺伝素因の同定を目指す。

網膜症は合併症の中で最も生活質の低下をきたす深刻な問題である。糖尿病の遺伝学的解析において最も重要なことは均一集団を設定することである。そこで我々は、体外から詳細に「病気の質」が目で観察できる網膜症に注目した。すなわち、増殖性変化について症例を眼科的に明確に区分できる。本研究では、モデル動物を用いて、病態によって発現レベルが変化する遺伝子を網羅し、検出感度の高いSNPを獲得する。次いで、高感度SNPハプロタイプを用いた病型との関連解析を行ない、網膜症の感受性遺伝子を同定する。

期間内に、先ず網膜ESTマイクロアレイの確立による候補遺伝子の集積とSNPプールの構築を行う。次いで、同候補の高感度SNPハプロタイプを用いて網膜症との関連解析を行い、感受性遺伝子を特定する。

### 〈研究開始時の研究計画〉

#### マイクロアレイの作成と発現変化遺伝子の獲得

当初、ラット網膜ESTの収集作業が進行しており、当該年度の初頭には少なくとも2万個が集積される予定であった。本研究は大量のDNA試料を扱うので、ESTシーケンスと後述のSNP獲得の迅速処理を計るために、現有の自動遺伝子解析システムを駆使する（7台のDNAシーケンサ、12台のPCR機、4台のDNA抽出ロボット、3台の分注ロボット）。これらのESTについてクラスタリングを行い重複しない遺伝子をセット区分する（専用のBLASTサーバーは現有する）。これらのラット網膜ESTを用いて独自のマイクロアレイを作成する。糖尿病を自然発症するGK (Goto-Kakizaki) ラットから発症前後の網膜mRNAを経時的に採取し、同アレイを用いて発現レベルが変化する遺伝子を得る。実験動物について、アルドース還元酵素阻害剤、VEGF、AGE阻害剤などの薬剤負荷と糖尿病治療を行い、これらの処置に応答する遺伝子も候補として獲得する。

肝由来の凝固線溶系の液性因子も関与する可能性が考えられる。これらの感受性遺伝子のうち、特に肝・脾ラ氏島での発現と連動して変化する遺伝子を肝・脾ラ氏島ESTパネルと対比して区分する。これらの遺伝子については、より濃厚な解析を加える。以上の過程で濃縮された感受性ハプロタイプを様々に複合させることによってエピスタティック効果を予測し、病態の重型についてより検出感度の高い網膜症マーカーを開発する。

### SNPハプロタイプを用いた関連解析

上記のラット遺伝子に対応するヒト配列をデータベースより獲得してSNPスクリーニングを行う。1遺伝子について10-30個のSNPを獲得する予定である。これらのSNPを用いてハプロタイプを構築し、種々の表現型との関連解析を重ねることによって高次の組み合わせを得る。解析対象は、増殖性変化、単純変化、正常網膜の3群の糖尿病患者グループと非糖尿病患者の合計4群（各100症例）を初期スクリーニングに用いる。

### 〈研究期間の成果〉

#### 網膜ESTマイクロアレイの作成

17,184個の3' ESTを用いたクラスタリング解析により、約半数のESTが未知遺伝子由来であることを既に明らかにしている。この内からハウスキーパーを除去し、先ず既知遺伝子を中心としたアレイを作成した。同アレイを用いてGKラットの糖尿病発症前後の網膜組織について解析を行なった。現在も、発現変化遺伝子の区分を継続して行なっている。

#### HIF-1 $\alpha$ 候補遺伝子の解析

本研究開始時に所有したラット網膜由来の17,184個の3' ESTからハウスキーパーを除去したマイクロアレイを作成した。同アレイを用いてGKラットの糖尿病発症前後の網膜組織について解析を行なった。糖尿病ラットはヒトと同じ増殖性変化は示さないが、虚血性変化は生じる。そこで前後でmRNA発現が変化する遺伝子をESTアレイを用いて検索した結果、大きく変化した遺伝子群にHypoxia inducible factor (HIF)- $\kappa$  遺伝子が含まれた。同遺伝子はもともと我々のヒト臍島ESTから同定されたものであるので、インスリン分泌に関する転写調節と網膜症の遺伝リンクを考える上で興味深い分子である。

増殖網膜症の血管新生において血管内皮増殖因子VEGFが重要な働きを担うが、VEGF遺伝子は転写因子HIF- $\kappa$ で正に転写制御される。そこで同遺伝子の直接解析に着手した。頻度の高い13個のSNPを求めて、168人の増殖網膜症を有する症例と185人の非糖尿病患者の間で関連解析を行ったところ、3' 端のSNP-13の出現頻度に有意差を認めた (P=0.0171)。連鎖不平衡を考慮してSNPハプロタイプを構築し、300サンプル数を用いて成績を確認した。このSNPは近隣の3種類のミスセンス変異 (S28Y, P582S, A588T) と有意の連鎖不平衡にあったので、同cSNPsから原因サイトの特定を試みた。性差、年齢、BMI等で補正した結果、アミノ酸置換であるSNP-10 (P582S) にのみ有意差を見出した。すなわち、Haplotype 25-10と10-13においてマイナーアリル2/2の組み合わせにおいて出現頻度に有意差を見出した (p=0.0060, p=0.0005)。そこで、PCR-mutagenesisによって変異を野生型に導入し、VEGF遺伝子プロモーターのHRE配列を用いたレポーターアッセイを行なった。その結果、変異蛋白の転写調節能は野生型に比して低酸素状態で有意に減弱していた。

本研究が同定した分子が転写因子なので、病態を理解

するためには、下流の標的遺伝子を知ることが重要である。そこで、アデノウイルスを用いたHIF- $\kappa$ の過剰発現系と網膜ESTマイクロアレイを用いて転写標的を網羅することによって、新たな候補遺伝子を獲得すると同時に糖尿病網膜症の発症機構の解析を行なっている。

#### 〈国内外での成果の位置づけ〉

慢性の高血糖状態では細小血管障害の合併が特徴であり、糖尿病患者の生活質を大きく損なう。欧米人では動脈硬化などの大血管障害が日本人に比して高頻度であるが、日本人では網膜症などの細小血管障害の頻度が高い。本研究は日本人の増殖網膜症の病態解明を目指すものである。日本人を対象として研究を行なうことに意義がある。当該年度の候補遺伝子解析によりHIF- $\kappa$ 遺伝子が2型糖尿病と関連することが明らかとなったことから、網膜での機能低下が下流標的遺伝子の発現量にどのように影響するか解析研究が期待される。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

HIF- $\kappa$ 遺伝子が2型糖尿病の感受性遺伝子であることが判明したが、増殖性変化との有意な関連を見出すには至っていない。網膜症の質的診断によるグループ化のために、各グループにおける解析対象数に限りがあったことがその背景にある。さらに症例数を増やして検討することが重要である。

#### 〈今後の課題〉

HIF- $\kappa$ 遺伝子多型による疾患感受性の増大の機序を解明するためには、転写調節科流の標的遺伝子を総合的に解析することが必須である。しかも、両組織における虚血状態の有無による効果の解析も重要である。このような病態に即したトランスクリプトーム研究と共役分子の網羅的な同定研究（プロテオームとインタラクトーム）が今後の課題となろう。

#### 〈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) 0303252241

Horikawa Y, Oda N, Yu L, Fujiwara K, Makino M, Seino Y, Itoh M, and Takeda J.

Genetic variations in CAPN10 are not a major factor in the occurrence of type 2 diabetes in Japanese.

J Clin Endocrinol Metab 88: 244-247, 2003.

2) 0404051711

Lin J, Wang H, Narita T, Kikuno R, Ohara O, Shihara N, Nishigori T, Horikawa Y, and Takeda J.

Expression profile of mRNAs from human pancreatic islet tumors.

J Mol Endocrinol 31: 519-528, 2003.

3) 0304301557

Zhu Q, Yamagata K, Miura A, Shihara N, Horikawa Y, Takeda J, Miyagawa J, and Matsuzawa Y

T130I mutation in HNF-4 $\alpha$  gene is a loss-of-function mutation in hepatocytes and is associated with late-onset Type II diabetes mellitus in Japanese subjects.

Diabetologia 46: 567-573, 2003.

4) Tanaka T, Ikari K, Furushima K, Okada A, Tanaka H, Furukawa K, Yoshida K, Ikeda T, Ikegawa S, Hunt S, Takeda J, Toh S, Harata S, Nakajima T, and Inoue I.

Genomewide linkage and linkage disequilibrium analyses pinpoint the ossification of the posterior longitudinal

ligament of the spine to COL6A1 locus on chromosome 21. Am J Hum Genet 73: 812-822, 2003.

5) Smith A. N, Lovering R. C, Futai M, Takeda J, Brown D, and Karet F. E.

Revised nomenclature for mammalian vacuolar-type H+-ATPase subunit genes.

Mol Cell 12: 801-803, 2003.

6) Hayashi M, Yamada H, Uehara S, Morimoto R, Muroyama A, Yatsushiro S, Takeda J, Yamamoto A, and Moriyama Y.

Secretory granule-mediated co-secretion of L-glutamate and glucagon triggers glutamatergic signal transmission in islets of Langerhans.

J Biol Chem 278: 1966-1974, 2003.

7) 0601272010

Shihara N, Horikawa Y, Onishi T, Ono M, Kashimada K, and Takeda J.

Identification of a de novo case of hepatocyte nuclear factor-1 $\beta$  mutation with highly varied phenotypes.

Diabetologia 47: 1128-1129, 2004.

8) 0601272013

Kawamoto T, Horikawa Y, Tanaka T, Takeda J, and Mikuni M.

Genetic variations in the WFS1 gene in Japanese with type 2 diabetes and bipolar disorder.

Mol Genet Metab. 82: 238-245, 2004.

9) 0601272020

Tanaka T, Horikawa Y, Kawamoto T, Kabe N, Takeda J, and Mikuni M.

Expression profile of mRNAs from rat hippocampus and its application to microarray.

Mol Brain Res. 129: 20-32, 2004.

10) Kim Y, Kim H-J, Seong H-A, Park K-C, Sanyal S, Takeda J, Ha H, Shong M, Tsai M-J, and Choi H-S.

Orphan nuclear receptor SHP, a novel corepressor for a basic Helix-Loop-Helix (bHLH) transcription factor BETA2/NeuroD.

Mol Endocrinol 18: 776-790, 2004.

11) Shimamoto Y, Ishida J, Yamagata K, Saito T, Kato H, Matsuoka T, Hirota K, Daitoku H, Nangaku M, Yamagata K, Fuji H, Takeda J, and Fukamizu A.

Inhibitory effect of small heterodimer partner hepatocyte nuclear factor-4 mediates bile acid-induced repression of human angiotensinogen gene.

J Biol Chem 279: 7770-7776, 2004.

12) Echwald S. M, Andersen K. L, Sørensen T. A, Larsen L. H, Andersen T. I, Tonooka N, Tomura H, Takeda J, and Pedersen O.

Mutation analysis of NROB2 among 1,545 Danish men identifies a novel G93D variant with reduced functional activity.

Hum Mut. 24: 381-387, 2004.

13) Gu N, Suzuki N, Takeda J, Adachi T, Tsujimoto G, Aoki N, Ishihara A, Tsuda K, and Yasuda K.

Effect of mutations in HNF-1 $\alpha$  and HNF-1 $\beta$  on the transcriptional regulation of human sucrase-isomaltase (SI) in Caco2 cells.

Biochem Biophys Res Commun. 325: 308-313, 2004.

14) Nishimura M, Miki T, Yokoi N, Horikawa Y, Yoshioka H, Takeda J, Ohara O, and Seino S.

Construction of a multi-functional cDNA library specific for

normal mouse pancreatic islets and its application to microarray.

DNA Res. 11: 315-323, 2004.

15) 601302007

Wang H, Horikawa Y, Jin L, Narita T, Yamada S, Shihara N, Tatamoto K, Muramatsu M, Mune T, and Takeda J.

Gene expression profile in rat pancreatic islet and RINm5F cells

J Mol Endocrinol. 35: 1-12, 2005.

16) 602082002

Isaji M, Mune T, Takada N, Yamamoto Y, Suwa T, Morita H, Takeda J, and White P. C.

Correlation between left ventricular mass and urinary sodium excretion in specific genotypes of CYP11B2.

J Hypertens. 23: 1149-1157, 2005.

17) 601302003

Ueno H, Yamada Y, Watanabe R, Mukai E, Hosokawa M, Takahashi A, Hamasaki A, Fujiwara H, Toyokuni S, Yamaguchi M, Takeda J, and Seino Y. (2005)

Nestin-positive cells in adult pancreas express amylase and endocrine precursors cells.

Pancreas. 31: 126-131.

18) 601302017

Tanahashi H, Mune T, Takahashi Y, Isaji M, Suwa T, Morita H, Yamakita N, Yasuda K, Deguchi T, White P. C, and Takeda J.

Association of Lys173Arg polymorphism with CYP11B2 expression in normal adrenal glands and aldosterone-producing adenomas.

J Clin Endocrinol Metab. 90: 6226-6231, 2005.

19) 601302011

N. Yamada, Y. Horikawa, N. Oda, K. Iizuka, N. Shihara, S. Kishi and J. Takeda. (2005)

Genetic variation in the HIF-1  $\alpha$  gene is associated with type 2 diabetes in Japanese.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 90: 5841-5847.

(2) データベース/ソフトウェア なし

(3) 特許など なし

(4) その他顕著なもの なし