

糖尿病疾患関連遺伝子の同定と医療への応用

●春日 雅人¹⁾ ◆門脇 孝²⁾ ◆安田 和基³⁾ ◆牧野 英一⁴⁾ ◆南條 輝志男⁵⁾

1) 神戸大学・大学院医学系研究科 2) 東京大学・大学院医学系研究科 3) 国立国際医療センター・研究所
4) 愛媛大学・医学部 5) 和歌山県立医科大学・医学部

<研究の目的と進め方>

我が国における糖尿病患者の急増は憂慮すべき問題であり、その遺伝素因を明らかにすることは糖尿病の発症予防や新しい治療法の開発に多大の貢献をする。糖尿病感受性遺伝子同定のために、ミレニアムゲノムプロジェクト「糖尿病サブチーム」として、SNPならびにマイクロサテライトマーカー (MS) を用いた全ゲノム関連解析を行った。全ゲノム関連解析は、2型糖尿病などの「ありふれた病気」の疾患感受性遺伝子同定には非常に有用とされる。しかしながら、それぞれの遺伝子が疾患感受性に寄与する程度は非常に弱いことが予想され、その場合の関連解析では多くのサンプルが必要となる。また、次第に明らかになりつつある疾患感受性遺伝子の機能解析についても、複数の遺伝子を1施設で行うことは非常に困難で、ミレニアムゲノムプロジェクト同様、本研究においても分担研究者と密に連携し、積極的に共同研究を推進し、計画を進めていくことが必要である。今後は、全ゲノム解析で捉えられてきた候補領域について、役割を分担し、ファインマッピング、遺伝子機能解析を用いて糖尿病感受性遺伝子を同定していくとともに、その成果の医療現場での活用を目指す。

<2007年度の研究の当初計画>

ミレニアムゲノムプロジェクトからの継続的研究により、我々がつきとめた2型糖尿病疾患感受性遺伝子の候補となる7遺伝子(領域)について、2007年度も分子生物学的手法による機能解析ならびに、遺伝学的解析を進めていく以下の計画を立てた。

(1) 先行して解析を行っている2遺伝子について、高密度SNP関連解析およびエクソン領域を中心としたダイレクトシーケンスによる原因領域あるいは原因多型(疾患感受性SNP)の絞込みを今年度中に終了させる。

(2) 残り5遺伝子以外について高密度SNP関連解析を開始する。

(3) 上述の7遺伝子について新たなケース・コントロールサンプル(確認パネル)でのSNP関連解析を目的とし、それぞれ1000例ずつの新規サンプルの収集を終了させ、順次タイピングを行う。

(4) 先行させている2遺伝子についてのノックアウトマウスの解析を進める。また、siRNAを用いた培養細胞での機能解析も進行中で、今年度もさらにそれを進めていく。

(5) 糖尿病の発症に関連することが予想される遺伝子(候補遺伝子)については、従来の候補遺伝子アプローチでも関連解析を進めていく。

<2007年度の成果>

(1) ミレニアムゲノムプロジェクトの結果を踏まえた解析

ミレニアムゲノムプロジェクトでは、2型糖尿病患者と正常対照者それぞれ約1600ずつのDNA検体および臨床情報を収集した。SNPを用いた関連解析では3段階スクリーニングを行っているが、2次スクリーニングで陽性となった201SNPが3次スクリーニングに進み、当初予定どおり平成19年1月中旬に全てのタイピングが終了した。そのうち3次スクリーニングでも2型糖尿病の発症と有意($P<0.05$)な関連を示したSNPは、10SNP(7遺伝子)であった。3SNPは同一の遺伝子内に存在するもので、別の1SNPは遺伝子領域から大きくはずれるものであった。これらの

7遺伝子のうち2遺伝子について、エクソン領域を中心としたダイレクトシーケンスによる原因領域あるいは原因多型(疾患感受性SNP)の絞込み作業・高密度SNP関連解析を終了させた。先行する2遺伝子の絞込み作業で2型糖尿病と最も有意な関連を認めたSNPについて、新たなケース・コントロールサンプル(それぞれ1000例の確認パネル)を用いてタイピングを終了させた。その結果、この2つの遺伝子は確認パネルにおいても2型糖尿病と有意に関連することを見出した。つまり、1次~3次パネルと確認パネルの合計、ケース・コントロールそれぞれ2400例ずつの比較的大きなパネルで関連を認めた有力な糖尿病感受性遺伝子の候補を2つ見出すことができた(それぞれ、 $P=1.2 \times 10^{-6}$ と $P=5.4 \times 10^{-5}$)。

機能解析についても、同じ2遺伝子について先行させて行っている。そのうちの1遺伝子についてはノックアウトマウスの作成がほぼ完了した。この遺伝子については、INS-1細胞(マウス膵β細胞の腫瘍化cell lineの一つ)における機能解析をsiRNAを用いて行っている。しかしながら、この遺伝子の発現量を減少させてもINS-1細胞におけるインスリン分泌の有意な変化は認められなかった。残りの1遺伝子については、ノックアウトマウスを供与いただき、その解析を進めているが、現在のところ耐糖能などの表現型に有意な差を認めていない。

東京大学・徳永勝士先生ならびに九州大学・山本健先生に、タイピングのご支援、千葉大学・羽田先生にゲノム試料収集のご支援をいただいている。

(2) 候補遺伝子解析

TCF7L2 遺伝子が2型糖尿病と関連することが白人・アジア人など多くの人種・民族で示されているが、春日らは分担研究者の安田、牧野、南條、門脇との共同研究により、ミレニアムゲノムプロジェクト「糖尿病サブチーム」の4000人以上の日本人サンプルを用い、この遺伝子が日本人でも2型糖尿病と関連することを示した。また、春日らは、*CPT1A* 遺伝子のSNPと日本人2型糖尿病の発症との関連や肝臓内脂肪量やインスリン抵抗性との関連を検討したがいずれも有意な関連を認めなかったことを報告した。門脇らは、欧米人における複数の全ゲノム解析において報告された複数の新規糖尿病感受性遺伝子 *FTO*, *HHEX*, *SCL30A8*, *EXT2*, *CDKAL1*, *CDKN2B*, *IGF2BP2* について日本人において関連解析を行い、*HHEX* のみが有意に2型糖尿病と関連することを見出した。南條らは、*IDE-KIF11-HHEX* 遺伝子領域に存在する2つのSNPが日本人において2型糖尿病と関連すること、タイ人MODY患者46家系における*PAX* 遺伝子変異の検索において、1家系においてR164W変異を同定した。牧野らは、インスリン抵抗性惹起性サイトカインであるレジスチンの血中濃度が一般日本人2078人においてプロモーター領域のSNP-420C/G多型と関連すること、インスリン抵抗性指標となるHOMA-IR、低HDLコレステロール血症と相関することを見出した。また、牧野らは春日・門脇らとの共同研究で、2型糖尿病2610名、対照2502例について、レジスチンのSNP、-420C/Gを解析し、2型糖尿病では、40歳未満の若年において、G/G型の頻度が高くなる傾向を見出した。安田らは、転写因子*Nrf2*及び細胞質のリザーバータンパク*Keap1*、ABCトランスポーターのひとつである*ABCC3*

遺伝子についてのハプロタイプ解析を行い報告した。また、日本人を含めた複数の人種で糖尿病遺伝子候補領域とされている、染色体 20 番長腕について、マイクロサテライトおよび SNP による系統的な検索をおこない、新規の糖尿病遺伝子候補を得た。

<国内外での成果の位置づけ>

国外において、2 型糖尿病に対する全ゲノム関連解析の報告が 2007 年 2 月より相次いでいる。いずれも全ゲノム上の 30 万~50 万 SNP をタイピングするプラットフォームを用いている。これまでに 10 報以上の報告があり、同定されてきている遺伝子数も 20 を数える。また国内を含めアジア人における同様の全ゲノム関連解析の報告は未だない。本研究では確認パネルまで 2 型糖尿病の関連することを見出した 2 つの遺伝子については、先述の 20 遺伝子と重複はなかった。一定の条件に合致した日本人 2 型糖尿病サンプルを収集することにより、日本人 (アジア人) 独自の 2 型糖尿病疾患関連遺伝子を同定しえたのではないかと考えている。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

機能解析を先行させている 2 つの遺伝子については、当初期待していたような結果が現在のところは得られていない。本研究デザインにより有意な関連を示すとして選択されてきた SNP / 遺伝子が、2 型糖尿病の病態 (表現型) に及ぼす影響が小さいことにより、うまくその差異を捉えられていないことが原因である可能性が高いと考えている。

<今後の課題>

日本人 (アジア人) 独自の関連遺伝子であるか、白人にも共通する関連遺伝子であるかを探求するため、さらに別の日本人パネル (徳島大学板倉先生のグループ)、韓国人パネル・中国人パネル・白人パネルで関連を追認できるかどうかについて共同研究を進めている。合計するとアジア人 12,000 人、白人 6,000 人におよぶ大規模な関連解析となる見込みである。

先行している 2 つの遺伝子についての機能解析は現在のところいずれも期待された結果を得ていない。今後は、ヒトサンプルでの遺伝子情報と臨床情報との関連につき詳細に検討し、どのような角度からの機能解析が有効・必要であるかを検討し、計画を練り直さなければならない。たとえば、細胞レベルでの解析では用いる細胞の種類やアッセイ方法を変える、あるいは、ノックアウトマウスでは、高脂肪食負荷など環境要因を変化させることなどが挙げられる。また、トランスジェニックマウスの作製も考慮中である。

<成果公表リスト>

- 0801111028 Miyake K, Horikawa Y, Hara K, Yasuda K, Osawa H, Furuta H, Hirota Y, Yamagata K, Hinokio Y, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Yamamoto K, Tokunaga K, Takeda J, Makino H, Nanjo K, Kadowaki T, Kasuga M. Association of TCF7L2 polymorphisms with susceptibility to type 2 diabetes in 4,087 Japanese subjects. *J Hum Genet* (in press)
- 0704201714 Hirota, Y., Kasuga, M., et al.: Lack of association of CPT1A polymorphisms or haplotypes on hepatic lipid content or insulin resistance in Japanese individuals with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 56: 656-661, 2007
- 0701291910 Horikoshi, M., Kadowaki, T., et al.: A genetic variation of the transcription factor 7-like 2 gene is associated with risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetologia* 50: 747-751, 2007
- 0801172220 Horikoshi, M., Hara, K., Ito, C., Shojima, N., Nagai, R., Ueki, K., Froguel, P., and Kadowaki, T. Variations in the HHEX gene are associated with increased risk of type 2

- diabetes in the Japanese population. *Diabetologia* 50(12):2461-6, 2007
- 0801182101 Plengvidhya, N., Kooptiwut, S., Songtawee, N., Doi, A., Furuta, H., Nishi, M., Nanjo, K., Tantibhedhyangkul, W., Boonyasrisawat, W., Yenchitsomanus, P. T., et al.: PAX4 Mutations in Thais with Maturity Onset Diabetes of the Young. *J Clin Endocrinol Metab* 92(7), 2821-2826, 2007
- 0801182142 Liu, L., Furuta, H., Minami, A., Zheng, T., Jia, W., Nanjo, K., Xiang, K.: A novel mutation, Ser159Pro in the NeuroD1/BETA2 gene contributes to the development of diabetes in a Chinese potential MODY family, *Mol Cell Biochem* 303, 115-120, 2007
- 0801182203 Furukawa, Y., Shimada, T., Furuta, H., Matsuno, S., Kusuyama, A., Doi, A., Nishi, M., Sasaki, H., Sanke, T., Nanjo, K. Polymorphisms in the IDE-KIF11-HHEX Gene Locus Are Reproducibly Associated with Type 2 Diabetes in a Japanese Population, *J Clin Endocrinol Metab* 93(1), 310-314, 2008
- 0704251540 Osawa H., Makino, H., et al.: Plasma resistin, associated with single nucleotide polymorphism -420, is correlated with insulin resistance, lower HDL, and high sensitivity CRP in the Japanese general population. *Diabetes Care* 30: 1501-1506, 2007
- 0801181713 Ochi, M., Osawa, H., Hirota, Y., Hara, K., Tabara, Y., Tokuyama, Y., Shimizu, I., Kanatsuka, A., Fujii, Y., Ohashi, J., Miki, T., Nakamura, N., Kadowaki, T., Itakura, M., Kasuga, M., and Makino, H. Frequency of the G/G genotype of resistin single nucleotide polymorphism at -420 appears to be increased in younger-onset type 2 diabetes. *Diabetes* 56: 2834-8, 2007.
- 0801181716 Osawa, H., Ochi, M., Tabara, Y., Kato, K., Onuma, H., Nishida, W., Takata, Y., Yamauchi, J., Kawamura, R., Shimizu, I., Fujii, Y., Miki, T., Ohashi, J., and Makino, H. Serum resistin is positively associated with the accumulation of metabolic syndrome factors in type 2 diabetes. *Clin Endocrinol* (in press)
- 0801181719 Yamauchi, J., Osawa, H., Takasuka, T., Ochi, M., Murakami, A., Nishida, W., Takata, Y., Onuma, H., Tabara, Y., Miki, T., Ohashi, J., and Makino, H. Serum resistin is reduced by glucose and meal loading in healthy human subjects. *Metabolism* (in press)
- 0801181720 Osawa, H., Yamada, K., Tabara, Y., Ochi, M., Onuma, H., Nishida, W., Murakami, A., Tanabe, F., Takasuka, T., Shimizu, I., Kawamoto, R., Fujii, Y., Miki, T., Ohashi, J., and Makino, H. The G/G genotype of single nucleotide polymorphism at -1066 of c-Jun N-terminal kinase 1 gene (MAPK8) does not affect type 2 diabetes susceptibility despite the specific binding of AP2 α . *Clin Endocrinol* (in press)
- 0801211625 Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Maekawa K, Kamatani N, Kajio H, Kuzuya N, Noda M, Yasuda K, Sawada J-I. Genetic variations and haplotype structures of transcription factor Nrf2 and its cytosolic reservoir protein Keap1 in Japanese. *Drug Metab Pharmacokinet* 22(3):212-9, 2007
- 0801211627 Takeuchi F, Yanai K, Inomata H, Kuzuya N, Kajio H, Honjo S, Takeda N, Kaburagi Y, Yasuda K, Shirasawa S, Sasazuki T, Kato N. Search of type 2 diabetes susceptibility gene on chromosome 20q. *Biochem Biophys Res Commun* 357(4):1100-1106, 2007
- 0801211629 Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Maekawa K, Hasegawa R, Suzuki K, Yanagawa T, Kajio H, Kuzuya N, Noda M, Yasuda K, Tohkin M, Sawada J-I. Genetic variations of the ABC transporter gene *ABCC3* in a Japanese population. *Drug Metab Pharmacokinet* 22 (2) 129-135, 2007