

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¹⁾ ◆大澤 春彦³⁾ ◆南條 輝志男⁴⁾ ◆木戸 良明⁵⁾

1) 国立国際医療センター・研究所 2) 東京大学・大学院医学系研究科 3) 愛媛大学・大学院医学系研究科

4) 和歌山県立医科大学・医学部 5) 神戸大学・保健学研究科

<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、平成19(2007)年国民健康・栄養調査では、糖尿病が強く疑われる人は890万人、糖尿病の可能性が否定できない人(予備群)は1,320万人にのぼり、この合計は10年間で約38%増加している。糖尿病は、透析導入や成人失明の主な原疾患であるとともに、心筋梗塞、脳卒中など動脈硬化性疾患も引き起こし、健康寿命やQOLに大きく影響し、医療経済上も大きな問題となっている。糖尿病は代表的な多因子疾患であり、その発症には遺伝素因が大きく関与しているため、その本体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と期待される。

糖尿病の遺伝素因の解析は、従来は、候補遺伝子アプローチが中心であり、一定の成果を挙げつつあるものの、結果の再現性に問題があることが多く、疾患の遺伝的背景の全体像をとらえるには、ほど遠かった。2型糖尿病を対象としたゲノムワイド関連解析(GWAS)の報告が平成17年(2007)年2月より白人を中心に相次いでおり、*TCF7L2*をはじめ多くの新規遺伝因子が同定された。しかしながら、国内を含めアジア人の2型糖尿病における同様の全ゲノム関連解析の報告は未だなかった。

本研究は、日本人2型糖尿病の遺伝素因を系統的に同定し、医療への応用を目指すために、ゲノムワイドないわゆる「トップダウン」の手法と、病態の知識に基づくいわゆる「ボトムアップ」の手法を併用し、これらの解析の基盤となる臨床パネルの構築にも重点的に注力する。「トップダウン」の方法としては、従来注目された罹患同胞対法に加え、上述のようにSNPによるGWASの有用性が急速に認められつつあり、先行するミレニアムプロジェクトの成果を最大限に活かして解析する。一方、糖尿病の基盤的研究により、病態について新たな知見が生まれており、「ボトムアップ」の方法として厳選した候補遺伝子アプローチを引き続き行う。また、遺伝学的に同定された糖尿病感受性遺伝子が糖尿病の発症に関与するメカニズムを、各種の分子生物学的方法を用いて機能的に検討する。臨床パネルの有用性は、詳細かつ正確な臨床情報にかかっており、専門家の手による詳しい臨床情報を完備したゲノム解析用パネルを作成し、日本の糖尿病研究の重要なリソースとする。これらにより、糖尿病感受性遺伝子の全貌を明らかにするとともに、その成果の医療現場での活用を目指す。

なお、上記代表・分担研究者のほか、本研究期間中、牧野英一、三宅一彰(敬称略)が分担研究者として参加し、また非常に多くの研究協力者の参加をいただいたことを最初に記しておく。

<研究開始時の研究計画>

2型糖尿病の遺伝素因を系統的に同定し、医療への応用へつなげるために、当初は以下の6つの柱を計画した。

① ミレニアムプロジェクトの成果を踏まえた遺伝素因の同定

糖尿病感受性遺伝子同定のために、先行するミレニアムゲノムプロジェクトでは、「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)を用いた多段階的ゲノムワ

イド関連解析を行った。これはGWASの先駆的試みであり、当時は世界でも例のない試みであった。その成果を踏まえ捉えられてきた候補領域について、本計画研究において高密度SNP関連解析、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。

② 新たな罹患同胞対解析

既に分担研究者門脇、安田らを中心に日本人を対象とした2型糖尿病罹患同胞対解析は3報ある。しかしいずれもfine mappingまで到達しておらず、また用いたマーカーも現在のゲノム配列からみると改善の余地があった。そこで、より大規模に新たな罹患同胞対を収集して解析したいと考えた。

③ 連鎖解析などで得られた候補領域についての Even-spacing Common SNPs による解析

糖尿病感受性候補領域について、さらに密に解析するために、いわゆる Even-spacing Common SNPs (公開SNPデータベースから得たマイナーアレル頻度が15%以上で、間隔が5-10kb以内のSNP)を構築し、それを用いて絞り込みを行い、糖尿病感受性遺伝子を同定する。

④ 候補遺伝子アプローチ

細胞レベルやモデル動物を用いた実験から糖尿病の発症に関連する遺伝子(糖尿病関連遺伝子)が次々に見いだされている。これらも新たな糖尿病感受性遺伝子の有力な候補であり、候補遺伝子アプローチを行う。

⑤ 得られた遺伝因子の機能解析

遺伝学的に同定された糖尿病感受性遺伝子が真に糖尿病の発症に関与するかどうかを、分子生物学的あるいは遺伝子改変マウスの作製などにより検討する。

⑥ 臨床情報の整備された臨床パネルの構築

専門家の手による詳しい臨床情報を完備したゲノム解析パネルを作成し、日本の糖尿病研究の重要なリソースとする。

しかしながら、予算規模及び新たな家系試料収集の困難さの関係から、残念ながら②③は除き、既に進行している①、及びヒトゲノム研究の基盤をなす⑥を全体研究として推し進め、④⑤を個別研究として進めることにした。

<研究期間の成果>

(1) ミレニアムプロジェクトの成果を踏まえた解析

① 「JSNPスキャン」による新規糖尿病関連遺伝子KCNQ1の同定

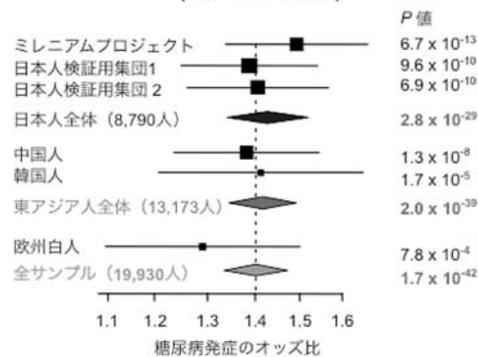
日本において、省庁連携国家プロジェクトとしてスタートした「ミレニアムプロジェクト」では、その目玉として「5大疾患(がん、高血圧、認知症、糖尿病、アレルギー喘息)」のゲノム網羅的解析を行った。具体的には、JSNPデータベースに登録された日本人SNP10万個を用いて、第1段階は、各疾患患者188名を用い、多段階スクリーニングによる患者/対照相関解析を進めた(通称「JSNPスキャン」)。

糖尿病は、全国10大学及び国立国際医療センター等が主要施設となって、チームを形成して研究を進めた。3次スクリーニングのうち、10SNPが統計的に有意に糖尿病と相関したが、最も

相関の強かった SNP を含む 3 つの SNP (rs151290, rs163184, rs2237895) が、細胞膜上のカリウムチャネルをコードする *KCNQ1* という遺伝子の、しかも同じイントロン (イントロン 15) 領域に存在した。また、酵母 *GCA2* のホモログでアミノ酸代謝とタンパク合成をつなぐ *EIF2AK4* 遺伝子は、糖尿病の病態からみてきわめて興味深い、この遺伝子の SNP についても相関が陽性であった。この 2 つの遺伝子領域の全域にわたって高密度 SNP タイピングを施行したところ (dense mapping)、*KCNQ1* でさらに強く相関する SNP が得られた (特に rs2237892、統計学的 p 値で 6.7×10^{-13} 、オッズ比 1.49)。

そこで *KCNQ1* で最も強く相関した 3 SNP を用いて、多施設共同研究にて以下の検討を行った。まず我々のパネルも含め 3,000 人規模の日本人集団を 2 つ用意して、この遺伝子の SNP と 2 型糖尿病との関係を検証したところ、全く同様に 2 型糖尿病のなり易さに関連することがわかった (再現性)。続いて、日本人と糖尿病の表現型の近い韓国人 1,390 人、中国人 (香港) 2,993 人についても 2 型糖尿病との明らかな関連を認め、*KCNQ1* は東アジア人では、非常に重要な 2 型糖尿病関連遺伝因子であることがわかった (Dr Hong Kyu Lee, Dr Juliana CN Chan らとの共同研究)。さらに意外なことに、北欧白人 2,570 人を用いた解析 (Dr Leif Groop らとの共同研究) でも糖尿病と強い相関を認めた (普遍性)。すべての結果を合わせると、解析した人数は合計で約 2 万人にのぼり、2 型糖尿病発症に関するオッズ比は 1.4、統計学的 P 値は 1.7×10^{-42} となった (図 1)。最後に *KCNQ1* リスクアレルと表現型との関係を主に対照群で調べた結果、日本人でも北欧人でもこの遺伝子は、インスリン分泌障害を介して 2 型糖尿病のリスクを上げていることがわかった (病態) [以上、業績 7]。

KCNQ1のSNPは、人種を越えて2型糖尿病と関連した(SNP rs 2237892)



KCNQ1 は、細胞膜上に存在する電位依存性 K チャネルの一つである、Kv7.1 の α サブユニットをコードする。このチャネルは、心筋の活動電位の再分極 (活動電位からの膜電位の回復)、消化管や腎における上皮の水・電解質輸送・吸収への関与が知られ、この遺伝子の機能喪失性変異が、ヒトにおいて QT 延長症候群の原因となることが知られていたが、このチャネルと糖尿病や糖代謝などの関連は、全く不明であった。

KCNQ1 タンパクは膵 β 細胞で発現しており、感受性 SNP がその発現量の調節に関与する可能性が第一に考えられる。もしチャネルの発現が亢進すれば、脱分極からの膜電位の回復過程が促進され、インスリンの開口分泌が低下する可能性がある。一方、培養細胞を用いた実験では、このチャネルの阻害剤によりインスリン分泌が亢進するという報告もあるが、チャネルの発現が抑制されれば、 β 細胞の興奮状態が過度に持続し、早期に「疲弊」をもたらしてインスリン分泌障害をきたすという考えも成り立つ。消化管に発現することから、膵の発生・分化や、インクレチンの

分泌に関与する可能性もある。

KCNQ1 遺伝子の機能の検証については、本研究班の個別研究で行った。安田らは *in vitro* で *Kcnq1* をノックダウンした β 細胞株で、インスリン分泌を検討したが、グルコース反応性などに明らかな変化はなかった。同時に遺伝子発現に対する影響をマイクロアレイにて網羅的に検討し、いくつかの糖代謝に関連する遺伝子の発現変化を認めている。木戸らは、*Kcnq1* ノックアウトマウスの供与を受けて解析を行った。ホモで *Kcnq1* を欠損した膵島では、明らかなインスリン分泌障害は認めなかった。一方ヘテロノックアウトマウスにおいて、出生時における膵 β 細胞量の減少、ゲノム上近接した遺伝子の発現変化を認めており、ヒト SNP との関係を検討中である。

② MS スキャンによる解析

ミレニアムプロジェクトでは JSNP スキャンと同時に、2 万の MS を用いた多段階全ゲノム関連解析を行った。3 次スクリーニングで有意な関連を認めた 14MS、および全検体一元化した解析により有意となった 16MS を候補領域として、2 型糖尿病および正常対照者それぞれ約 1600 検体による、SNP 関連解析を行った。3 遺伝子で有意な関連 ($P < 0.05$) を得たが、JSNP スキャンの陽性領域とは全く別であり、また高密度 SNP スクリーニングで必ずしも相関の強い SNP が得られず意義づけが難しいことから、それ以上の解析はとりあえず行わず、今後の課題とした。

③ 白人の GWAS で報告された遺伝因子の日本人における検証

平成 19 (2007) 年に白人を中心に 10 以上の 2 型糖尿病遺伝素因が報告されており、その日本人糖尿病との相関を検討した。全体研究として、本研究班で構築したパネルを用いて行った検討では、*TCF7L2* [19] をはじめ、ほとんどの遺伝因子が日本人でも糖尿病とよく相関した [10]。このほか個別研究でも、それぞれの独自のパネルで、*TCF7L2*、*HHEX* を中心に日本人における糖尿病や表現型との相関を確認した [5、11、18、25]。大澤らは、日本人についての報告のメタ解析を行い、これらの遺伝因子の交差妥当性を確認した [5]。すなわち GWAS で得られた遺伝因子は驚くほど人種をこえてよく再現した。ただし、リスクアレルは共通するものの、そのアレル頻度にはかなりの人種差があることも明らかになった。

一般に GWAS における検出力は、パネルが大きいほど、SNP の効果 (オッズ比) が大きいほど、そしてマイナーアレル頻度 (MAF) が大きいほど (common SNP であるほど) 高くなる。*KCNQ1* は、人種をこえて効果がみられる遺伝因子であるが、白人の GWAS において同定されなかった理由は、白人では rs2237892 などの MAF が小さかったためと思われる。これらのことから、普遍的な遺伝因子であっても、アレル頻度と GWAS の検出力の問題から、各人種で GWAS を行うことの意義が、明らかになったと考えられる。

④ 日本人における予測モデルの構築

多因子病の遺伝素因が系統的に同定されると、臨床応用としてまず期待されるのは、これらの組み合わせによる発症予測モデルの構築である。まずどのような遺伝因子を含めるかを決定するために、ミレニアムプロジェクトの 3 次スクリーニングで残った 7 SNP について、別パネルで検討したが、*EIF2AK4* のように相関の傾向を示すものは見られたものの、ゲノムワイドな統計学的有意水準には届かなかった。そこで本研究班では、約 5,000 人の日本人サンプルを用い、日本人でこれまで強い相関を認めた 11 の SNP (*KCNQ1*、*TCF7L2*、*CDKAL1*、*CDKN2A/B*、*IGF2BP2*、*SLC30A8*、*HHEX*、*GCKR*、*HNF1B*、*KCNJ11*、*PPARG*) による糖尿病予測モデルを構築し、ロジスティック回帰分析を行った。その結果、ROC 曲線の AUC (area under the curve) は遺伝子の

みで 0.63、年齢、性、BMI を加えても 0.72 であり、遺伝因子による予測力は現時点では不十分であった [4]。将来的には、遺伝因子と肥満や環境因子、家族歴などの組み合わせによる、総合的なリスク評価が必要だろう。

(2) 候補遺伝子解析

個別研究として、各分担研究者の得意とする研究分野から候補遺伝子を抽出し、2 型糖尿病との相関を検討した。春日らは、*INSIG2* 遺伝子のプロモーター領域の SNP が 2 型糖尿病患者においてインスリン抵抗性、肝臓脂肪含量、血中中性脂肪濃度に関連することを見出した。また 2 型糖尿病患者について体内脂肪分布など詳細な臨床情報を収集し、2 型糖尿病との関連を報告した *UCPI* 遺伝子の 5' UTR の多型 (-112A/C) が、肝細胞内脂肪含量およびインスリン抵抗性 (HOMA-IR) と関連することを示し、インスリン抵抗性を介した 2 型糖尿病感受性遺伝子であることを示唆した [30]。

牧野、大澤らは、2 型糖尿病感受性遺伝子として同定した、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 (*RETN*) について、一般住民及び 2 型糖尿病における SNP 及び血中レジスチン濃度の意義を検討した [5、15～17、20、23、24、34]。一般住民 2078 例において、血中レジスチンは、SNP-420 が C/C < C/G < G/G 型の順に高かった。また、血中レジスチンは、HOMA-IR、低 HDL、高感度 CRP と関連した。一方、2 型糖尿病において、血中レジスチンは、メタボリックシンドローム因子 (肥満、低 HDL、高 TG、高血圧) の数と正に関連し、動脈硬化性疾患でも高かった。以上のことから、血中レジスチンは、SNP-420 遺伝子型と強く関連し、インスリン抵抗性を介して 2 型糖尿病、メタボリックシンドローム、動脈硬化を惹起する可能性が想定された。多変量解析の結果、SNP-420 は最も強い血中レジスチンの決定因子であり、血中レジスチンは、年齢、性、max BMI とは独立した 2 型糖尿病の説明因子であり、SNP-420 が G の場合には、レジスチンの単球 mRNA 及び血中濃度が増加し、2 型糖尿病感受性が高まることが想定された。2 型糖尿病患者において進展した網膜症、進展した腎症、あるいは神経障害を有すると空腹時血中レジスチン濃度が高くなっていることを見出した。このほか、2 型糖尿病の候補遺伝子として、インスリン抵抗性に関する *ANKK1* を解析し、*ANKK1* 遺伝子の SNP-1066 の G/G 型は、転写因子 AP2a の特異的結合を認めたが、2 型糖尿病感受性には影響しなかった。

南條らは、協力研究者古田らと共に、*UCP2* 遺伝子の転写調節領域に存在する -886G/A 多型が、糖尿病性神経障害の遺伝的な増悪因子のひとつであること [29]、抗炎症関連遺伝子 *SUMO4* 遺伝子 Met55Val 多型が 2 型糖尿病患者において冠動脈疾患の発症リスクに関連すること [2] を示した。膵β細胞の新生、増殖、抗アポトーシスに関係する増殖因子のひとつである *Betacellulin* (*BTC*) 遺伝子の -226A > G 多型が 2 型糖尿病患者において有意に多いこと、さらに、-226A > G 多型を有する糖尿病患者ではインスリン分泌障害がより強く、また *in vitro* の機能解析においても -226G を有するプロモーターはその機能が 50% 低下していることを明らかにした [35]。また、タイ国との共同研究で *PAI4* 遺伝子変異 (R164W 変異) により MODY (若年発症糖尿病) の病像が生じること [13]、韓国、日本、台湾、香港、中国の 4 カ国の共同研究でミトコンドリア DNA のコントロール領域に位置する 16189T>C 多型がアジア人において 2 型糖尿病の発症に関連していること [3] を報告した。

門脇らは、罹患同胞対法により平成 14 (2002) 年に報告した 9 箇所の 2 型糖尿病感受性遺伝子座のうち、さらに 2 箇所について、感受性遺伝子を検討した。染色体 20 番の領域について、MODY

遺伝子である *HNF4A* 遺伝子の特異的プロモーターのハプロタイプが有意に 2 型糖尿病と関連を示した [27]。また染色体 1 番の領域については、AMP キナーゼ α 2 サブユニット (*PRKAA2*) の rs2051040 がインスリン抵抗性と有意に関連し、さらにこの SNP を含むハプロタイプが有意に 2 型糖尿病と関連することを示した [28]。さらに染色体 11 番短腕について候補領域の連鎖不平衡マッピングを行い、有望な遺伝子 X を得ており、このノックアウトマウスが高脂肪食負荷によりインスリン分泌低下と耐糖能異常を示すことから、その病態をさらに解析している。

安田らは、日本人 2 型糖尿病患者において、*HNF4A* 遺伝子の多型をスクリーニングし、39 の SNP を同定しハプロタイプを構築した。また、ER (小胞体) ストレス関連遺伝子などを対象に候補遺伝子アプローチを行ったが、明らかな相関はみられなかった。重要な薬物代謝酵素である *CYP2C9* 遺伝子について、日本人 253 人で多型スクリーニングを行い 48 の多型を同定し、ハプロタイプ構造が欧米人と異なることを報告した [22]。また、アミノ酸置換をとともなう 7 つの多型について、バキュロウィルスを用いた *in vitro* 系で活性を測定したところ、抗糖尿病薬 glimepiride や、降圧薬 losartan など、臨床的に汎用される基質 (薬剤) に対する代謝活性に大きな差がみられ、これらの多型が薬剤至適投与量に大きく影響する可能性を示した [1]。

(3) 新たな GWAS

平成 19 年 (2007 年) より、世界で次々と GWAS の成果が報告され、特に糖尿病における成果により、GWAS の特徴が明らかになった。すなわち、①より多くの 1 次パネルで②より多くの SNP で、③ハップマップ計画の成果を踏まえたより網羅的な SNP を用いて行うことで、検出力が上がることを示された。ミレニアムプロジェクトは、GWAS の先駆的な試みであったが、1 次パネルは 188 人で、しかも用いた 10 万 SNP は必ずしもゲノムワイドな分布を示していなかった。また SNP 頻度に人種差があることは明らかで、日本人 2 型糖尿病の common SNP が網羅的に解析されたとはいえない。新世代 GWAS として、他の研究費により分担研究者安田を中心に、糖尿病患者 400 人を対象として、イルミナ社 550K SNP セットを用いた GWAS が行われており、先行する GWAS の知見とノウハウを有する本研究班としては、この研究に協力して解析を進め、特に 2 次解析以降はこの班の有するパネルを用いて行うこととした。1 次スキャンにて、trend test の p 値で、 10^{-6} 以下が 4 個、 10^{-5} 以下が 56 個であった。有意な上位 200SNP には、*TCF7L2* や *KCNQ1* も含まれ、現 replication panel でタイピングを行い、いくつか統計学的に有望な SNP も得られており、さらに高密度 SNP 解析を行っている。

(4) パネルの作成

ミレニアムプロジェクト「糖尿病サブチーム」において、2 型糖尿病および正常対照者の DNA 検体をそれぞれ約 1500 ずつ収集しており、これらの検体を用いてミレニアムプロジェクトからの候補領域をさらに解析していく。さらに本研究班として、独自に糖尿病対照各 1,000 名を収集し、ミレニアムプロジェクトの replication panel として活用した。合計で 2 型糖尿病患者・正常対照者それぞれ約 2,400 検体から成るパネルを作成したことになる。これらは、糖代謝疾患の解析に必要な臨床情報を専門家が収集し、完備している特徴があり、重要なリソースにきわめて有効に利用できた。なお、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・羽田明先生にゲノム試料収集のご支援をいただいている。

<国内外での成果の位置づけ>

最も大きな成果である *KCNQ1* 同定について、その意義は大きく 3 つ挙げられる。

まず、日本人2型糖尿病において、現時点で最も重要と思われる遺伝因子を明らかにした。全く独立に行われた、理化学研究所の「オーダーメイド医療実現化プロジェクト」でも、やはり日本人で一番強力な2型糖尿病関連遺伝子は*KCNQ1*であったことが同時に報告された。

次に*KCNQ1*は人種をこえてヒト2型糖尿病と関連する普遍的な因子であることを示した。その後も中国・韓国などの東アジア人を中心に多くの人種で*KCNQ1*の多型と糖尿病との相関が報告されており、白人でもインスリン分泌低下との関連が認められている。現在までに主にGWASにより、15~20の2型糖尿病関連遺伝因子が報告されているが、その中でも、オッズ比で見ると、*KCNQ1*は1.4程度と、*TCF7L2*と並んで高く、ほかの遺伝因子はだいたい1.1-1.2程度である。すなわち、ヒト2型糖尿病の成因のうち、common SNPでは最も重要な分子の一つを同定したことになる。

3つ目には、人種をこえた糖尿病の遺伝因子でも、リスクアレル頻度には大きな人種差があることを示し、病態の解明には、それぞれの人種でのGWASが必要であることを初めて具体的に明らかにした。Nature Genetics掲載号でも、Editorialでこの点を評価いただいている。なお、上記のように*TCF7L2*をはじめとする、白人で同定された2型糖尿病遺伝因子も、ほとんどが日本人でも相関し、リスクアレル頻度は異なることが知られている。

このように、我々が報告した*KCNQ1*は、その後全世界で糖尿病との相関が追討・確認され、白人も含めて普遍的な2型糖尿病遺伝因子であることが確認された。

Common diseaseの遺伝解析は、GWASにしても、候補遺伝子アプローチにしても、またこれらのバリデーションスタディについても、非常に大きなパネルでの解析が必要で、かつ再現性を要求されるようになってきた。我々が本研究班で構築したパネルは、大規模とはいえないまでも、臨床情報も完備しており、糖尿病のゲノム研究において、将来も貴重な研究リソースとなると思われる。

個別研究の候補遺伝子アプローチも有効であり、興味深いデータを示すことができた。例えばレジスチン(*RETN*)遺伝子多型については、SNPと血中レジスチン濃度、さらにインスリン抵抗性や糖尿病、合併症など臨床像との関係を確認し、世界の他民族でも再現する報告がなされるなど、オリジナリティの高い成果を発信することができた。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

GWASで得られた遺伝因子による疾患予測モデルについては、その予測力が不十分であるという結果であった。白人からの同様の試みも平成20(2008)年以降いくつか報告されているが、ROC曲線のAUCは0.6~0.75であり、「糖尿病の発症予測モデル」が、従来の危険因子に上乗せできる有用性はごくわずかであるという結果であった。2型糖尿病の疾患感受性遺伝子一つ一つが持つ効果は小さく、発症には環境因子の関与も大きいことから、今後はこれらも加味したパネル、特に前向きコホートでの検討が重要と思われる。またcommon SNPを対象とするGWASに共通した課題の可能性があり、後述するrare variantの意義も再検討する必要がある。

*KCNQ1*の機能的意義の証明は、きわめて難しかった。既に心臓でよく検討されている遺伝子であり、ノックアウトマウス、細胞でのノックダウンとともに、インスリン分泌低下の明らかな手掛かりはまだ得られていない。イントロンSNPと連鎖不平衡にある他の責任SNPが機能をもつ可能性は否定は仕切れないが、dense mappingを行っており、やや考えにくい。一般にGWASで得られる遺伝因子は、タンパクコード領域以外に存在するSNP

のことが多く、たとえイントロンや遺伝子近傍に存在しても、必ずしもその遺伝子の発現を変化させているかどうかは不明である。しかも、こうしたヒトSNPは動物モデルで対応する領域を特定しづらく、糖尿病のように直接ヒト罹患臓器を臨床的に得にくい(糖尿病では脾、肝、筋など)場合は、SNPの機能的意義を証明することはきわめて困難である。*KCNQ1*のSNPも、*KCNQ1*タンパク発現調節とは異なる機序で作用している可能性もある。例えば近傍の遺伝子(細胞周期に関連する*CDKN1C*など)を含む他の遺伝子の発現調節に関与する可能性、SNP近傍の未知の転写産物(非コードRNAマイクロRNAを含む)の発現や機能に影響を与える可能性、DNAメチル化などのエピジェネティックな調節機構に変化を生じる可能性(この領域はインプリティングを受けている)もありうる。これらの可能性も検討中であるが、なぜこのSNPがインスリン分泌低下を生じるのかは、ゲノム科学の技術を駆使して、総合的に証明してゆかなくてはならないだろう。

<今後の課題、展望>

日本人の糖尿病遺伝素因は、まだ解明尽くされていないと思われる。より網羅的なGWASから新規の遺伝因子の同定を進めてゆく。また、遺伝因子同士の相互作用、遺伝因子と環境因子との相互作用の検証も必要と思われる。

*KCNQ1*は、日本人において、現時点で最も重要な糖尿病遺伝因子であるが、日本人における臨床的意義の確立が必要である。白人において*TCF7L2*のSNPでは、リスクアレルでSU剤の効果が弱いと報告されており、日本人でも*KCNQ1*のSNPについて治療反応性との関連が注目される。*KCNQ1*をはじめ、これまで得られた遺伝因子については、機能解析をすすめるとともに、生活習慣介入の効果や薬物の治療反応性を、より大規模な共同研究により検討してゆきたい。

さらに、臨床像や家族歴から絞りこんだ症例を対象として、次世代シーケンサーなどを用いた「リシーケンシング」により、いわゆるrare variantも視野に入れた遺伝子探索も計画したい。2型糖尿病は、GWASが最も成功した疾患の一つであり、*KCNQ1*を中心としたcommon SNPと、こうしたrare variantとの意義がそれぞれ明らかになれば、個別化医療・予防への応用についても、生活習慣病のモデルケースとなると期待される。

こうしたゲノム研究では多施設共同研究により、多数のサンプルを常時解析可能な体制を確立し、維持していく必要がある。今後は、環境因子の定量化を含めた精度の高い一般住民サンプルが必要であると思われる。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

1.0912020733 Maekawa, K., Harakawa, N., Sugiyama, E., Tohkin, M., Kim, S-R., Kaniwa, N., Katori, N., Hasegawa, R., Yasuda, K., Kamide, K., Miyata, T., Saito, Y., and Sawada, J.:Substrate-dependent functional alterations of seven CYP2C9 variants found in Japanese subjects. Drug Metab Dispos, 37(9), 1895-1903(2009).
2.0910292013 Shimada, T., Furukawa, Y., Furuta, H., Yasuda, K., Matsuno, S., Kusuyama, A., Doi, A., Nishi, M., Sasaki, H., Sanke, T., and Nanjo, K.:SUMO4 Met55Val polymorphism is associated with coronary heart disease in Japanese type 2 diabetes individuals. Diabetes Res Clin Pract, 85(1), 85-9(2009).
3.0903031441 Park, K.S., Chan, J.C., Chuang, L.M., Suzuki, S., Araki, E., Nanjo, K., Ji, L., Ng, M., Nishi, M., Furuta, H., Shirohani, T., Ahn, B.Y., Chung, S.S., Min, H.K., Lee, S.W., Kim, J.H., Cho, and Y.M., Lee, H.K.:A mitochondrial DNA variant at position 16189 is associated with type 2 diabetes mellitus in

- Asians. *Diabetologia*, 51(4), 602-608(2008).
- 4.0903021624 Miyake, K., Yang, W., Hara, K., Yasuda, K., Horikawa, Y., Osawa, H., Furuta, H., Ng, M., Hirota, Y., Mori, H., Ido, K., Yamagata, K., Hinokio, Y., Oka, Y., Iwasaki, N., Iwamoto, Y., Yamada, Y., Seino, Y., Maegawa, H., Kashiwagi, A., Wang, HY., Tanahashi, T., Nakamura, N., Takeda, J., Maeda, E., Yamamoto, K., Tokunaga, K., Ma, RC., So, WY., Chan, JC., Kamatani, N., Makino, H., Nanjo, K., Kadowaki, T., and Kasuga, M.:Construction of a prediction model for type 2 diabetes mellitus in the Japanese population based on 11 genes with strong evidence of the association. *J Hum Genet*, 54(4), 236-41(2009).
- 5.0901101854 Tabara, Y., Osawa, H., Kawamoto, R., Onuma, H., Shimizu, I., Miki, T., Kohara, K., and Makino, H.:Replication study of candidate genes associated with type 2 diabetes based on genome-wide screening. *Diabetes*, 58(2),493-498(2009).
- 6.0901101849 Osawa, H., Tabara, Y., Kawamoto, R., Ohashi, J., Ochi, M., Onuma, H., Nishida, W., Yamada, K., Nakura, J., Miki, T., Makino, H., and Kohara, K.:The PPAR γ Pro12Ala Pro/Pro and resistin SNP-420G/G genotypes are synergistically associated with plasma resistin in the Japanese general population. *Clin Endocrinol*, 71, 341-345(2009).
- 7.0811171544 Yasuda, K., Miyake, K., Horikawa, Y., Hara, K., Osawa, H., Furuta, H., Hirota, Y., Mori, H., Jonsson, A., Sato, Y., Yamagata, K., Hinokio, Y., Wang, HY., Tanahashi, T., Nakamura, N., Oka, Y., Iwasaki, N., Iwamoto, Y., Yamada, Y., Seino, Y., Maegawa, H., Kashiwagi, A., Takeda, J., Maeda, E., Shin, HD., Cho, YM., Park, KS., Lee, HK., Ng, MC., Ma, RC., So, WY., Chan, JC., Lyssenko, V., Tuomi, T., Nilsson, P., Groop, L., Kamatani, N., Sekine, A., Nakamura, Y., Yamamoto, K., Yoshida, T., Tokunaga, K., Itakura, M., Makino, H., Nanjo, K., Kadowaki, T., and Kasuga, M.:Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nature Genetics*, 40(9), 1092-1097(2008).
- 8.0806202003 Takeuchi, F., Ochiai, Y., Serizawa, M., Yanai, K., Kuzuya, N., Kajio, H., Honjo, S., Takeda, N., Kaburagi, Y., Yasuda, K., Shirasawa, S., Sasazuki, T., and Kato, N.:Search for type 2 diabetes susceptibility genes on chromosome 1q, 3q and 12q. *J Hum Genet*, 53(4), 314-324(2008).
- 9.0806171842 Ohshiro, Y., Hayashi, M., Yabiku, K., Ueda, K., Wakasaki, H., Ishigame, M., Furuta, H., Nishi, M., Sasaki, H., Takasu, N., and Nanjo, K.:Mutations in the β 1 adrenergic receptor gene and massive obesity in Japanese. *Diabetes Res Clin Pract*, 80(2), 213-217(2008).
- 10.0806121443 Horikawa, Y., Miyake, K., Yasuda, K., Enya, M., 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, and Kasuga, M.:Replication of genome-wide association studies of type 2 diabetes susceptibility in Japan. *J Clin Endocrinol Metab*, 93(8), 3136-3141(2008).
- 11.0801182203 Furukawa, Y., Shimada, T., Furuta, H., Matsuno, S., Kusuyama, A., Doi, A., Nishi, M., Sasaki, H., Sanke, T., and 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).
- 12.0801182142 Liu, L., Furuta, H., Minami, A., Zheng, T., Jia, W., Nanjo, K., and 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).
- 13.0801182101 Plengvidhya, N.,Kooptiwut, S.,Songtawee, N.,Doi, A.,Furuta, H.,Nishi, M.,Nanjo, K.,Tantibhedhyangkul, W.Boonyasrisawat, W., and 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).
- 14.0801181720 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 AP2a. *Clin Endocrinol*, 69, 36-44(2008).
- 15.0801181719 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*, 57, 149-156(2008).
- 16.0801181716 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*, 69, 74-80(2008).
- 17.0801181713 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).
- 18.0801172220 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), 2461-2466(2007).
- 19.0801111028 Miyake, K., rikawa, 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., and Kasuga, M.:Association of TCF7L2 polymorphisms with susceptibility to type 2 diabetes in 4,087 Japanese subjects. *J Hum Genet*, 53(2), 174-180(2008).
- 20.0704251540 Osawa, H., Tabara, Y., Kawamoto, R., Ohashi, J., Ochi, M., Onuma, H., Nishida, W., Yamada, K., Nakura, J., Kohara, K., Miki, T., and Makino, H.: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).
- 21.0704201714 Hirota, Y., Ohara, T., Zenibayashi, M., Kuno, S., Fukuyama, K., Teranishi, T., Kouyama, K., Miyake, K., Maeda, E., and Kasuga, M.: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).
- 22.0702081846 Maekawa, K., Fukushima-Uesaka, H., Tohkin, M., Hasegawa, R., Kajio, H., Kuzuya, N., Yasuda, K., Kawaoto, M.,

- Kamatani, N., Suzuki, K., Yanagawa, T., Saito, Y., and Sawada, J.: Four novel defective alleles and comprehensive haplotype analysis of CYP2C9 in Japanese. *Pharmacogenetic Genomics*, 16(7), 497-54(2006).
- 23.0701302031 Osawa, H., Ochi, M., Kato, K., Yamauchi, J., Nishida, W., Takata, Y., Kawamura, R., Onuma, H., Takasuka, T., Shimizu, I., Fujii, Y., Ohashi, J., and Makino, H.: Serum resistin is associated with the severity of microangiopathies in type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*, 355, 342-346(2007).
- 24.0701302029 Tokuyama, Y., Osawa, H., Ishizuka, T., Onuma, H., Matsui, K., Egashira, T., Makino, H., and Kanatsuka, A.: Serum resistin level is associated with insulin sensitivity in Japanese type 2 diabetes. *Metabolism*, 56, 693-698(2007).
- 25.0701291910 Horikoshi, M., Hara, K., Ito, C., Nagai, R., Froguel, P., Kadowaki, T.: 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).
- 26.0608042045 Ihara, K., Miyako, K., Ishimura, M., Kuromaru, R., Wang, H.Y., Yasuda, K., and Hara, T.: A case of hyperinsulinism/hyperammonaemia syndrome with reduced carbamoyl-phosphate synthetase-1 activity in liver: A pitfall in enzymatic diagnosis for hyperammonaemia. *J Inher Metab Dis*, 28(5), 681-687(2005).
- 27.0608041520 Hara, K., Horikoshi, M., Kitazato, H., Ito, C., Noda, M., Ohashi, J., Froguel, P., Tokunaga, K., Tobe, K., Nagai, R., and Kadowaki, T.: Association of Hepatocyte Nuclear Factor-4 α P2 Promoter Haplotypes With Type 2 Diabetes in the Japanese Population. *Diabetes*, 55, 1260-1264(2006).
- 28.0608041517 Horikoshi, M., Hara, K., Ohashi, J., Miyake, K., Tokunaga, K., Ito, C., Kasuga, M., Nagai, R., and Kadowaki, T.: A polymorphism in the AMPK α 2 subunit gene is associated with insulin resistance and type 2 diabetes in Japanese. *Diabetes*, 55, 919-923(2006).
- 29.0608032119 Yamasaki, H., Ogawa, K., Sasaki, H., Nakao, T., Wakasaki, H., Matsumoto, E., Furuta, H., Nishi, M., Ueda, K., Iwao, K., and Nanjo, K.: Uncoupling protein 2 promoter polymorphism -866G/A affects peripheral nerve dysfunction in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, 29, 888-894(2006).
- 30.0601281541 Fukuyama, K., Ohara, T., Hirota, Y., Maeda, K., Kuno, S., Zenibayashi, M., Teranishi, T., Koyama, K., Maeda, E., Sakamoto, N., and Kasuga, M.: Association of the -112A>C polymorphism of the uncoupling protein 1 gene with insulin resistance in Japanese individuals with type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*, 339, 1212-1216(2006).
- 31.0602021241 Fukushima-Uesaka, H., Saito, Y., Maekawa, K., Ozawa, S., Hasegawa, R., Kajio, H., Kuzuya, N., Yasuda, K., Kawamoto, M., Kamatani, N., Suzuki, K., Yanagawa, T., Tohkin, M., and Sawada, J.: Genetic variations and haplotypes of CYP2C19 in a Japanese population. *Drug Metab Pharmacokin*, 20(4), 300-7(2005).
- 32.0601312052 Hashiramoto, M., Osawa, H., Ando, M., Murakami, A., Nishimiya, T., Nakano, M., Nishida, W., Onuma, H., and Makino, H.: A Nonsense Mutation in the Arg345 of the Insulin Receptor Gene in a Japanese Type A Insulin-resistant Patient. *Endocrinology*, 52, 499-504(2005).
- 33.0601312047 Onuma, H., Ogura, T., Tanabe, F., Nishida, W., and Makino, H.: A newly identified 50kDa protein which is associated with phosphodiesterase 3B is phosphorylated by insulin in rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 337, 976-982(2005).
- 34.0601312042 Osawa, H., Onuma, H., Ochi, M., Murakami, A., Yamauchi, J., Takasuka, T., Tanabe, F., Shimizu, I., Kato, K., Nishida, W., Yamada, K., Tabara, Y., Yasukawa, M., Fujii, Y., Ohashi, J., Miki, T., and Makino, H.: Resistin SNP-420 determines its monocyte mRNA and serum levels inducing type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*, 335, 596-602(2005).
- 35.0601301925 Nakano, Y., Furuta, H., Doi, A., Matsumoto, S., Nakagawa, T., Shimomura, H., Sakagashira, S., Horikawa, Y., Nishi, M., Sasaki, H., Sanke, T., and Nanjo, K.: A functional variant in the human betacellulin gene promoter is associated with type 2 diabetes. *Diabetes*, 54, 3560-3566(2005).
- 36.0601301620 Hara, K., Horikoshi, M., Kitazato, H., Yamauchi, T., Ito, C., Noda, M., Ohashi, J., Froguel, P., Tokunaga, K., Nagai, R., and Kadowaki, T.: Absence of an association between the polymorphisms in the genes encoding adiponectin receptors and type 2 diabetes. *Diabetologia*, 48, 1307-14(2005).
- 2) 学会発表
- 〔本研究を統括した代表的発表のみ記す〕
- ・安田和基「2型糖尿病遺伝子のゲノム全域検索」ゲノム4領域主催シンポジウム『ゲノム医学のこれから』平成20年10月14日（東京国際フォーラム）
 - ・Yasuda K, Miyake K, Kasuga M「Hunt for susceptibility genes for type2 diabetes in Japanese by GWAS」第52回日本糖尿病学会年次学術集会 平成21年5月（大阪）
- 3) 図書
- ・春日雅人『糖尿病とゲノム科学』
- 文部科学省 特定領域研究「応用ゲノム」編
「ゲノム科学と社会—ゲノム科学の明日の医学へのインパクト」
p35~50、平成19（2007）年
- 4) データベース/ソフトウェア
- なし
- 5) 研究成果による産業財産権の出願・取得状況
- 特許出願：安田和基、春日雅人、門脇孝、牧野英一、他
「遺伝子多型を用いた2型糖尿病の検査方法」
特願2007-325366（出願年月日：平成19年12月18日）特開2009-142239（公開年月日：平成21年7月2日）
- 6) 新聞発表、その他顕著なもの
- ・文部科学省特定領域研究：ゲノム研究HPより
「2型糖尿病に関連する新規遺伝子KCNQ1を同定」
[<https://www.genome-sci.jp/modules/contents3/index.php?id=13>]
 - ・国立国際医療センター研究所HPより
「2型糖尿病に関連する新規遺伝子KCNQ1を同定—日本人では最も重要な2型糖尿病関連遺伝子—」
[<http://www.imcj.go.jp/rese/top/j/news/news0015.html>]
 - ・上記につき、新聞各社にて報道・配信平成20年8月18日