

論文の内容の要旨

論文題目

位置的・機能的情報に基づく日本人2型糖尿病遺伝素因の解析

指導教官 門脇 孝 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成12年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 堀越 桃子

【はじめに】 2型糖尿病は遺伝素因に加え環境因子が組み合わさって発症する多因子病である。2型糖尿病の罹患者数は年々増加し、平成15年には740万人にもものぼっている。2型糖尿病の発症・進展予防を行なうためには、その遺伝素因をもつハイリスクグループを早期に発見し、糖尿病予防のための強力な生活習慣介入をすることが大切である。

2型糖尿病の遺伝素因は一つ一つの遺伝子変異の発症への寄与は低いが、複数の遺伝子多型が同一固体に集積することで糖尿病発症の疾患感受性をたかめると考えられている。このような多型として一塩基多型(SNP)は2型糖尿病の遺伝因子として疾患の発症や進展に関与しうる。糖尿病の原因遺伝子に迫る方法として家系分析から全ゲノムマッピング(連鎖解析)によって疾患感受性遺伝子座を同定する全ゲノムアプローチと、糖尿病の病態に関与する遺伝子について関連解析を行なう機能

的候補遺伝子アプローチがある。本研究に先立って行なわれた 224 組の日本人 2 型糖尿病罹患同胞対を対象とした whole genome association study で 9 ヶ所の染色体領域に (1p36-p32, 2q34, 3q26-q28, 6p23, 7p22-p21, 9p, 11p13-p12, 15q13-q12, 20q12-q13) 日本人 2 型糖尿病疾患感受性遺伝子座が同定された。このうち 1p36-p32 と 20q12-q13 には機能的にも糖・脂質代謝に深く関与する遺伝子、AMP キナーゼ $\alpha 2$ サブユニット(PRKAA2)遺伝子[1p36-p32]と HNF4 α 遺伝子[20q12-q13]が存在する。AMP キナーゼ $\alpha 2$ サブユニットはおもに骨格筋に発現し、筋におけるブドウ糖の取り込みを抑制し、肝における脂肪酸の β 酸化の促進および糖新生の抑制をすることでインスリン抵抗性の改善に働く。一方 HNF4 α 遺伝子は ubiquitous に発現している転写因子であるが、そのもっとも 5'側にある p2 プロモーターは膵 β 細胞特異的に発現しており、さまざまな糖・脂質代謝関連遺伝子の発現制御に関与している。最近この p2 プロモーター周辺の遺伝子多型と 2 型糖尿病との相関が Finnish と Ashkenazi Jews において報告されている。位置的にも機能的にも日本人 2 型糖尿病感受性遺伝子候補と考えられるこれら PRKAA2 遺伝子および HNF4 α 遺伝子について、SNP を利用した患者対照関連解析を行なった。

【対象および方法】

対象 東京大学医学部附属病院糖尿病・代謝内科に通院もしくは入院している 192 名の 2 型糖尿病患者と広島原対協健康管理センターを受診した 272 名の 60 歳以上で HbA1c が 5.8%未満、かつ 2 型糖尿病の家族歴がない正常対照者を対象とした。また有意な結果が得られたものについては前述の施設から得られた 657 名の 2 型糖尿病患者と、552 名の正常対照者においてさらに 2 次検討を行なった。東京大学大学院医学系研究科ヒトゲノム遺伝子解析研究倫理委員会の承認の下に行なわれ、文書による同意を得たうえで遺伝子解析をおこなった。

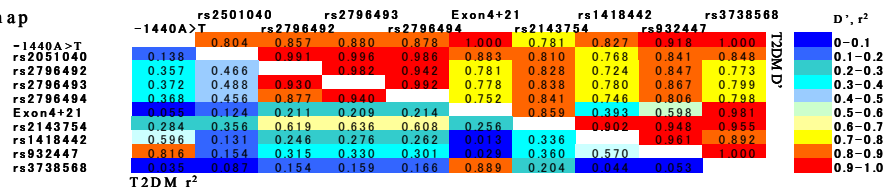
方法 PRKAA2 遺伝子については直接シーケンス法によるスクリーニングで新たに同定した SNP と公開データベースから得た計 10 個の SNP を対象とした。HNF4 α 遺伝子については他民族において 2 型糖尿病との関連が報告されている SNP と公開データベースから得られた計 12 個の SNP を対象として遺伝子型を決定し、患者対照関連解析を行なった。遺伝子型の決定には Big Dye Terminator によるシーケンス法と TaqMan Probe によるタックマン法を用いた。関連解析には Fisher の χ^2 検定を用い、EM アルゴリズムによる連鎖不平衡解析とハプロタイプ解析につい

ては SNPalyze V3.2 Pro software を用いた。また糖尿病関連指標と遺伝子多型との関連解析は糖尿病治療による影響を受けていない正常対照者において one-way ANOVA 法で解析した。インスリン抵抗性の指標として HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance) 値を用いた。

【結果】

図 9 PRKAA2

a) LD map



b) PRKAA2 のハプロタイプブロック

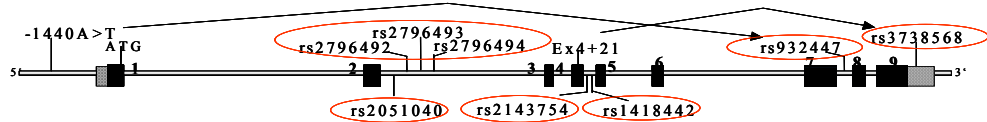


図 9 c) ハプロタイプ解析

1次サンプル						2次サンプル					
Haplotype	Case	Control	Chi-Squ	p-value	permutation p-value	Haplotype	Case	Control	Chi-Squ	p-value	permutation p-value
0 0 0 0 0 0	0	0	0.134	0.182	2.35	0	0	0	0.144	0.164	0.99
1 0 0 0 0 0	0	0	0.417	0.293	8.71	0	0	0	0.368	0.301	6.34
0 1 1 1 0 0	0	0	0.165	0.190	0.47	0	0	0	0.203	0.194	0.16
0 1 1 0 0 1	0	0	0.085	0.115	1.29	0	0	0	0.124	0.101	1.87

PRKAA2 遺伝子(図 9) : プロモーター領域と 9つのエクソンおよび 5'UTR、3'UTR のスクリーニングによって新たに 4つの SNP を同定した。公共のデータベースから得られた SNP を含め遺伝子型を決定した 10 個の SNP は比較的頻度が高く、すべて Hardy-Weinberg 平衡に従っていた。いずれの多型も遺伝子型においてもアリル頻度においても 2型糖尿病群と正常対照者群の間で有意な頻度差を認める単一の SNP はなかった。しかし連鎖不平衡係数 r^2 を推定し、 $r^2 > 0.8$ 以上の SNP 群を一つのハプロタイプ群として得られる 6つのハプロタイプ群から一つずつ SNP を選択しハプロタイプを組むと、比較的頻度の高いハプロタイプが 4つ同定され、そのうち 1つのハプロタイプは有意に 2型糖尿病と相関した($p=0.0032$)。対象人数を増やした 2次サンプルにおいても同じ 4つの比較的頻度の高いハプロタイプが同定され、1次サンプルと同じハプロタイプが有意に 2型糖尿病と相関した($p=0.011$)。このハプロタイプは一つの SNP(rs2051040)についてのみマイナーアレルをもち、それ以外の 5つの SNP についてはすべてメジャーアレルを有していた。

SNP と糖尿病関連指標との相関解析を行なったところ、2型糖尿病との相関が認められたハプロタイプに唯一含まれるマイナーアレルである rs2051040 に関して、インスリン抵抗性と有意な相関

が認められた。すなわちマイナーアリルを持つ群(AA+AG 群)は持たない群(GG 群)に比べ、有意にインスリン抵抗性が高かった (AA/AG vs GG; 1.95 ± 0.08 vs 1.49 ± 0.10 , 補正 $p=0.0020$)。同様の結果が2次サンプルでも追認された(補正 $p=0.037$)。

HNF4 α 遺伝子 : p2 プロモーターの上流 27kb から下流 73kb までの間で、p2 プロモーター周辺領域を中心に 12 個の比較的頻度の高い SNP について遺伝子型を同定した。いずれの SNP も Hardy-Weinberg 平衡に従っていた。単一の SNP で 2 型糖尿病との相関を認めるものは見出せなかったが、隣り合う 2 つの SNP でハプロタイプを組んでハプロタイプ解析を行なうと、p2 プロモーター周辺の 4 つの SNP(rs4810424, rs1884613, rs1884614, rs2144908)の間の組み合わせによるハプロタイプでは、糖尿病患者と正常対照者間で有意な頻度差が認められた。これら 4 つの SNP と 2 型糖尿病関連指標との関係を見るために正常対照者における HbA1c, 空腹時血糖、空腹時インスリン値、インスリン抵抗性(HOMA-IR)、インスリン分泌能(HOMA- β)と多型頻度の関連を調べたが、多型頻度の分布に明らかな差を認めなかった。

【考察】 本研究において日本人 2 型糖尿病の遺伝素因として AMP キナーゼ $\alpha 2$ サブユニット (PRKAA2)遺伝子と HNF4 α 遺伝子が 2 型糖尿病と相関することが示された。単一の遺伝子多型で 2 型糖尿病と相関するものは同定できなかったが、PRKAA2 遺伝子も HNF4 α 遺伝子もハプロタイプ解析にて 2 型糖尿病との相関が認められたことより、あらためて患者対照相関解析におけるハプロタイプ解析の重要性が示された。またハプロタイプを組んだ遺伝子領域もしくは解析対象となった SNP と連鎖不平衡にある未知の SNP のなかに真の SNP が存在する可能性が示唆される。PRKAA2 遺伝子変異が 2 型糖尿病のリスクをあげる要因として、インスリン抵抗性の増悪が一因を担っていることが示せたが、HNF4 α 遺伝子に関しては多型と有意な相関を持つ糖代謝関連指標は見出せなかった。今後真の SNP を同定するためには p2 プロモーター領域を中心にさらに密に SNP を選択し、患者対照相関解析を行なうことが課題となる。

また今回、2 型糖尿病の遺伝素因という比較的頻度は高く、複数存在するものの、一つ一つの遺伝子変異の糖尿病発症への寄与は低いため同定するのが難しい遺伝子変異を効率的に見出していく方法として、位置情報をもとにした全ゲノムアプローチと分子の持つ機能面から迫る候補遺伝子アプローチの両方に立脚したアプローチが有用な方法であることが示された。