

論文の内容の要旨

論文題目 : **A novel key molecule for the glucose homeostasis, *GENE X* as a potential target for a treatment to type 2 diabetes mellitus**

和訳: 関連解析の絞り込みで得られた2型糖尿病の新規感受性遺伝子と機能解析～遺伝子治療

指導教員 藤田敏郎 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入 (進) 学

医学博士課程

内科学専攻

岡本 好司

本文 :

東京女子医科大学のグループから日本人 2 型糖尿病患者に対するゲノムワイド連鎖解析で 21 番染色体に未発見の疾患感受性遺伝子の存在を示唆する報告がなされた (Iwasaki, N. *et al. Diabetes*, 2003)。同サンプルの一部を利用した関連解析で rs7432xx が候補単(Ok?)遺伝子多型 (SNP)である事が明らかになった (Nishimura, C. *Master's thesis*, 2006)。そこで私はこの候補 SNP をもとに疾患感受性遺伝子と疾患感受性 SNP を絞りこみ、その機能を明らかにし新規治療ターゲットとしての可能性を明らかにするための研究を行った。

rs7432xx の周辺の連鎖ブロック構造から疾患感受性遺伝子が *GENE X*である事を想定し、同遺伝子のプロモーター領域と全エクソンをダイレクトシーケンス法によって変異スクリー

ニングを行った。健常人のサンプルにおいて 3%以上の minor allele frequency を持つ SNP を 5 か所に認めた。最初の rs7432xx を含めた全 6 か所の SNP に対して、前出の関連解析で使用した 2 型糖尿病パネルを利用し関連解析を行った。その結果 rs7432xx と rs37468xx に有意な関連を認め、body mass index (BMI)が低値な個体ほど、より強い関連を示していた。再現性を確認するため独立のケースサンプルとコントロールサンプルを用意し、同 2 か所の SNP に対し関連解析を行ったところ rs37468xx のみが有意であった。イントロンのスクリーニングのため 3 つの SNP を tag SNP として haplotype 解析を行ったが有意な haplotype 頻度の変化は認めなかった。以上より rs37468xx を疾患感受性 SNP とし、所属遺伝子 *GENE X* を疾患感受性遺伝子とした。rs37468xx は synonymous SNP であったため、遺伝子発現に影響を与えている可能性を想定し健常人の末梢血における mRNA 発現量を比較したところ、リスクアレルでは高発現である事がわかった。次に、各アレルを持つ open reading frame をクローニングし *in vitro* 実験系で検討し、mRNA 安定性を介してリスクアレルでは *GENE X* の翻訳産物が高発現である事を明らかにした。ケースサンプルの臨床データとの比較検討では、rs37468xx は低 BMI および、早期インスリン導入比率と有意に関連が認められた。この事から *Gene X* はインスリン分泌に影響を与えていると考えられ、膵β細胞におけるインスリン分泌機能への関与が疑われた。実際、培養インスリノーマ細胞株 (INS-1) における *Gene X* の発現を確認したところ発現が認められ、加えて高グルコース状態において *Gene X* の発現が亢進している事が明らかとなった。次に、INS-1 において RNA 干渉 (RNAi) による knock down 実験と CMV プロモーターを利用した強制発現実験を行った。*Gene X* の knock down によりインスリンの追加分泌が増加し、強制発現により分泌量が減少した。そこで *in vivo* RNAi 導入技術を利用して、インスリン分泌低下型糖尿病モデルマウスである Akita mice に knock down 実験を行った。*GENE X* の knock down により糖負荷後血糖が有意に低下し、効果は 2 週間以上持続した。糖負荷前後のインスリン分泌量も有意に改善した。非糖尿病マウスである C57/BL6 mice

に対して同様の実験を行ったが、効果はほとんど認められなかった。

私は、2型糖尿病における疾患感受性遺伝子と疾患感受性単遺伝子多型を明らかにした。また同多型のリスクアレルは、遺伝子発現において促進的に働いており、同遺伝子はリスク遺伝子である事を明らかにした。*in vitro* 及び *in vivo* の両実験において、インスリン分泌能への影響を明らかにし、目的遺伝子の **knocking down** によりインスリン分泌能が改善した事から新規治療ターゲットとしての創薬の可能性を示した。これまでインスリン分泌における β 細胞の自己刺激・細胞間情報交換による統括された分泌のメカニズムの詳細は明らかになってはなかったが、この遺伝子産物とそのブラックボックスを担っている可能性があり今後の研究が待たれる。

以上